

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'Etat
mention SCIENCES

RECHERCHES HISTOLOGIQUES ET CYTOLOGIQUES SUR LES
INFECTIONS INTRACELLULAIRES DES MOLLUSQUES BIVALVES MARINS

par

Michel COMPS

Soutenu le 22 janvier 1983 devant la Commission d'Examen

JURY : MM. C. VAGO, Membre de l'Institut, **Président**

L. EUZET

G. BOUIX

M. BERGOIN

R. LABAT

A V A N T - P R O P O S

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Pathologie de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes à Sète. Il a été dirigé par Monsieur le Professeur C. VAGO, Membre de l'Institut. Nous sommes très heureux de l'assurer de notre reconnaissance pour les conseils et les encouragements qu'il n'a cessé de nous prodiguer au long de nos recherches.

Messieurs les Professeurs L. EUZET, G. BOUIX et R. LABAT et Monsieur M. BERGOIN, Maître de recherches au C.N.R.S., ont accepté de juger ce travail; nous leur adressons nos respectueux remerciements.

Nous remercions très cordialement Messieurs J.R. BONAMI et F. COUSSERANS de l'intérêt qu'ils ont toujours manifesté pour notre travail.

Je ne saurais oublier de remercier tous mes collègues et amis des Laboratoires de Biologie Conchylicole de l'Institut des Pêches Maritimes ainsi que ceux du Laboratoire de Pathologie Comparée de l'U.S.T.L. et de la Station de Pathologie Comparée de St. Christol.

o
o o

S O M M A I R E

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : EVOLUTION DES RECHERCHES SUR LES MALADIES EPIZOOTIQUES DES MOLLUSQUES BIVALVES MARINS	3
1 - Maladies d'origine bactérienne	4
2 - Maladies d'origine fongique	4
3 - Maladies à Protozoaires	6
4 - Parasitoses diverses	9
5 - Viroses	9
6 - Maladies de causes indéterminées	9
CHAPITRE II : CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES INFECTIONS VIRALES ET RICKETTSIENNES DES MOLLUSQUES BIVALVES MARINS	12
I - INFECTIONS VIRALES	12
1 - Virus de Céphalopodes	12
2 - Virus de Mollusques bivalves	13
a - Virus d'huîtres	13
b - Virus d'autres Mollusques bivalves	16
II - INFECTIONS RICKETTSIENNES	16
CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES	18
I - MOLLUSQUES ETUDIES	18
1 - Les Huîtres	18
a - L'huître portugaise <u>Crassostrea angulata</u> Lmk	18
b - L'huître du Pacifique <u>Crassostrea gigas</u> Th.	19
c - L'huître plate <u>Ostrea edulis</u> L.	19
2 - Autres Pélécypodes	20
a - <u>Donax trunculus</u> L.	20
b - <u>Scrobicularia piperata</u> P.	20
c - <u>Ruditapes philippinarum</u> A. et R.	20
II - TECHNIQUES D'ETUDE	20
1 - Examens sur le frais	20
2 - Microscopie photonique	21
a - Fixation	21
b - Coloration	21
3 - Microscopie électronique	21
a - Fixation	21
b - Inclusion	22
c - Coloration des coupes	22

CHAPITRE IV : RECHERCHES SUR LES INFECTIONS VIRALES DES HUITRES

DES COTES FRANCAISES	23
I - VIROSE NECROTIQUE DES BRANCHIES	24
A - Symptômes externes et leur évolution	25
B - Histologie et cytologie	27
1 . Symptômes histopathologiques	27
2 . Symptômes cytopathologiques	29
C - Microscopie électronique	30
D - Discussion	33
(entre les pages 33 et 34 : planches I à IX)	
II - INFECTIONS VIRALES HEMOCYTAIRES DES HUITRES	34
A - Virose de l'huître portugaise <u>Crassostrea angulata</u>	34
1 . Evolution de la maladie	34
2 . Microscopie photonique	37
a) Infiltration hémocytaire	37
b) Développement des cellules brunes	38
c) Cellules atypiques	39
3 . Microscopie électronique	40
4 . Relation entre lésions virales et mortalité.	41
B - Virose de l'huître du Pacifique <u>Crassostrea gigas</u>	43
1 . Microscopie photonique	43
2 . Microscopie électronique	44
C - Discussion	45
(entre les pages 45 et 46 : planches X à XVII)	
III - ETUDE COMPARATIVE DU VIRUS DE LA NECROSE DES BRANCHIES ET DES VIRUS DES INFECTIONS HEMOCYTAIRES DES HUITRES	46
A - Comparaison entre les deux types de virus étudiés.	46
a - Taille, morphologie et structure	46
b - Morphogénèse	48
c - Symptômes cytologiques et histologiques.	48
B - Comparaison avec le groupe des <u>Iridovirus</u>	49
C - Conclusion	52

CHAPITRE V : ETUDE D'INFECTION RICKETTSSIENNES CHEZ LES MOLLUSQUES

BIVALVES MARINS	54
I - INFECTION RICKETTSSIENNE DE L'HUITRE <u>CRASSOSTREA GIGAS</u>	54
1- Histopathologie	55
2- Microscopie électronique.	55

3 - Position systématique. Discussion	56
II - INFECTION RICKETTSIENNE DE <u>DONAX TRUNCULUS</u> L.	57
1 - Histopathologie	57
2 - Microscopie électronique	58
a - Les germes	58
b - Action cytopathogène	58
c - Position systématique	59
III - INFECTION RICKETTSIENNE DE <u>OSTREA EDULIS</u> L.	60
1 - Microscopie photonique	60
2 - Microscopie électronique	61
a - Les corps bactériens	61
b - Les formes altérées.	62
3 - Effet cytopathogène.	62
4 - Position systématique	63
IV - INFECTION RICKETTSIENNE DE <u>RUDITAPES PHILIPPINARUM</u>	63
1 - Histopathologie	63
2 - Microscopie électronique	64
a - Formes claires	64
b - Formes denses	64
3 - Effet pathogène.	65
4 - Position systématique. Discussion	65
V - INFECTION RICKETTSIENNE CAUSEE PAR UN MICROORGANISME DE TYPE CHLAMYDIEN CHEZ L'HUITRE <u>CRASSOSTREA</u> <u>ANGULATA</u> LMK.	67
1 - Histopathologie	67
2 - Microscopie électronique	68
a - Forme microbienne à développement multivacuolaire.	68
b - Forme microbienne à développement monovacuolaire	70
3 - Position systématique.	72
a - Forme à développement multivacuolaire.	72
b - Forme à développement monovacuolaire	72
VI - INFECTION RICKETTSIENNE COMPLEXE DE <u>SCROBICULARIA</u> <u>PIPERATA</u>	73
1 - Histopathologie	74
2 - Microscopie électronique	74
a - Rickettsie de type 1	75
b - Rickettsie de type 2	75
c - Rickettsie de type 3	76
3 - Position systématique	78
a - Rickettsies de type 1 et de type 2	78
b - Rickettsie de type 3	78
VII - ETUDE COMPARATIVE DES RICKETTSIES DES MOLLUSQUES BIVALVES MARINS	79
1 - Mode de développement, cycle, morphologie.	79
a - Rickettsies sans cycle	80
b - Rickettsies à cycle complexe	80

2 - L'effet pathogène	83
3 - Implications taxonomiques	84

(entre les pages 86 et 87 : planches XVIII à XXXIV)

CHAPITRE VI : ETUDE DE L'INFECTION CAUSEE PAR BONAMIA OSTREAE CHEZ

L'HUITRE PLATE <u>OSTREA EDULIS</u>	87
I - ETUDE DU PARASITE <u>BONAMIA OSTREAE</u> Pichot et coll.	88
A - Localisation	88
B - Morphologie et structure du Parasite	88
1 - Microscopie photonique	89
2 - Microscopie électronique	89
a) Organisation et structure générale	90
b) Les organites cellulaires particulier : les particules denses structurées(PDS)	93
c) Multiplication du parasite. Cycle de développement.	96
(1)- Division binaire simple	96
(2)- Formes plasmodiales	97
C - Données taxonomiques	98
II - ETUDE DE L'EFFET PATHOGENE DE <u>B. OSTREAE</u>	99
1 - Symptômes primaires	99
a) Effet cytopathogène	99
b) Réaction de la cellule infectée	100
2 - Symptômes secondaires	101
a) Les lésions internes	101
b) Les lésions externes	102
III - DISCUSSION	

(entre les pages 111 et 112 : planches XXXV à XLIII)

CONCLUSION	112
BIBLIOGRAPHIE	117

INTRODUCTION

Depuis quelques années, des efforts importants sont accomplis pour développer les cultures marines en recherchant de nouvelles productions complémentaires des activités traditionnelles dont l'ostréiculture représente encore actuellement un des secteurs les plus rentables. En retenant le chiffre de 100.000 T d'huîtres annuellement commercialisées on peut juger de l'importance de cette production dont il est permis de prévoir qu'elle s'accroîtra encore compte tenu de son extension récente sur des sites nouveaux tels que les côtes normandes.

Cependant ce type de monoculture intensive se trouve plus spécialement exposé à l'action d'agents pathogènes qui peuvent tantôt avoir un rôle limité et localisé, mais aussi être à l'origine d'épizooties aux effets catastrophiques pour l'économie de la région concernée. Tel fût le cas de la mortalité massive de 1970 qui à la suite de la maladie des branchies entraîna la disparition pratiquement totale en France de l'huître portugaise.

Si les recherches en pathologie marine sont restées longtemps limitées le plus souvent à la description de parasitoses dont la signification pathologique n'était pas toujours évidente, les développements nouveaux de l'aquaculture ont imposé d'aborder d'une façon plus systématique et plus approfondie la pathologie des espèces cultivées et en particulier celles des Mollusques bivalves.

Ainsi, l'étude des grandes épizooties en ostréiculture a-t-elle fourni des données étiologiques nouvelles dans des domaines encore explorés, avec notamment la mise en évidence de viroses chez les huîtres et dans le même temps, l'existence d'infections à procaryotes intracellulaires était-elle révélée chez plusieurs mollusques d'élevage ou faisant l'objet d'une pêche littorale saisonnière.

Bien que la pathologie des Mollusques bivalves marins accuse par rapport à la pathologie des Invertébrés terrestres un retard considérable dans le domaine expérimental, il n'en subsiste par moins que les recherches histologiques et cytologiques conduites systématiquement depuis plusieurs années en microscopie photonique comme en microscopie électronique ont permis de faire progresser la connaissance des maladies infectieuses de ces animaux.

Dans les chapitres qui suivent, en se limitant aux infections intracellulaires, seront développés pour ce qui concerne les grandes épidémies survenues en France au cours des dernières décennies, la maladie des branchies, la mortalité massive de 1970 et une maladie hémocytaire de l'huître plate.

Enfin avec les études de divers cas de mortalités seront abordées les infections rickettsiennes des huîtres et d'autres mollusques pélicypodes marins.

o

o o

CHAPITRE I

EVOLUTION DES RECHERCHES SUR LES MALADIES ÉPIZOOTIQUES DES MOLLUSQUES BIVALVES MARINS

Dans le milieu marin on n'est en fait amené à constater des maladies épizootiques que chez des animaux dont on contrôle les populations, autrement dit, dans la pratique, chez les animaux d'élevage ou chez certaines espèces dont on exploite les gisements naturels.

Jusqu'à ces dernières années, n'étaient essentiellement concernés que les Mollusques bivalves, notamment les huîtres et les moules et à un moindre degré quelques Mollusques fouisseurs. Dans ce domaine on doit s'attendre d'ailleurs à des développements importants, consécutifs à l'extension actuelle de l'aquaculture.

Les épizooties les plus graves ont été observées chez les huîtres qui, en raison de leur importance économique, ont été l'objet des recherches les plus nombreuses et les plus suivies.

Si des mortalités sont souvent apparues dans les populations d'huîtres comme résultant de conditions de milieu défavorables, un grand nombre d'entre-elles et parmi les plus importantes ont été attribuées à des maladies contagieuses dont dans certains cas on n'a pas toujours pu définir les causes avec précision.

Bactéries, champignons et protozoaires représentaient les principaux agents connus des maladies des huîtres. Depuis une date récente des virus ont également été impliqués dans plusieurs épizooties.

1 - Maladies d'origine bactérienne.

Depuis 1955, on a enregistré au Japon des cas de mortalité massive dans les élevages d'huîtres du Pacifique (Crassostrea gigas Th.) sans que l'on puisse toutefois identifier des agents pathogènes spécifiques. Dans la baie de Kanasawa, les pertes annuelles atteignirent 80 % de la production. A partir de 1927, des phénomènes semblables ont été signalés dans la péninsule de Miura. Plus tard, en 1945, des mortalités massives se produisirent dans la baie d'Hiroshima : on suspecta alors un bacille (Achromobacter) d'être responsable de la maladie (Takeuchi et coll., 1960).

Une hypothèse semblable a été émise pour expliquer certains symptômes associés aux mortalités massives qui affectèrent gravement l'ostréiculture dans la baie de Matsushima à partir de 1960. Des nécroses dans le conjonctif, "focal necrosis" comparables aux "abcès multiples" décrits chez les huîtres de la baie de Willapa (Etat de Washington) ont été signalées ; des bactéries ont été isolées sans que l'on puisse confirmer leur rôle pathogène.

Durant les mortalités de l'huître plate (Ostrea edulis L.) de 1919 à 1924, plusieurs bactéries avaient été isolées mais aucun rôle pathogène n'avait pu leur être attribué. Les causes de la maladie n'ont en fait jamais été trouvées.

On rappellera enfin que Guillard (1959) puis Tubiash et coll. (1965) ont isolé des bactéries (Pseudomonas sp. et Vibrio sp.) pathogène pour les larves de Crassostrea virginica Gmelin et de Ostrea edulis L.. Des Vibrionaceae ont encore été impliquées au cours de ces dernières années dans des mortalités de larves d'huîtres produites dans des écloseries de la côte Est des Etats Unis (Leibovitz, 1978).

2 - Maladie d'origine fongique.

Plusieurs maladies des huîtres ont été attribuées à des

agents de nature fongique. Les premières descriptions concernent la "maladie de la coquille" encore connue sous le nom de "maladie du pied" ou "maladie de la charnière" suivant la partie affectée de la coquille. Signalée en 1884, cette maladie a fait l'objet d'études successives chez Ostrea edulis et chez Crassostrea angulata. Giard (1894), Korringa (1948) puis Alderman et Jones (1971) en ont décrit en détail les symptômes et le champignon responsable des lésions.

L'apparition de tâches blanches à la face interne de la coquille marque le début de l'infestation par le champignon Ostracoblabe implexa (Bornet et Flahaut, 1889) qui au fur et à mesure de son développement provoque des altérations et distorsions graves de la coquille. Selon Korringa la maladie de la coquille aurait entraîné des mortalités dans des parcs d'huîtres plates en Hollande.

Pour mémoire, on signalera Chladothrix dichotoma trouvé par Eyre (1924) dans les huîtres plates au cours des mortalités de 1919-1923, ainsi qu'une espèce de Nocardia décrite chez ces mêmes huîtres par Pettit (1921). On ne sait rien de leur rôle pathogène chez l'huître. Par contre, Sirolopidium zoophtorum a été présenté par Davis et coll. (1954) comme agent d'épizooties pour les larves d'huîtres produites en "écloseries".

La maladie causée par Dermocystidium marinum compte parmi les plus graves affections d'origine parasitaire. C'est sous ce nom en effet que Mackin et coll. (1950) ont décrit un dangereux parasite de l'huître américaine Crassostrea virginica. Une très abondante littérature lui a été consacrée (Mackin, 1962). Après avoir été rattaché aux Labyrinthulales sous le nom de Labyrinthomyxa marina (Mackin et coll., 1966) sa position a été récemment révisée avec la création d'un genre nouveau et l'espèce Perkinsus marinus (Levine, 1978). L'infestation initiale se produit au niveau de l'épithélium intestinal et au niveau du manteau. Il détruit l'épithélium et provoque une lyse de la basale avant d'envahir tous les tissus et entraîner la formation d'abcès. Le développement des gonades est inhibé. Les huîtres s'amaigrissent et meurent.

Ray (1952) a mis au point une technique de culture sur milieu au thioglycolate permettant de déceler la présence de P. marinus et de réaliser un diagnostic précoce de la maladie.

Sa distribution géographique comprend essentiellement les estuaires du golfe du Mexique où il a été découvert primitivement et certaines zones de la côte Atlantique des Etats Unis (Tampico, baies Delaware et Chesapeake).

La pathogénicité de ce parasite se manifeste par des mortalités durant les mois chauds de l'été (Hewatt et Andrews, 1956). Son développement est étroitement lié à la température de l'eau et il ne prolifère activement qu'à partir de 25°C. Les faibles salinités (15‰) retardent son développement (Ray, 1954).

L'infestation expérimentale d'huîtres saines a été obtenue ; elle a confirmé ce parasite comme agent causal de mortalités (Mackin, 1962).

On pourrait mentionner ici la maladie des branchies de l'huître portugaise Crassostrea angulata car un parasite incriminé comme responsable de la destruction des branchies, décrit par Franc et Arvy (1970) sous le nom de Thanatostrea polymorpha, a été rapproché par ces auteurs des Labyrinthulales et des champignons inférieurs. Comme on le verra ultérieurement, l'étiologie de cette maladie a été remise en cause à la suite de recherches plus approfondies en microscopie électronique.

Enfin, on signalera que des corps sphériques présentant des similitudes avec un champignon marin (Hyalochlorella marina) ont été impliqués dans une maladie de larves de Cr. gigas élevées en éclosion (Elston, 1980).

3 - Maladie à Protozoaires

Peu de Protozoaires en fait ont été reconnus comme agents d'épizooties chez les Mollusques bivalves marins.

Les plus importants sont des Haplosporidies et des parasites appartenant aux genres Marteilia (Grizel et coll., 1974) et Bonamia (Pichot et coll., 1980), groupes nouveaux dont la position systématique n'est pas encore clairement établie.

- Les Haplosporidies

Il s'agit essentiellement de deux Haplosporidies, Minchinia costalis et Minchinia nelsoni qui au cours des années 1960 ont perturbé la production de l'huître américaine (Crassostrea virginica) sur la côte Est des Etats Unis.

Minchinia costalis a été signalé par Wood et Andrews (1969) comme agent responsable de mortalité des huîtres sur les côtes du Maryland et de Virginie et dans la baie Delaware. Mackin (1960), Engle et Rosenfield (1963) Haskin et coll. (1966) ont étudié par ailleurs les effets de Minchinia nelsoni, un Sporozoaire voisin du précédent, largement distribué du Connecticut à la Caroline du Nord. Les pertes causées par ce parasite dépassèrent 95 % par an dans certaines zones en particulier dans la baie Delaware à partir de 1957 et dans la baie Chesapeake à partir de 1959. Des études approfondies ont permis de caractériser ces parasites (structure des spores, cycle de développement) (Rosenfield et coll., 1969 ; Farley, 1967). Les aspects ultrastructuraux ont été développés par Perkins (1968) pour Minchinia nelsoni et Perkins (1969) pour M. costalis.

- Les Marteilia

Ce genre regroupe à l'heure actuelle quatre espèces dont la principale, l'espèce type M. refringens (Grizel et coll., 1974) est responsable d'une grave épizootie qui à partir de 1969 a causé de lourdes pertes dans les élevages d'huîtres plates du littoral atlantique.

Ce parasite a été signalé à l'origine dans le bassin de Marennes-Oléron (Comps, 1970 a) et ultérieurement en Bretagne (Herrbach, 1971) et dans le bassin d'Arcachon. Son cycle, initialement décrit par Comps (1970 a) et confirmé par Grizel et coll., 1974 et par Perkins (1976), se développe au niveau des épithéliums digestifs (estomac et diverticules)

suisant un mode annuel. Des recherches récentes (Franc, 1980) ont par ailleurs montré que ce cycle pourrait également comporter une phase sexuée.

Sa structure complexe n'a pu être précisée qu'après étude en microscopie électronique (Bonami et coll., 1971 ; Perkins, 1976).

Il est constitué d'une cellule souche, à l'intérieur de laquelle des cellules se multiplient suivant un processus endogène aboutissant à des spores formées de trois cellules emboîtées. Parallèlement à son mode de multiplication, l'originalité de ce parasite réside dans la présence d'inclusions cytoplasmiques inhabituelles : des particules denses structurées comparables aux haplosporosomes des Haplosporidies, des formations multivésiculaires complexes et des formations paracrystallines présumées être de nature golgienne.

Au plan taxonomique, M. refringens pose encore beaucoup de problèmes. Mentionnées au départ par Comps (1970 a), certaines similitudes avec les Haplosporidies ont été confirmées par Perkins (1976). Toutefois à la suite d'études sur des parasites voisins tels Paramarteilia orchestiae (Ginsburger-Vogel et Desportes, 1979 a et 1979 b) et Paramyxa paradoxa Chatton, 1911 (Desportes et Lom, 1981) il est apparu que ces différentes espèces présentaient avec les Marteilia des points communs touchant à l'organisation de la spore et au mode de sporogénèse, caractères qui les éloigneraient des Haplosporidies. Selon Desportes et Lom, avec les genres Paramyxa et Paramarteilia, le genre Marteilia pourrait être regroupé dans la classe des Paramyxea (Levine et coll., 1980).

- Parasite du genre Bonamia

Un parasite nouveau des cellules sanguines (Bonamia ostreae n. sp.) a été récemment décrit chez des huîtres plates O. edulis subissant des mortalités sur les parcs des côtes bretonnes (Comps et coll., 1980 ; Pichot et coll., 1980). Son étude sera développée dans la suite.

- Autres Protozoaires

Des Protozoaires ont été décrits chez les huîtres mais

leur rôle pathogène en relation avec des épizooties n'a pas été établi clairement. Tel est le cas de la grégarine Nematopsis ostrearum (Owen et coll., 1952), de la microsporidie Steinhausia ovicola (Leger et Hollande, 1917) ou encore du flagellé Hexamita sp suspecté d'avoir provoqué des mortalités chez O. edulis et Cr. virginica (Mackin et coll., 1952).

4 - Parasitoses diverses.

De nombreux parasites ont été observés chez les huîtres en particulier des vers (Cestodes, Trématodes et Annélides) et des crustacés (Copépodes). Si dans certains cas on a pu leur attribuer des troubles divers chez l'hôte ils n'ont jamais provoqué de maladies à caractère épizootique.

5 - Viroses.

Souvent suspectés de provoquer des mortalités, des virus n'ont été qu'assez récemment mis en évidence dans des maladies de l'huître. Il s'agit du virus de la maladie des branchies de l'huître portugaise (Comps et Duthoit, 1976) et des virus de mortalités de Cr. angulata et de Cr. gigas (Comps et coll., 1976 ; Comps et Bonami, 1977). Les recherches concernant ces agents seront exposées plus loin.

Plus récemment encore une infection virale a été décrite par Elston (1979) chez des larves de Cr. gigas subissant d'importantes mortalités en éclosion.

6 - Maladie de causes indéterminées.

En ostréiculture, il n'est pas rare d'observer des mortalités qui, si elles ne sont pas négligeables économiquement restent souvent limitées dans le temps et très localisées. Généralement, faute de mettre en évidence un agent pathogène ou de prouver qu'il s'agit de troubles liés aux conditions de milieu on doit se résoudre à laisser le phénomène inexplicé.

Des mortalités massives ou extensives peuvent ainsi être également rangées dans cette catégorie et notamment la maladie de Malpèque et la maladie massive de l'huître plate en Europe de 1919 à 1923.

Sous le nom de maladie de Malpèque, on a désigné la maladie qui débuta en 1915 sur les côtes de l'Île du Prince Edouard. En matière de pathologie des huîtres cette affection représente un cas très particulier en raison de son développement et de son évolution. C'est en effet à une maladie contagieuse qu'ont été attribuées les importantes mortalités enregistrées à partir de 1915 dans la baie de Malpèque. Elles ont porté sur 90 % du stock d'huîtres et ont persisté pendant de nombreuses années en se développant dans des zones de conditions hydrologiques très variées.

Les recherches concernant cette maladie n'ont pas conduit à en déterminer les causes (Needler et Logie, 1947). Toutefois, selon Rosenfield (1969), les études histopathologiques indiqueraient la possibilité d'une maladie virale. Le fait n'a pas été confirmé.

A partir de 1933, on assista à une lente reconstitution des stocks mais en 1955 les mortalités reprirent sur les côtes du Nouveau Brunswick. A partir des populations d'huîtres de l'Île du Prince Edouard, qui paraissent avoir acquis une certaine résistance, des transferts furent effectués vers les zones nouvellement touchées. Ces opérations furent couronnées de succès (Logie et coll., 1960 ; Drinnan et England, 1965).

Pour ce qui concerne les mortalités de l'huître plate (1919-1923) les causes de l'épizootie n'ont pu être définies avec certitude : des bactéries ont été isolées à partir de mollusques malades mais leur rôle pathogène n'a pas été prouvé (Orton, 1924 ; Eyre, 1924).

On pourrait enfin ranger dans cette rubrique plusieurs cas de mortalité constatés en différents points du Japon depuis 1915 chez l'huître Cr. gigas, les nombreuses recherches consacrées à ces maladies ne concluant pas sur le rôle effectif d'un pathogène déterminé.

Pour ce qui concerne les autres mollusques bivalves d'intérêt commercial, bien qu'une abondante littérature traite de leurs parasites on connaît peu de choses sur des maladies à caractère épizootique

de ces animaux.

Toutefois, en raison de ses implications économiques, on mentionnera ici le cas important concernant l'infestation des moules (Mytilus edulis et Mytilus galloprovincialis) par le copépode Mytilicola intestinalis Steuer.

Localisé dans l'intestin, ce parasite provoque des lésions épithéliales (Couteaux-Bargeton, 1953) et ralentit la vitesse de filtration (Campbell, 1970). Très amaigris les mollusques peuvent mourir.

De sérieuses mortalités chez les moules de Hollande en 1979 ont été mises en relation avec le développement de M. intestinalis (Korringa; 1951).

o
o o

CHAPITRE II

CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES INFECTIONS VIRALES ET RICKETTSIENNES DES MOLLUSQUES MARINS

I - INFECTIONS VIRALES

Chez les Invertébrés marins, les recherches concernant les maladies virales ont connu depuis une dizaine d'années un développement important. C'est essentiellement chez les Crustacés que les progrès ont été les plus rapides à la suite de la découverte par Vago (1966) du premier virus d'Invertébré marin chez Macropipus depurator.

Récemment, Bonami (1980) a recensé les infections virales chez les Crustacés marins et étudié en détail certaines d'entre elles.

A l'exception de Peneaeus duorarum et de Callinectes sapidus, les espèces concernées ne présentent qu'un intérêt économique limité sinon nul. Par contre, pour ce qui concerne les Mollusques les premières viroses ont été constatées chez des bivalves faisant l'objet d'une importante exploitation commerciale. Les recherches sont toutefois moins avancées que pour les Décapodes, le plus souvent limitées aux aspects histopathologiques. On connaît à l'heure actuelle des virus chez des Céphalopodes mais surtout chez les Huîtres et chez quelques autres Lamellibranches.

1 - Virus des Céphalopodes.

Un premier virus de Mollusque marin a été trouvé par Rungger et coll. (1971) chez Octopus vulgaris du golfe de Naples. L'infection virale a lieu au niveau de tumeurs observables sur le corps de l'animal et notamment sur les tentacules. Sur coupes les virions montrent un contour

hexagonal ; leur taille varie entre 120 et 140 nm. Dans les cellules infectées, des membranes entourent de petits groupes de virions associés à une inclusion dense aux électrons. Ce virus a été classé dans la famille des Iridoviridae.

A la même époque un deuxième virus était décrit chez un autre Céphalopode, la Seiche Sepia officinalis, par Devauchelle et Vago (1971). Les particules mesurent 75 nm et possèdent un core dense de 32 à 35 nm ; elles se forment à la périphérie de plages denses aux électrons. Dans le cytoplasme de la cellule atteinte, elles se rassemblent en formations paracristallines. Ce virus a été rapproché des Reovirus.

2 - Mollusques bivalves.

a - Virus d'huîtres

. - Virus de type Herpes

Réalisant une étude sur les effets de la température sur la croissance et la survie de Cr. virginica, Farley et coll. (1972) ont constaté des mortalités anormales (52 %) chez les huîtres soumises aux températures élevées (28°-30° C). Les huîtres malades présentent une dilatation des diverticules digestifs accompagnée d'une infiltration cellulaire au niveau du conjonctif et des sinus sanguins. Dans ces sites, certaines cellules comportent une inclusion intranucléaire Feulgen positif. L'étude en microscopie électronique montre que ces inclusions renferment des particules généralement hexagonales de 70 à 90 nm, constituées d'un nucléoïde dense entouré d'une enveloppe simple.

Selon les auteurs, ce virus qui présente des similitudes morphologiques avec le virus Lucké de la grenouille, pourrait être rapproché du groupe des Herpes virus.

. - Virus de type Iridovirus

Des viroses ont été associées aux deux épizooties qui ont successivement dévasté de 1967 à 1973 les stocks d'huîtres portugaises

sur les côtes françaises (Comps et coll., 1976 ; Comps et Duthoit, 1976). Le premier virus concerne la mortalité massive de 1970, le second la maladie des branchies. Les caractéristiques de ces virus ont conduit à les rapprocher des Iridovirus.

Une troisième infection virale a été décrite en France chez les huîtres Cr. gigas durant des mortalités estivales (Comps et Bonami, 1977). Le virus en cause est proche du virus de mortalité de l'huître Cr. angulata.

L'étude de ces trois virus sera développée dans la suite.

On peut rapprocher enfin de ce groupe l'agent infectieux découvert par Elston (1979) au cours de l'étude de mortalités de larves de Crassostrea gigas élevées en écloserie. L'auteur signale dans les cellules épithéliales du velum la présence de particules hexagonales de 228 ± 7 nm de diamètre, limitées par deux feuilletts membranaires de 85 nm d'épaisseur. La partie centrale est occupée par un core dense aux électrons de 160 nm de diamètre. Ces particules complètes sont associées à des vacuoles claires alors que les formes incomplètes comprenant uniquement l'enveloppe bilamellaire sont usuellement associées à une masse granuleuse dense, vraisemblablement un viroplasma.

Chez les cellules infectées, la membrane plasmique est mal définie et le cytoplasme perd sa texture normale au voisinage des lésions.

. - Autres virus

Plusieurs types de particules d'allure virale ont été signalés aux Etats Unis chez les huîtres et notamment chez Crassostrea virginica et Ostrea lurida.

Dans le noyau de cellules géantes (500 μ m) observées dans les gonades de Cr. virginica, Farley (1976) met en évidence des particules de 53 nm sans enveloppe. Dans certains cas, les lésions comportent des filaments intranucléaires et des microtubules de structure hélicoïdale de 20 nm de diamètre. Notant des similitudes avec les Papillomavirus, l'auteur suggère la possibilité d'une oncogénèse virale chez les mollusques.

Par ailleurs, un certain nombre de lésions attribuées à des virus et plusieurs particules d'allure virale observées occasionnellement chez des huîtres ont été répertoriées par Farley (1978) qui les regroupe dans différentes familles de virus sur la base de similitudes présumées.

Ces observations sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Famille de virus	:	Hôte
Papovaviridae	:	<u>Cr. gigas</u> , <u>Cr. commercialis</u>
	:	<u>O. edulis</u> , <u>O. lurida</u>
Herpetoviridae	:	<u>O. edulis</u>
Togaviridae	:	<u>O. lurida</u>
Retroviridae	:	<u>Cr. virginica</u>
Reoviridae	:	<u>Cr. gigas</u>
	:	<u>O. edulis</u>
	:	

Pour toutes ces particules, l'auteur ne mentionne pas de liens avec des maladies de l'huître.

. - Viroses expérimentales

La pathogénicité de deux souches de virus de type NIP, isolées à partir de Tellina tenuis et d'Ostrea edulis a été testée sur l'huître plate O. edulis (Hill et Alderman, 1977).

L'infection des huîtres est plus prononcée aux basses températures (8-10°C) qu'à des températures plus élevées (16-18°C). Elle se manifeste par le développement d'oedèmes, par une infiltration d'hémocytes au niveau de la glande digestive accompagnée d'une nécrose du tissu conjonctif. Les auteurs ne donnent toutefois aucunes précisions sur les sites de replication des virus.

Par ailleurs, chez les hôtes d'origine l'effet pathogène de ces agents infectieux n'a pas été mis en évidence.

Des travaux comparables ont été réalisés récemment par Meyers (1980) qui a étudié les effets pathogènes du réovirus 13 p2 sur des juvéniles d'huîtres américaines Crassostrea virginica.

b - Virus d'autres Mollusques bivalves.

Peu d'observations ont été faites à ce jour chez les Bivalves marins autres que les Huîtres. Elles sont limitées au signalement de particules d'allure virale chez quelques espèces.

Farley (1978) note des particules icosaédriques de 40 à 45 nm dans le tissu conjonctif, dans les hémocytes et dans l'épithélium branchial de Mya arenaria et suggère un rapprochement avec les Polyomavirus.

Cet auteur mentionne par ailleurs, uniquement sur la base d'observations en microscopie photonique, la présence possible d'un virus de type Herpesvirus chez Mercenaria mercenaria et d'un virus supposé proche des Paramyxoviridae chez Mya arenaria.

II - INFECTIONS RICKETTSIENNES

Les infections rickettsiennes c'est-à-dire dues à des microorganismes bactériens Gram-négatif à développement intracellulaire stricte, déjà bien connues chez les Invertébrés terrestres chez lesquels un grand nombre de ces agents a été étudié, représentent un domaine de recherche encore peu exploré pour ce qui concerne les Invertébrés marins.

La découverte des premiers microorganismes de type rickettsien parasites d'Invertébrés marins est due à Harshbarger et coll. (1977) avec la description d'une Chlamydie chez Mercenaria mercenaria de la baie Chesapeake et de la baie Chincoteage. Dans l'épithélium des diverticules digestifs, des inclusions intracytoplasmiques constituées de granulations basophiles, renferment des corps pléomorphes représentant les trois stades du cycle d'une Chlamydie : formes larges de 400 à 900 nm, corps intermédiaires de 400 à 600 nm et corps élémentaires de 200 à 300 nm. Certaines formes contiennent des particules arrangées en réseau paracristallin, correspondant à un phage infectant la Chlamydie.

Ces auteurs mentionnent également la présence d'une Rickettsie chez Mya arenaria provenant des mêmes secteurs : les microorganismes de forme allongée (300 - 2500 nm) comportent des travées cytoplasmiques riches en ribosomes et sont limités par une double membrane.

Dans le même temps, des infections rickettsiennes étaient pour la première fois mises en évidence dans les huîtres Crassostrea gigas (Comps et coll., 1977) et Ostrea edulis (Comps et coll., 1977). Ultérieurement, un microorganisme présentant un cycle de type chlamydien devait être décelé chez l'huître portugaise Cr. angulata (Comps et Deltreil, 1979).

On connaît par ailleurs chez les Bivalves pélecypodes plusieurs cas d'infections dues à des microorganismes rickettsiens.

Buchanan (1978) a décrit une rickettsie parasite des cellules digestives de Tellina tenuis des côtes d'Ecosse. L'infection concerne 75 % des individus pêchés. Les bactéries de 300 à 500 nm occupent des plages intracellulaires de 25 à 35 µm. L'auteur signale des formes géantes (2 µm), des formes filamenteuses et des formes en bâtonnets ; certaines bactéries sont infectées par un phage de 67 nm.

Cette rickettsie est rapprochée du genre Coxiella dans la famille des Rickettsiaceae.

En France, une rickettsie morphologiquement voisine a été trouvée dans les diverticules digestifs de Donax trunculus de la côte méditerranéenne (Comps et Raimbault, 1978).

Plus récemment, un agent pathogène de type rickettsien a été décelé chez le lavignon Scrobicularia piperata pêché sur les côtes de Saintonge (Comps et coll., 1980). Le développement intracellulaire de ce microorganisme s'effectue suivant un cycle montrant des similitudes avec celui des Chlamydies. C'est de ce groupe qu'à également été rapproché un microorganisme à cycle de type chlamydien signalé par Joly et Comps (1980) chez la palourde Ruditapes decussatus.

On mentionnera enfin l'existence d'un type de rickettsie nouvellement observé dans les cellules digestives de Ruditapes philippinarum et dont l'étude est développée dans la suite.

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES

I - MOLLUSQUES ETUDIES

Les recherches ont porté exclusivement sur des maladies de Mollusques bivalves marins présentant un intérêt économique, faisant l'objet d'élevages importants comme les Huîtres ou de pêche artisanale comme les Bivalves fouisseurs.

1 - Les Huîtres.

Parmi les Filibranches, trois bivalves de la famille des Ostreidae ont été étudiés avec des représentants des genres Crassostrea Sacco et Ostrea Linné.

a - L'huître portugaise Crassostrea angulata Lamark

Anciennement connue sous le nom de Gryphaea angulata, cette huître était largement répandue sur les côtes du Portugal et sur les côtes atlantiques de France ; des gisements naturels étaient exploités encore en Espagne (région de Cadix) et au Maroc (Larache et Mogador).

Introduite accidentellement en France en 1868 à l'embouchure de la Gironde, sa culture s'est principalement développée dans la baie d'Arcachon et sur les côtes de Charente maritime et de Vendée. L'élevage en était également pratiqué en Méditerranée (étang de Thau) et en Bretagne (rivière d'Etel).

De forme plutôt allongée, avec une valve droite plate et une valve gauche creuse, la morphologie et la taille de cette huître varie en fonction de l'âge et des conditions de milieu.

Cette espèce gonochorique présente une alternance sexuelle. La fécondation a lieu dans l'eau où sont émis les gamètes.

Les huîtres examinées ont été récoltées principalement sur les parcs du bassin de Marennes-Oléron. Des échantillons provenant de Bretagne (rivière d'Étel), d'Arcachon et de l'étang de Thau ont également été étudiés. Enfin des recherches purent être poursuivies ultérieurement, c'est-à-dire après la mise en évidence des viroses, à partir de matériel prélevé sur des gisements naturels du Sado et de la baie de Cadix.

b- L'huître du Pacifique, Crassostrea gigas Thunberg

On trouve cette espèce de grande importance économique, au Japon, en Corée, en mer d'Okhotsk et dans l'île de Sakaline. Sa culture a été étendue sur la côte Pacifique d'Amérique du Nord et en Australie.

Introduite en France en 1966 à titre expérimental, son extension a été accélérée à partir de 1970 pour remplacer l'huître portugaise à la suite des mortalités massives.

Sur le plan systématique, Ranson (1951) et Menzel (1974) considèrent que Cr. gigas et Cr. angulata sont une même espèce. Les études les plus récentes n'ont toutefois pas permis de conclure (More, 1969).

Les recherches sur la virose de Cr. gigas ont été effectuées sur des huîtres natives d'Arcachon.

c - L'huître plate, Ostrea edulis Linné

Cette espèce est l'huître d'Europe où elle abonde sur de nombreuses côtes. En France, sa culture est surtout développée en Bretagne ; elle est présente à Arcachon et dans l'étang de Thau. Dans le bassin de Marennes-Oléron, elle fait l'objet d'affinage en claire.

Pour l'étude de la maladie hémocytaire de l'huître plate, on a examiné des huîtres prélevées sur les gisements naturels et sur les parcs des principaux centres de Bretagne, d'Arcachon et dans les claires de La Tremblade.

2 - Autres Pélécy-podes.

Trois bivalves fouisseurs ont été étudiés :

a - Donax trunculus Linné

Ce petit coquillage fréquent sur le littoral du Languedoc, où il est appelé à tort "Telline", fait l'objet d'une exploitation artisanale et d'un commerce local. Les mollusques examinés étaient pêchés dans le secteur du Grau du Roi et des Saintes Maries de la Mer.

b - Scrobicularia piperata Poiret

Surtout connu dans certaines zones cotières de l'Atlantique, ce pélécy-pode est commun à l'embouchure des fleuves.

Les échantillons étudiés provenaient de bancs sableux en aval de la Seudre (secteur de La Tremblade).

c - Ruditapes philippinarum Adam et Reeves

Originnaire d'Extrême Orient (Corée, Japon, Philippines) ce mollusque a été introduit en France depuis une dizaine d'années pour des actions de repeuplement et plus récemment à des fins d'élevage (Vendée, Bretagne).

II - TECHNIQUES D'ETUDE

1 - Examens sur le frais.

Pratiqués à l'ouverture des huîtres, ils ont permis, dans le cas de la maladie des branchies de suivre directement l'évolution de l'épidémie.

Pour le maladie de l'huître plate, le parasite pouvait être décelé sur simples "squash" et sur frottis fixés par le Carnoy II coloré par le bleu de méthylène ou par la coloration de May-Grünwald.

2 - Microscopie photonique.

a - Fixation

L'essentiel des recherches a été mené sur la base d'examen histologiques.

Le matériel a été fixé le plus souvent dans le liquide de Bouin et dans le liquide de Davidson dont la composition à base d'eau de mer est bien adaptée à la fixation des mollusques marins.

Certaines fixations ont été effectuées dans le Carnoy et le Zenker.

b - Coloration

Pour les colorations topographiques générales, les trichromes de Masson, de Ramon et Cajal et de Mallory et l'Azan de Heidenhain ont été utilisés couramment, ainsi que la coloration par l'hémalum-bleu de Mallory différencié par le toluène picriqué.

Le caractère fuschsinophile de certaines formations a été mis en évidence par la coloration de Vago et Amargier (1972).

Certains aspects cytopathologiques ont pu être précisés par la microscopie à fluorescence. Deux fluorochromes ont été utilisés :

- l'acridine orange à pH 3,8 d'après la méthode de Dart et Turner (1959)

- le D.A.P.I. (4-6 Diamidino-2-phenylindole, 2 HCl), suivant la technique de Russel et coll. (1975).

Pour la caractérisation des microorganismes rickettsiens on a enfin utilisé la coloration de Gram sur coupe selon la formule de Gram-Weigert (Humason, 1962).

3 - Microscopie électronique.

a - Fixation

Le matériel destiné aux études ultrastructurales a été fixé

1 heure par le glutaraldéhyde en solution à 3 % tamponnée par le cacodylate de sodium (0,4 M) en présence de NaCl (0,4 M). Après rinçage, les tissus étaient post-fixés par le tétroxyde d'osmium à 2 % dans le tampon cacodylate (0,4 M).

b - Inclusion

L'enrobage des pièces a été effectué dans l'araldite, dans quelques cas dans le spurr et l'épon.

c - Coloration des coupes

La coloration par l'acétate d'uranyle à 5 % en solution alcoolique, suivie d'une coloration au citrate de plomb a permis d'obtenir des contrastes satisfaisants.

Pour la détection des acides nucléiques, on a utilisé la "coloration régressive" selon Bernhard (1968). Les coupes de matériel fixé par le glutaraldehyde et inclus dans l'épon sont traitées 1 mn par une solution aqueuse d'acétate d'uranyle, 30 mn à 1 heure par une solution 0,2 M d'EDTA avant de subir une coloration de 1 mn par le citrate de plomb. Ce traitement augmente le contraste de l'ARN et diminue préférentiellement celui de l'ADN.

Pour le matériel ayant subi une post-fixation osmique les coupes subissent un traitement préalable à l'acide périodique.

CHAPITRE IV

RECHERCHES SUR LES INFECTIONS VIRALES DES HUITRES DES COTES FRANCAISES

A l'exception de quelques mortalités d'importance limitée , aucune maladie grave depuis la mortalité massive de l'huître plate en 1920-1921 (Dollfus, 1922 ; Orton, 1924a, 1924b) n'avait affecté jusqu'en 1966 les élevages d'huîtres en France. C'est en effet à cette date qu'allait se déclencher une série d'épizooties aux effets particulièrement dévastateurs, remettant en cause à plusieurs reprises la production ostréicole du pays.

Chronologiquement deux épizooties se sont succédé dans les élevages d'huîtres portugaises, la maladie des branchies de 1966 à 1969 et la mortalité massive de 1970 à 1973.

La maladie des branchies, dont les premiers symptômes furent observés par Trochon dans la région de La Tremblade en novembre 1966 (Marteil, 1968), s'aggrava et prit un caractère épizootique durant l'année 1967. Elle s'étendit alors à toutes les zones d'élevage d'huîtres portugaises en France, le bassin de Marennes-Oléron, le bassin d'Arcachon, la Vendée et enfin certains secteurs de Bretagne. Les mortalités anormales observées à cette époque confirmèrent la virulence de la maladie dont l'intensité maximale fut enregistrée en 1967. Une régression sensible s'opéra au cours de l'été 1968 mais, malgré ce déclin, des signes de la maladie furent visibles jusqu'en 1970. En 1978, la maladie des branchies persistait encore à l'état endémique sur les gisements naturels d'huîtres portugaises du Sado et de la région de Cadix (Comps et Masso, 1978).

En 1970, ce sont donc des populations d'huîtres adultes généralement affaiblies et du naissain issu de géniteurs plus ou moins

affectés encore par la maladie des branchies, qui furent brusquement touchées par une épizootie nouvelle désignée sous le nom de "mortalité massive de 1970". Cette maladie se manifesta en août 1970 dans certains élevages du Bassin de Marennes-Oléron et presque simultanément en Bretagne dans la rivière d'Etel. Sans symptômes précurseurs, d'importants stocks d'huîtres furent décimés. Ces mortalités massives furent observées jusqu'en juillet 1971. Par la suite, les pertes furent épisodiques et moins intenses, achevant la destruction des stocks.

En 1973, l'huître portugaise avait disparu des côtes françaises à l'exception de quelques gisements naturels isolés en Gironde au Verdon. L'implantation rapide d'une nouvelle espèce originaire du Japon, Crassostrea gigas, avait par ailleurs contribué à accélérer l'élimination de l'huître indigène.

I - VIROSE NECROTIQUE DES BRANCHIES.

On a désigné sous le nom de "maladie des branchies" une épizootie de l'huître portugaise Crassostrea angulata Lmk. caractérisée par une ulcération évolutive des lames branchiales et, à un moindre degré, des palpes labiaux. Provoquant un amaigrissement des huîtres et des mortalités, cette maladie aux conséquences économiques importantes a fait l'objet d'un certain nombre de recherches qui ont abouti, dans un premier temps, à l'indication d'une étiologie parasitaire.

A l'origine Besse (1968) a envisagé le rôle d'un cilié du genre Trichodina tandis qu'Alderman et Gras (1969) notaient chez les huîtres malades la présence d'un parasite "ressemblant" à Labyrinthomyxa marina Mackin et coll. Dans le même temps, Arvy et Franc (1968), à la suite d'une étude histologique des tissus altérés, mettaient en cause un Protiste nouveau apparenté aux Labyrinthulales, Thanatostrea polymorpha Franc et Arvy, 1969. Cette dernière interprétation, en contradiction avec les précédentes, a été basée sur la présence dans les épithéliums atteints de grandes cellules polymorphes de 30 à 60 µm et de cellules fusiformes associées en pseudoplasmodes. Si, par la suite,

l'existence de cellules géantes caractéristiques de la maladie des branchies a été confirmée (Comps, 1969), il est apparu plus douteux que des tractus cytoplasmiques les relient entre elles (Comps, 1972).

Devant ces hésitations, une étude plus approfondie réalisée en microscopie électronique devait apporter certaines précisions ultra-structurales et surtout révéler une infection virale de l'épithélium des branchies (Comps et Duthoit, 1976).

A - Symptômes externes et leur évolution.

La maladie des branchies se manifeste par une ulcération évolutive des branchies et des palpes labiaux ; l'extension des lésions au manteau a été parfois constatée (Alderman et Gras, 1969). Elle débute par l'apparition sur ces organes de taches jaunâtres et de petites perforations dont l'extension entraîne la formation d'indentations sur la bordure externe de l'organe.

L'évolution de ces symptômes a fait l'objet de classements en différents stades (fig. 1 à 4) qui ont permis de suivre la progression de l'épizootie dans les populations d'huîtres atteintes (Marteil, 1969 ; Ferreira et Dias, 1973).

Par ailleurs, quelques précisions ont été fournies sur l'érosion des tissus qui, en provoquant une interruption de la circulation, favorise la "dégénérescence de la partie distale des filaments" (Arvy et Franc, 1968).

L'extension des nécroses (fig.5,6,7), souvent accompagnée de phénomènes de cicatrisation partielle indiqués notamment par la fusion des filaments en bordure des lésions, aboutit en fait à des faciès anatomopathologiques multiples et variés (Comps, 1970).

Les contrôles épidémiologiques effectués sur les parcs ont fait ressortir que la maladie des branchies avait un développement plus

intense au printemps et en été mais dépendait aussi de l'état initial des huîtres et des conditions d'élevage. A partir d'expériences mises en place dans le bassin d'Arcachon, il a en effet été établi que les mortalités consécutives à la maladie, estimées à 8 % en juillet après trois mois d'essai, s'élevaient à 15 % en septembre et à 20 % en novembre (Deltreil, 1969). Par contre, se référant directement à l'état des branchies, Alderman et Gras (1969) ont constaté que le taux d'huîtres au stade actif de la maladie pouvait passer de 2 % à 60 % en trois semaines.

Au laboratoire, chez des huîtres conservées en aquarium, aucune extension des lésions n'a pu être notée (l'élimination d'une partie de la valve droite permettait une observation directe des branchies) (Comps, 1970).

En culture organotypique, sur milieu liquide ou semi-solide, les lésions présentes initialement n'ont pas évolué sur les explants après 15 jours de maintien en survie "in vitro" des branchies.

Ces différentes observations reflètent les difficultés rencontrées dans l'étude expérimentale de la maladie et particulièrement pour réaliser des infections. Toutefois, si les symptômes de la maladie n'ont pu être reproduits expérimentalement, certains signes cliniques suggèrent des processus d'extension de la maladie chez l'huître atteinte. Ainsi notamment, l'existence de lésions (perforations contiguës) sur les faces voisines de deux lames branchiales montrerait la possibilité d'une transmission des germes pathogènes par contact.

D'une façon plus générale, l'élimination de débris cellulaires infectés entraînés par le mucus le long des filaments et de la gouttière marginale, pourrait intervenir dans la formation de nouvelles lésions en d'autres points des branchies et assurer la contamination d'huîtres voisines par l'intermédiaire des pseudo-fèces rejetées dans le milieu.

B - Histologie et cytologie.

1. Symptômes histopathologiques.

La destruction de l'épithélium des branchies et des palpes est caractérisée histologiquement par des phénomènes inflammatoires localisés aux sites où se développe l'infection. L'infiltration hémocytaire provoque un gonflement et une distension des filaments branchiaux des liaisons interfilamentaires et des liaisons interfoliaires. La structure régulière des branchies se trouve localement fortement bouleversée avec des faciès histologiques atypiques divers (fig. 8 à 11). Ces modifications sont d'autant plus marquées que les réactions hémocytaires sont suivies de développement de tissus cicatriciels qui peuvent être le siège de nouvelles altérations. L'examen de nombreuses coupes histologiques passant par différents niveaux des altérations fournit des indications sur le développement des nécroses tout en suggérant des mécanismes de destruction des tissus.

Le phénomène réactionnel d'invasion par les cellules de l'hémolymphe de la lumière des filaments et des espaces lacuneux des liaisons interfilamentaires voisines paraît être le premier symptôme décelable de la maladie et correspond à de petites taches jaunâtres observées "in vivo".

Le gonflement des filaments, visible sur de jeunes lésions ou dans les parties marginales de lésions plus avancées (fig.8, 9), constitue la première phase de désorganisation de la structure des branchies. Il est manifestement accompagné d'une rupture de l'épithélium libérant à l'extérieur du matériel cellulaire (fig.8). L'hyperplasie hémocytaire s'étend progressivement aux tissus voisins formant des masses syncytiales denses où l'on reconnaît à côté de cellules sanguines agglomérées des fibrocytes et des fibrilles de collagène ou encore des fragments des baguettes chitineuses de filaments nécrosés. Ces néoformations se développent aussi bien au niveau de plis entiers de filaments ordinaires,

qu'à la place de filaments principaux et des liaisons interfoliaires (fig.8,9,10). Dans certains cas, l'épithélium qui les borde se modifie : la proportion des cellules à granulations éosinophiles augmente jusqu'à former une couche pratiquement continue (fig.10) ; cette spécialisation pré luderait à une intensification de la sécrétion de mucus, les cellules à granulation se transformant en cellules muqueuses (Leenhardt, 1926).

En phase active de la maladie, le phénomène de nécrose est visible en bordure de ces masses tissulaires. Toujours ouvertes, les ulcérations provoquent des excavations plus ou moins profondes et naturellement plus ou moins allongées dans le sens des filaments (fig.8,10). Débris cellulaires et hémocytes sont généralement présents dans la lumière de ces excavations (fig.8,10) ; d'autres types de cellules de taille importante décrites en détail dans le paragraphe suivant peuvent également y être observés. Pour ce qui concerne les palpes labiaux, les faciès histopathologiques sont plus simples ; la destruction des épithéliums et du conjonctif se caractérise par la formation d'excavations sur la face lisse ou sur la face striée de l'organe qui peut également être perforé d'une face à l'autre (fig.11). Comme pour les branchies, la réaction inflammatoire est intense à la périphérie de la lésion.

Dans certaines conditions, on a pu noter des signes de régression de la maladie. En bordure de la lésion, leucocytes et fibrocytes s'arrangent en couche qui, suivant un processus décrit par Desvoigne et Sparks (1968), se différencie en un pseudo-épithélium qui se spécialise en épithélium cilié avec cellules sécrétrices. Au niveau des branchies, les lésions cicatrisées sont caractérisées par la présence d'un épithélium uniforme et lisse, comparable à celui de la gouttière marginale.

A la suite d'expériences conduites en laboratoire, on a pu établir que l'huître portugaise cicatrise rapidement les blessures au niveau des branchies (Comps, 1970). Consécutivement, il apparaît donc vraisemblable que, dans la maladie des branchies, cicatrisation et

altération interfèrent, la première dans des conditions favorables, prenant le pas sur la seconde, pour aboutir à la cicatrisation complète de la plaie.

2. Symptômes cytopathologiques.

Les zones où se développe l'infection proprement dite, caractérisées par la nécrose des tissus, sont occupées par des hémocytes et par des cellules polymorphes de grandes dimensions (fig.12) qui, au moins en raison de leur taille, représentent une composante caractéristique de la maladie des branchies. Elles peuvent être, en fonction de leur morphologie et de leur structure, regroupées globalement en deux grandes catégories.

Les plus nombreuses sont des cellules au contour irrégulier, plus ou moins fusiformes et généralement imbriquées dans la masse tissulaire en cours de nécrose : elles ont un aspect plus massif, voire globuleux, dans les parties périphériques des nécroses où elles tapissent les excavations. Leur taille varie entre 15 et 30 μm .

Leur noyau, généralement ovoïde, peut mesurer jusqu'à 15 μm ; il possède un volumineux nucléole (3 à 4 μm).

Le cytoplasme, chez certaines de ces cellules, renferme des inclusions légèrement réfringentes de forme et de taille variables (3 à 5 μm). De nature protéinique, ces corps sont fuchsinophiles (coloration de Vago-Amargier). On observe également, bien visibles sur coupes semi-fines, de petites inclusions sphériques de 2 à 3 μm fortement basophiles, fréquemment associées à de nombreuses vacuoles (fig.17).

D'autres cellules, de forme généralement plus arrondie que les précédentes, ont une localisation très marginale quand elles ne sont pas totalement libérées dans la lumière de la nécrose (fig.12, 15). Elles sont caractérisées par la présence d'une volumineuse inclusion basophile qui peut occuper la majeure partie du cytoplasme. Fortement fuchsinophile, cette inclusion est riche en A.D.N. (réaction nucléale de Feulgen positive). La présence d'une forte concentration en A.D.N. a été confirmée par l'examen en fluorescence après coloration par

l'acridine-orange et le D.A.P.I.

Sur certaines sections, on peut voir à la périphérie de l'inclusion de fines granulations colorées par l'hémalum ou par l'hématoxyline ferrique.

Les coupes semi-fines, plus précises, montrent que l'inclusion basophile présente plusieurs zones dont la partie centrale plus chromophile (fig.17) correspond en fluorescence à une région d'émission plus intense (fig.16). Dans le cytoplasme, les granulations périphériques très basophiles sont nettement individualisées ; leur taille est estimée à 0,3 μm environ. La fluorescence bleue avec le D.A.P.I. indique que ces granulations renferment de l'A.D.N. (fig.16).

Enfin, parmi les symptômes observés, on mentionnera, ainsi que l'a montré l'examen de nombreux mollusques atteints, la prolifération des "cellules brunes" dans le tissu conjonctif des palpes et de la masse viscérale. Ces cellules ont une taille de 7 à 12 μm ; elles renferment de grosses granulations brunes. Décrites par Takatsuki (1934), elles se multiplieraient chez les huîtres dans certains cas d'infection. Stein et Mackin (1955) ont ainsi signalé que leur nombre augmentait chez des huîtres Crassostrea virginica parasitées par Dermocystidium marinum (Perkinsus marinus).

C - Microscopie électronique.

Les examens en microscopie électronique ont permis de montrer que les cellules géantes observées au niveau des tissus en cours de nécrose correspondaient à différentes phases d'une infection virale, des précisions ayant pu être apportées sur le mode de formation et la structure des virions et sur les effets cytopathogènes.

- Développement et structure des virions (fig.20,21,22).

Les cellules géantes à inclusion et granulations basophiles sont le siège de lésions virales cytoplasmiques au niveau desquelles a lieu la virogénèse.

L'inclusion basophile apparaît constituée d'un stroma dense aux électrons, comprenant des zones plus opaques qui peuvent être mises en parallèle avec les centres plus basophiles observés au microscope photonique. Cette formation est assimilable à un viroplasma à partir duquel se forment des particules identifiables aux granulations basophiles signalées en histologie classique. En effet, à la périphérie de ce viroplasma se différencient des membranes qui englobent et isolent une portion du stroma. Les particules ainsi formées, libérées dans le cytoplasme, ont un contour polygonal, hexagonal ou pentagonal : elles sont formées d'une partie centrale granuleuse, dense aux électrons, limitée par un système membranaire tripartite.

Dans le cytoplasme de la cellule infectée, ces virions immatures acquièrent une structure plus complexe par condensation du matériel dense qu'ils contiennent. Ce phénomène débute par la différenciation d'un core sphérique plus dense, entouré d'une mince couche claire, occupant une position plus ou moins excentrée (fig.22).

Ce processus de maturation aboutit à des particules de 380 ± 5 nm (côté à côté) dont la forme icosaédrique est démontrée par l'observation de sections hexagonales ou pentagonales à symétries d'ordre 2, 3 ou 5 (Mattern et coll., 1974).

Les virions matures comportent un nucléoïde sensiblement sphérique, d'aspect granuleux, dense aux électrons, de 250 nm de diamètre ; à sa périphérie on note dans certains cas une couche diffuse plus claire (fig. 22,41).

Une couche de matériel moyennement dense aux électrons, de 40 nm d'épaisseur, forme une coque protéinique autour du nucléoïde dont, sur certaines sections, elle paraît séparée par un double feuillet de type membrane unitaire.

La particule est limitée par un complexe membranaire formé de deux membranes trilaminaires séparées par un espace granuleux peu dense, l'ensemble ayant une épaisseur moyenne de 20 nm ; la membrane interne, caractérisée par un contour sinueux, est souvent peu apparente (fig.41).

- Symptômes cytopathologiques (fig.18,19,20).

Le développement de la lésion virale proprement dite, telle qu'elle est décrite ci-dessus, s'accompagne d'un ensemble de symptômes cytopathologiques aboutissant à la destruction de la cellule infectée. Ces symptômes apparaissent concurremment à une hypertrophie progressive des cellules atteintes comme tendaient à le suggérer les observations effectuées en microscopie photonique.

Dans les cellules infectées, l'effet pathogène se manifeste par un accroissement sensible de la taille du noyau et parallèlement de celle du nucléole qui peut atteindre 3 μm ; dans le même temps, on note une disparition quasi-complète de la chromatine ; des déformations de la membrane nucléaire peuvent également apparaître, conférant au noyau un contour sinueux. La désorganisation du noyau se poursuit par une régression du nucléole; il finit par disparaître complètement, n'étant plus visible dans les cellules où s'observe un viroplasma.

Au niveau cytoplasmique, on note, avant même l'apparition de toute lésion virale, une augmentation du nombre des mitochondries qui sont généralement regroupées en petits amas. En même temps que des vacuoles claires aux électrons apparaissent des corps parasphériques fortement opaques, de 0,5 à 1 μm de diamètre : leur structure est caractérisée par l'alternance de couches claires et de couches denses arrangées de façon concentrique. Enfin, il faut signaler la présence de formations plus ou moins ovoïdes de 2 à 3 μm , renfermant des vésicules claires ou opaques aux électrons constituées par des systèmes membranaires fermés.

Dans les cellules, où l'infection est plus avancée, comportant des plages virogènes en cours de développement, une grande partie du cytoplasme est occupée par des corps sphéroïdes de 1 à 1,5 μm , formés d'une partie centrale moyennement dense, entourée d'une couche plus claire. Outre une vacuolisation cytoplasmique accrue, on observe des signes de dégradation des mitochondries (élargissement des citernes).

PLANCHE I

Maladie des branchies de Crassostrea angulata

Fig. 1. : Huître saine.

Fig. 2. : Huître au stade I : à côté d'une indentation marginale du feuillet branchial, on note la présence de taches claires (▶) correspondant à une inflammation au niveau de micro-lésions.

Fig. 3. : Huître au stade II : la multiplication des indentations et des perforations (▷) a entraîné une réduction importante de la surface de la lame branchiale.

Fig. 4. : Huître au stade III : les branchies sont presque entièrement détruites ; à noter l'état de maigreur du mollusque.



PLANCHE II

Maladie des branchies de Crassostrea angulata

Examen macroscopique

Fig. 5. : Vue d'une lésion de la bordure ventrale de la branchie : la formation d'une perforation () consécutive à la nécrose des filaments est dans ce cas à l'origine d'un effondrement de la gouttière marginale et de la formation d'une indentation. X 40.

Fig. 6 et 7. : Micro-lésions sur un feuillet de la lame branchiale ; les filaments localement nécrosés subissent d'importantes déformations () et apparaissent à la périphérie de la lésion, agglomérés et soudés entr'eux (). X 60.

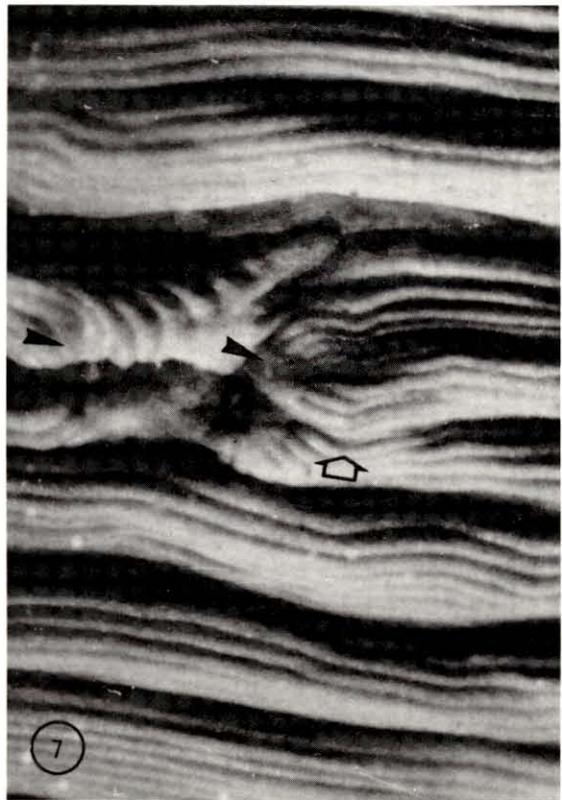
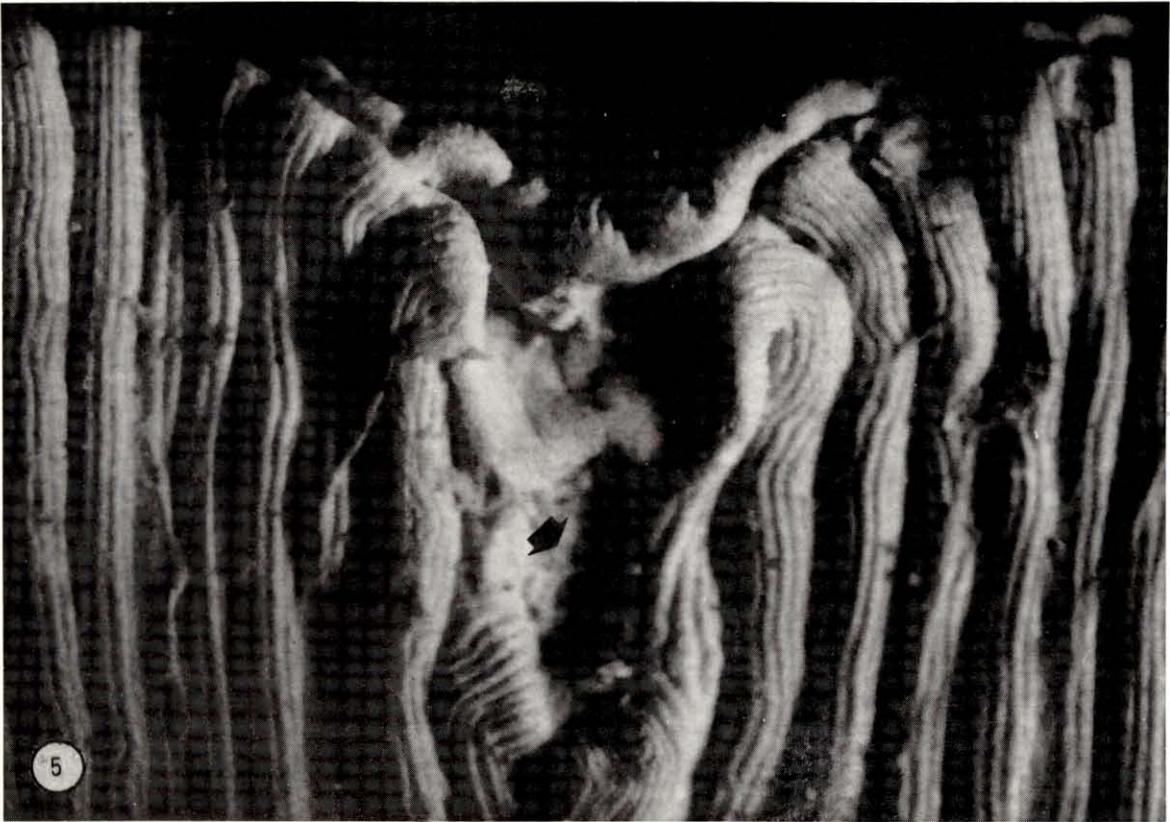


PLANCHE III

Maladie des branchies de Crassostrea angulata

Histologie

Fig. 8, 9 et 10. : Sections de branchies après coloration par l'azan de Heidenhain. Les premiers stades de l'infection sont marqués par une importante inflammation provoquant un gonflement des filaments branchiaux (▶) des liaisons interfilamentaires (*) et interfoliaires (★). Le développement des lésions est caractérisé par la formation de masses syncytiales englobant de nombreux filaments soudés entre-eux (▶). Dans la lumière des excavations on note la présence de matériel cellulaire (→) provenant de l'érosion des tissus. Au niveau de certaines ulcérations on observe une prolifération de cellules muqueuses (→). X 100.

Fig. 11. : Section de palpes labiaux après coloration par l'azan de Heidenhain. La nécrose s'est développée à partir de l'épithélium de la face lisse des palpes (▶). Au sein du conjonctif, la zone inflammatoire est bien distincte à la périphérie de la lésion (▶). X 90.

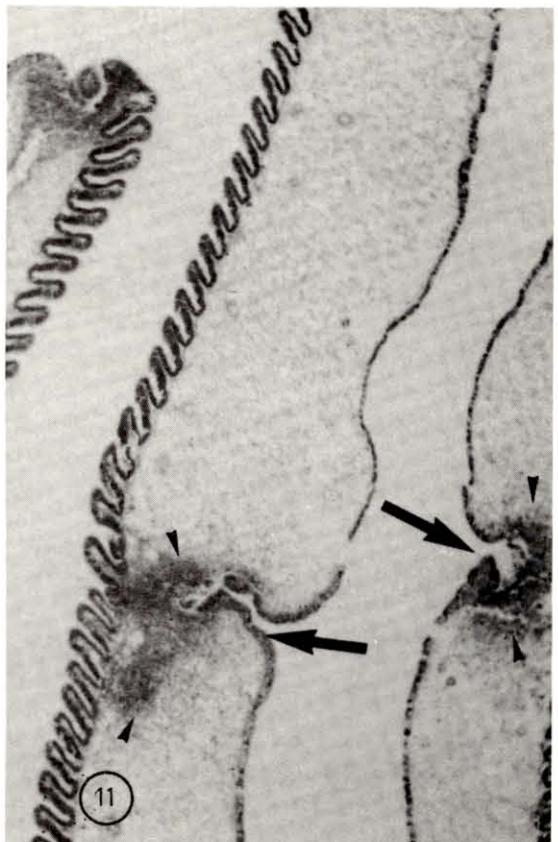
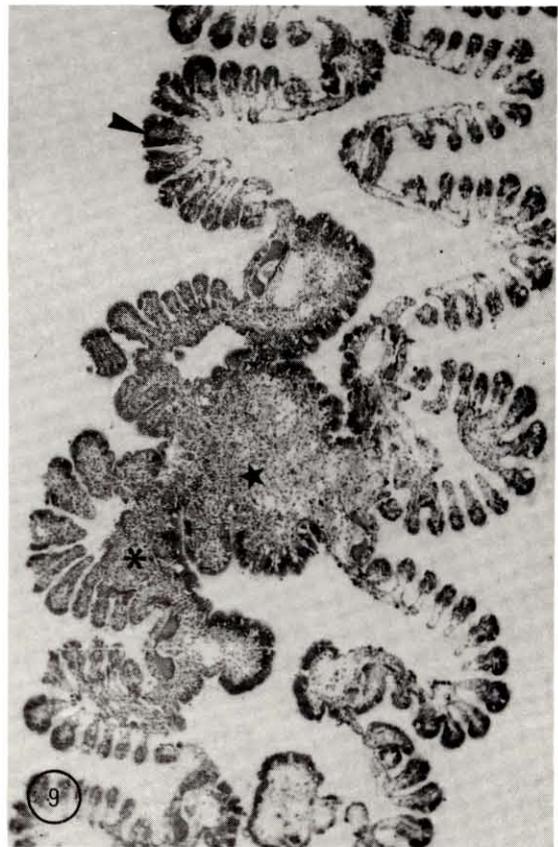
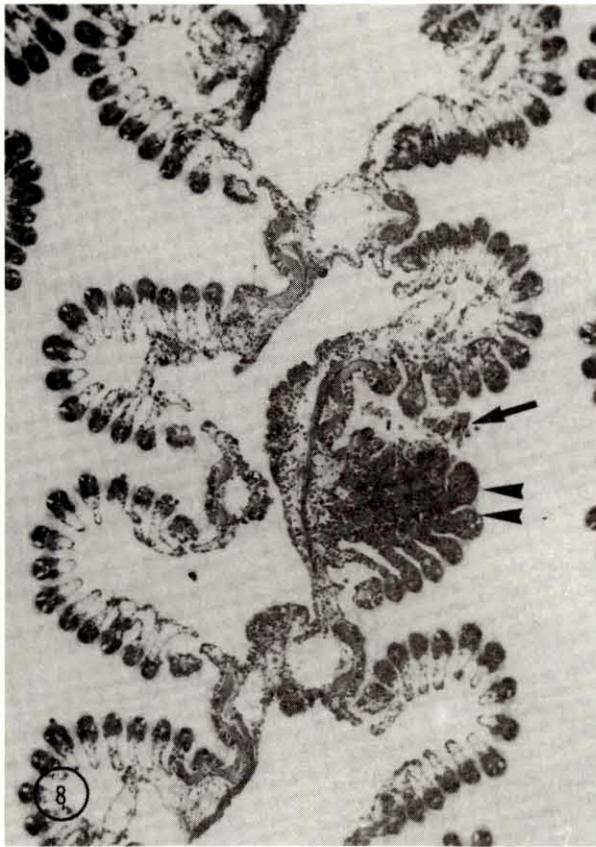


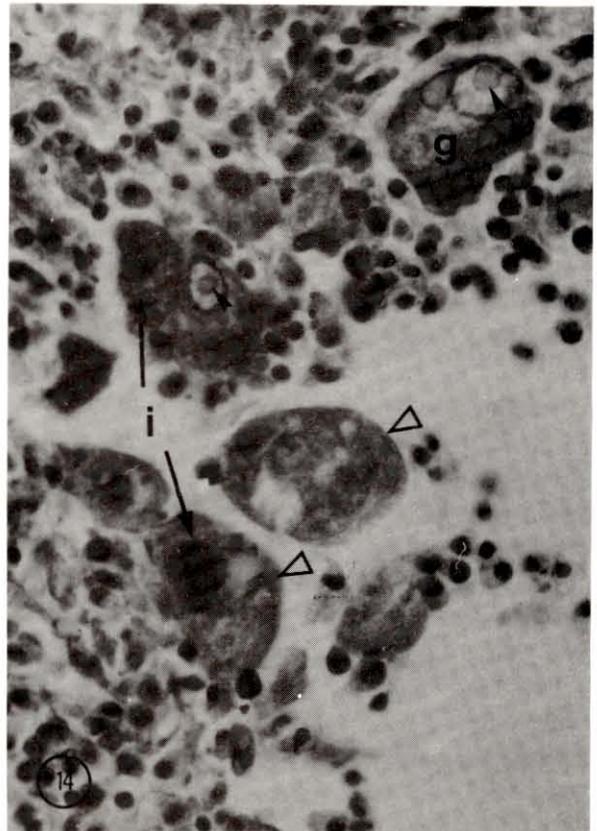
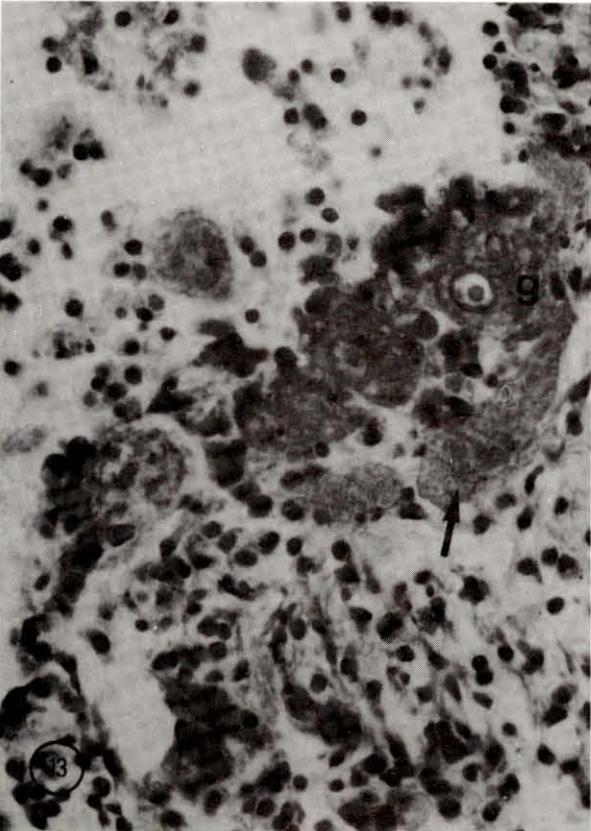
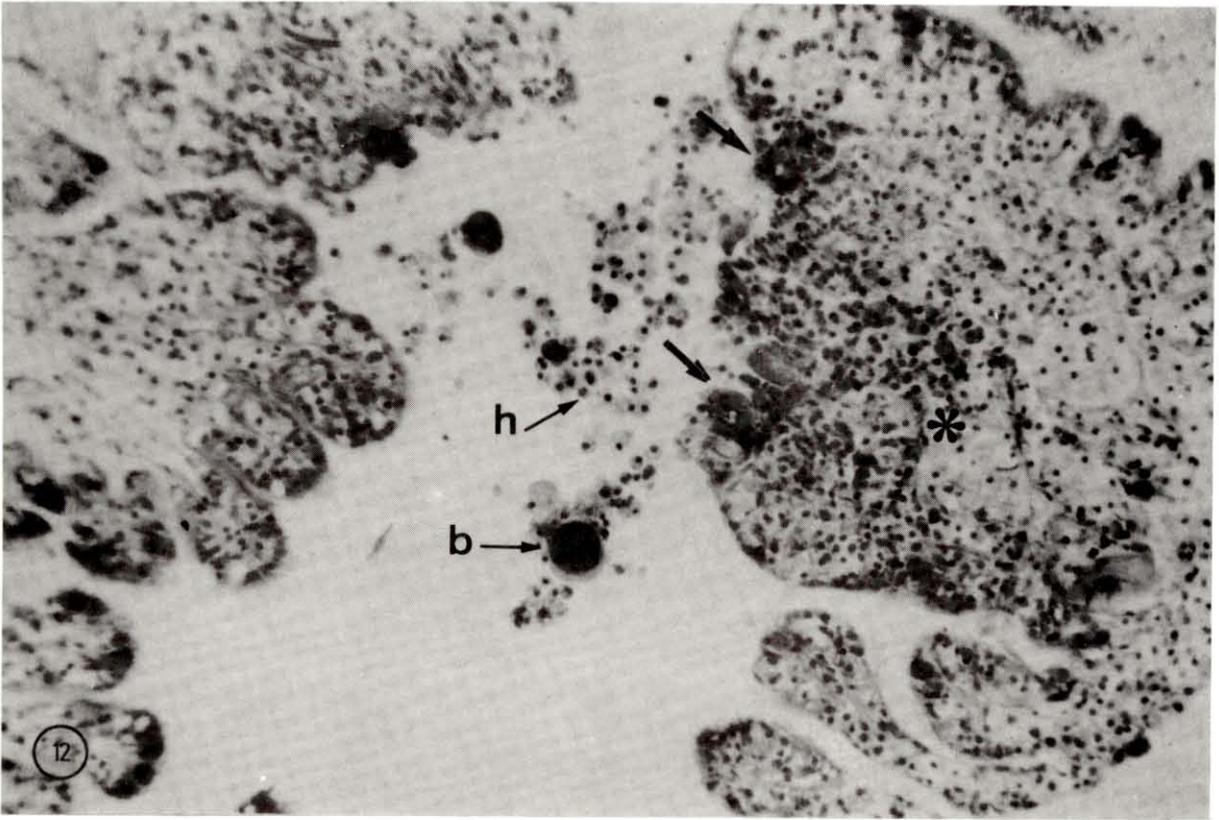
PLANCHE IV

Maladie des branchies de Crassostrea angulata

Histologie

Fig. 12. : Section de branchie d'huître montrant une zone nécrosée ; les filaments soudés forment une masse compacte (*****) envahie par de nombreux hémocytes ; en bordure les parties dépourvues d'épithélium sont occupées par des cellules géantes (**→**) ; des cellules géantes au contenu fortement basophile (**b**) et des hémocytes (**h**) sont libérés à partir des tissus en cours d'érosion. Coloration de Mann-Dominici. X 200.

Fig. 13 et 14. : Cellules géantes (**g**) présentes en bordure des ulcères branchiaux ; imbriquées dans les tissus, elles ont une forme allongée (**→**) et prennent un aspect globuleux quand elles s'en détachent (**▷**) ; à ce stade elles renferment des inclusions basophiles de taille variable (**i**) et le noyau hypertrophié possède un volumineux nucléole (**▷**). Azan de Heidenhain. X 1000.



PLANCIE V

Maladie des branchies de Crassostrea angulata

Fig. 15. : Cellule géante (g) se détachant des tissus en cours de nécrose ; l'inclusion basophile (i) occupe une grande partie du cytoplasme à côté d'un noyau hypertrophié nettement pycnotique. Des cellules dont l'hypertrophie est encore peu marquée sont visibles dans les tissus sous-jacents (→). Coloration de Mann-Dominici. X 1000.

Fig. 16. : Cellule géante observée en microscopie à fluorescence après coloration par le D.A.P.I., révélant l'ADN : l'absence presque totale de chromatine dans le noyau (n) contraste avec la forte concentration d'ADN au niveau de l'inclusion cytoplasmique (i) ; le reste du cytoplasme est occupé par de fines granulations également riches en ADN (▶). X 2000.

Fig. 17. : Coupe semi-fine d'une lésion, colorée par le bleu de Sahli. Cellule géante sans inclusions cytoplasmiques (g₁) : le noyau (n) est partiellement dégénéré. Cellule à inclusion et granulations basophiles (g₂) : une partie du cytoplasme est fortement vacuolisée. A noter la présence d'hémocytes hyalins (h) et de granulocytes (hg). X 1600.

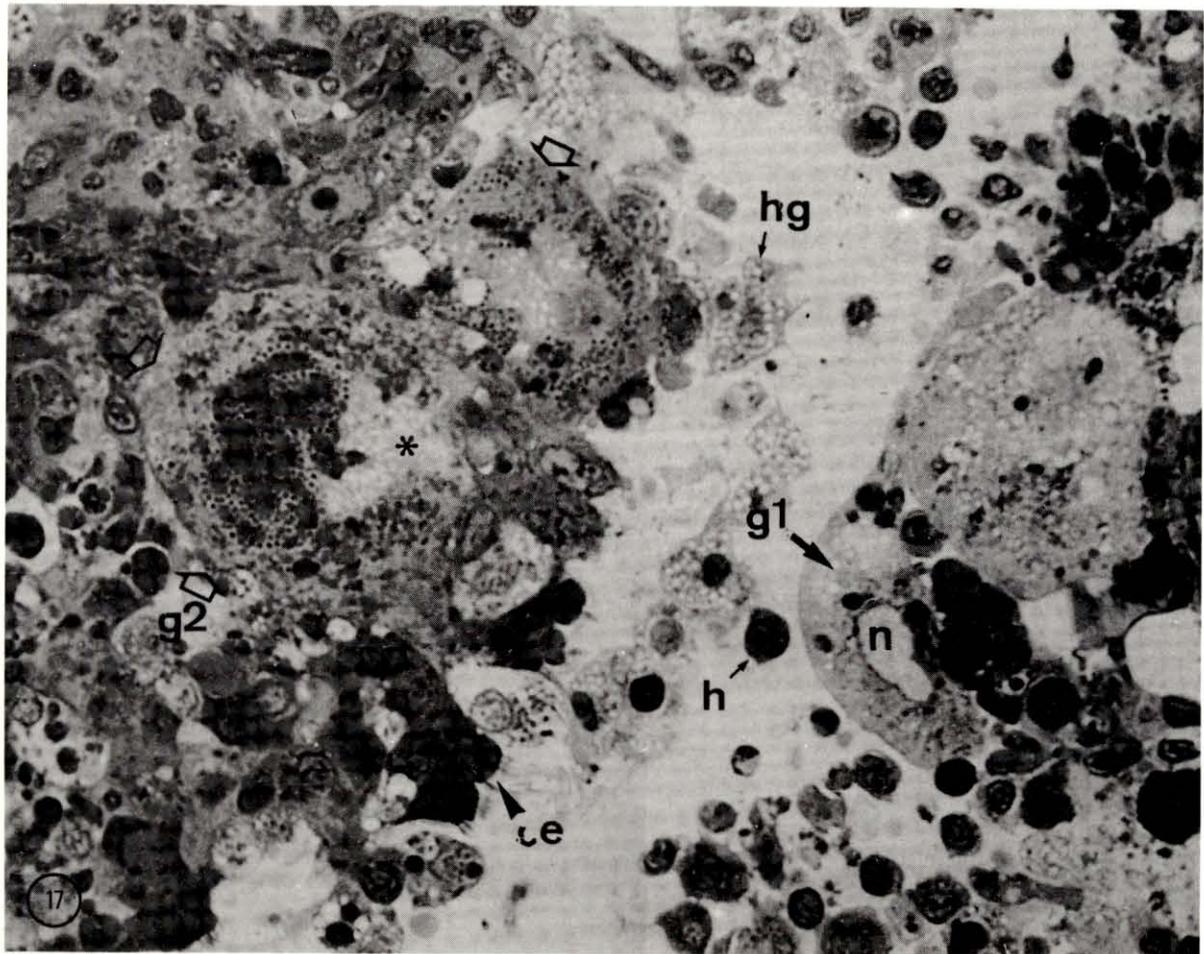
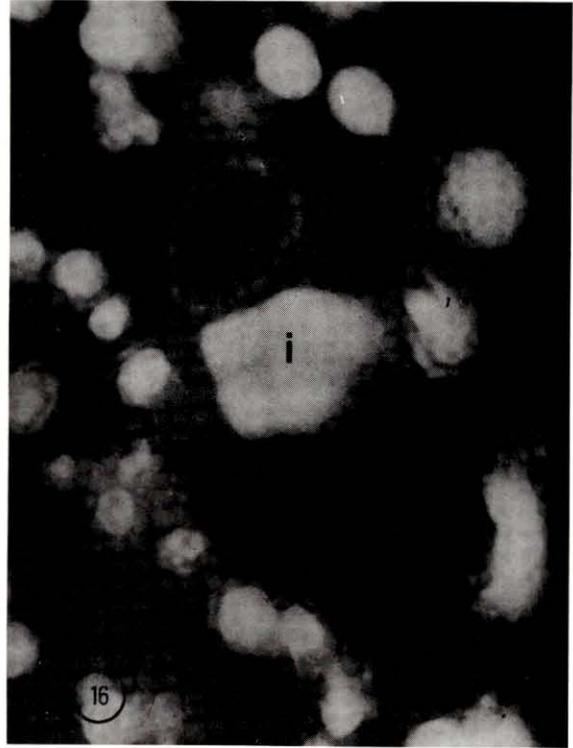
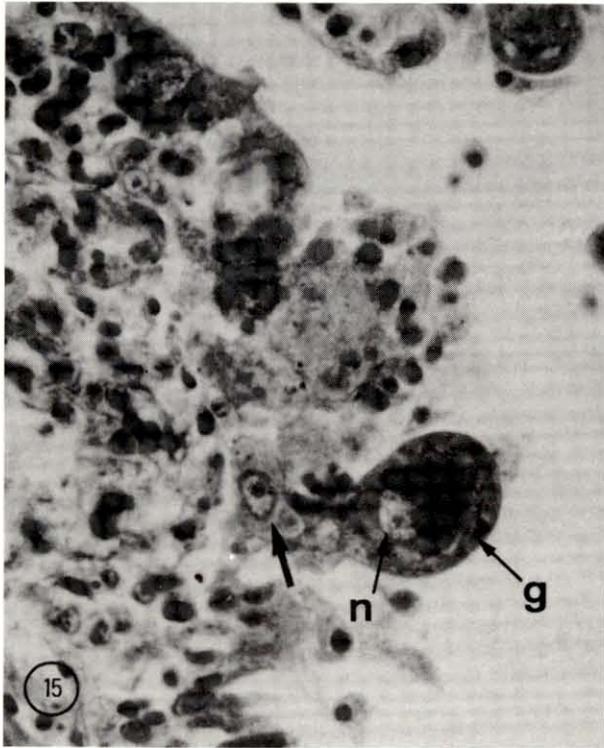


PLANCHE VI

Maladie des branchies de Crassostrea angulata

Ultrastructure

Fig. 18. : Coupe fine d'une cellule hypertrophiée au niveau de l'épithélium branchial. Dans le cytoplasme on note des petits amas de mitochondries (→) et des corps denses à structure lamelleuse (▶). Le noyau hypertrophié (nh) montre un nucléoplasme clair : à ce stade, le nucléole (▷) est sensiblement dégradé. X 14800.

Fig. 19. : Détail d'une inclusion dense présente dans les cellules hypertrophiées. La structure en lamelles concentriques (▶) indiquerait l'origine dégénérative de ces formations. X 88000.

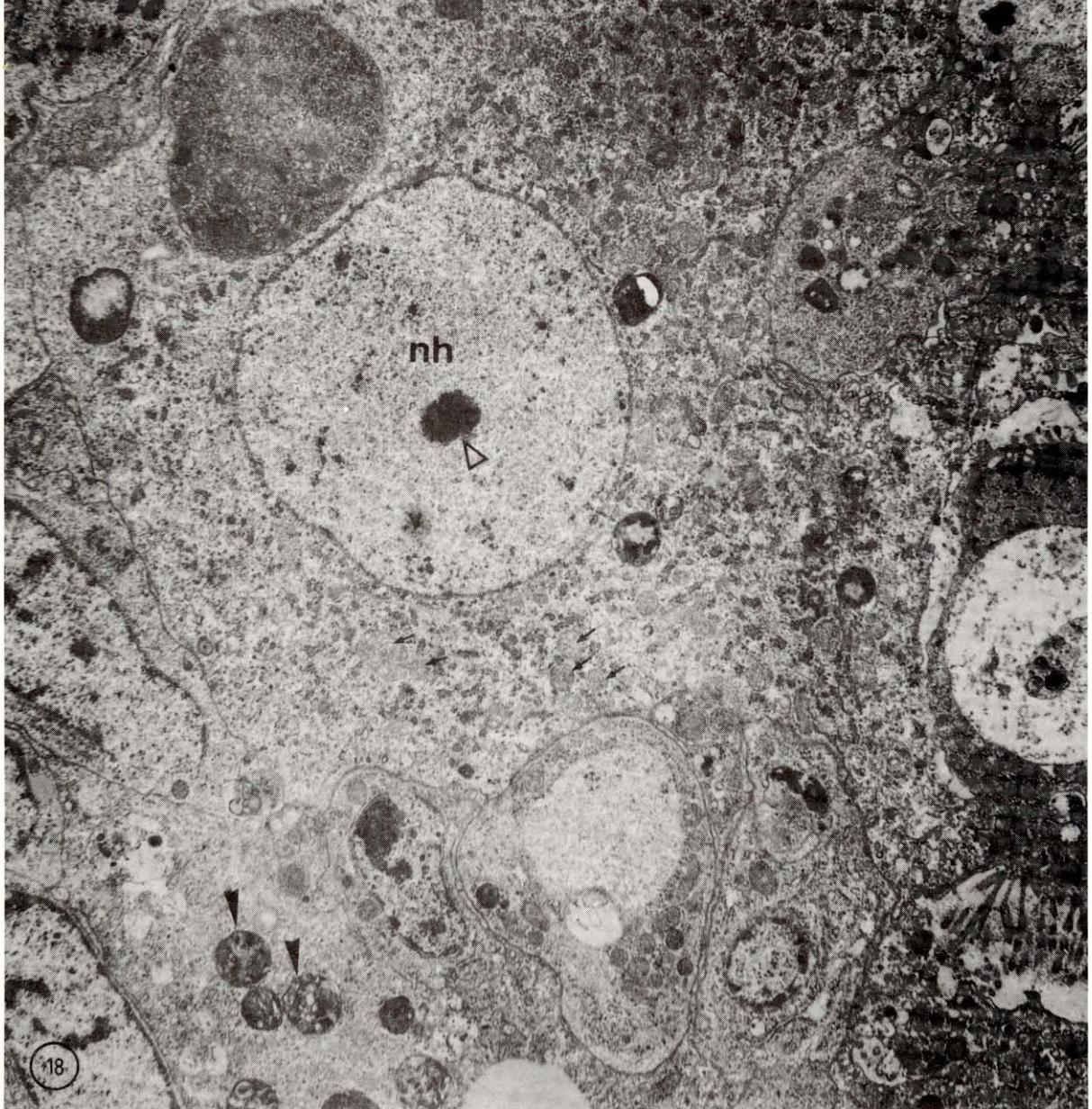
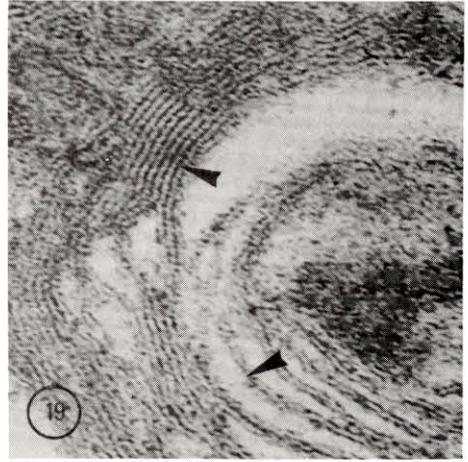
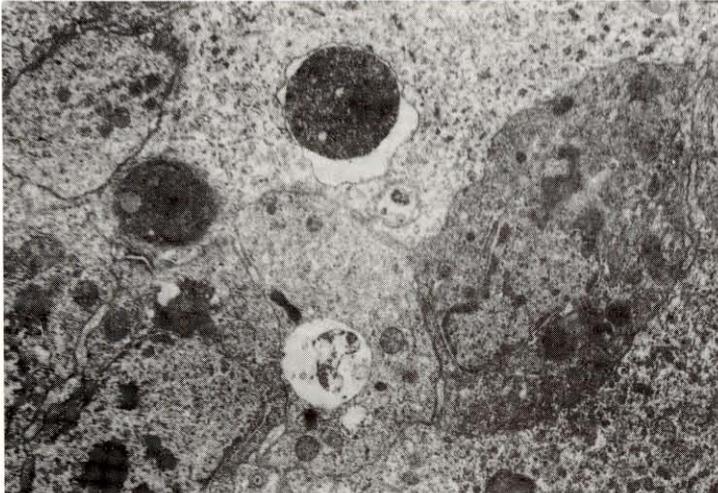


PLANCHE VII

Maladie des branchies de Crassostrea angulata

Ultrastructure

Fig. 20. : Cellule hypertrophiée à un degré avancé de l'infection dans laquelle s'est développée une lésion virale comprenant une plage virogène (vi) et de nombreux virions (→). Les mitochondries regroupées en amas denses montrent des signes de dégénérescence (m). De multiples vacuoles claires apparaissent dans le cytoplasme (→) dont une portion importante est occupée par des corps sphéroïdes (cs) constitués de matériel réparti en deux secteurs de densité différente (◀).

X 10500.

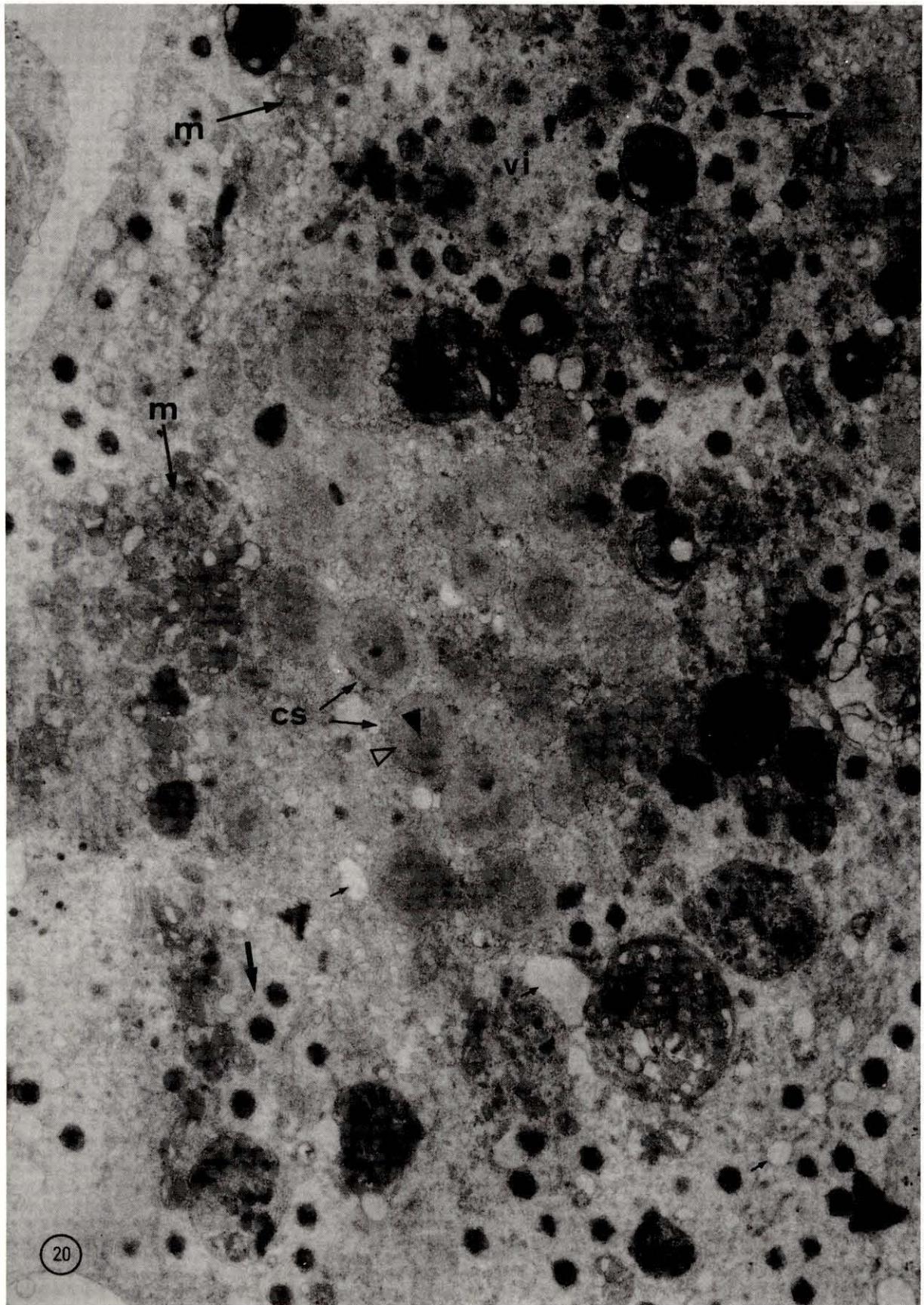


PLANCHE VIII

Maladie des branchies de Crassostrea angulata

Ultrastructure

Fig. 21. : Dans les dernières phases de l'infection, une portion importante de la cellule géante est occupée par la lésion virale dont l'aspect multilobé résulte de la coalescence de plusieurs centres virogènes (→). Les virions formés en bordure des aires de matériel dense (d) sont ensuite dispersés à la périphérie de la lésion. Dans le cytoplasme où ne subsiste qu'un matériel granuleux très dispersé, on reconnaît quelques amas de mitochondries (▷), des virions immatures (vi), des virions matures (v). X 13200.

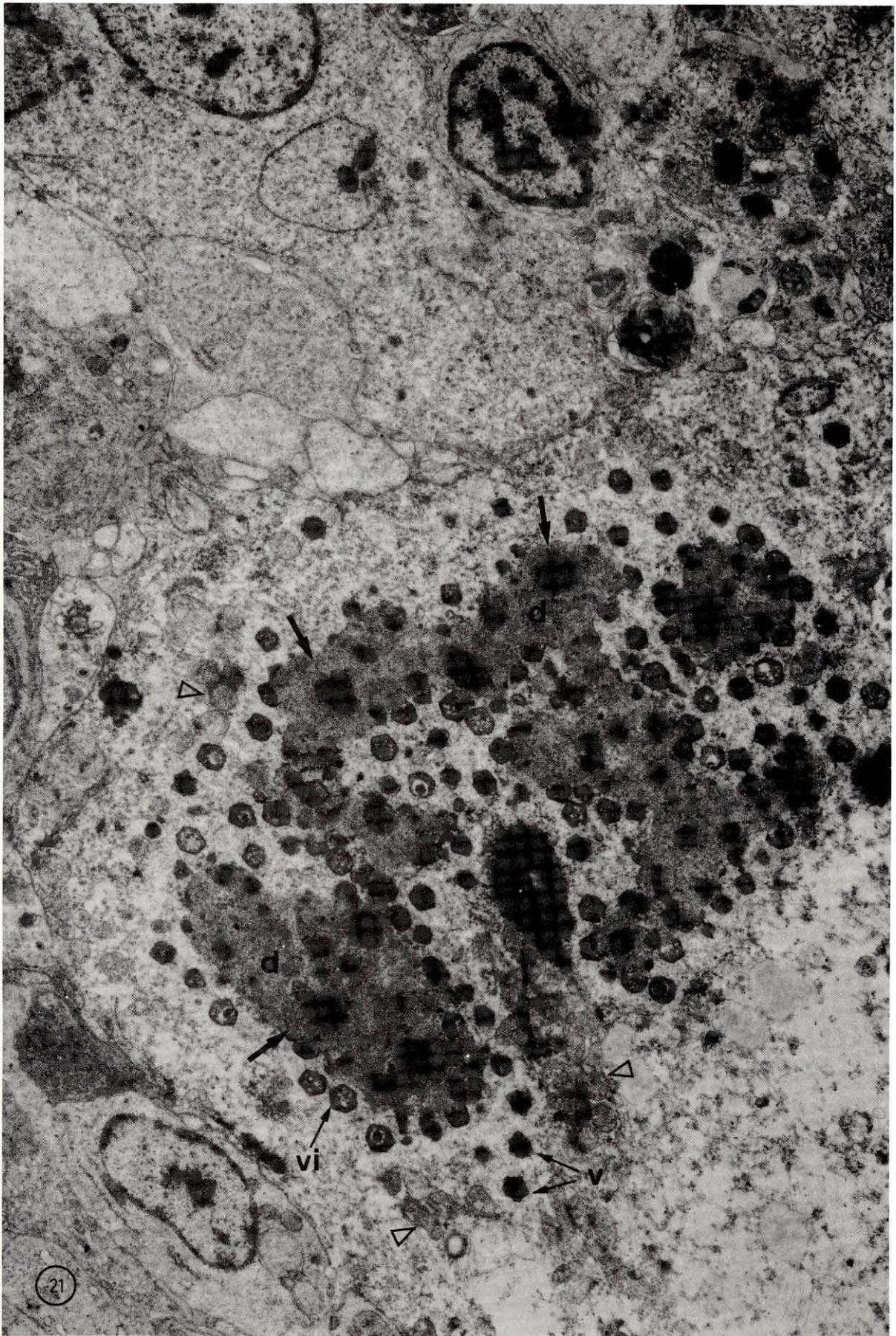
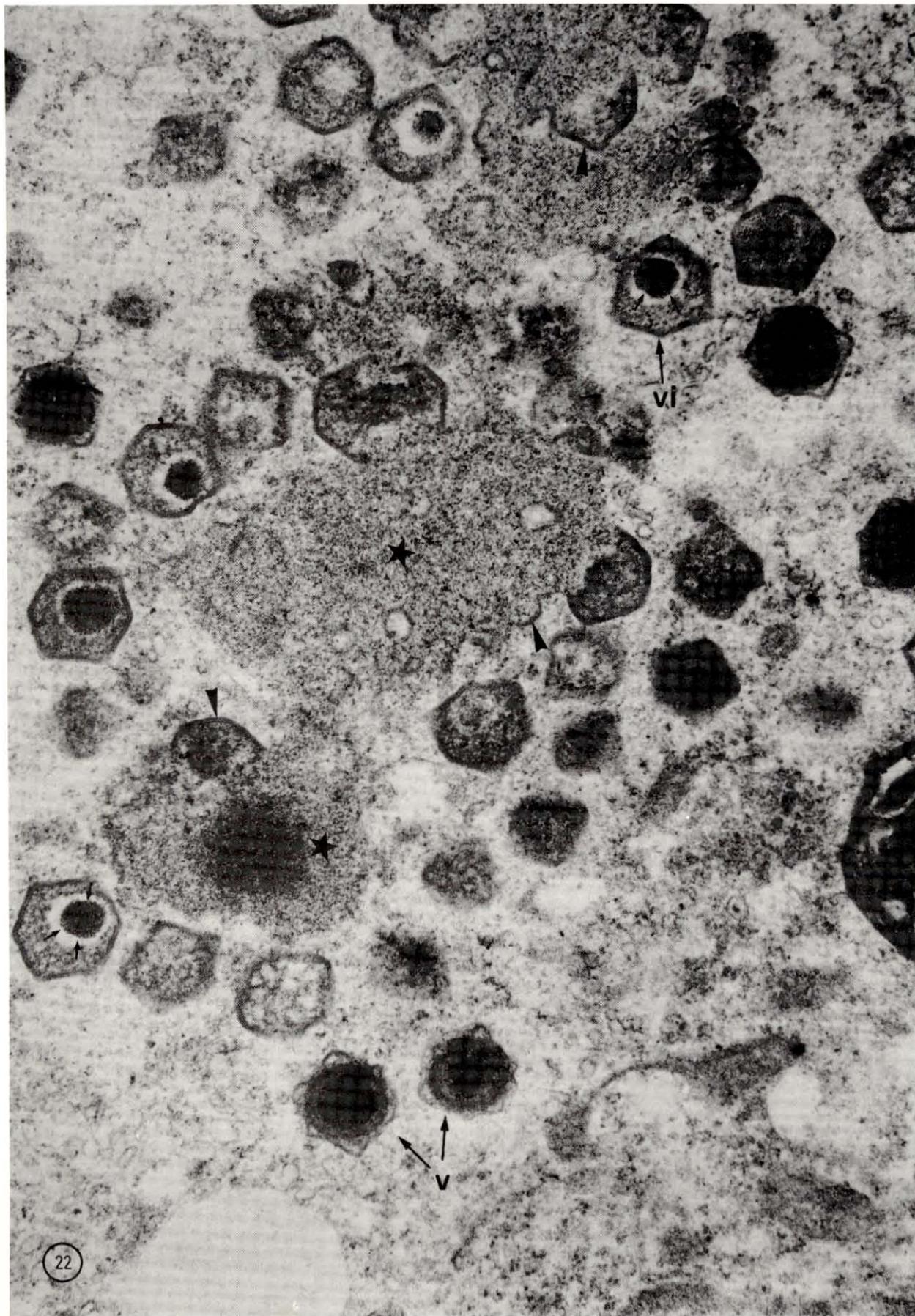


PLANCHE IX

Maladie des branchies de Crassostrea angulata

Ultrastructure

Fig. 22. : Coupe fine au niveau d'une lésion cytoplasmique. Des membranes (▶) se forment en bordure de plages virogènes (★). Les premières phases de condensation (→) du matériel viral s'observent dans un certain nombre de particules immatures (vi). Des virions matures (v) sont dispersés à la périphérie de la zone de formation des particules.
ME. X 2000.



D - Discussion.

L'étude approfondie de la nécrose des branchies de l'huître portugaise, notamment dans ses aspects cytochimiques et ultrastructuraux, a révélé que les ulcérations des tissus étaient associées à une infection virale cytoplasmique.

Cette donnée remet en cause l'étiologie parasitaire avancée par Arvy et Franc (1968). Ainsi, il n'apparaît plus douteux que les "kystes" signalés par ces auteurs correspondent, au vu des images fournies, à des cellules présentant une importante lésion virale.

En matière de pathologie des huîtres, la maladie des branchies de l'huître portugaise représenterait donc le premier cas observé de virose, pouvant être mis en relation avec une épizootie importante.

Sur le plan de la virologie générale, de par l'ensemble de ses caractéristiques, le virus décrit montre des similitudes avec les Iridovirus, groupe qui compte des pathogènes d'insectes (Bellett, 1968 ; Tinsley et Kelly, 1970 ; Stolz, 1971) et auquel sont rattachés des virus d'animaux marins (Devauchelle, 1977 ; Reno et coll., 1978). En raison de l'hypertrophie des cellules infectées on peut plus précisément rapprocher le virus de la nécrose des branchies des agents de la maladie "lymphocystis" (Walker et Weissenberg, 1965 ; Zwillenberg et Wolf, 1968) en notant que ces virus sont regroupés avec les Iridovirus (Matthews, 1979).

II - INFECTIONS VIRALES HEMOCYTAIRES DES HUITRES

A - Virose de l'huître portugaise Crassostrea angulata Lmk.

Des mortalités inhabituelles ont été constatées au cours de l'été 1970 sur la plupart des élevages d'huîtres portugaises de la côte atlantique française. Après la maladie des branchies qui, surtout entre 1966 et 1969, avait causé d'importantes pertes chez Cr. angulata, une nouvelle épizootie allait frapper cette espèce jusqu'à sa disparition des parcs ostréicoles français, son remplacement par l'huître du Pacifique ayant été effectivement envisagé à partir de 1971. Par l'ampleur et la rapidité de ses effets, cette maladie peut être rangée parmi les plus grandes épizooties connues chez les huîtres à coté de la maladie de Malpègue au Canada (1915) et la "maladie de l'huître plate" (1921) en Europe. La méconnaissance de leurs causes représentait un autre point commun à ces trois épizooties. L'hypothèse d'une origine bactérienne pour les mortalités massives de l'huître plate avait été avancée ; de la même manière on a suspecté l'action d'un virus pour expliquer les mortalités enregistrées sur les gisements de l'île du Prince Edouard ; enfin jusqu'à une date récente (printemps 1975) aucune précision n'avait pu être donnée sur les causes des mortalités massives de l'huître portugaise. Des recherches complémentaires toutefois, ont permis dans ce dernier cas de découvrir chez les huîtres malades des lésions virales constituant un des éléments de base de l'étiologie de la maladie.

1. Evolution de la maladie.

Région de culture intensive et traditionnelle de l'huître portugaise, le bassin de Marennes-Oléron fut la zone où l'on signala au cours du mois d'août 1970 les premières mortalités importantes, quelques cas ayant toutefois été enregistrés dès le mois de juillet en Bretagne dans la rivière d'Étel. Il fallut ensuite attendre le mois de décembre pour constater des pertes massives dans le Bassin d'Arcachon, deuxième centre français pour l'élevage de l'huître portugaise.

L'extension de la maladie aux autres centres eut lieu au cours de l'année 1971 , les gisements naturels de Charente et de Gironde étant les derniers atteints. En Méditerranée (étang de Thau), les élevages ne subirent aucun dommage sensible durant la période de mortalité en Atlantique.

Dès l'observation des premières pertes, outre la valeur des taux de mortalité, on a recherché à préciser les manifestations pouvant précéder la mort des mollusques et susceptibles de fournir des indications sur ses causes.

Au niveau de la coquille on a pu constater une prolifération de Polydora (P. ciliata ou P. hoplura), mais ce n'est que dans des cas particuliers (lots d'huîtres en casiers en zone profonde du banc de Ronce, bassin de Marennes-Oléron) et assez rares du reste que ces vers avaient gravement dégradé les valves et affaibli les huîtres au point d'entraîner quelques pertes.

On a également souvent noté chez des huîtres présumées atteintes un net retrait de la valve gauche par rapport à la valve droite. Le caractère facultatif de ce phénomène ne permet pas toutefois de le retenir comme symptomatique de l'affection. Il est certain néanmoins qu'il traduit un trouble dans le comportement et plus particulièrement de la croissance de l'huître.

En ce qui concerne le mollusque proprement dit, les seuls signes observables macroscopiquement consistaient en lésions branchiales, symptômes caractéristiques de la maladie des branchies. Cette affection, comme on a pu le voir précédemment avait, de 1966 à 1969, causé de graves dommages dans les élevages d'huîtres portugaises. Outre des mortalités importantes, les effets de la maladie se firent ressentir durement par une chute très sensible de la qualité des produits. Les huîtres avec branchies parasitées déchiquetées étaient souvent très maigres et par suite d'une valeur marchande nettement diminuée d'autant que, par ailleurs, leur croissance se trouvait singulièrement ralentie.

Toutefois, à l'époque où se déclaraient les mortalités massives, la maladie des branchies ne subsistait plus qu'à l'état enzootique. Les chiffres indiqués sur le tableau ci-dessous précisent cette situation en pourcentage global d'huîtres élevées pour quelques secteurs du Bassin de Marennes-Oléron :

Date des prélèvements	Lieu d'origine des huîtres	Age des huîtres (ans)	Taux de mortalité	Maladie des branchies	
23/9/70	Ronce Ilot	2	13,0	16	12
"	Ronce Dépot	3	40,0	18	16
"	Ronce Ilot	3	40,1	26	24
11/1/71	Crassats Mérignac	2-3	10	20	10

Il faut remarquer en outre qu'il s'agissait essentiellement de lésions au stade I (suivant le classement indiqué par Marteil, 1968), autrement dit de lésions peu étendues et de surcroît le plus souvent en voie de guérison avec formation de tissus cicatriciels.

Les nombreux examens effectués durant l'épizootie de 1970-1973 ne permettent pas d'établir une liaison directe entre les cas de maladie des branchies observés et les mortalités. Cependant, on ne peut omettre l'incidence probable de la maladie des branchies qui a frappé des populations d'huîtres qui devaient ultérieurement subir des mortalités massives.

On verra par la suite les rapports qui pourraient être établis entre les deux maladies au moins en considérant les caractéristiques des agents infectieux mis en cause dans leur développement.

2. Microscopie photonique.

Devant l'absence de symptômes externes susceptibles d'être associés aux mortalités, les recherches ont été orientées sur les examens histologiques en microscopie photonique, qui ont été complétés ultérieurement par des études en microscopie électronique.

La recherche de parasites éventuels et d'une façon plus générale de symptômes internes, tant au niveau histologique qu'au niveau cytologique, a été poursuivie au cours des différentes phases de la maladie. Les échantillons examinés comportaient des mollusques apparemment sains et des individus dans un état sub-létal (huîtres cloquantes et bâillantes). Les prélèvements étaient effectués directement sur les parcs au moment des contrôles de mortalité, ou encore dans les claires (Région de La Tremblade), les bassins de stockage et les dégorgeoirs, donc dans des sites très variés. Les conditions de prélèvements permirent de faire des observations dans un champ d'investigation très large, pouvant expliquer par la suite certains aspects de la maladie.

On a ainsi relevé les manifestations habituellement observées chez des huîtres affaiblies ou mourantes. La prolifération de bactéries principalement dans les tissus digestifs et de ciliés était fréquente mais ne correspondait en fait qu'à une phase normale de la dégradation des sujets morts.

Par ailleurs, on a pu faire certaines observations pouvant être plus directement rattachées à l'état pathologique des huîtres examinées. On retiendra ici les plus caractéristiques et les plus fréquentes.

a) Infiltration hémocytaire.

Les hémocytes migrent dans le tissu conjonctif, s'infiltrant en grand nombre dans les zones proches de l'estomac ou des

diverticules digestifs ; ils s'agglomèrent par petits groupes au sein de lacunes qui, lorsque leur nombre devient important, modifient sensiblement l'aspect du conjonctif (fig.23). L'ensemble de ces modifications confère dans certains cas une densité anormale au tissu de soutien de la glande digestive, notamment chez le naissain (fig.24).

L'infiltration hémocytaire ne se limite pas aux seuls tissus de la glande digestive, les cellules sanguines pouvant également envahir d'autres parties du mollusque : manteau, palpes et branchies.

Par contre, dans les vaisseaux et les sinus, l'accumulation de cellules sanguines est très variable. Il n'est pas douteux que tous ces phénomènes relèvent d'une inflammation intense de la masse viscérale.

b) Développement des cellules brunes.

Ces cellules, selon Grobben (1888), se formeraient dans la zone foncée du péricarde ; leur taille chez Cr. angulata varie entre 10 et 20 μ m. Elles renferment des globules sphériques brun jaune, leur conférant une coloration caractéristique. On les trouve généralement insérées dans le tissu conjonctif au niveau des palpes labiaux et du tissu de soutien de la glande digestive. Pendant les mortalités, on a noté chez des huîtres malades un accroissement du nombre de cellules brunes, spécialement au voisinage des diverticules digestifs et de l'estomac. Généralement isolées, ces cellules étaient très rapprochées par petits groupes de 4 ou 5. Il est certain, bien que le rôle des cellules brunes soit encore mal connu, que ce phénomène traduit un processus réactionnel lié à l'état pathologique du mollusque : la multiplication des cellules brunes a été antérieurement signalée chez les huîtres portugaises atteintes de la maladie des branchies (Comps 1969 ; Lasserre, 1969) ou encore chez l'huître de palétuvier de Guyane parasitée par Nematopsis sp. (Comps et coll., 1972).

c) Cellules atypiques.

Parmi les symptômes les plus constants observés au cours de la maladie on notera la présence au sein du tissu conjonctif de cellules sanguines atypiques comparativement à la structure habituelle de ces dernières.

Le noyau est pauvre en chromatine, celle-ci apparaissant généralement sous forme d'un fin liseré marginal ; le nucléole est rarement observé (fig.26).

La particularité essentielle de ces cellules réside dans la présence d'une inclusion cytoplasmique de nature protéinique de 2 à 3 μm de diamètre. Cette inclusion, dont le caractère fuchsnophile est mis en évidence par la coloration de Vago et Amargier (1963) est Feulgen positif. La présence d'A.D.N. à ce niveau est confirmée par l'examen en fluorescence en utilisant le D.A.P.I. comme fluorochrome.

La coloration par l'hémotoxyline ferrique (fortement différenciée) permet par ailleurs d'observer à la périphérie de ces inclusions de nombreuses granulations dont la taille est voisine de 0,3 μm . Ces dernières, bien visibles sur coupes semi-fines colorées par le bleu de Sahli, ont la même affinité tinctoriale que l'inclusion cytoplasmique (fig.28).

Comme les hémocytes normaux auxquels elles sont associées on trouve les cellules atypiques dans les vaisseaux et sinus sanguins des différents organes. Dans le conjonctif, elles sont isolées entre les cellules ou par paquets au sein de petites lacunes (fig.26). Dans le tissu englobant les diverticules et canaux digestifs, l'abondance des cellules atypiques se traduit par une multiplication et une extension des lacunes (fig.27) ; consécutivement, le tissu de soutien et de réserve apparaît fortement dégradé et modifié dans sa structure. Il ne subsiste plus qu'un ensemble de cellules libres d'une configuration généralement dense. La destruction du conjonctif s'opère également dans le manteau et dans les palpes. A partir de zones proches de l'épithélium qui sont le plus souvent les premières affectées, l'infiltration hémocytaire et l'apparition de cellules atypiques s'étendent progressivement

aux tissus sains. On peut ainsi déceler dans des secteurs tissulaires encore intacts, des cellules à inclusion cytoplasmique très dispersées, insérées entre les cellules de Leydig (fig.25).

3 . Microscopie électronique.

L'étude en microscopie électronique des huîtres malades a été effectuée ultérieurement à partir de matériel fixé et inclus en 1972 et 1973 sur des huîtres issues de stocks ayant subsisté à l'embouchure de la Gironde.

Les cellules atypiques, reconnues sur coupes semi-fines, se sont révélées être le siège d'une infection virale : l'inclusion fuchsiophile présente dans le cytoplasme correspond sur coupe ultrafine à une aire opaque aux électrons constituée d'un stroma homogène, à la périphérie duquel se produit la virogénèse suivant un mode comparable à celui de la replication du virus de la maladie des branchies (fig.29).

En bordure de cette formation , assimilable à un viroplasma, se différencient des membranes qui entourent partiellement ou enveloppent complètement quand elles sont refermées, une portion du stroma dense. Les particules ainsi formées se détachent de la plage virogène. Dans le cytoplasme, on distingue en fonction de leur morphologie, deux types de particules suggérant l'intervention d'un processus de maturation au sein de la cellule infectée :

- particules immatures : quand elles se séparent du viroplasma, les particules ont un contour polygonal qui, suivant le plan de la section, correspond à des figures hexagonales ou pentagonales. L'existence de symétries d'ordre 2, 3 et 5 indique qu'à ce stade les virions ont acquis une forme icosaédrique. Elles sont constituées d'une masse homogène dense aux électrons de 250 nm de diamètre entourée par une couche claire et limitée par un système membranaire à quatre feuillettes denses d'une épaisseur totale de 20 nm (fig.30, 31),

- particules matures : ces particules dont la structure icosaédrique est révélée de la même manière que pour les particules immatures, ont un diamètre de 380 nm, côté à côté. La partie centrale

d'un diamètre moyen de 225 nm est bordée par un feuillet double de 10 nm d'épaisseur ; elle comporte une masse dense entourée par une couche claire plus ou moins épaisse. Autour de cette structure, on trouve une zone dense de 40 à 45 nm d'épaisseur limitée par un système de deux membranes séparées par un espace clair, d'une épaisseur de 20 nm (fig.33, 39).

4 . Relation entre lésions virales et mortalité.

A l'époque des mortalités, l'existence d'un virus chez Cr. angulata n'étant pas encore connue, son rôle en rapport avec les mortalités n'a pu être directement établi. Cependant la présence de cellules atypiques (avec plages fuchsinophiles), c'est-à-dire avec lésions virales, ayant été établie dès le début de la maladie, et suivie ultérieurement, on peut préciser de fait, à partir des seules études en microscopie photonique, la relation entre l'infection virale et les mortalités.

Sur le tableau sont rassemblées des données concernant différents cas de mortalités pour lesquels on a pu préciser les caractéristiques cytologiques et en particulier l'existence de lésions virales.

On a ainsi mis en évidence plusieurs faits :

- le virus était présent chez Cr. angulata dès la manifestation des premières mortalités, du moins pour le Bassin de Marennes puisque pour Arcachon et la Bretagne les examens ont été différés de 5 à 6 mois respectivement par rapport au début des mortalités,

- durant les trois années qu'ont duré les mortalités, de 1970 à 1973, on a constaté la persistance de lésions virales chez les populations subissant des mortalités,

- géographiquement, le virus a été décelé dans toutes les zones d'élevage du littoral atlantique.

On rappellera qu'en Méditerranée les stocks d'huîtres portugaises situés pour l'essentiel dans l'étang de Thau, n'ont pas été touchés par la mortalité massive.

Date des observations	Sites des mortalités	Natives de	Age	Mortalité %	Lésions virales
1970	Marennes	Seudre	3	45	++
-	-	Ronce	3	30	++
-	-	Casse	3-4	25	+
-	-	Ronce	3	30	+++
octobre	-	Lamouroux	3	40	+
-	-	Ronce	3	30	+
novembre	-	-	3	60	+
décembre	-	La Tremb.	3	20	+++
-	Bretagne	Penerf	3-4		++
1971	Marennes	Seudre	0,5	30	++
avril	Arcachon	Gr. banc	1,5	58	++
août	Marennes	Agnas	3	50	+
1972	Marennes	La Tremb.	3		++
1973	Gironde	Verdon	2-3	35	+

Tableau I - Etat partiel des cas de mortalité en relation avec des lésions virales chez les huîtres.

B - Virose de l'huître du Pacifique Crassostrea gigas Th.

Depuis l'introduction à titre expérimental en 1966 de l'huître du Pacifique Crassostrea gigas, la culture de cette espèce s'est considérablement développée sur les côtes françaises en raison de sa vigueur et de son aptitude à résister aux maladies qui ont dévasté les populations d'huîtres portugaises. Les importations massives de naissain provenant du Japon à partir de 1971 et le semis sur les gisements naturels d'huîtres de Colombie britannique ont permis une extension rapide de l'espèce qui, dans les zones traditionnelles de production d'huîtres portugaises, a trouvé des conditions favorables à sa reproduction. Les résultats de captage de naissain de 1971 (Gras et coll., 1971) sont significatifs à cet égard. Toutefois, cette espèce nouvellement adoptée s'est montrée assez rapidement sensible à certaines conditions du milieu et dès 1973 on devait enregistrer localement des mortalités estivales. Affectant des populations sur parc comme en 1973 dans le Bassin de Marennes-Oléron et en Vendée en 1976 ou encore des huîtres stockées en réserves ou dégorgeoirs. Chez les huîtres affectées on pouvait observer des symptômes histopathologiques indiquant des troubles liés à des conditions hydrologiques anormales, températures élevées (supérieures à 30°C) et taux d'oxygène insuffisant. Des cas de mortalité ont également été constatés en hiver sur des stocks d'huîtres conservées dans les bassins mal oxygénés où proliféraient des ciliés et surtout le flagellé Hexamita inflata.

L'étude systématique des huîtres atteintes a permis de mettre en évidence une infection virale au cours de mortalités estivales survenues en 1977 dans le Bassin d'Arcachon. Toutefois, les circonstances dans lesquelles les examens ont pu être réalisés ont limité les recherches aux seuls aspects histopathologiques.

1 . Microscopie photonique.

Dès que les premières mortalités ont été constatées, un échantillon d'huîtres a été prélevé dans la population affectée. A l'examen direct sur le frais, aucun symptôme n'a été décelé chez ces

huîtres alors en période de frai, certains sujets montrant des gonades en état de réplétion, d'autres ayant partiellement émis leurs gamètes. Chez quelques huîtres (3 %) les coupes histologiques ont cependant permis d'observer dans le conjonctif englobant les diverticules digestifs des cellules comparables aux cellules atypiques décrites dans la virose de la mortalité massive de 1970 chez les huîtres portugaises. Aisément reconnaissables par la présence d'une inclusion cytoplasmique fuchsino-phile, ces cellules étaient toutefois peu nombreuses, le plus souvent isolées avec des hémocytes au sein de petites lacunes dans le tissu conjonctif. Sur coupes semi-fines, on a retrouvé les mêmes faciès cytopathologiques, à savoir l'existence d'une aire intracytoplasmique, basophile de 2 à 3 μ de diamètre avec à sa périphérie des granulations basophiles de faibles dimensions (0,3 μ). Le noyau de la cellule apparaît le plus souvent pycnotique.

2 . Microscopie électronique.

Comme chez l'huître portugaise, les cellules atypiques présentent des lésions virales, l'inclusion fuchsinophile correspondant à un viroplasma à partir duquel se forment les virions que l'on trouve irrégulièrement disséminés dans le cytoplasme (fig.34). Le viroplasma est constitué d'un stroma dense aux électrons (fig.35,36). Les particules résultent du développement de systèmes membranaires qui enveloppent une portion du stroma virogène. Libérées dans le cytoplasme, les particules, de profil hexagonal ou pentagonal possèdent un nucléoïde dense de 250 nm limité par une enveloppe comportant deux membranes à trois feuillettes séparées par un espace granuleux peu dense, l'ensemble ayant une épaisseur de 20 nm. La maturation de ces particules dans le cytoplasme aboutit par condensation du matériel dense à une morphologie plus complexe (fig.37,40). Les virions matures d'un diamètre moyen de 380 nm sont formés d'une zone centrale dense aux électrons, entourée de deux couches claires et opaques ; deux membranes unitaires séparées par un espace clair limitent la particule. Dans quelques cas, on observe dans la cellule infectée un réseau paracristallin dont la taille peut atteindre 0,5 à 1,5 μ m (fig.38).

Le développement de la lésion virale s'accompagne d'une pycnose nucléaire et d'une importante vacuolisation du cytoplasme dans lequel on trouve par ailleurs des ribosomes regroupés en petits amas (fig.37).

PLANCHE X

Virose hémocytaire de Crassostrea angulata

Histologie

Fig. 23. : Coupe passant par la glande digestive. Entre les diverticules (▶) et les canaux digestifs (▷) le tissu conjonctif (tc) profondément dégradé est caractérisé par son aspect granuleux. Cellules infectées groupées à l'intérieur de lacunes (→). X 120.

Fig. 24. : Au voisinage de l'épithélium stomacal (es), le conjonctif détruit est remplacé par une masse tissulaire sans organisation comprenant des cellules infectées et de nombreux hémocytes parmi lesquels on reconnaît des fibres conjonctives (►). X 200.

Fig. 25. : Section transversale d'un palpe labial. L'infection s'est développée dans la région proche de l'épithélium strié, caractérisée par une désorganisation du conjonctif et un accroissement de la densité cellulaire (☆). Elle progresse dans la masse du tissu conjonctif au niveau de lacunes (→) formées entre les cellules de Leydig (cl). Azan de Heidenhain. X 95.

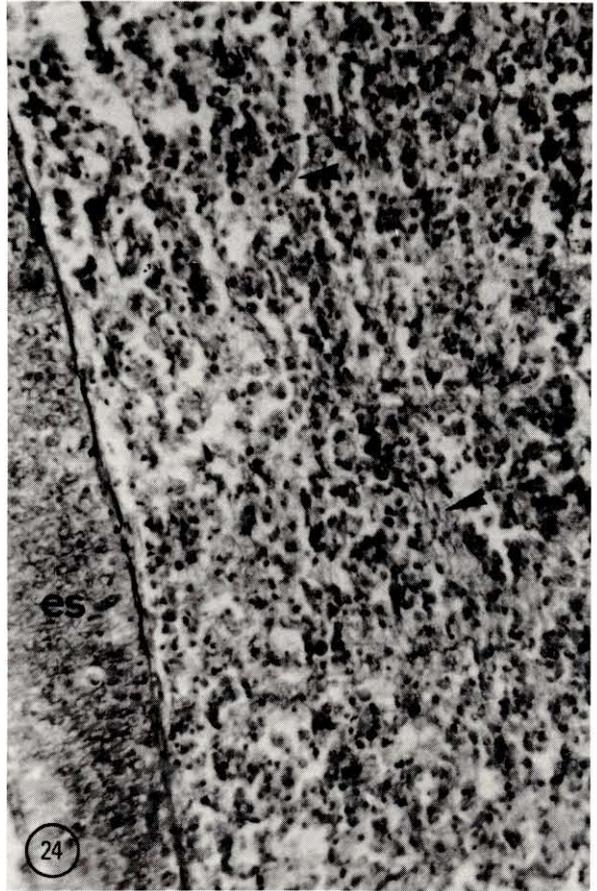
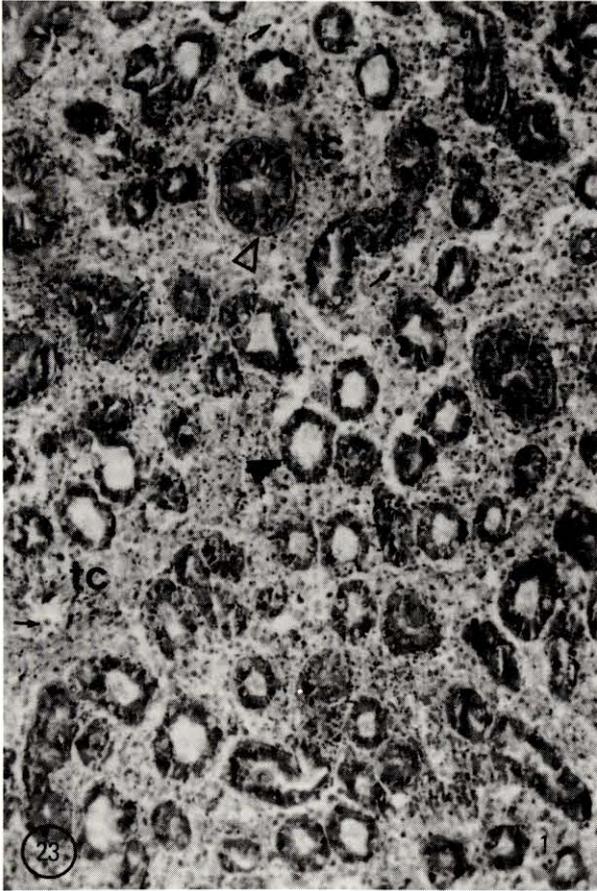


PLANCHE XI

Virose hémocytaire de Crassostrea angulata

Histologie

Fig. 26 et 27. : Dans les premiers stades de la maladie, des cellules atypiques (►), siège de lésions virales, apparaissent infiltrées dans le tissu conjonctif où commencent à se former de petites lacunes (★). Leur élargissement entraîne une dégradation plus complète du conjonctif : d'importants secteurs ne sont occupés que par des hémocytes dont la plupart sont infectés (hi). Hémocytes sains:(h). Coloration azan de Heidenhain. X 1000.

Fig. 28. : Coupe semi-fine passant par le tissu interstitiel au niveau de la glande digestive. Au sein des tissus altérés, on reconnaît des cellules infectées (ci) renfermant une aire (▷) et des granulations (→) basophiles; leur noyau est peu chromophile:(n). Cellules brunes : (br); fibres conjonctives : (f). Coloration par le bleu de Sahli. X 3000.

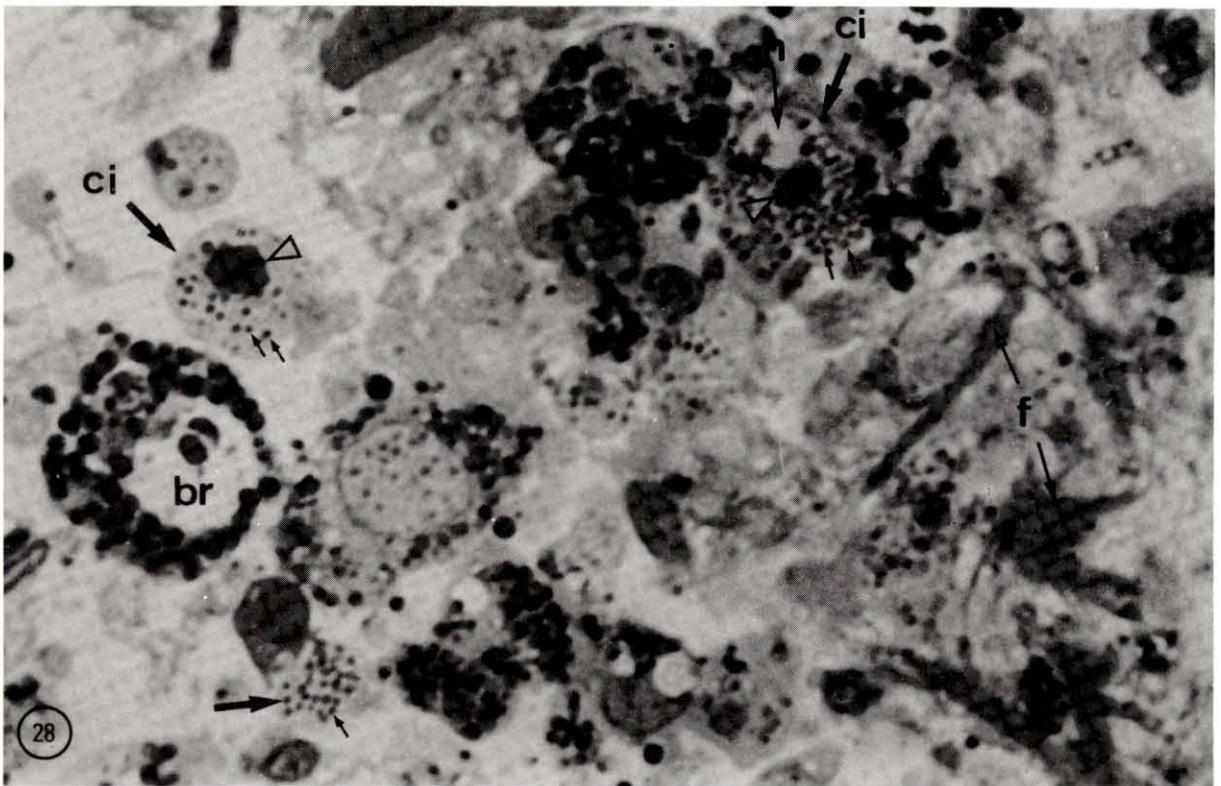
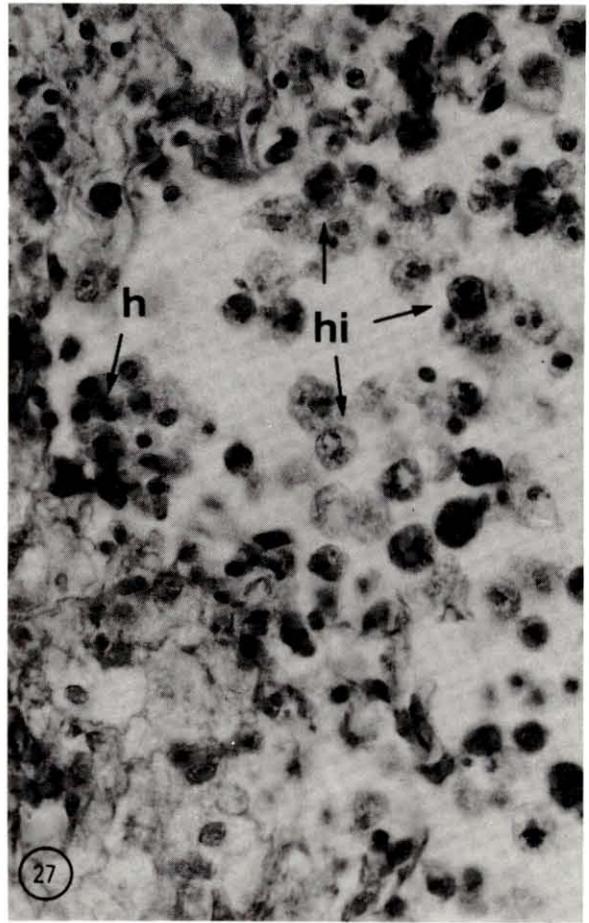
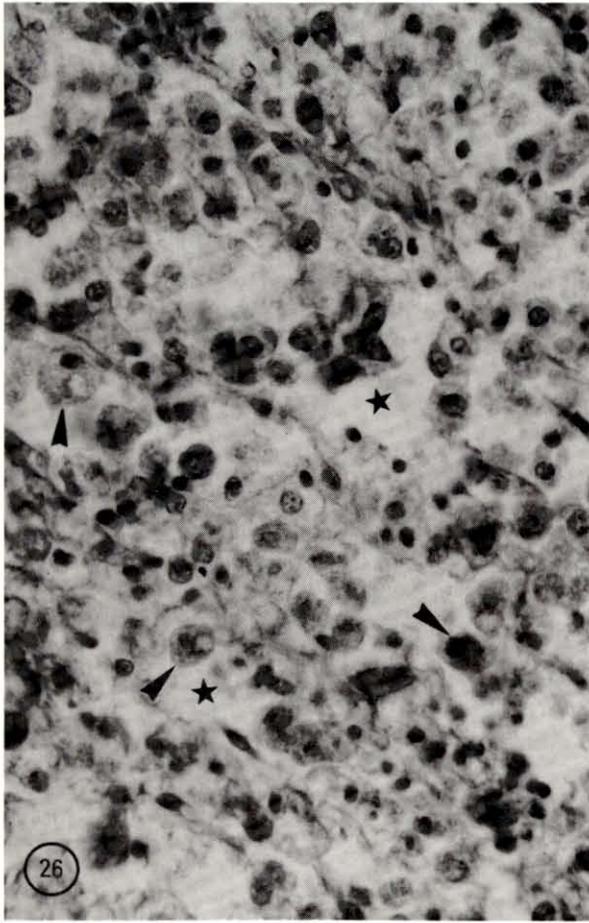


PLANCHE XII

Virose hémocytaire de Crassostrea angulata

Ultrastructure

Fig. 29. : Section d'une cellule infectée. Le cytoplasme est occupé par une plage virogène (v) et par des virions irrégulièrement dispersés (▶) L'aspect du noyau contraste avec celui des hémocytes voisins (h) : le nucléoplasme dépourvu d'amas denses de chromatine comporte de larges zones claires aux électrons. X 13000.

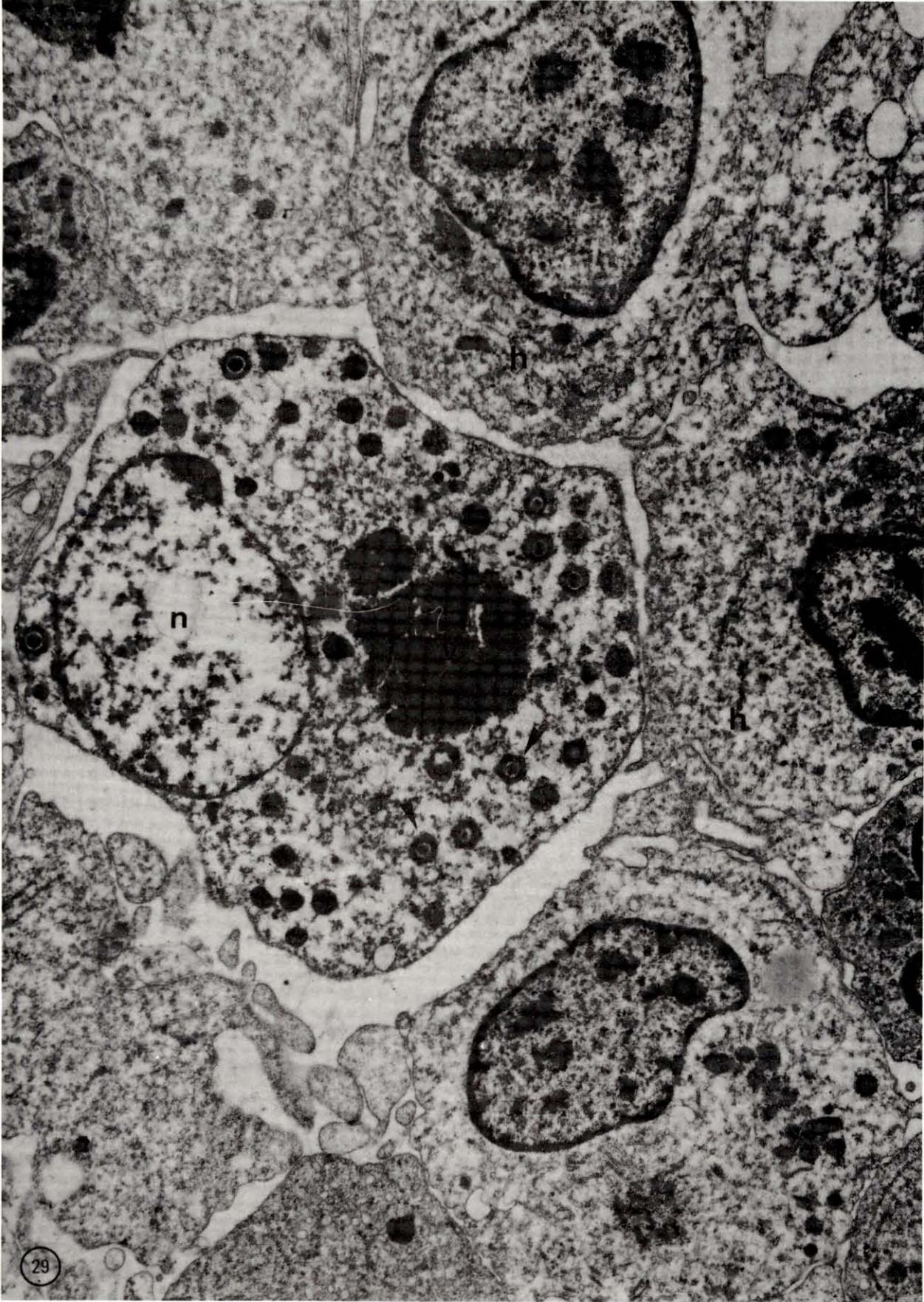


PLANCHE XIII

Virose hémocytaire de Crassostrea angulata

Ultrastructure

Fig. 30. : Détail d'une lésion virale cytoplasmique. Sur la bordure de l'aire virogène (vp) sont visibles des particules à différents stades de leur morphogénèse. Systèmes membranaires (▷). Particules virales immatures libérées dans le cytoplasme (vi). X 45000.

Fig. 31. : Section d'une particule virale immature. Le matériel granuleux issu de la plage virogène est enveloppé par un double système membranaire (▶). X 125000.

Fig. 32. : Par rotation de la figure 31, le matériel viral apparaît à ce stade d'évolution de la particule, plutôt condensé suivant une couche périphérique. A noter le renforcement du profil à symétrie d'ordre 5 du virion. X 125000.

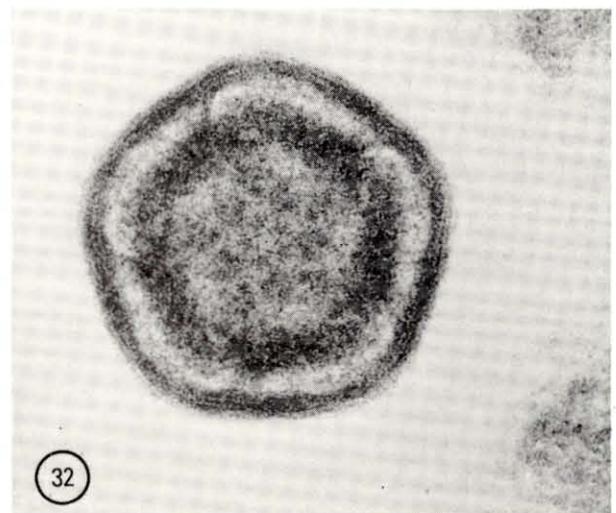
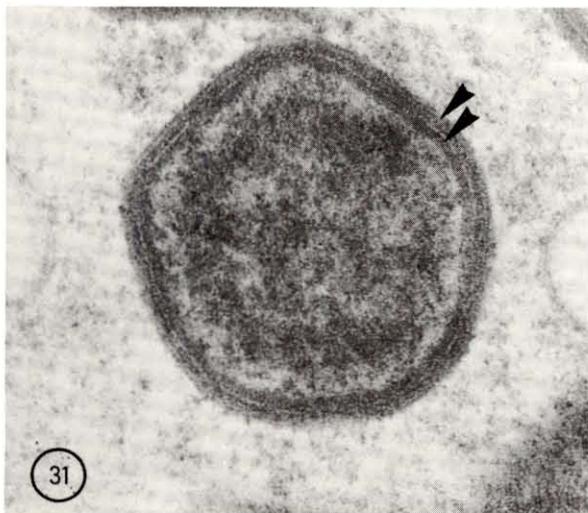
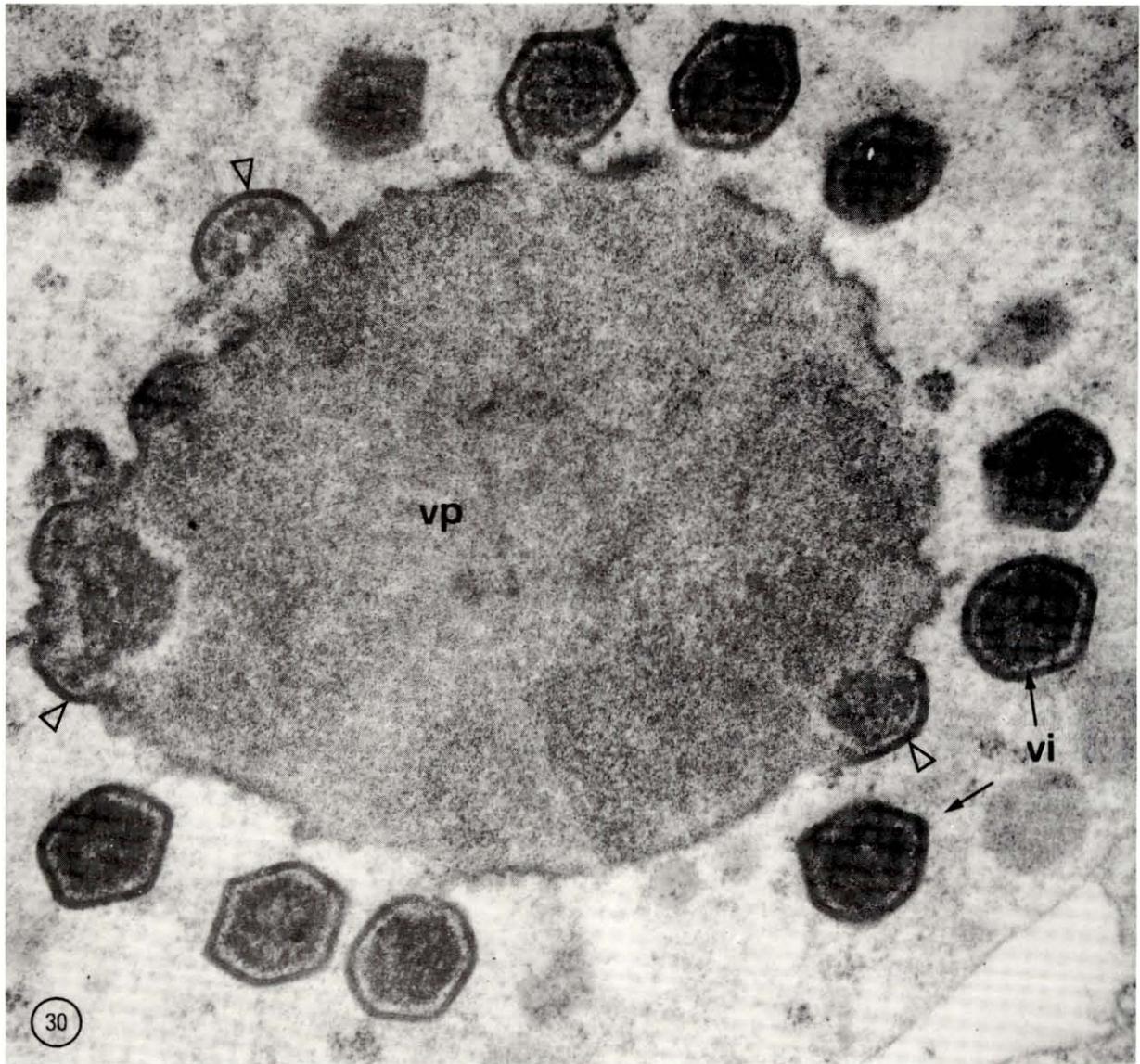


PLANCHE XIV

Virose hémocytaire de Crassostrea angulata
Ultrastructure

Fig. 33. : Virions matures dans le cytoplasme d'un hémocyte infecté. A ce stade on distingue nettement les deux membranes enveloppant la particule (▶). On notera la formation de vacuoles cytoplasmiques (va) et de petits groupements de ribosomes (r). Noyau (n) ; mitochondries (m).
X 72000.

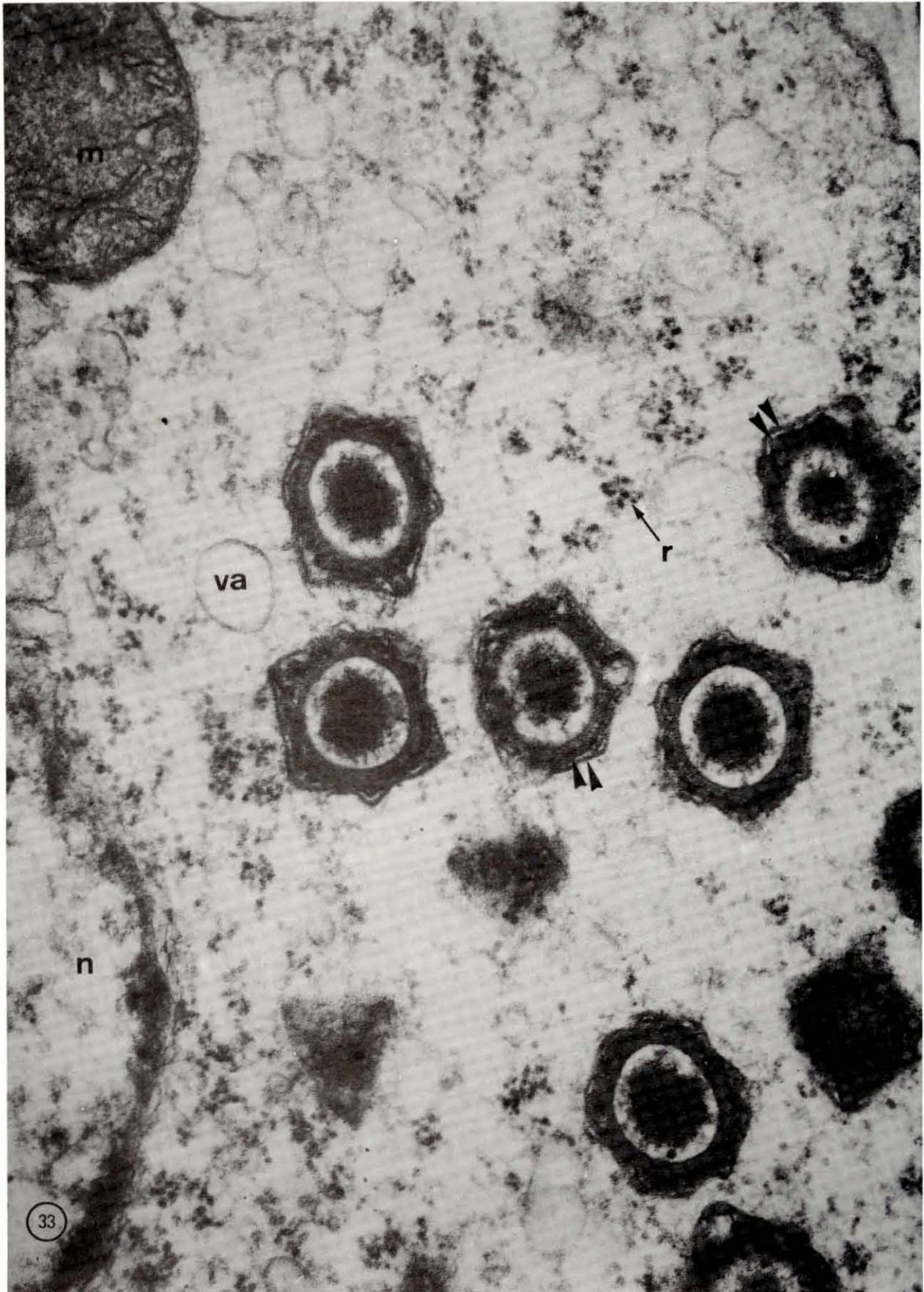


PLANCHE XV

Virose hémocytaire de Crassostrea gigas
Ultrastructure

Fig. 34. : Section d'un hémocyte infecté isolé entre les cellules du tissu conjonctif : cellules de Leydig (cl), fibrocyte (f). Des virions matures sont dispersés dans le cytoplasme où sont visibles de petites vacuoles claires (▶) et des mitochondries à matrice dense (m). La pyknose du noyau (n) est marquée par un éclaircissement du nucléoplasme : une fine couche périphérique de chromatine est encore apparente (ch). X 16000.

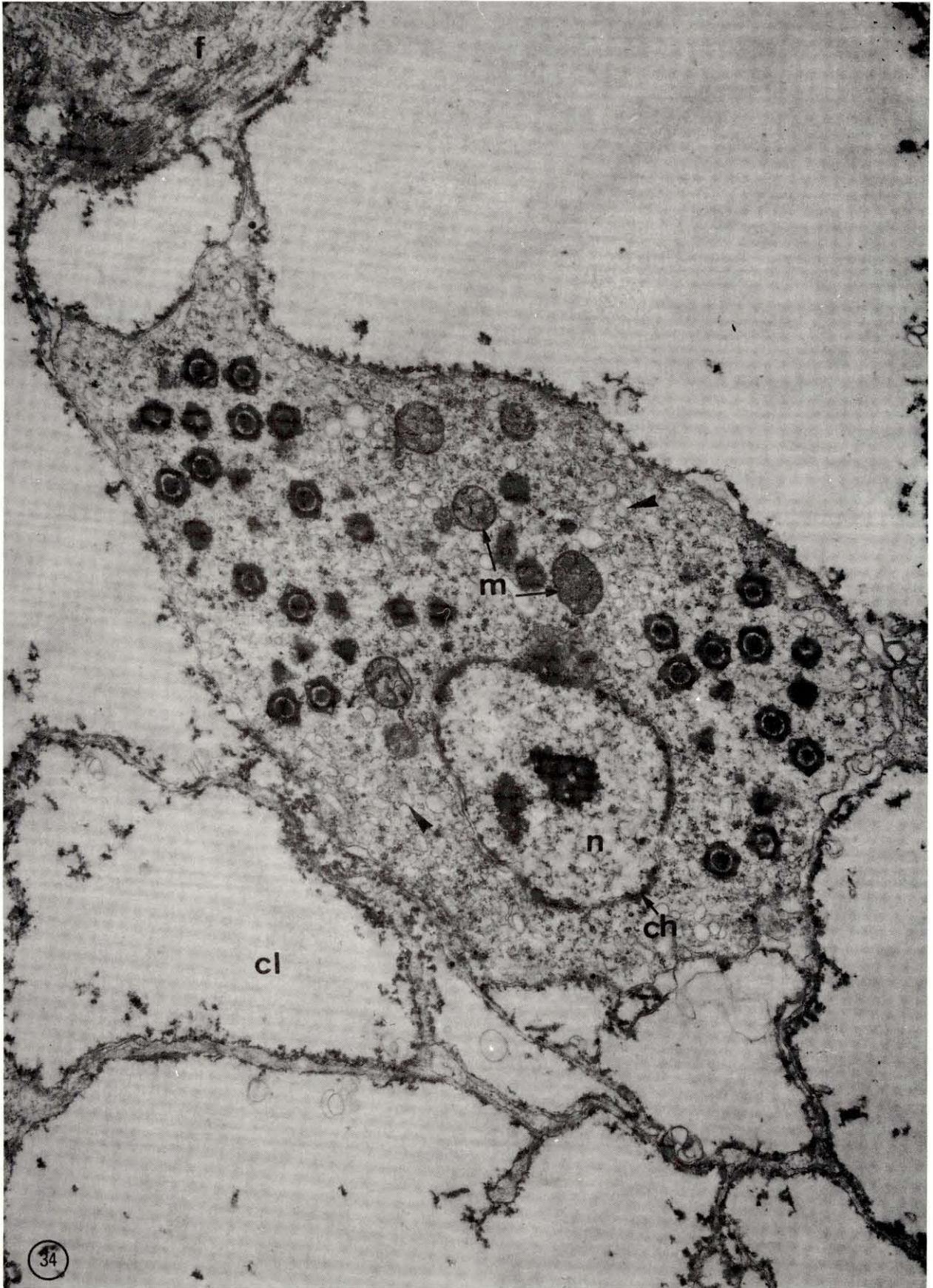


PLANCHE XVI

Virose hémocytaire de Crassostrea gigas
Ultrastructure

Fig. 35 et 36. : Sections de cellules infectées montrant l'évolution de la cyto-nécrose. Le développement des lésions virales s'accompagne d'une multiplication (35) et d'une extension (36) des vacuoles cytoplasmiques claires (►). La disparition des structures internes des mitochondries (m) précède une dégradation plus profonde de ces organites (→). Formation à caractère dégénératif (▷). X 21000.

Fig. 37. : Virions matures libérés dans le cytoplasme de la cellule atteinte (v). Vacuoles claires (►). Amas de ribosomes (r). X 40000.

Fig. 38. : Formations membranaires intracytoplasmiques présentant un arrangement régulier de type paracristallin (*). Virion (v). Vacuole (►). X 65000.

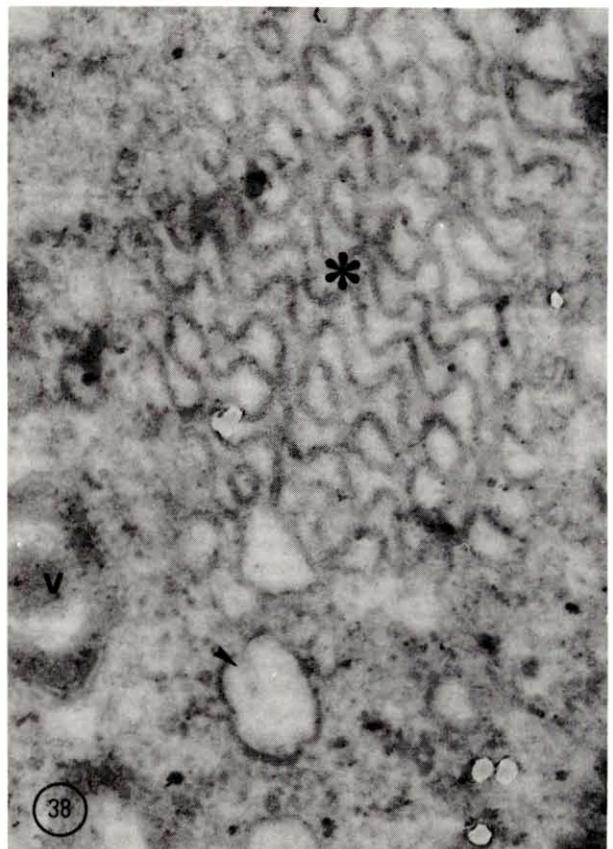
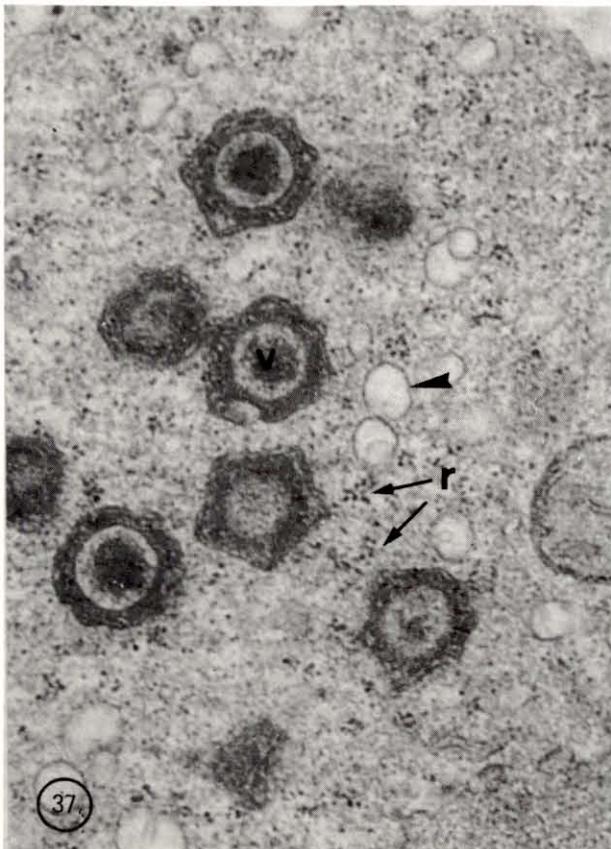
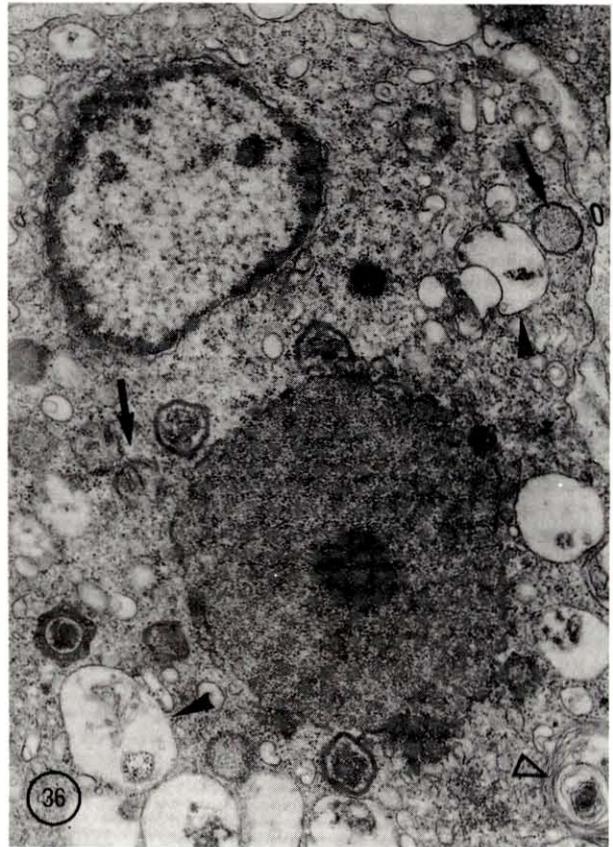
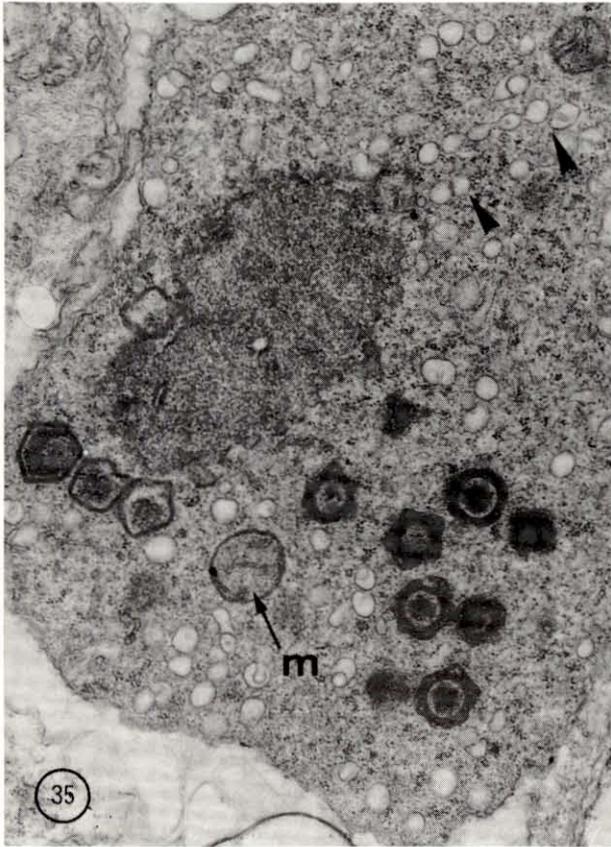


PLANCHE XVII

Viroses des huîtres

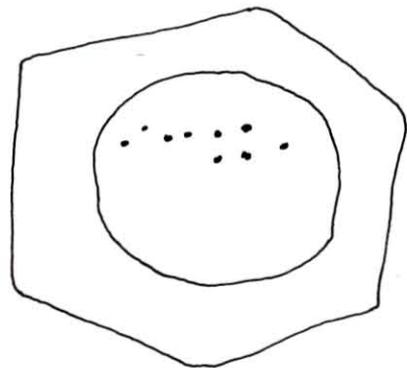
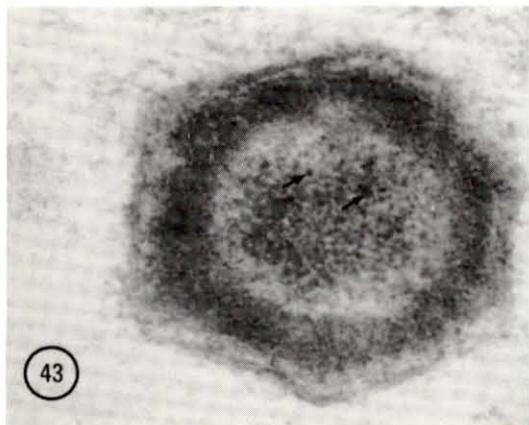
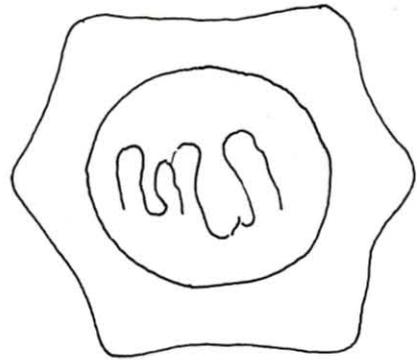
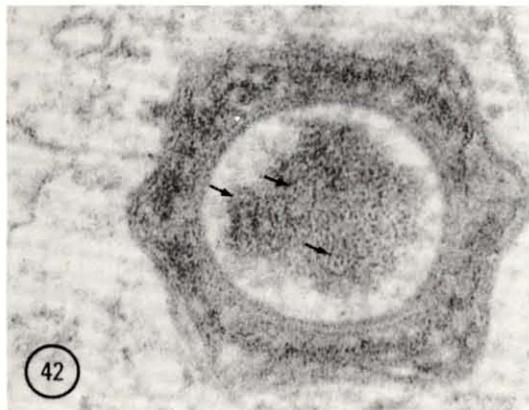
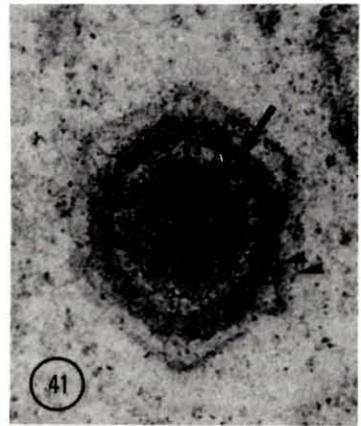
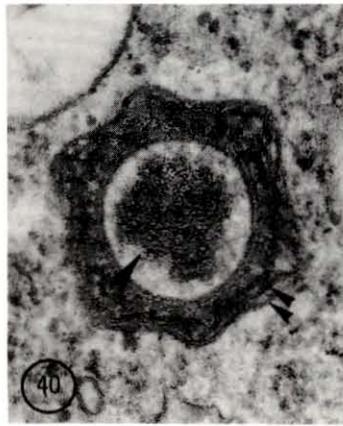
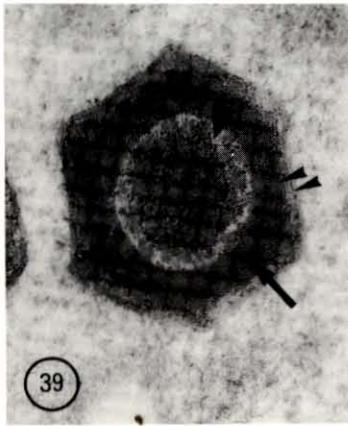
Ultrastructure

Fig. 39. : Virus de l'infection hémocytaire de Cr. angulata . La densité du nucléoïde s'atténue à sa périphérie (►), contrastant avec l'opacité de la couche dense qui l'entoure (→); système membranaire enveloppe:(➤). X 80000.

Fig. 40. : Virus de l'infection hémocytaire de Cr. gigas. Autour d'une zone centrale dense, le nucléoïde comporte une large couche claire (►) limitée par deux feuillets denses séparés par un feuillet clair (≡). X 80000.

Fig. 41. : Virus de la nécrose des branchies de Cr. angulata. Autour du nucléoïde (►) le matériel viral forme une couche dense régulière (→); la déformation des membranes enveloppes (➤) pourrait résulter d'un défaut de fixation. X 80000.

Fig. 42 et 43. : Détail de la structure du virus de l'infection hémocytaire de Cr. gigas et de Cr. angulata. Sur certaines sections, l'arrangement de l'ADN est visible : il apparaît suivant l'orientation des coupes, sous forme d'un filament sinueux replié sur lui-même ou de taches opaques disposées en alignements plus ou moins réguliers(→). X 118000.



C - Discussion

Deux infections virales ont été décrites chez les huîtres du genre Crassostrea. Dans les deux cas examinés (Cr. angulata et Cr. gigas), les caractéristiques des virus et le développement de l'infection sont similaires sinon identiques.

Durant les mortalités de 1970, l'huître portugaise avait montré une grande sensibilité à la virose alors que l'huître du Pacifique s'était révélée totalement résistante. L'observation du même type de virose chez Cr. gigas en 1977 laisserait supposer qu'après dix ans d'acclimatation sur les côtes françaises atlantiques, cette espèce a perdu de sa vigueur et de sa résistance, sans exclure toutefois la possibilité d'apparition d'une nouvelle souche de virus d'infection hémocytaire.

Enfin, bien que ces maladies n'aient pas été reproduites expérimentalement, toutes les données acquises sur le plan étiologique indiquent que ces formes de viroses sont particulièrement dangereuses pour les huîtres puisqu'elles ont été à l'origine d'une véritable panzootie qui s'est étendue de la rivière d'Étel à l'embouchure du Guadalquivir.

o

o o

III - ETUDE COMPARATIVE DU VIRUS DE LA NECROSE DES BRANCHIES ET DES VIRUS DES INFECTIONS HEMOCYTAIRES DES HUITRES.

A - Comparaison entre les deux types de virus étudiés.

Les conditions dans lesquelles ont été mises en évidence des viroses d'huîtres sur les côtes françaises n'ont pas permis d'isoler les virus et donc de les étudier en contraste négatif ni d'en faire une étude biochimique approfondie. Un certain nombre de caractéristiques ont néanmoins été précisées par l'histo-cytologie : c'est sur la base de ces données que l'on comparera les agents infectieux des huîtres Cr.angulata et Cr. gigas. Pour simplifier le texte on utilisera les abréviations suivantes :

V.N.B. : virus de la nécrose des branchies

V.I.H. : virus de l'infection hémocytaire.

a) Taille, morphologie et structure.

Les trois virus décrits présentent de grandes similitudes pour ce qui est de la taille, la morphologie et la structure.

Dans le tableau ci-après sont regroupées les valeurs des principales caractéristiques dimensionnelles.

Hôte	VNB Cr.angulata	VIH (70) Cr.angulata	VIH (77) Cr. gigas
: \emptyset côté à côté (nm)	: 380-390 : 385	: 372-387 : 379	: 373-389 : 381
: \emptyset nucléoïde (nm)	: 250 ± 8	: 250 ± 5	: 250 ± 5

Le diamètre moyen (côté à côté) voisin de 380 nm pour les deux virus d'infections hémocytaires apparaît légèrement supérieur pour le VNB. Les variations observées pour un même virus paraissent liées en premier lieu au degré de maturation qui se traduit par une condensation plus ou moins importante du matériel viral. S'ajoute à

cette cause de variation les conditions de traitement des échantillons et notamment de la fixation. Celle-ci en effet peut être considérée comme étant vraisemblablement à l'origine d'artefacts divers : contours sinueux des membranes, condensation irrégulière du matériel contenu entre le nucléoïde et le système membranaire enveloppe.

De forme icosaédrique, les virions possèdent la même structure :

- un nucléoïde central dont le matériel est plus ou moins condensé,
- deux feuillets denses séparés par un espace plus clair, d'une épaisseur totale de 10 à 12 nm limitant le nucléoïde,
- une zone intermédiaire dense,
- un système membranaire enveloppe de 15 à 20 nm d'épaisseur, constitué de deux membranes tripartites séparées par un espace périplasmique plus ou moins granuleux.

En dehors des variations relatives du diamètre du nucléoïde, qui globalement suivent les variations du diamètre des particules, les différences observées entre les trois types de virions concernent l'état de condensation du nucléoïde qui se manifeste par l'existence à sa périphérie d'une couche claire d'épaisseur variable chez les VIH (38 à 40 nm pour le VIH de Cr. gigas et 15 à 20 nm pour le VIH de Cr. angulata). Chez le VNB, le matériel dense du nucléoïde est réparti d'une façon plus uniforme, avec une zone périphérique plus claire ne dépassant pas 5 nm d'épaisseur.

On note par ailleurs dans le cas du VNB des variations du même type concernant la zone intermédiaire. Celle-ci forme une couche homogène de matériel peu dense par rapport au nucléoïde. Par contre, pour ce qui concerne les VIH, ce matériel est le plus souvent ramassé en agrégats irréguliers denses aux électrons.

b) Morphogénèse.

Le mode de virogénèse est identique chez les deux types de virus étudiés (VNB et VIH). Elle se réalise à partir d'une aire cytoplasmique de matériel granuleux dense à la périphérie de laquelle se différencient des systèmes membranaires constituant les limites des particules. Les virions immatures dérivant de ce processus, comportent à l'intérieur du système membranaire un core de matériel granuleux homogène ; ils évoluent en particules matures à structure plus complexe. Si chez les VIH on ne trouve que ces deux catégories de particules, on note dans le cas du VNB l'existence de particules à structure intermédiaire. Ces particules sont caractérisées par la présence d'une aire arrondie de matériel fortement opaque aux électrons, bordée par une couche claire. Cet ensemble paraît se différencier à la périphérie mais tend à occuper une situation plus centrale au fur et à mesure que sa taille s'accroît. Cette phase intermédiaire dans le processus de maturation serait moins fugace dans le cas du VNB que dans le cas des VIH chez lesquels elle n'a jamais été observée. Cette donnée pourrait être mise en relation avec la dynamique de la virogénèse : il a été en effet constaté que le développement de l'infection était plus rapide dans les mortalités massives à VIH que dans la maladie des branchies.

c) Symptômes cytologiques et histologiques.

Si dans leurs caractéristiques morphologiques et ultrastructurales les VIH et le VNB présentent peu de différence, ils se distinguent nettement par les symptômes qu'ils provoquent.

Les lésions causées par les VIH comportent un seul viroplasma de 2 à 3 μ de diamètre entouré de particules et associé à une dégradation du cytoplasme et principalement du noyau qui perd sa chromatine et son nucléole.

A l'inverse, dans le cas du VNB, le viroplasma est composé de plusieurs aires qui par endroits confluent, formant un viroplasma de 10 à 20 μ ; ces différentes aires possèdent une zone centrale plus dense

aux électrons.

L'apparition du stroma virogène s'accompagne d'une hypertrophie de la cellule infectée et, conjointement, d'une hypertrophie du noyau qui finit par perdre la plus grande partie de sa chromatine et son nucléole. L'hypertrophie précède la formation des virions, ce qui indiquerait que l'infection comporte une phase de réplication de l'acide nucléique indépendante de la formation des virions. L'absence de synchronisation entre les deux phénomènes expliquerait l'existence de cellules plus ou moins hypertrophiées renfermant une inclusion riche en ADN dont la taille serait en relation avec le degré de développement de l'infection.

Les différences notées dans l'action cytopathogène des VIH et du VNB sont confirmées par la spécificité des symptômes histopathologiques de chacun de ces deux types de virions.

Les VIH ont une action "systémique" par la destruction des hémocytes à tous les niveaux du système sanguin dans les vaisseaux et les sinus mais aussi dans les lacunes qui se forment au niveau du tissu conjonctif : l'infection est ainsi étendue à l'ensemble des organes.

La maladie des branchies au contraire est strictement localisée aux branchies et aux palpes, l'extension des lésions s'effectue à partir d'un ou plusieurs points d'infection d'une façon progressive, la réaction inflammatoire se manifestant uniquement au voisinage des lésions.

A notre connaissance, le syndrome double VIH-VNB n'a jamais été signalé chez un même hôte.

B - Comparaison avec le groupe des Iridovirus.

Les seules données ultrastructurales, histo-et cytochimiques réunies sur les deux catégories de virus étudiés sont insuffisantes pour rattacher ces virus à un groupe précis. Toutefois, en se basant sur les caractères morphologiques et ultrastructuraux, sur la nature de l'acide nucléique et sur le mode de virogénèse, il apparaît que des points com-

WV
→

muns existent entre ces virus et les Iridovirus principalement et les virus du "lymphocystis", groupes voisins sur le plan taxonomique (Zwillenber et Wolf, 1968), les virus du "lymphocystis" ayant été récemment admis comme membres possibles du genre Iridovirus (Matthews, 1979). Des similitudes peuvent enfin être notées avec les virus de la nécrose érythrocytaire de certains poissons marins (morue, hareng) qui ont été provisoirement insérés dans le groupe des Iridovirus (Reno et coll., 1978).

A côté des trois virus mis en évidence chez les huîtres françaises, un seul cas de virose cytoplasmique d'huître a été signalé par Elston (1979). Les lésions virales sont observées dans le cytoplasme des cellules du velum des larves de Cr.gigas subissant d'importantes mortalités en bassins d'écloseries (Leibovitz et coll., 1978). Les virions ont un diamètre de 228 nm ; leur structure, voisine de celle du VIH, en diffère par l'existence d'une seule membrane limitant la particule et par le profil pararectangulaire de la zone dense centrale.

La morphologie virale est similaire mais deux phases distinctes sont définies par l'auteur : une première comportant des particules incomplètes (particules creuses) associées à une aire cytoplasmique dense et une seconde où les particules complètement formées sont associées à de grandes vacuoles claires aux électrons. Si, en ce qui concerne ce virus, aucune précision n'a été donnée par Elston (1979) du point de vue systématique, il convient d'indiquer qu'un virus très proche mais plus petit (120-140 nm) décrit par Rungger et coll. (1971) chez le mollusque marin Octopus vulgaris a été classé dans le genre Iridovirus (Fenner, 1976).

En tant que désoxyribovirus cytoplasmiques icosaédriques (ICDV), les VIH et VNB apparaissent naturellement très proches des Iridoviridae (Mc Auslan et Armentrout, 1974).

Par leur taille, les virus des huîtres se rangent parmi les plus gros virus à symétrie cubique donc parmi les Iridovirus. Dans ce groupe on trouve notamment avec les virus du lymphocystis, des virus dont la taille se situe entre 130 et 360 nm (Kelly et Robertson, 1973).

Sur ce plan, on peut aussi les mettre en parallèle avec certains virus de la nécrose érythrocytaire des poissons (Pen), en particulier celui de la morue Gadus morhua dont le diamètre moyen est de 330 nm (310-350) (Walker et Sherburne, 1977).

La morphogénèse cytoplasmique et la structure des virus étudiés nous ramènent encore aux groupes de virus cités précédemment, bien que sur certains points ils montrent par rapport à ces derniers une certaine originalité. C'est en effet un processus identique à celui de la formation des virus d'huître (VIH et VNB) qui a été décrit dans le cas de plusieurs infections dues à des Iridovirus (Devauchelle et Durchon, 1973 ; Kelly et Tinsley, 1972 et 1974). Dans le cas du virus NIV de Nereis diversicolor une deuxième modalité de virogénèse a toutefois été signalée avec formation initiale des enveloppes et remplissage progressif des particules (Devauchelle et Durchon, 1973). Par ailleurs, les images fournies par Walker et Sherburne (1977) indiquent une morphogénèse de même type pour les VEN.

La structure générale des virions de cet ensemble de virus comprend un nucléoïde central sphéroïde, opaque aux électrons, enveloppé par une couche protéique (la capsid) limitée par un système membranaire plus ou moins complexe comportant deux membranes tripartites. Bien apparente chez les virus d'huîtres cette configuration se retrouve chez le NIV (Devauchelle et Durchon, 1973) où, selon ces auteurs, l'ensemble trilamellaire externe correspondrait à une couche de sous unités.

Chez le virus du Lymphocytis la composition de l'enveloppe serait équivalente. Zwillenberg et Wolf (1968) indiquent en effet que chez Lepomis macrochirus les virions sont limités par un ensemble pentalamellaire dont le feuillet médian opaque est le plus épais ; une telle disposition conduit à suggérer que ce feuillet médian pourrait résulter de la caolescence des feuillets contigus à l'espace séparant les deux complexes membranaires tripartites distincts chez les virus d'huîtres.

Enfin, selon Walker et Sherburne (1977), le virus agent de la PEN de la morue posséderait également une double enveloppe sans que l'on puisse préciser si l'enveloppe externe dérive d'un codage cellulaire ou viral.

En ce qui concerne la répartition des virions dans le cytoplasme, aucun arrangement paracristallin n'a été observé dans les cellules d'huître infectées comme c'est le cas chez certains Iridovirus (Walker et Weissenberg, 1965 ; Devauchelle et Durchon, 1973) mais il ne s'agit pas là d'un caractère constant du groupe.

Par contre on retrouve chez les VIH des inclusions paracristallines très similaires aux inclusions observées au cours de la replication de virus iridescents chez des insectes (Kelly et Tinsley, 1974 ; Kelly, 1976), des formations du même type ayant été par ailleurs signalées dans des cellules infectées par un Iridovirus responsable de lésions du muscle chez Octopus vulgaris (Rungger et coll., 1971).

Enfin, si l'on considère l'effet pathogène, on peut établir certains rapprochements entre le VNB, les VIH et les virus évoqués ci-dessus. Sur ce plan, un des points les plus intéressants demeure l'hypertrophie des cellules infectées par le VNB. Il semble en effet qu'il s'agisse là d'un phénomène analogue à celui de la production de cellules géantes observées dans la maladie "lymphocystis" avec toutefois un rapport d'accroissement en taille des cellules infectées plus faible puisqu'il ne dépasserait pas 8/1 chez les huîtres, contre 150/1 chez les Poissons.

C - Conclusion.

Si, au plan de la pathologie comparée des Invertébrés marins, la description de viroses chez les huîtres élargit un domaine de recherche jusqu'alors très limité, pour ce qui concerne les Mollusques, elle soulève à l'échelle de la virologie générale certains problèmes dont la solution est liée aux possibilités futures d'isolement des agents infectieux incriminés. Ce n'est en effet qu'à partir de virus purifiés que pourront

être entreprises l'étude biochimique de l'acide nucléique et la détermination de la structure du génome et de la structure polypeptidique des virus. De telles informations nécessaires pour comparer les virus entre eux s'avèrent par ailleurs indispensables pour établir leur position systématique.

Pour le moment, les données relatives à la nature de l'acide nucléique (ADN), à la taille, à la structure et aux modalités de la morphogénèse incitent à rapprocher les deux types de virus de la famille des Iridoviridae en retenant que certains caractères structuraux des virions leur confère une position particulière par rapport à ce groupe.

o o
o

CHAPITRE V

ETUDE D'INFECTIONS RICKETTSIENNES CHEZ LES MOLLUSQUES

BIVALVES MARINS

A l'occasion d'examens zoosanitaires de populations de bivalves marins provenant de gisements naturels ou d'élevage, plusieurs cas d'infections dues à des microorganismes de type rickettsien ont été reconnus au cours de ces dernières années sur les côtes de France.

Si la présence de ces germes est sporadique chez l'huître plate O. edulis (Comps et coll., 1977) ou rare chez les huîtres creuses (Cr. angulata, Cr. gigas) (Comps et Deltreil, 1979 ; Comps et coll., 1977), elle est plus régulière chez des fouisseurs tels Donax trunculus qui se sont révélés être des hôtes quasi permanent de rickettsies (Comps et Raimbault, 1978 ; Comps et coll., 1979).

Bien qu'associées à des phénomènes suggérant une certaine morbidité, il n'a pas été démontré que ces rickettsies en étaient la cause. Leur rôle chez les mollusques n'est pas évident et pose à nouveau le problème des relations hôte-parasite. Ces questions seront évoquées dans la suite conjointement aux aspects taxonomiques.

I - INFECTION RICKETTSIENNE DE L'HUITRE CRASSOSTREA GIGAS TH.

Au cours des mois de février et mars 1977, plusieurs cas de mortalité ont été signalés dans certains élevages d'huîtres Cr. gigas du bassin de Marennes-Oléron.

Aucun symptôme externe n'était relevé sur les huîtres atteintes qui au contraire présentaient un état d'engraissement normal pour l'époque.

Limitées à des huîtres élevées en claires (secteur d'Arvert), ces

mortalités ont été mises en relation avec d'importantes variations de conditions de milieu mais devaient également être associées à la présence d'un germe microbien infectant l'épithélium digestif.

1 - Histopathologie.

Les cellules infectées par la rickettsie ne sont trouvées qu'au niveau de l'épithélium des diverticules digestifs où l'on observe de larges plages sensiblement ovoïdes de 10 à 30 μm de diamètre (fig. 44). Localisées dans le cytoplasme des cellules sécrétrices elles ont un aspect finement granuleux mis en évidence par la coloration de Mann-Dominici qui révèle par ailleurs leur caractère basophile (fig. 45). On note également qu'elles sont Feulgen positif et Gram négatif.

La cellule hôte est hypertrophiée : dans son cytoplasme, on trouve des grains de sécrétion comme dans les cellules saines mais aussi de nombreuses et volumineuses vacuoles occupant la région distale au voisinage de la lumière du tubule.

Cette infection limitée à un nombre restreint de cellules épithéliales n'entraîne pas une dégradation profonde de l'épithélium et consécutivement, il apparaît difficile, sur la base de ces observations d'attribuer à la rickettsie un rôle dans les mortalités des huîtres.

2 - Microscopie électronique.

La microscopie électronique a révélé la nature microbienne des granulations contenues dans la vacuole cytoplasmique. A l'intérieur de celle-ci sont en effet regroupés de nombreux microorganismes en forme de bâtonnets allongés plus ou moins effilés aux extrémités. Leur longueur varie entre 1,5 et 2,5 μm et leur diamètre entre 500 et 600 nm (fig. 46).

Ces germes sont limités par un système membranaire de 24 nm d'épaisseur, formé de deux membranes unitaires, une paroi externe et une membrane plasmique, séparées par un espace périplasmique granuleux.

A l'intérieur, des grains denses (de 15 nm) ayant l'aspect de ribosomes sont irrégulièrement répartis au voisinage de la membrane plasmique. On n'observe pas de nucléoïde distinct mais dans la partie centrale de la particule, un réseau fibreux lâche correspondrait à l'ADN (fig. 47).

On reconnaît des figures de division binaire suivant des modalités comprenant un étirement des cellules accompagné d'une constriction latérale et conduisant à la formation de chaînes de bactéries.

3 - Position systématique. Discussion.

Les caractéristiques de ce microorganisme permettent de le rattacher à l'ordre des Rickettsiales où en tant que germe associé à un invertébré il pourrait être inséré dans la tribu des Wolbachieae Philip, 1955, en notant par ailleurs que sa localisation au sein de vacuoles cytoplasmiques suggérerait la possibilité d'un rapprochement avec les Coxiella (Rickettsiaceae). Toutefois, si certaines Coxiella peuvent présenter des formes de résistance (Burton et coll., 1971), aucune image de forme dense alternant avec les formes végétatives n'a été décelée dans le cas de la rickettsie de l'huître. Cette dernière observation l'éloignerait de la plupart des rickettsies pathogènes d'Invertébrés, notamment des Rickettsiella (Vago et Meynadier 1965 ; Meynadier et Montsarrat, 1969 ; Vago et coll., 1970 ; Morel, 1977). On notera enfin une certaine communauté de caractères morphologiques et ultrastructuraux existant entre cette rickettsie et des germes rencontrés dans les cellules digestives de Mya arenaria (Harshbarger et coll., 1977) ou encore chez Tellina tenuis (Buchanan, 1978). Pour cette dernière, l'auteur mentionne également des ressemblances avec les Rickettsiaceae du genre Coxiella.

II - INFECTION RICKETTSIENNE DE DONAX TRUNCULUS L.

A la suite de mortalités signalées au début de 1978 dans les populations naturelles de Donax trunculus de la région du Grau du Roi nous avons mis en évidence une infection rickettsienne de l'épithélium des diverticules digestifs (Comps et Raimbault, 1978).

Les contrôles effectués à différentes époques dans plusieurs secteurs de la côte languedocienne révélèrent comme l'indique le tableau ci après, qu'une proportion proche de 25 % des sujets échantillonnés était atteinte.

Lieu de prélèvement	Date de prélèvement	Animaux infectés (%)
Les Saintes Maries	15 février	20
	16 "	26
Grau du Roi	23 février	25
	30 mai	26
Valras	22 mars	46

1 - Histopathologie.

Cette rickettsie se développe dans les cellules sécrétrices de l'épithélium des diverticules digestifs, à l'exclusion de tout autre tissu (fig. 48). Elle forme à l'intérieur de vacuoles cytoplasmiques des inclusions granuleuses Gram négatif dont les affinités tinctoriales indiquent des variations importantes de la basophilie (fig. 49). Sensiblement sphériques, ces formations mesurent de 5 μ m à 12 μ m de diamètre (fig. 50). Le plus souvent le germe occupe une vacuole unique dans la cellule hôte mais on rencontre aussi deux ou trois vacuoles dans la même cellule. Les cellules infectées sont hypertrophiées mais ne présentent pas de modifications nucléaires ou cytoplasmiques évidentes. Plus généralement d'ailleurs l'épithélium des diverticules ne paraît pas affecté dans sa structure, l'effet

cytopathogène étant limité à un nombre relativement réduit de cellules.

2 - Microscopie électronique.

Tout en confirmant la nature rickettsienne du germe et sa localisation au sein de vacuoles intracytoplasmiques, la microscopie électronique a permis d'en préciser la structure et différents aspects de son évolution dans les tissus.

a - Les germes

Les rickettsies ont une forme allongée de section cylindrique, plus ou moins effilée aux extrémités ; leur taille atteint 2,5 à 3 μm pour un diamètre variant entre 500 et 700 nm (fig. 51).

Ces corps sont limités par deux membranes tripartites séparées par un espace périplasmique granuleux de 10 nm (fig. 52). Ils renferment un matériel granuleux dense aux électrons associé à un réseau lâche de fibrilles. La division du microorganisme s'effectue, comme l'indiquent certaines figures, suivant un mode de division binaire résultant d'une constriction latérale (fig. 50).

Conjointement à un épaissement de la membrane vacuolaire (fig. 53, 54, 55), on note parfois des modifications importantes de la forme et de la structure des germes, suggérant une dégénérescence de ces derniers. La membrane externe est fortement déformée avec de nombreuses ondulations tandis que la membrane plasmique n'est généralement plus visible (fig. 55).

Le matériel cytoplasmique est condensé en amas irréguliers plutôt répartis dans les zones périphériques. Ces modifications ne peuvent être assimilées à un processus de restructuration des particules comme il en existe chez les microorganismes à cycle de type chlamydien.

b - Action cytopathogène

Le plus souvent regroupées à l'intérieur d'une vacuole unique, les rickettsies peuvent aussi se développer dans plusieurs vacuoles

(2 ou 3) au sein d'une même cellule ce qui évoquerait la manifestation d'un phénomène d'auto-infection ou le développement quasi simultané de plusieurs germes. Ces vacuoles, limitées par une membrane unitaire, provoquent un gonflement de la cellule hôte qui est hypertrophiée. Le noyau conserve sa structure normale. Par contre, le cytoplasme est fortement vacuolisé et riche en formations ergastoplasmiques ; les mitochondries sont réparties dans l'ensemble de la cellule (fig. 51).

Dans certaines cellules infectées, on note un épaississement de la membrane vacuolaire contre laquelle sont accolées de nombreuses mitochondries. A un stade plus avancé, les microorganismes sont isolés à l'intérieur d'une capsule formée d'une membrane et d'une couche de matériel opaque aux électrons dont l'épaisseur peut atteindre 0,8 à 1 μm (fig. 55).

Cette formation dont l'extension parait être centripète épouse le contour des rickettsies qui se trouvent à son contact quand celles-ci n'ont pas été complètement englobées. A l'intérieur de cette paroi, les germes sont altérés comme nous l'avons signalé précédemment.

c - Position systématique

Ce microorganisme possède des caractéristiques qui permettent de l'inclure dans l'ordre des Rickettsiales dans lequel il présenterait des affinités avec le genre Coxiella en raison de son développement intravacuolaire sans exclure toutefois un rapprochement avec les Wolbachieae, l'hôte étant un invertébré.

Les difficultés rencontrées pour isoler les germes dont on a vu qu'ils ne présentent pas de formes denses limitent considérablement leur étude et particulièrement, leur comparaison avec des microorganismes voisins. Ces questions seront reprises ultérieurement.

III - INFECTION RICKETTSIENNE DE OSTREA EDULIS L.

Dès 1974 des inclusions basophiles, Feulgen positif étaient observées dans l'épithélium digestif d'huîtres plates de Bretagne. Des formations identiques étaient retrouvées par la suite chez quelques spécimens de cette espèce originaires du Bassin d'Arcachon ainsi que dans la glande digestive de naissain produit dans une éclosérie de Californie (1976). La nature microbienne de ces formations ne fut établie que par la suite après une étude en microscopie électronique (Comps et coll., 1977).

Bien que la fréquence d'observation de ces germes reste faible, on note régulièrement leur présence chez des huîtres de Bretagne et d'Arcachon. Récemment ils ont été retrouvés dans des huîtres de gisements naturels du secteur de la Rochelle.

1 - Microscopie photonique.

Sur coupes à la paraffine, la coloration de Mann-Dominici permet de mettre en évidence dans l'épithélium des diverticules digestifs des plages ovales entourées d'une zone claire constituées de grains basophiles Gram négatif.

Des images plus détaillées de ces lésions obtenues sur coupes semi-fines ont permis d'en préciser les différentes caractéristiques. En effet, colorées par le bleu de Sahli, les fines granulations apparaissent regroupées dans une vacuole généralement unique, des vacuoles doubles peuvent toutefois être rencontrées (fig. 56).

La cellule hôte est hypertrophiée et sa taille peut atteindre 70 à 100 μm . Son cytoplasme est profondément modifié : autour de la plage granuleuse on distingue en effet de nombreuses petites vacuoles de 2 à 4 μm séparées par un réseau ténu de matériel plasmique (fig. 57). Cette intense vacuolisation entraîne une déformation du noyau qui souvent est repoussé contre la membrane cellulaire. Observé uniquement dans le cas de l'huître plate, ce phénomène caractériserait l'effet cytopathogène du microorganisme.

L'aspect des microcolonies présente certaines variations concernant les affinités tinctoriales des particules et leur agencement au sein de la vacuole. Le plus souvent ces particules sont réparties d'une façon homogène mais dans un certain nombre de vacuoles la configuration est irrégulière, des aires non colorées, en petites tâches ou en bandes, s'intercalant entre les grains basophiles (fig. 58). On verra par la suite que ces figures correspondent à différents états du microorganisme au cours de l'évolution de l'infection.

A côté des cellules infectées, l'épithélium des diverticules digestifs ne subit aucune modification décelable histologiquement : les cellules sécrétrices comme les cellules de remplacement restent indemmes.

On notera enfin que chez l'huître plate, la rickettsiose peut se manifester concurremment avec d'autres infections de l'épithélium digestif et en particulier avec l'infection due au parasite Marteilia refringens (fig. 56).

Des examens histologiques en microscopie à fluorescence ont fourni quelques précisions sur les caractères biochimiques de l'agent infectieux. La faible intensité de fluorescence avec le D.A.P.I., confirmant d'ailleurs la réaction de Feulgen a montré que ces germes renfermaient une faible proportion d'ADN. Par contre la fluorescence obtenue avec l'acridine orange à pH 3,8 a révélé une certaine richesse en ARN ribosomal.

2 - Microscopie électronique.

a - Les corps bactériens

A l'examen en microscopie électronique, les plages granuleuses apparaissent constituées d'un grand nombre de germes de type rickettsien (fig. 59).

De forme coccoïde, les microorganismes mesurent 0,5 à 0,7 µm avec un diamètre moyen de 450 nm. La paroi d'une épaisseur de 25 nm est formée de deux membranes à triple feuillet, séparées par un espace périplasmique granuleux. La partie centrale, peu dense, est occupée par un réseau lâche de fibrilles et de petits amas granulaires. La partie périphérique

par contre est formée par une agglomération de grains assimilables à des ribosomes lui conférant une forte opacité aux électrons. Ce matériel est réparti de façon souvent irrégulière; il peut aussi pour une majeure partie être localisé dans un secteur préférentiel de la particule (fig. 60).

A l'extérieur, des formations membranaires fermées sont accolées aux microorganismes (fig. 60) ; leur configuration est identique à celle de la paroi de ces derniers et l'espace limité par les membranes est clair ou occupé par de fines granulations denses. Pour le moment, leur signification n'est pas évidente : il pourrait s'agir d'un processus de bourgeonnement intervenant dans la multiplication du microorganisme. La présence de germes plus allongés avec une constriction latérale suggérerait par ailleurs un mode de multiplication par division binaire simple.

b - Les formes altérées

Les vacuoles caractérisées par une répartition irrégulière des particules contiennent des corps bactériens en cours de dégradation. Ce phénomène se manifeste par un décollement et une rupture de la membrane externe. Par endroits la membrane plasmique est lysée libérant le contenu cellulaire. Les grains ribosomiaux sont accumulés contre la paroi en amas très denses (fig. 61, 62).

D'aspect hétérogène, tant par la forme et par la taille (de 300 à 800 nm) que par la répartition du matériel cytoplasmique, ces formes altérées sont irrégulièrement regroupées dans la vacuole qui présente de nombreux espaces clairs sans microorganismes.

Il est à noter par ailleurs que cette vacuole est délimitée par une membrane épaisse de 80 à 100 Å.

3 - Effet cytopathogène

La formation de nombreuses vacuoles dans le cytoplasme de la cellule hôte représente le symptôme le plus caractéristique accompagnant l'infection. Les tractus cytoplasmiques qui séparent ces vacuoles recèlent des

mitochondries et de fines granulations opaques. L'effet de cette vacuolisation modifie le contour du noyau dont le nucléoplasme est clair et pauvre en chromatine.

4 - Position systématique.

Ce microorganisme à développement intracellulaire sans cycle interne de type chlamydien peut être placé dans l'ordre des Rickettsiales.

Il parait difficile de préciser davantage la position de ce microorganisme qui, comme les rickettsies précédemment étudiées, en raison de son développement intravacuolaire serait proche des Coxiella, alors que la nature de l'hôte commanderait de l'insérer dans les Wolbachieae.

IV - INFECTION RICKETTSIENNE CHEZ LA PALOURDE RUDITAPES PHILIPPINARUM.

Toujours dans le cadre de la recherche des causes de mortalités, des examens histologiques de palourdes originaires de Vendée ont révélé chez 12 % des individus la présence de rickettsies parasites de l'épithélium digestif.

L'existence d'un microorganisme à cycle de type chlamydien récemment décrit par Joly et Comps (1980) chez l'espèce voisine, Ruditapes decussatus, a naturellement incité à approfondir l'étude de ce nouveau germe.

1 - Histopathologie.

Comme dans les cas précédemment décrits, l'infection se manifeste au niveau de l'épithélium des diverticules digestifs par la présence de plaques finement granuleuses, de forme sphérique ou ovoïde dont la taille varie entre 20 et 25 μm . Ces formations ont un contenu basophile, rose à la réaction de Feulgen et Gram négatif (fig. 63).

Sur coupes semi-fines, on observe qu'elles sont intracellulaires et correspondent à une vacuole intracytoplasmique occupée par de nombreux microorganismes. Deux types de plages sont distincts : des plages à granulations très chromophiles et des plages dont les granulations ont une affinité moins marquée pour le bleu de toluidine.

2 - Microscopie électronique.

L'étude du microorganisme a permis de noter l'existence de deux types structuraux correspondant à la distinction établie en fonction du caractère basophile des microcolonies.

a - Formes claires

Généralement bacilliformes, ces microorganismes présentent un certain pléomorphisme (fig. 64). Leur longueur varie de 200 à 1400 nm et leur diamètre entre 400 et 600 nm. Certains microorganismes sont réniformes, d'autres montrent une double constriction latérale indiquant le début d'une division binaire.

Ils sont limités par un ensemble paroi-membrane plasmique de 15 à 20 nm d'épaisseur ; la paroi a un contour sinueux (fig. 66).

Le contenu cytoplasmique a un aspect granulo-fibrillaire leur conférant un aspect réticulé : des grains denses ayant l'aspect de ribosomes sont regroupés en petits amas dont la densité est plus grande au voisinage de la membrane plasmique ; un fin réseau de fibrilles est associé à ce matériel granuleux dense.

b - Formes denses

Leur aspect est voisin de celui des formes claires mais plus régulier. En tenant compte des variations dues au plan de la section, ils se présentent comme des bâtonnets légèrement cunéiforme, une des extrémités étant aplatie, l'autre plus ou moins effilée et arrondie ; ils mesurent de 800 à 1000 nm de long et de 300 à 400 nm de diamètre (fig. 65).

Le cytoplasme est constitué de grains denses entourés d'une fine auréole claire, uniformément répartis sur l'ensemble du germe ; cette

texture régulière contraste avec celle des formes claires (fig. 67).

On remarque qu'un certain nombre de ces particules sont regroupées par paires, les extrémités applaties étant contiguës : cette disposition pourrait correspondre à la fin d'une division binaire par scissiparité.

Le système enveloppe est identique à celui des formes claires : les sinuosités de la paroi pourraient là encore être interprétées comme des décollements anormaux de celle-ci, probablement dus à l'action du fixateur (fig. 68).

Si les microcolonies de corps denses sont homogènes l'observation de nombreuses cellules infectées montre que les microcolonies de forme réticulée peuvent renfermer des formes aberrantes. Généralement plus volumineuses, (1100 à 1300 nm x 600 à 800 nm), ces formes se distinguent encore par la texture de leur cytoplasme : celui-ci peut être pour partie du type réticulé, pour partie du type dense ou encore entièrement du type dense (fig. 66).

3 - Effet pathogène.

L'action cytopathogène du procaryote se manifeste principalement par une hypertrophie de la cellule épithéliale due à l'extension de la micro-colonie de rickettsies à l'intérieur de la vacuole cytoplasmique. Le cytoplasme de la cellule hôte se trouve progressivement réduit à une couche mince qui finit par se rompre : des vacuoles limitées par une paroi résultant d'un épaissement de la membrane vacuolaire d'origine sont ainsi libérées dans la lumière des diverticules digestifs. On ne note pas toutefois de modifications importantes du cytoplasme de la cellule infectée.

Même si dans certains cas les lésions cellulaires sont relativement nombreuses, elles n'entraînent pas de dommages importants pour l'épithélium digestif. On n'a pu de ce fait établir de lien précis entre l'infection et les mortalités constatées, d'autant que cette infection n'a pu être reproduite expérimentalement.

4 - Position systématique. Discussion.

Bien que présentant un certain nombre de caractères communs avec

la plupart des Rickettsiales décrites chez les Mollusques bivalves, notamment par sa structure et son développement intravacuolaire, ce germe s'en distingue sensiblement par l'existence d'un deuxième type structural de particules, caractérisé par un cytoplasme dense et homogène. Par ailleurs, la présence de formes réunissant les deux types structuraux constituant un stade intermédiaire entre ces derniers permet d'envisager sinon l'existence d'un cycle de développement, du moins une transformation des corps réticulés en corps denses.

Cette évolution diffère notablement de celle qui est observée dans le cycle complexe qui assure la multiplication des Chlamydiales et des Rickettsiella : la modification fondamentale notée chez le parasite de la Palourde consiste en une densification du cytoplasme sans différenciation de nucléoïde, sans redistribution du contenu cellulaire et enfin sans remaniement du système paroi-membrane plasmique.

Le polymorphisme de ce microorganisme rappelle celui d'une rickettsie récemment décrite par Bonami et Pappalardo (1980) chez le crustacé Carcinus mediterraneus Czerniavski. Celle-ci comporte en effet des formes bactériennes qui se multiplient à l'intérieur d'une vacuole cytoplasmique : ces formes bactériennes subissent des modifications, aboutissent, en passant par des formes de transition, à des formes denses aux électrons. En excluant l'hypothèse d'un cycle de type chlamydien, Pappalardo (1981) a inclus la rickettsie du crabe dans l'ordre des Rickettsiales et mentionné un rapprochement avec les Wolbachieae, tenant ainsi compte de la pathogénicité pour un arthropode, sans éclairer davantage le problème taxonomique posé.

Dans le cas de la rickettsie de la Palourde, on retiendra outre ses caractéristiques générales, l'absence d'un véritable cycle de type chlamydien pour l'inclure dans l'ordre des Rickettsiales, son association à un invertébré la rapprochant des Wolbachieae, tout en suggérant un rapprochement avec les Coxiella en raison du mode de développement dans une vacuole (Moulder, in Bergey's Manual, 1974). L'existence de deux formes chez Coxiella burnetii (Rosenberg et Kordova, 1960 ; Burton et coll., 1971) irait dans le sens d'un tel rapprochement.

V - INFECTION RICKETTSIENNE CAUSEE PAR UN MICROORGANISME DE TYPE CHLAMYDIEN CHEZ L'HUITRE CRASSOSTREA ANGULATA Lmk.

Après l'observation de plusieurs cas d'infection de Mollusques dues à des Rickettsiales et dont les symptômes en histologie classique sont très voisins, nous avons constaté chez l'huître portugaise, l'existence de lésions qui bien que rappelant les premiers cas de rickettsioses montraient des particularités par rapport à celles-ci.

Une étude plus approfondie révélait que l'infection était due à un microorganisme présentant un cycle de développement intracellulaire. Il s'agit du premier germe de type chlamydien signalé chez les huîtres, seul étant connu jusqu'alors chez les Mollusques bivalves marins le cas d'une "chlamydie" observée par Harshbarger et coll. (1977) dans la glande digestive du clam, Mercenaria mercenaria.

Là encore nous nous trouvons devant un cas de rickettsiose non liée en apparence à des symptômes pathologiques comme une infection généralisée des tubules et éventuellement des mortalités.

Si donc pour ce qui concerne la pathologie des huîtres ce nouveau germe ne semble pas représenter pour le moment un agent infectieux important son étude détaillée en microscopie électronique a montré son intérêt sur le plan de la pathologie comparée des Invertébrés.

1 - Histopathologie.

Les lésions dues au microorganisme sont comparativement aux premières rickettsies décrites chez les Mollusques marins, difficilement repérables par la microscopie photonique sur coupes classiques comme sur les coupes semi-fines.

Dans l'épithélium des diverticules digestifs, on distingue des aires mal délimitées, de 10 à 15 μ m occupées par un matériel hétérogène caractérisé par la présence de granulations basophiles éparses (fig. 70).

Parallèlement, certaines cellules épithéliales renferment une inclusion ovoïde de 7 μm sur 10 μm contenant également de fines granulations basophiles en faible densité. Cette inclusion est située à l'intérieur d'une vacuole cytoplasmique (fig. 69).

Dans tous les cas observés, ces formations granuleuses étaient en nombre limité, n'introduisant aucune modification sensible des tissus, excepté une légère distension de la cellule hôte.

2 - Microscopie électronique.

La nature rickettsienne des lésions décelées dans les diverticules digestifs de l'huître portugaise a été démontrée par l'étude ultrastructurale qui a également permis de révéler l'existence d'un cycle de développement complexe aboutissant à des formes de résistance.

La microscopie électronique a conduit à distinguer en fonction du mode de localisation intracellulaire deux groupes de formes microbiennes correspondant aux deux types de formations granuleuses observées sur coupes semi-fines.

L'existence de plusieurs types de particules s'apparentant par la taille, la forme et l'opacité aux électrons aux différentes formes reconnues dans le cycle de développement des Chlamydiales et des Rickettsiella ayant enfin été établie par l'examen sur coupes ultrafines, on utilisera dans la description des microorganismes la terminologie actuellement appliquée à ces deux groupes.

a - Forme microbienne à développement multivacuolaire.

Dans le premier cas, les particules sont isolées ou regroupées en petit nombre (2 ou 3) à l'intérieur de petites vacuoles cytoplasmiques à contour irrégulier, plus ou moins sphériques. Rassemblées dans un même secteur de la cellule infectée, elles sont contiguës, simplement séparées par leurs membranes ou par des tractus cytoplasmiques incluant eux-même de petites vacuoles ovoïdes de 200 à 300 nm. Ce cytoplasme est riche en ribosomes de 200 Å répartis principalement à la périphérie des petites vacuoles. Il renferme également dans la zone directement infectée des mitochondries

généralement dégradées aux crêtes peu distinctes. Autour de cette zone on trouve un abondant réticulum endoplasmique formant de longs vésicules aplatis, souvent alignés, associés à de nombreux ribosomes et un grand nombre de mitochondries (fig. 71).

Dans une même cellule infectée, on distingue réparties dans les vacuoles différentes formes du microorganisme correspondant à des phases de son cycle de développement.

- Les corps initiaux

De forme coccoïde, leur taille varie entre 500 et 700 nm. Ils sont limités par deux membranes unitaires séparées par un espace périlasmique. Ils renferment à la périphérie un matériel opaque avec des grains de type ribosome alors que leur partie centrale est occupée par un matériel fibreux lâche et ténu (fig. 72, 73).

Chez certaines formes on note des figures de division binaire par constriction médiane du cytoplasme. L'existence de corps initiaux accolés à l'intérieur d'une vacuole indique une division récente.

- Les corps élémentaires

Les corps élémentaires sont représentés par des particules oblongues mesurant 700 à 850 nm pour un diamètre maximum variant entre 300 et 350 nm ; une des extrémités est arrondie et l'autre effilée. Il ressort des images fournies par les sections sagittales et par les sections orthogonales au grand axe que leur surface est ornée de sillons longitudinaux dont le nombre ne paraît généralement pas excéder 9 (fig. 75, 76).

Ces corps sont limités par une paroi complexe de 200 Å d'épaisseur constituée de 5 feuillets accolés : un feuillet dense médian séparé des feuillets denses, interne et externe, par deux feuillets intermédiaires claires aux électrons. Le feuillet dense interne se distingue difficilement de la frange cytoplasmique à laquelle il est appliqué. L'épaisseur moyenne de ces différents feuillets individualisés est voisine de 30 Å (fig. 77).

Les corps élémentaires ont un cytoplasme très dense, comportant de nombreux grains (ribosomes) excepté à la périphérie du nucléoïde qui est entouré d'une zone claire aux électrons. Le nucléoïde, caractérisé par une

grande opacité est de forme hémisphérique ; sa localisation latérale contre le feuillet dense interne introduit une certaine asymétrie dans la répartition du contenu cellulaire (fig. 75, 76).

- Les corps intermédiaires

Dans un petit nombre de vacuoles, on observe des formes de transition, les corps intermédiaires, qui possèdent des caractéristiques communes aux deux premiers types de particules. Ces corps sont ovoïdes, souvent plus allongés que les corps initiaux ; leur longueur est de 400 à 600 nm et leur largeur moyenne de 400 nm, valeurs indiquant une diminution de taille par rapport à ces derniers (fig. 72, 74).

Résultant, d'après certaines figures, d'une condensation des fibrilles cytoplasmiques, le nucléoïde occupe une position plus ou moins excentrée. Des grains assimilables à des ribosomes se concentrent à la périphérie de la particule. Conjointement s'opère une transformation du système membranaire constituant l'enveloppe : l'espace périplasmique séparant les deux membranes unitaires disparaît tandis que s'individualisent clairement les feuillettes denses médian et externe.

Le nombre relativement peu élevé de corps intermédiaires semblerait indiquer qu'il s'agit d'un stade fugace dans le cycle de développement.

b - Forme microbienne à développement monovacuolaire

Dans ce deuxième cas d'infection des cellules digestives de l'huître portugaise les particules sont regroupées à l'intérieur d'une vacuole unique (fig. 78).

Le cytoplasme de la cellule atteinte est riche en ribosomes et en formations ergastoplasmiques. Il comporte également de nombreuses vacuoles bordées de ribosomes. Étroitement appliquées à sa membrane, les mitochondries sont regroupées autour de la vacuole contenant les germes.

Le développement intravacuolaire du microorganisme passe par plusieurs phases suggérant l'existence d'un cycle interne. Toutefois dans les spécimens étudiés nous n'avons rencontré que les corps initiaux et corps intermédiaires sans pouvoir observer la formation des corps élémentaires.

- Les corps initiaux

Caractérisés par un certain pléomorphisme ces corps d'allure bactérienne mesurent 500 à 550 nm de long sur 250 à 300 nm de large. Ils sont limités par deux membranes unitaires séparées par un espace périplasmique clair aux électrons, l'ensemble du système membranaire ayant une épaisseur de 30 nm. Un matériel ténu, d'apparence fibreuse confère à la partie centrale une faible opacité aux électrons, tandis qu'à la périphérie, un matériel granuleux forme une zone dense (fig. 79).

A la surface de certaines particules on remarque une expansion globuleuse limitée par la seule membrane externe et occupée par un matériel granuleux opaque séparé de la membrane par une couche claire de 70 Å. En se détachant de la particule par constriction de la membrane, ces formations sont à l'origine de corps parasphériques de 150 à 160 nm possédant la même structure : ces corps libres à l'intérieur de la vacuole sont constitués d'un noyau central de grains denses entouré d'une couche claire, elle-même limitée par une membrane unique (fig. 80, 81, 82).

- Les corps intermédiaires

De forme assez irrégulière, généralement allongée, les corps intermédiaires ont une longueur variant entre 500 et 950 nm pour un diamètre de 300 à 400 nm. Le système membranaire enveloppant des particules a la même organisation que celui des corps initiaux, la membrane plasmique n'étant pas cependant toujours bien visible. En bordure le cytoplasme est riche en grains denses assimilables à des ribosomes ; au centre, de nombreuses fibrilles sont condensées et forment un nucléoïde opaque, diffus, aux contours mal délimités (fig. 79).

On reconnaît parmi les corps intermédiaires différentes phases d'un processus de répllication impliquant conjointement un bourgeonnement et une division binaire. Comme l'indiquent de nombreuses figures de division, avant la séparation complète des particules, la cellule fille issue d'un corps intermédiaire est dépourvue de nucléoïde ; sa structure est identique à celle des corps initiaux (fig. 79).

- Les corps géants

Dans certaines vacuoles, on a pu observer la présence

de formes ovoïdes de grande taille (1100 x 800 nm).

Comme les autres particules, les corps géants sont limités par deux membranes unitaires séparées par un espace clair. Le cytoplasme est peu dense aux électrons, formé de granulations irrégulièrement réparties, avec de nombreux espaces clairs. Dans les cas observés, ils ne comportaient pas de nucléoides apparents (fig. 79).

3 - Position systématique.

a - Forme à développement multivacuolaire

Les caractéristiques de ce microorganisme ont conduit à le rapprocher des rickettsies présentant un cycle de développement de type chlamydien.

Les différentes formes observées dans les cellules infectées de l'huître peuvent en effet s'apparenter aux corps rencontrés dans le cycle des Rickettsiella, rickettsies inféodées aux Invertébrés (Meynadier et Montsarrat, 1969 ; Devauchelle et coll., 1972), ou des Chlamydiales comme l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne (Devauchelle et coll., 1971 ; Eb et coll., 1972) ou Porochlamydia buthi ng. nsp., germe récemment décrit chez le scorpion Buthus occitanus (Morel, 1976). Toutefois, les différences observées, notamment dans la morphologie des corps denses confère à ce microorganisme une particularité par rapport à ces deux groupes dont par ailleurs les affinités relatives font l'objet de mises au point.

b - Forme à développement monovacuolaire

Bien qu'étant en présence d'un cycle de développement apparemment incomplet, il n'est pas douteux que cet agent infectieux est proche des microorganismes présentant un cycle de développement de type chlamydien. Toutefois, l'absence d'observations sur les corps élémentaires ne permet pas pour le moment de le ranger dans un groupe précis, à savoir les Chlamydiales ou les Rickettsiella.

Considérant principalement la localisation commune, dans les mêmes diverticules de Cr. angulata, de ce germe et du procaryote précédemment décrit et, retenant par ailleurs certaines similitudes morphologiques, nous avons admis à l'origine l'existence d'un microorganisme unique (Comps et Deltreil, 1979).

Il résulterait de cette conception que le microorganisme pourrait avoir deux modes de développement, tantôt à l'intérieur de multiples vacuoles renfermant toutes les phases du cycle, tantôt à l'intérieur d'une vacuole unique ne contenant pas à la fois toutes les formes de ce cycle.

La découverte ultérieure d'infections rickettsiennes complexes qui seront étudiées dans la suite nous a incité à considérer plutôt que nous avons à faire à deux germes distincts. Bien que l'on ne puisse pour le moment assigner à cette rickettsie une place dans la systématique, on notera toutefois qu'elle présente quelques similitudes avec un microorganisme décrit en tant que Chlamydie chez le clam Mercenaria mercenaria (Harshbarger et coll., 1977).

VI - INFECTION RICKETTSIENNE COMPLEXE DE SCROBICULARIA PIPERATA P.

Bien connu dans certains secteurs des côtes françaises de l'Atlantique, le Lavignon Sc. piperata fait l'objet d'une pêche artisanale destinée essentiellement à une consommation locale, sporadique et limitée.

En 1979, certains signes d'appauvrissement des gisements et la constatation de mortalités inhabituelles dans certaines zones du bassin de Marennes-Oléron, nous conduisirent à examiner quelques échantillons de ces Mollusques.

Comme dans le cas de Donax trunculus, des symptômes d'infection rickettsienne furent rapidement décelés sur coupes histologiques. On put reconnaître en effet dans l'épithélium digestif des inclusions basophiles granuleuses comparables aux lésions dues à des rickettsies et déjà observées à diverses reprises chez plusieurs bivalves marins et notamment les huîtres. A partir de contrôles histologiques réguliers il n'a pas été toutefois possible de démontrer l'existence d'une relation entre cette infection et les phénomènes pathologiques signalés, bien qu'en mai 1979, le taux d'infection s'élevait à 20 %. Il faut cependant ajouter que conjointement on notait 12 % d'animaux parasités par un Protiste du genre Marteilia.

Il convient de souligner ici les difficultés rencontrées pour définir le rôle d'agents infectieux sur des populations naturelles et particulièrement quand il s'agit de bivalves fouisseurs. Les mêmes problèmes s'étaient posés antérieurement pour apprécier l'effet pathogène de la rickettsie trouvée chez Donax trunculus.

1 - Histopathologie.

Les lésions dues aux rickettsies ne sont apparentes que dans l'épithélium des diverticules digestifs, à l'exclusion de tout autre tissu. Elles se présentent sous forme de plages de forme généralement oblongue, de 10 à 15 μm sur 12 à 25 μm . A l'examen sur coupes semi-fines, on distingue, suivant leur aspect et la répartition du matériel qu'elles renferment, trois types de lésions : un premier type comportant des granulations d'aspect sphérique séparées par une trame régulière d'espace clairs (fig. 83), un deuxième type formé de grains fortement agglomérés (fig. 84) et enfin un troisième type constitué de deux aires contigües, l'une formée de granulations lâches, peu chromophiles, l'autre de petites granulations fortement basophiles (fig. 85).

Les coupes semi-fines montrent clairement que ces formations sont incluses dans le cytoplasme des cellules digestives. Si dans le premier et le troisième cas, les modifications de la cellule infectées sont peu évidentes, on observe dans le second cas d'importantes transformations : la cellule semble vidée de son contenu cytoplasmique, ne subsistant que quelques grains de sécrétion ; les cellules voisines par contre conservent un aspect normal.

D'une façon générale, les examens histologiques ne révèlent pas de troubles graves liés à ces infections : l'épithélium n'est que très localement affecté et aucune réaction notamment hémocytaire n'est observée chez les animaux infectés.

2 - Microscopie électronique.

L'étude en microscopie électronique des différentes inclusions cytoplasmique a confirmé leur nature rickettsienne et a démontré l'existence

de trois types de microorganismes cytopathogènes chez le même hôte. Nous serons donc amenés à en donner une description séparée.

a - Rickettsie du type 1.

Les microorganismes sont regroupés à l'intérieur d'une vacuole unique délimitée par une paroi aux contours réguliers, présentant par endroits des sinuosités. Cette paroi d'une épaisseur de 60 nm est formée de deux feuillets séparés par un espace clair, le feuillet externe étant le plus épais (fig. 86).

Les particules sont d'allure coccoïde et mesurent 500 à 600 nm de largeur sur 600 à 1100 nm de longueur. Les plus longues montrent pour certaines une légère constriction latérale indiquant un début de division (fig. 87).

On retrouve chez ces formes la structure rencontrée chez la plupart des rickettsies de bivalves marins : les germes sont en effet limités par un ensemble de deux membranes tripartites, une paroi externe de 50 Å et une membrane cytoplasmique souvent peu distincte, séparées par un espace périplasmique granuleux de 150 Å (fig. 88).

Le cytoplasme est peu dense aux électrons : il ne renferme pas de nucléoïde apparent mais un réseau lâche de fibrilles et des granulations denses de 100 Å en moyenne ; assimilables à des ribosomes, ces dernières sont irrégulièrement réparties mais généralement plus nombreuses à la périphérie.

A l'intérieur de la vacuole on observe aussi à côté des rickettsies des vésicules de petite taille (50 à 200 nm), de forme parasphérique entourées par une seule membrane (fig. 87).

b - Rickettsie du type 2.

Le développement de l'agent infectieux a lieu à l'intérieur d'une vacuole unique au contour fortement ondulé. La limite de cette vacuole est constituée d'un feuillet dense dont l'épaisseur atteint 50 nm.

Comme le suggeraient les observations sur coupes semi-fines, les germes ont une forme générale allongée, mais souvent irrégulière. Leur longueur varie entre 0,8 et 1,5 µm. Elles sont limitées par un ensemble membranaire comportant une paroi de 90 Å et une membrane cytoplasmique de 80 Å

souvent peu distincte, séparées par un espace périplasmique dont la largeur varie entre 100 et 130 Å. Le cytoplasme a une structure granulo-fibrillaire : Les ribosomes représentés par des grains denses de 10 nm sont groupés en petits amas irrégulièrement dispersés dans la masse cytoplasmique où ils sont associés à un réseau ténu de fibres d'ADN (fig. 90). Contrairement au premier type décrit, on trouve dans la vacuole de nombreux microorganismes en cours de division. Certains germes très allongés, mesurant jusqu'à 1,5 µm présentent une ou deux zones de segmentation. Sur les sections de microorganismes en cours de division, on constate que les cellules filles sont bien individualisées à l'intérieur de la paroi qui présente au niveau de la séparation un étranglement médian encore peu marqué (50 nm) (fig. 90). Ce processus a déjà été décrit chez l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne (Eb et coll., 1972) et signalé chez une rickettsie du clam Mercenaria mercenaria (Harshbarger et coll., 1977). Ce mode de division est à l'origine d'une organisation en chaîne des microorganismes (fig. 89) : dans certains cas même, la succession des divisions est telle que l'on trouve des chaînes de trois particules alignées dont la séparation n'est qu'à un stade encore peu avancé.

c - Rickettsie du type 3.

L'examen en microscopie électronique montre que l'agent infectieux forme à l'intérieur d'une vacuole une microcolonie comportant trois types de particules indiquant l'existence d'un cycle comparable à celui de la rickettsie de Cr. angulata (fig. 91).

On distingue en effet trois types de particules que l'on peut classer suivant la terminologie appliquée aux Chlamydiales et aux Rickettsiella : des corps élémentaires correspondant aux grains les plus basophiles observés sur coupes semi-fines, des corps intermédiaires et des corps initiaux formant une plage de grains peu basophiles. Les corps initiaux sont sensiblement ovoïdes (fig. 92) ; ils ont des dimensions variables allant de 300 à 1000 nm. Limités par une paroi à trois feuillets et par une membrane plasmique souvent peu apparente, ils renferment des grains denses aux électrons vraisemblablement des ribosomes, répartis à la périphérie de la particule, la plus grande partie du cytoplasme par contre est claire aux

électrons, laissant voir seulement un fin réseau de fibrilles (fig. 93). Dans certaines particules, on observe une formation membranaire cytoplasmique comparable au système membranaire signalé par Morel (1979) dans les corps initiaux de Porochlamydia buthi buthi et considéré par cet auteur comme assimilable à un mésoosome (fig. 94). De rares figures de division binaire sont visibles parmi les corps initiaux.

Les corps élémentaires sont empilés de façon régulière par petits groupements de 20 à 50 unités. Ils présentent une morphologie originale en forme de bâtonnet de section cylindrique. Ils mesurent 350 à 500 nm de long pour un diamètre moyen de 100 nm (fig. 95).

L'enveloppe de ces corps est constituée d'un ensemble pentalamellaire de feuilletts denses et clairs aux électrons dont l'épaisseur totale est de 220 Å. Le feuillet dense interne est souvent confondu avec le matériel plasmique qu'il limite (fig. 96).

A l'intérieur le cytoplasme est formé de matériel dense réparti en deux zones sensiblement égales : une zone de grains ayant l'aspect de ribosomes et une zone finement granuleuse, plus dense pouvant être assimilée au nucléoïde. Sur des sections longitudinales on distingue à l'une des extrémités (côté nucléoïde) un renforcement des feuilletts internes de l'enveloppe, associé à une aire plus claire elle-même entourée par des membranes (fig. 97).

Au cours du cycle, la transformation des corps initiaux en corps élémentaires passe par le stade des corps intermédiaires. Ceux-ci, de forme plus allongée que les corps initiaux, possèdent des limites partiellement restructurées et montrent à une extrémité une condensation de grains denses aux électrons. Le nombre réduit de ces corps indiquerait qu'il s'agit d'un stade fugace.

A l'intérieur de la vacuole, les particules sont englobées dans un cytoplasme finement granuleux dans lequel sont visibles des vésicules arrondies de 30 à 50 nm de diamètre (fig. 92).

Pour ce qui concerne la cellule infectée, l'examen en microscopie électronique n'a pas révélé de profondes modifications liées au développement du microorganisme.

3 - Position systématique.

a - Rickettsies de type 1 et de type 2.

Sur le plan de la taxonomie, les rickettsies du type 1 et du type 2 peuvent être considérées comme appartenant à un même groupe. Ces deux procaryotes sont monomorphes et l'absence d'un cycle complexe à l'intérieur de la vacuole de développement conduit naturellement à les inclure dans l'ordre des Rickettsiales. Présentant d'importantes similitudes avec les rickettsies parasites de Tellina tenuis, d'Ostrea edulis, de Donax trunculus, de Mya arenaria et de Crassostrea gigas, ces deux microorganismes peuvent être comme ces dernières rapprochées du genre Coxiella ainsi que le suggère leur localisation intravacuolaire en mentionnant que leur association à un invertébré pourrait inciter à les intégrer aux Wolbachieae (Rickettsiaceae).

b - Rickettsie du type 3.

La comparaison des formes de ce germe avec les corps observés au cours du développement de certains procaryotes à cycle nous amène à mettre en parallèle cette rickettsie avec les Chlamydiales et les Rickettsiella. Comme pour ces dernières, le cycle comporte des corps initiaux, des corps intermédiaires et des formes de résistance, les corps élémentaires.

Si des similitudes importantes avec ces deux groupes existent au niveau des corps initiaux et intermédiaires, ce microorganisme s'en distingue toutefois pour ce qui concerne les corps élémentaires. D'importantes différences existent entre les corps élémentaires du procaryote parasite de S. piperata et ceux des représentants du genre Chlamydia (Jones, Rake et Stearns, 1945) et du genre Porochlamydia nouvellement créé dans l'ordre des Chlamydiales (Morel, 1976).

Les bases de la classification actuelle des Chlamydiales et des Rickettsiella fournies par le Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan et Gibbons, 1974) ne permettent pas pour le moment d'assigner une place précise dans la systématique à ce nouveau procaryote marin. Cette question sera reprise et discutée ultérieurement.

VII - ETUDE COMPARATIVE DES RICKETTSIES DES MOLLUSQUES BIVALVES MARINS.

1 - Mode de développement, cycle, morphologie.

La plupart des recherches récentes en rickettsiologie conduisent à la suite de nombreuses mises au point à préciser sinon à redéfinir les groupes de microorganismes de type rickettsien en fonction des données ultra-structurales, biochimiques et immunologiques (Devauchelle et coll., 1972 ; Croizier et coll., 1975 ; Morel, 1979 ; Louis, 1980). L'ensemble de ces critères sont considérés désormais comme plus sûrs du point de vue taxonomique que le critère lié à l'espèce hôte (Louis et coll., 1977).

La notion de cycle est devenue prédominante dans la caractérisation de ces germes : elle conduit ainsi aujourd'hui plusieurs auteurs à réviser les affinités des Rickettsiella en proposant leur intégration aux Chlamydiales et même dans la famille des Chlamydiaceae (Louis et coll., 1977 ; Morel, 1977 ; Devauchelle et coll., 1971).

Comme nous l'avons déjà vu, les rickettsies des Mollusques bivalves marins se répartissent en deux groupes définis par la présence ou l'absence de cycle chlamydien : pour les rickettsies monophormes on a affaire à des microorganismes appartenant aux Rickettsiales ; les rickettsies à cycle sont précisément à cause de ce cycle proches des Chlamydiales, ordre restreint encore au seul genre Chlamydia (Page, 1974) auquel on ne peut rattacher les rickettsies des Mollusques bivalves en raison des différences qu'elles présentent avec l'espèce type pour ce qui est de la morphologie des corps élémentaires. Ce point sera développé dans la discussion sur la taxonomie.

Entre ces deux groupes, une place particulière doit être faite à la rickettsie de Tapes decussatus qui manifestement présente un cycle évolutif qui toutefois diffère du cycle chlamydien complexe : la différenciation des formes réticulées en formes denses s'apparenterait plutôt au développement des formes de résistance de Coxiella burneti, procaryote dont la place dans les rickettsies est actuellement l'objet de discussions (Louis, 1980 ;

Eb et coll., 1976).

a - Rickettsies sans cycle

Excepté dans le cas particulier de la rickettsiose (b) de Sc. piperata, la multiplication des germes suit le mode habituellement reconnu chez les Rickettsiales par division binaire simple impliquant une constriction médiane intervenant après un accroissement de la taille des particules.

Les particularités de la division chez la rickettsie (b) du Lavignon sont à l'origine d'une disposition en chainettes des microorganismes rappelant les chainettes caractéristiques des Rickettsiella (Huger et Krieg, 1976 ; Morel, 1979).

b - Rickettsies à cycle complexe

Les données ultrastructurales obtenues sur les rickettsies de l'huître portugaise et du Lavignon montrent que ces microorganismes se développent chez l'hôte suivant un cycle où interviennent des formes comparables aux corps initiaux, aux corps élémentaires et aux corps intermédiaires observés dans le cycle des Chlamydiales, des Rickettsiella et des Porochlamydia.

Dans les deux cas étudiés la phase intracellulaire se déroule à l'intérieur de vacuoles cytoplasmiques et bien que l'infection n'ait pu être reproduite expérimentalement et suivie dès les premiers stades, on peut aisément concevoir le développement du cycle en notant certaines variations par rapport au cycle type des Chlamydiales.

Pour faciliter la discussion on adoptera le code suivant :

R₁' : Rickettsiemonovacuolaire de l'huître portugaise, R₁ : Rickettsie multivacuolaire de l'huître portugaise, R₂ : Rickettsie du lavignon. Dans l'étude comparée du cycle, on examinera plus particulièrement la multiplication des microorganismes et les caractéristiques des corps élémentaires.

- La phase de multiplication des germes

Chez la rickettsie R₁ elle se réalise par une section binaire des corps initiaux : la division s'accompagne d'un accroissement synchrone de la taille des particules et l'on n'observe pas de corps géants

comme il en a été signalé chez certaines Chlamydiaceae (Eb et coll., 1972), chez Rickettsiella sp de l'araignée Pisaura mirabilis (Morel, 1977) ou chez les Porochlamydia (Morel, 1979). La constriction médiane de la cellule mère s'opère simultanément sur l'ensemble du système membranaire enveloppe alors que chez l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne (Eb et coll., 1972) ou chez un procaryote à cycle chlamydien du clam Mercenaria mercenaria (Harshbarger et coll., 1977) les auteurs montrent des cellules filles possédant une paroi commune.

Le cas de la rickettsie R_1' est plus complexe et pose un certain nombre de question. Son développement intracellulaire à l'intérieur d'une vacuole unique a conduit à la distinguer du germe précédent (R_1) bien que les microcolonies de chacune d'elles soient présentes dans les mêmes tubules.

Dans une même vacuole on trouve des corps initiaux réticulés, certains étant en cours de division, des corps intermédiaires dotés d'un nucléoïde dense et des corps mixtes en cours de division dont un seul des éléments fils est pourvu d'un nucléoïde ; de nombreux corps intermédiaires par ailleurs présentent un ou deux bourgeons externes qui finissent par se séparer quand leur taille atteint 180 à 200 nm. Limité à ces trois types de particules, le cycle reste incomplet dans la mesure où l'on n'observe pas une transformation des corps intermédiaires en corps élémentaires.

Si l'on retient l'hypothèse que les microorganismes R_1 et R_1' sont différents on peut admettre que l'absence d'observation des corps élémentaires est liée à l'échantillonnage, le stade corps élémentaire n'étant pas encore atteint au moment de la fixation des mollusques, à moins que le cycle ne soit bloqué par réaction de l'hôte.

Par contre, si l'on considère que R_1 et R_1' représentent le même agent infectieux, il faudrait admettre que suivant l'état de la cellule hôte, le cycle subit d'importantes variations tant dans le type de localisation des particules que dans la transformation de ces dernières.

Dans les deux cas, le blocage du cycle s'accompagnerait, par bourgeonnement, d'une émission de vésicules denses. Signalé par Matsumoto et Manire (1970) un processus de bourgeonnement a également été décrit par Eb et coll., (1972) qui évoquent la possibilité pour les Chlamydiaceae de se reproduire suivant ce mode particulier.

En corollaire de ce qui précède, la présence de corps géants dans les microcolonies de R_1 doit être ici examinée. Comme chez les Rickettsiella (Dutky et Gooden, 1952 ; Krieg, 1958 ; Vago et coll., 1970 ; Morel, 1977), les Chlamydia (Eb et coll., 1972) et les Porochlamydia (Morel, 1976) les corps géants correspondraient selon Morel (1979) à des individus mutants qui, s'ils ne représentent pas une phase polyploïde pourraient trouver leur origine dans l'action d'une substance mutagène. Dans le cas de la rickettsie de l'huître, le développement des corps anormaux peut être rapproché du processus de bourgeonnement associé à un blocage du cycle.

Chez Scrobicularia piperata les trois types de corps caractéristiques d'un cycle chlamydien s'observent dans la même vacuole ; la rareté des corps intermédiaires indiquerait que ce stade est fugace, la transformation des corps initiaux en corps élémentaires devant être rapide.

Cette absence de synchronicité dans le développement du microorganisme a déjà été notée par Morel (1979) chez Porochlamydia piriformis et l'on peut d'ailleurs penser que la répartition en deux secteurs distincts des corps élémentaires et des corps initiaux en est une conséquence.

- Morphologie et ultrastructure des corps élémentaires

Par rapport aux rickettsies à cycle intracellulaire, Chlamydia, Rickettsiella et Porochlamydia les deux procaryotes que nous avons étudiés chez Cr. angulata et chez S. piperata présentent une certaine originalité pour ce qui concerne les caractéristiques des corps élémentaires

Dans les deux cas, l'organisation des corps élémentaires traduit d'importantes transformations résultant d'une condensation du matériel nucléaire, d'une redistribution de l'ensemble du contenu cellulaire et d'une restructuration du système membranaire enveloppe. Différents entre eux, ces corps élémentaires diffèrent aussi des corps élémentaires décrits chez des agents infectieux de Mercenaria mercenaria (Harshbarger et coll., 1977) et de Ruditapes decussatus (Joly et coll., 1980).

Il est possible que cette diversité indique des variations au niveau de l'adaptation aux conditions du milieu marin, en fonction du mode de vie de l'hôte, des particularités de son biotope et éventuellement de la nature d'un hôte intermédiaire.

En s'en tenant aux seules données ultrastructurales, en l'absence d'études biochimiques et immunologiques, les caractéristiques des corps élémentaires apparaissent comme essentiels pour aborder la systématique de ces germes qui pose des problèmes analogues à ceux qui ont conduit à la création d'un genre nouveau Porochlamydia pour une rickettsie de Buthus occitanus (Morel, 1976).

La comparaison des corps élémentaires indiquerait qu'il y a peu d'affinités entre ces microorganismes et les Chlamydia, ou entre les Rickettsiella : le passage des corps intermédiaires aux corps élémentaires va au delà d'une simple condensation et implique l'acquisition de caractères morphologiques et ultrastructuraux rappelant les restructurations importantes observées chez les Porochlamydia (Morel, 1976, 1978, 1979).

2 - L'effet pathogène.

Bien que tous les cas d'infection rickettsienne de mollusques bivalves marins aient toujours été observés conjointement à la constatation de mortalités, il n'a pas été démontré qu'il existe un lien direct entre les deux phénomènes. Les taux d'animaux infestés et le faible développement des lésions ne permettent pas en effet d'expliquer les mortalités du moins si l'on admet que celles-ci puissent survenir à la suite de la destruction du tissu digestif.

D'une façon commune à tous les microorganismes étudiés l'effet cytopathogène se manifeste par une hypertrophie de la cellule parasitée et par une rupture de la membrane plasmique qui libère l'inclusion encore limitée par la membrane vacuolaire dans la lumière du diverticule.

Le développement de la microcolonie peut s'accompagner d'une intense vacuolisation du cytoplasme comme le cas a été observé chez l'huître plate.

Les relations hôte-parasite peuvent toutefois s'inverser : ainsi, chez D. trunculus la membrane limitant la microcolonie s'épaissit pour former une véritable coque à l'intérieur de laquelle les rickettsies dégèrent. Un phénomène similaire est observé chez l'huître O. edulis.

L'effet cytopathogène des rickettsies de Bivalves marins apparait strictement limité aux cellules de l'épithélium des diverticules digestifs laissant intact le tissu interstitiel. Des observations similaires ont été faites par Morel (1979) avec les rickettsioses à Porochlamydia des araignées qui s'avèrent constituer des maladies non létales. Comme cet auteur, on peut penser que le mécanisme normal de remplacement des cellules de l'épithélium digestif tout en facilitant l'élimination des microcolonies, limite les effets du germe par reconstitution de l'épithélium puisque par ailleurs aucun autre tissu n'est affecté.

La spécificité des rickettsies des Mollusques bivalves marins pour un seul type cellulaire conduit à considérer que ces procaryotes faiblement pathogènes sont étroitement dépendants du métabolisme cellulaire.

L'existence d'infections multiples simultanées (cas de S. piperata) confirme cet état de fait et tend à remettre en cause le rôle de ces microorganismes en tant qu'agents infectieux pour leurs hôtes.

Il se peut en effet que les mollusques représentent pour les microorganismes étudiés des hôtes de passage temporaire, servant de réservoir à des rickettsies comme la possibilité en a déjà été évoquée par Bonami (1980) pour des populations de crabes infestés par des virus. L'aptitude des mollusques bivalves à filtrer d'importantes quantités d'eau de mer et donc à concentrer les particules qu'elle contient serait en accord avec une telle hypothèse qui demanderait à être examinée dans le cadre d'études biochimiques et immunologiques et d'essais d'infection d'autres Invertébrés et de Vertébrés.

3 - Implications taxonomiques.

Les rickettsies observées chez les Mollusques bivalves marins et plus spécialement les microorganismes à cycle complexe posent un certain nombre de problèmes au plan de la systématique.

De par leurs caractéristiques ultrastructurales, leur localisation et leur caractère Gram négatif, les rickettsies monomorphes peuvent être directement incluses dans l'ordre des Rickettsiales Gieszczykiewicz 1939 (Moulder, 1974) et rattachées à la famille des Rickettsiaceae Pinkerton, 1936.

Le développement de tous ces microorganismes à l'intérieur de vacuoles permet de faire un rapprochement avec le genre Coxiella Philip, la rickettsie de Ruditapes philippina^{rum} ayant une place particulière par rapport à ce genre par suite du développement de formes assimilables à des formes de résistance.

Si l'on tient compte, comme dans la plus récente classification (Bergey's Manual, 1974) de la nature de l'hôte, on ne peut pour le moment préciser davantage la position systématique de germes observés chez les mollusques bivalves marins, groupe nouvellement connu sur le plan des infections à Rickettsies.

Les rickettsies à cycle de développement intracellulaire posent des problèmes similaires si l'on considère l'hôte, à ceux évoqués à propos des rickettsies monomorphes. En raison de leur cycle qui comporte les mêmes phases que celui des Chlamydiales, des Rickettsiella ou des Porochlamydia, ces germes pourraient être rapprochées de ces différents groupes de procaryotes.

Toutefois, en examinant les caractères ultrastructuraux des corps élémentaires, ils s'éloignent nettement des Rickettsiella chez lesquels les corps élémentaires se forment par simple condensation du matériel nucléaire et cytoplasmique, sans accroissement important de la rigidité de la paroi. Il semble par ailleurs que la restructuration conduisant à la formation des corps élémentaires soit plus poussées que dans le cycle des Chlamydia. Par contre, les modalités de transformation des corps initiaux en formes de résistance comprennent comme pour les Porochlamydia une latéralisation du nucléoïde, une condensation importante du matériel cytoplasmique et l'acquisition d'une paroi rigide conférant une forme fixe aux corps élémentaires. Confirmant ces affinités, la limite des formes de résistance constituée d'un système pentalamellaire comporterait une paroi perforée, caractère retenu dans la diagnose du genre Porochlamydia Morel, 1976. On notera enfin, seulement dans le cas de la rickettsie de S. piperata, l'existence d'un système membranaire interne également caractéristique du genre.

La comparaison avec l'espèce type Porochlamydia buthi Morel, 1976 montre qu'il existe principalement dans la morphologie des corps élémentaires

des différences notables entre celle-ci et les agents infectieux de l'huître et du Lavignon qui ne permettent pas de les rattacher pour le moment aux Porochlamydia.

Comme on le voit, avec les procaryotes à cycle chlamydien des Mollusques bivalves marins, on retrouve les problèmes généraux posés depuis plusieurs années par la systématique des microorganismes rickettsiens présentant un cycle de développement.

Une tendance récente a été, à la suite des travaux de Devauchelle et coll. (1971) d'attribuer au mode de développement du germe une place plus importante en taxonomie qu'à la notion d'espèce-hôte. Ainsi l'appartenance des Rickettsiella aux Rickettsiales est controversée (Louis et coll., 1977 ; Louis et coll., 1979 ; Morel, 1979) mais leur rattachement aux Chlamydiaceae soulèverait dans l'état actuel des connaissances de nouvelles difficultés.

Les variations observées dans les différents cycles décrits ont conduit par ailleurs certains auteurs à développer l'étude de l'ADN de ces germes en G + C et à envisager l'étude des génomes (Louis, 1980).

o

o o

PLANCHE XVIII

Infection rickettsienne de Crassostrea gigas
Histologie et ultrastructure

Fig. 44. : Section de diverticules digestifs infectés. De volumineuses inclusions basophiles (i) correspondant à des microcolonies de rickettsies occupent une position intra-épithéliale. Coloration de Mann-Dominici. X 70.

Fig. 45. : Coupe semi-fine au niveau des cellules digestives montrant la localisation intravacuolaire de la microcolonie rickettsienne (r). Cellule digestive (d). Membrane vacuolaire (mv). Coloration bleu de Sahli. X 190.

Fig. 46. : Microcolonie de rickettsies regroupées à l'intérieur d'une vacuole cytoplasmique. On reconnaît des formes de division par scission binaire du microorganisme (▶). X 15500.

Fig. 47. : Structure de la rickettsie. L'enveloppe du microorganisme formé de deux membranes de type unitaire (▶) montre un contour sinueux. X 63000.

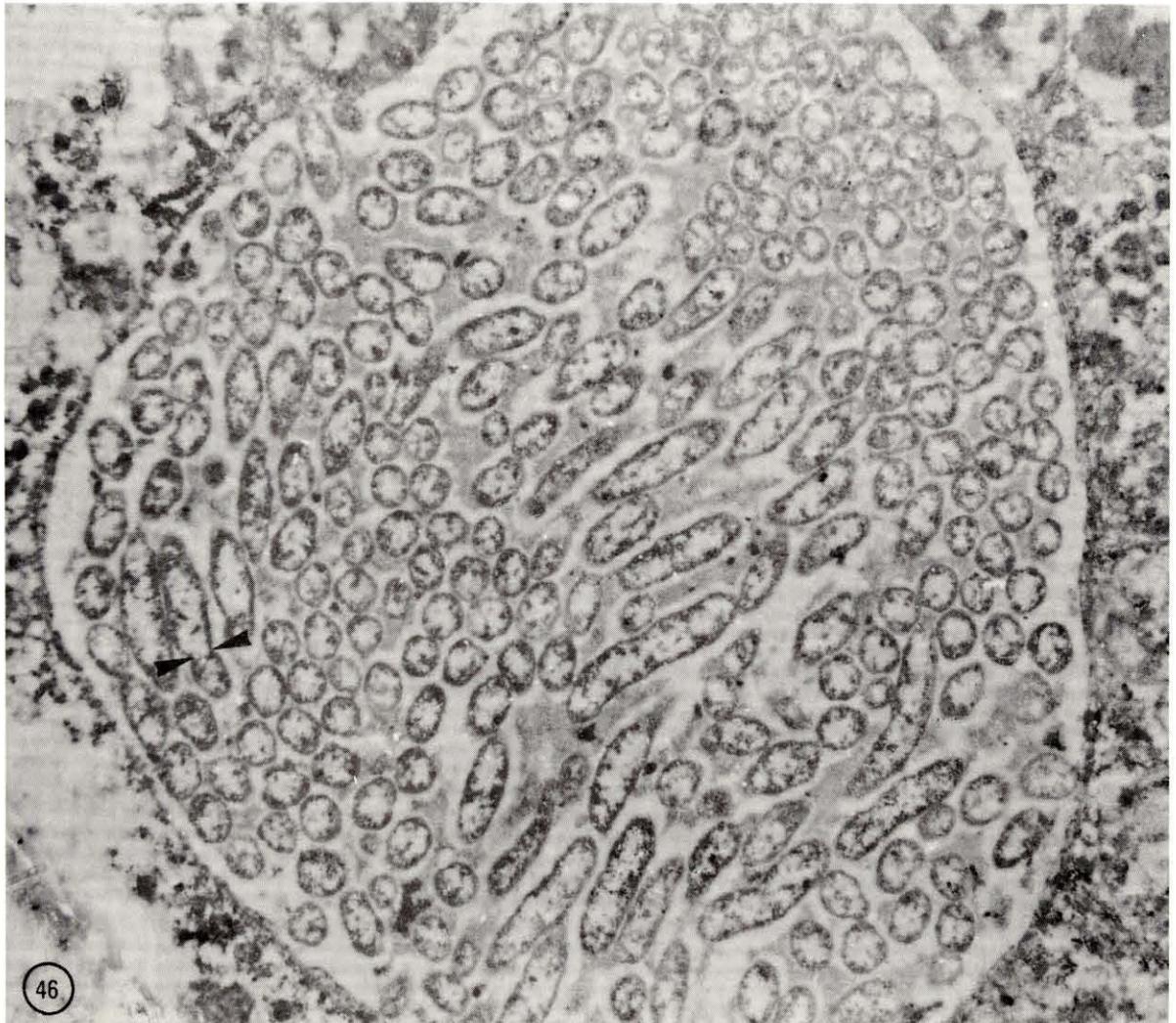
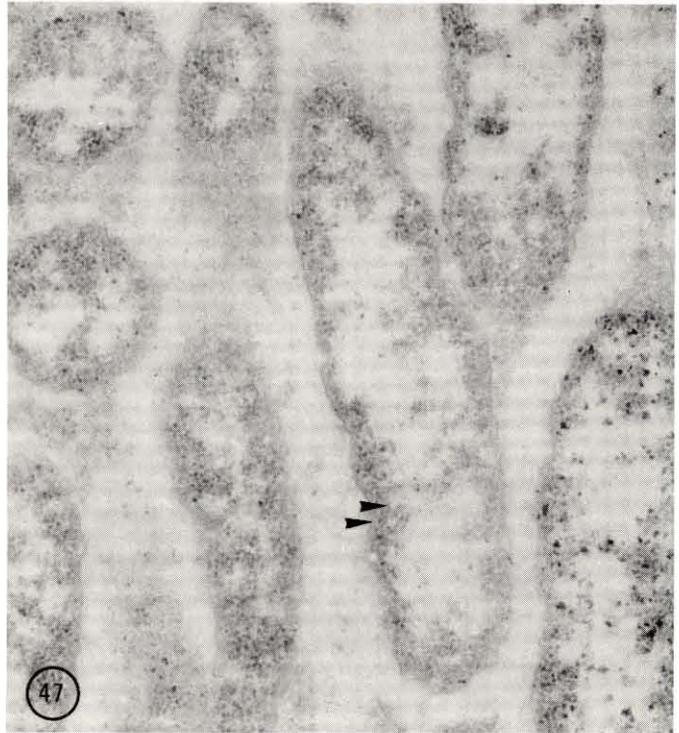
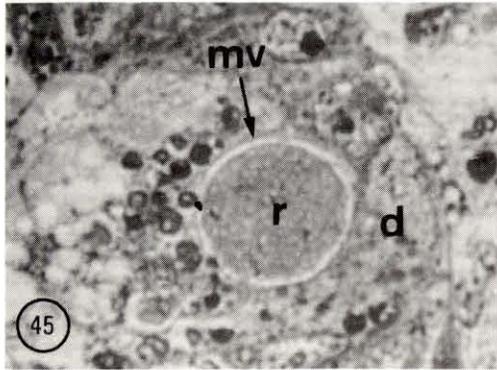
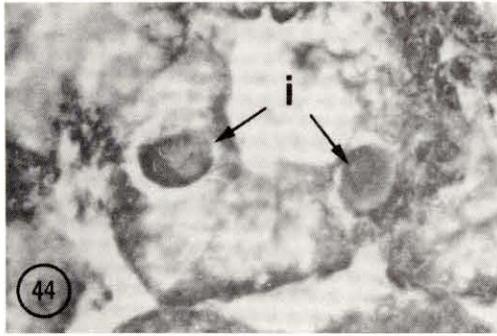


PLANCHE XIX

Infection rickettsienne de Dipax trunculus

Histologie

Fig. 48. : Section de diverticules infectés. L'infection est limitée à la présence de microcolonies isolées (mc), incluses dans l'épaisseur de l'épithélium digestif (d). Coloration de Mann-Dominici. X 700.

Fig. 49. : Dans une portion étroite de l'épithélium, l'aspect des microcolonies peut présenter d'importantes variations. Microcolonies de rickettsies peu basophiles (r). Microcolonies contenant des germes fortement basophiles (rb). Coupe semi-fine. Coloration bleu de Sahli. X 1250.

Fig. 50. : Certaines microcolonies rickettsiennes de forme ovoïde régulière sont enfermées dans une capsule épaisse (►) étroitement accolée à la masse granuleuse formée de microorganismes (r). Coupe semi-fine. Coloration bleu de Sahli. X 2500.

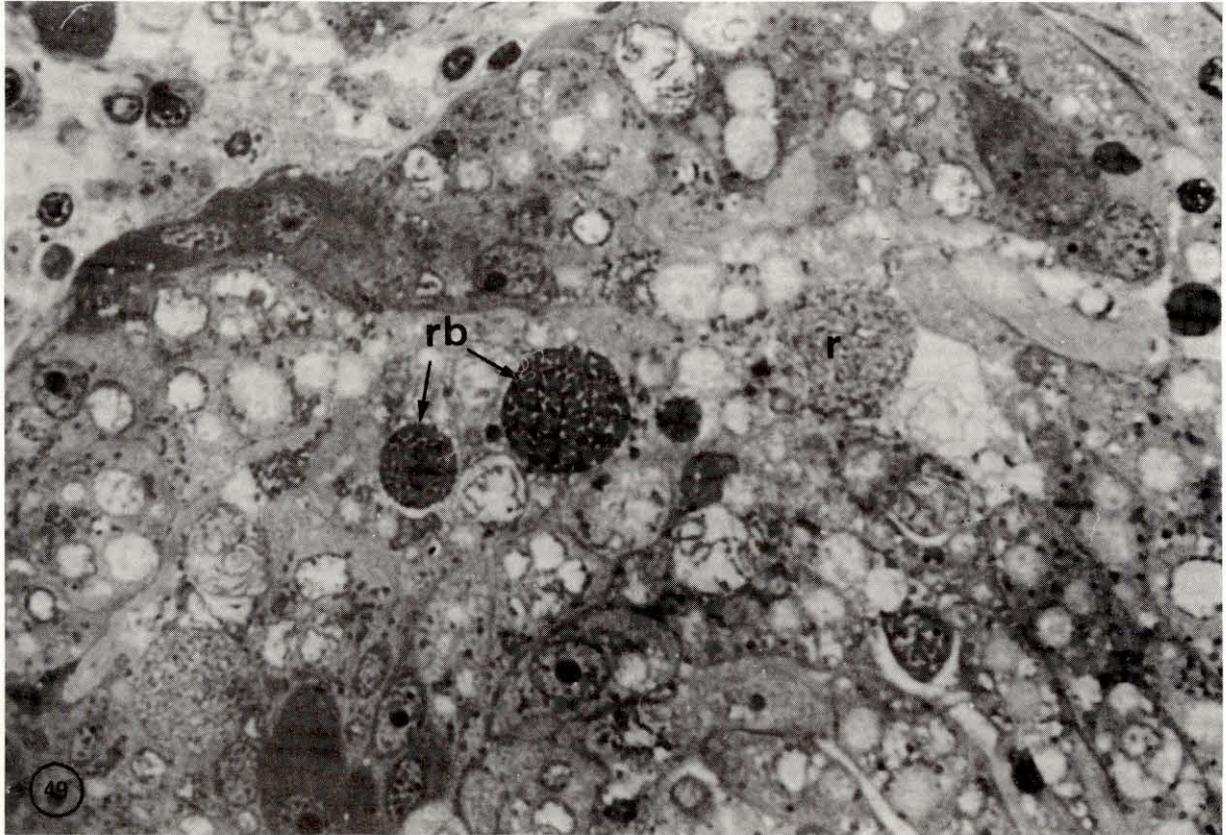
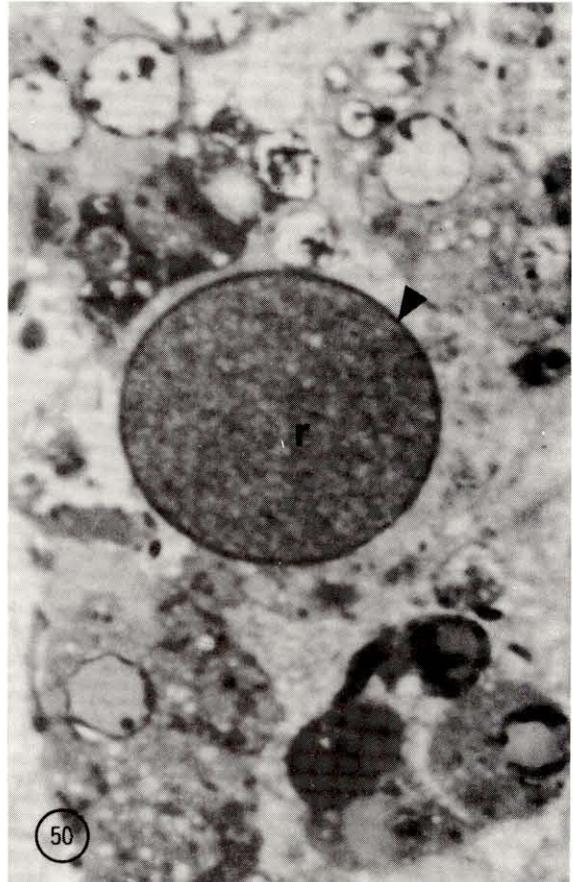
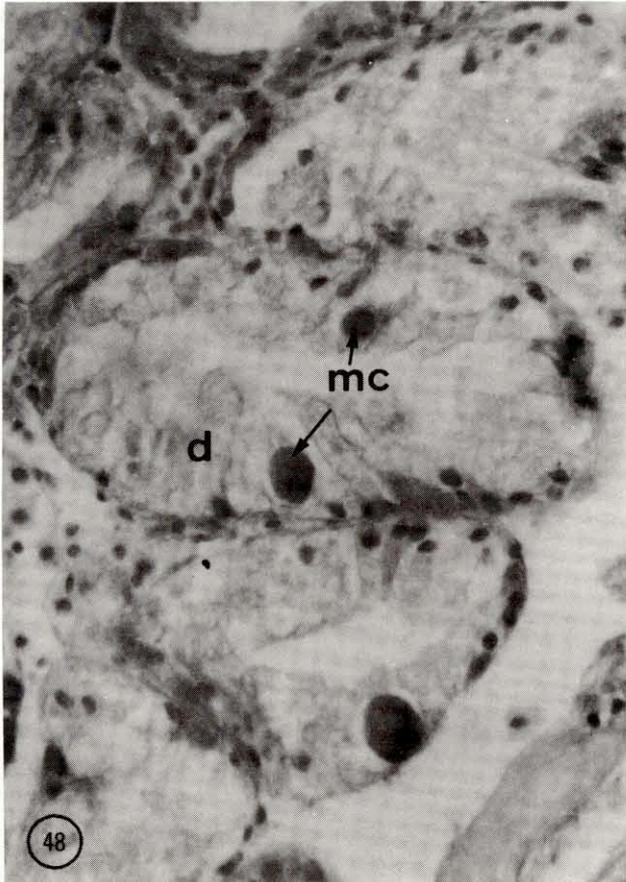


PLANCHE XX

Infection rickettsienne de Donax trunculus

Ultrastructure

Fig. 51. : Cellule digestive renfermant deux microcolonies de rickettsies (\Rightarrow)
Certaines rickettsies, de forme très allongée, sont en voie de divi-
sion (\blacktriangleright). Le noyau de la cellule infectée (n) montre des signes
de pycnose et le cytoplasme très altéré comporte de nombreuses vacuo-
les (v) de taille variable. Granules de sécrétion (g). Mitochondries
(m). X 10 000.

Fig. 52. : Section d'une rickettsie montrant la structure caractéristique de
l'enveloppe formée de deux membranes tripartites (\blacktriangleright) séparées
par un espace périplasmique granuleux (\rightarrow). X 75 000.

Evolution des microcolonies de rickettsies

Fig. 53. : Au cours de la phase de multiplication des germes la microcolonie se
développe à l'intérieur d'une vacuole limitée par une simple membrane
(\blacktriangleright). X 20 000.

Fig. 54. : La transformation de la membrane vacuolaire en paroi par épaisse-
ment du feuillet interne (\blacktriangleright) s'accompagne d'un début d'altération
des rickettsies. X 37 000.

Fig. 55. : L'épaississement de la paroi peut aboutir à la formation d'une cap-
sule (ca). A l'intérieur, la dégradation des germes s'est accentuée.
On note un décollement de la membrane externe (\rightarrow), des déforma-
tions importantes des germes et une densification anarchique du cyto-
plasme (\rightarrow). X 37 000.

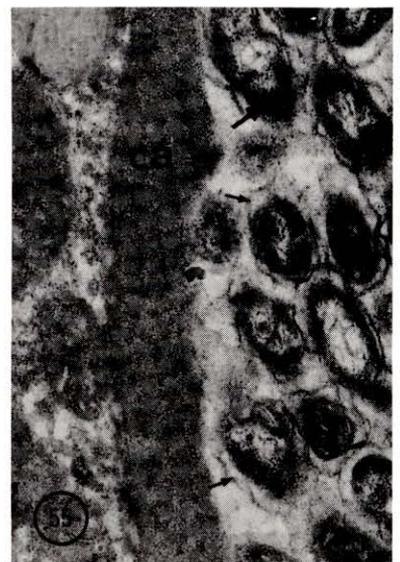
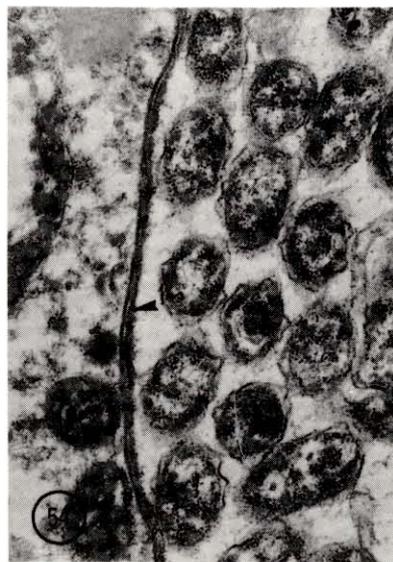
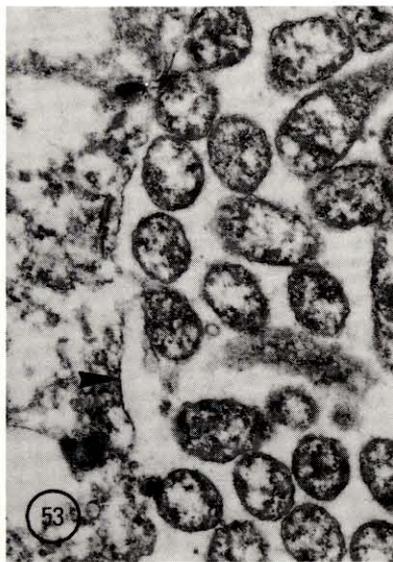
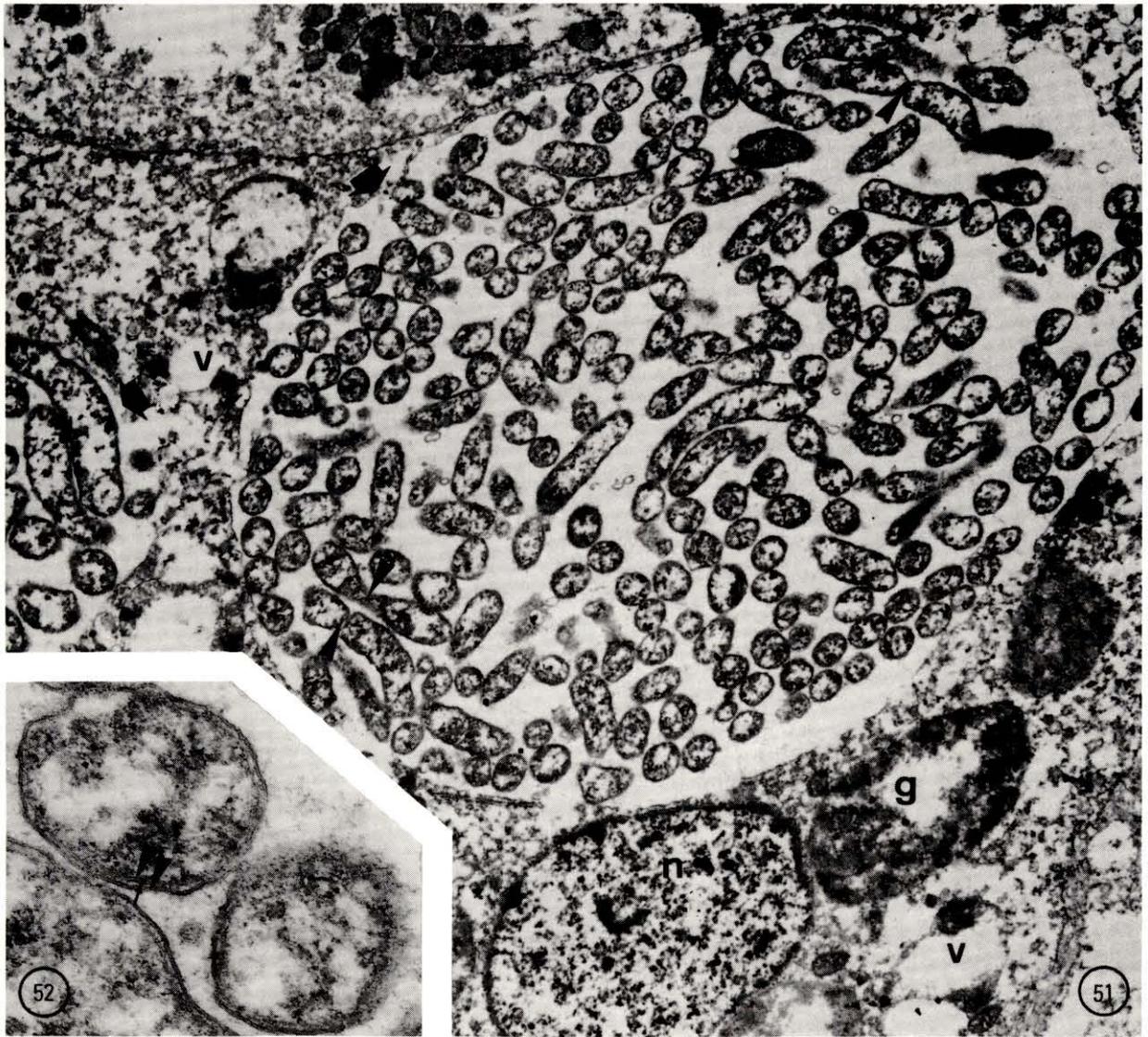


PLANCHE XXI

Infection rickettsienne d'Ostrea edulis

Histologie

Fig. 56. : Portion de l'épithélium digestif montrant le développement du micro-organisme dans les cellules sécrétrices. Cellules digestives (cd) Microcolonies de rickettsies (r). On note la présence de formes du parasite Marteilia refringens (→). Coupe semi-fine. Coloration bleu de Sahli. X 1 200.

Fig. 57. : La multiplication des rickettsies à l'intérieur d'une vacuole cytoplasmique unique (→) entraîne une importante vacuolisation du cytoplasme de la cellule infectée (*). Le noyau (n) subit également des déformations. Tissu interstitiel (ti). Basale (b). Coupe semi-fine. Coloration bleu de Sahli. X 1 200.

Fig. 58. : Coupe semi-fine au niveau des cellules digestives. Les grains basophiles (gb) correspondant aux germes rickettsiens sont répartis de façon hétérogène ; de nombreux espaces non colorés (▷) s'observent sur toute la surface de la microcolonie. Le cytoplasme de la cellule infectée est peu vacuolisé (▶). Coloration bleu de Sahli. X 1 200.

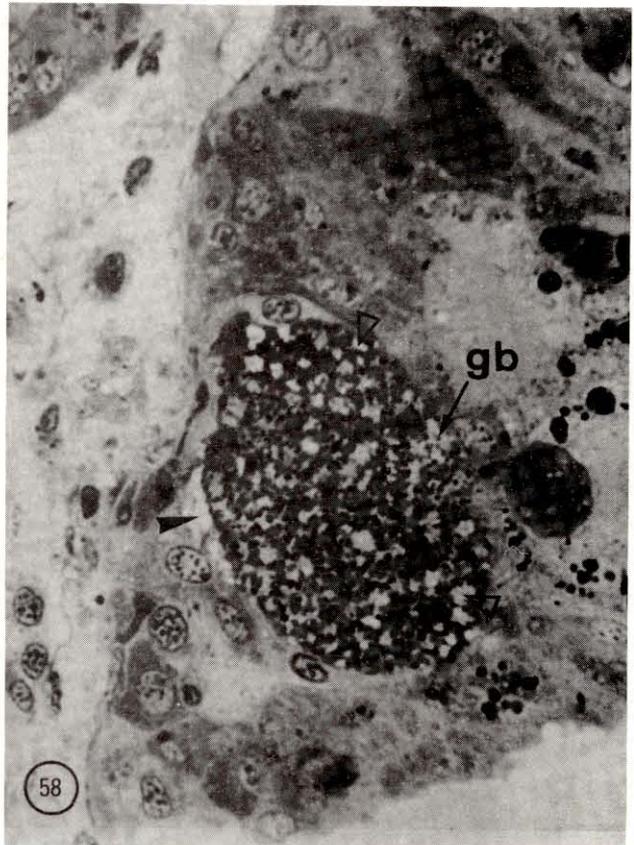
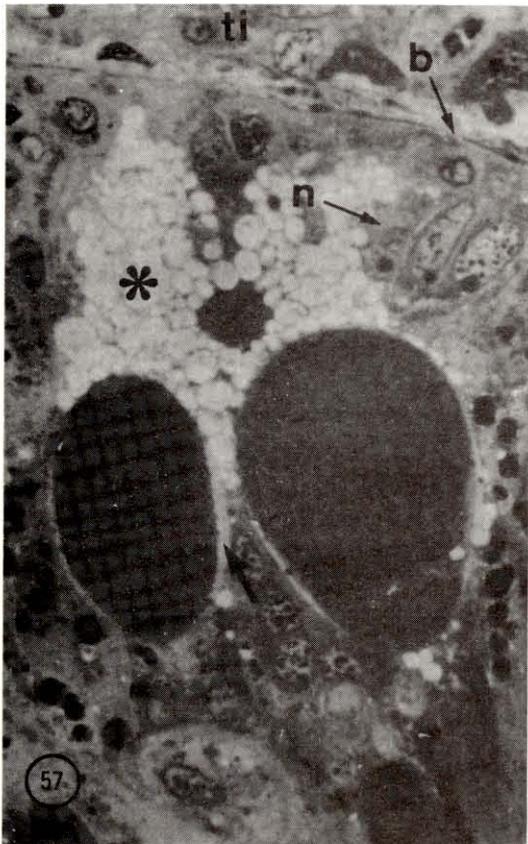
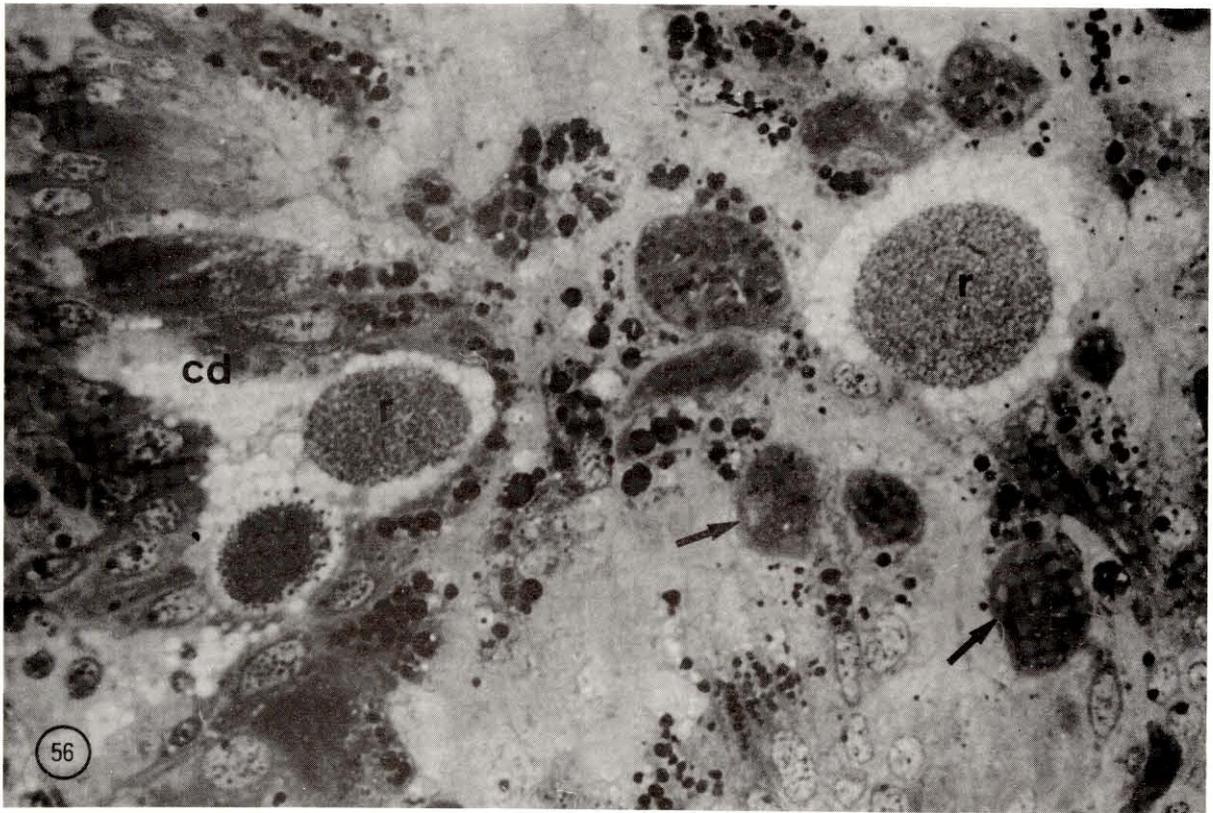


PLANCHE XXII

Infection rickettsienne d'Ostrea edulis
Ultrastructure

Fig. 59. : Coupe au niveau d'une microcolonie de rickettsies. Parmi les micro-organismes caractérisés par un certain pléomorphisme, on reconnaît des formes en cours de division présentant une constriction médiane (►). A côté de la vacuole principale (vp) contenant les germes, on observe des vacuoles claires de dimensions réduites (*), des granules de sécrétion (g) et des mitochondries (mi). X 11 000.

Fig. 60. : Section d'une rickettsie. L'enveloppe comporte deux membranes (►) trilamellaires. Dans le cytoplasme, des fibres (f) sont visibles parmi le matériel granuleux. X 77 000.

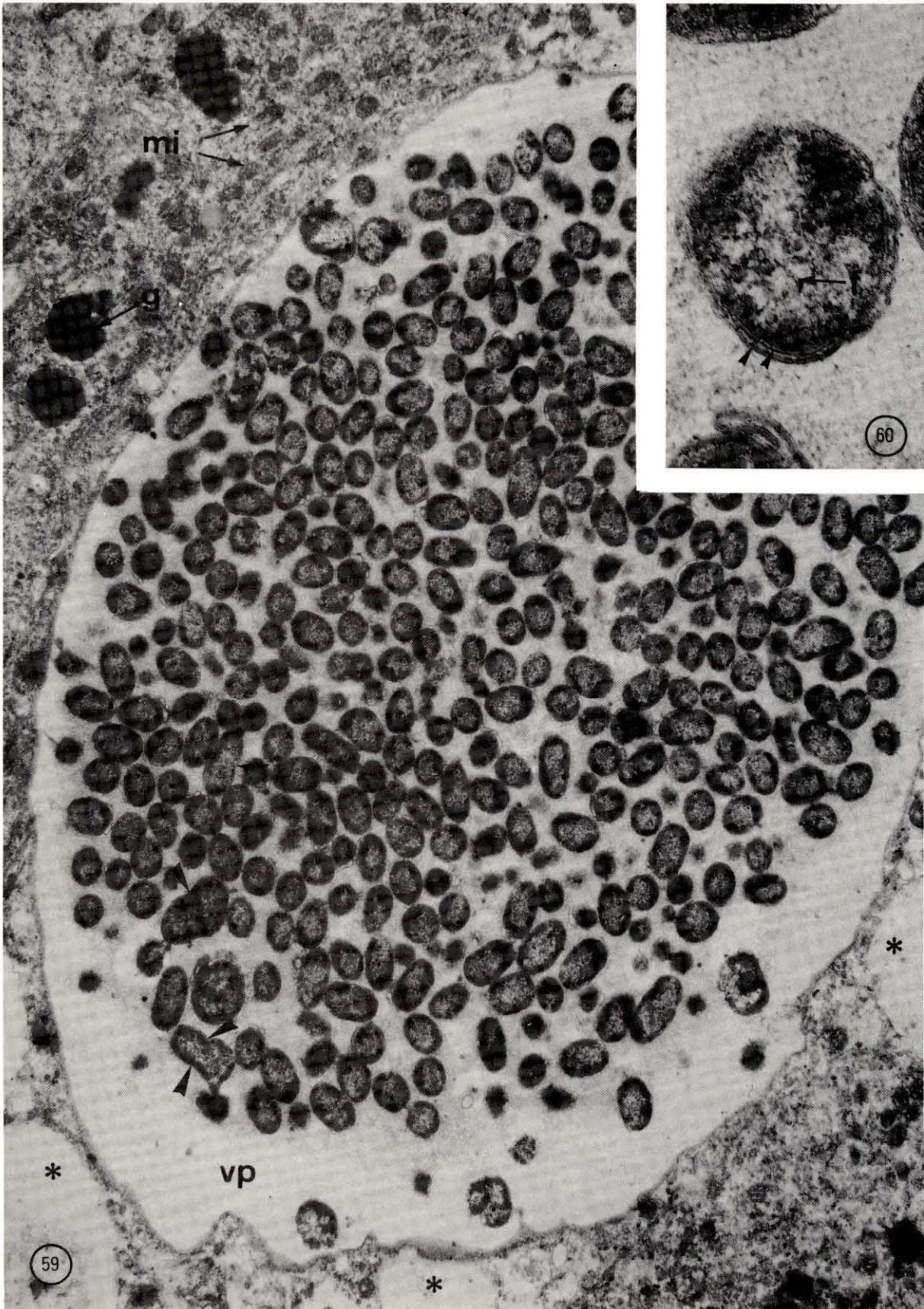


PLANCHE XXIII

Infection rickettsienne d'Ostrea edulis

Ultrastructure

Fig. 61. : Microcolonie formée de rickettsies altérées. Les cellules rickettsiennes sont caractérisées par de grandes variations dans la taille et la forme. L'enveloppe, souvent rompue laisse échapper du matériel cytoplasmique (→). Le cytoplasme s'est fortement opacifié dans les régions périphériques (▷). On note un certain épaissement de la membrane vacuolaire (m) et une dégradation très nette du cytoplasme de la cellule infectée (ci). X 17 000.

Fig. 62. : Détail de rickettsies altérées. Membrane externe rompue (►). Zone cytoplasmique constituée de matériel granuleux dense (g). X 110 000.

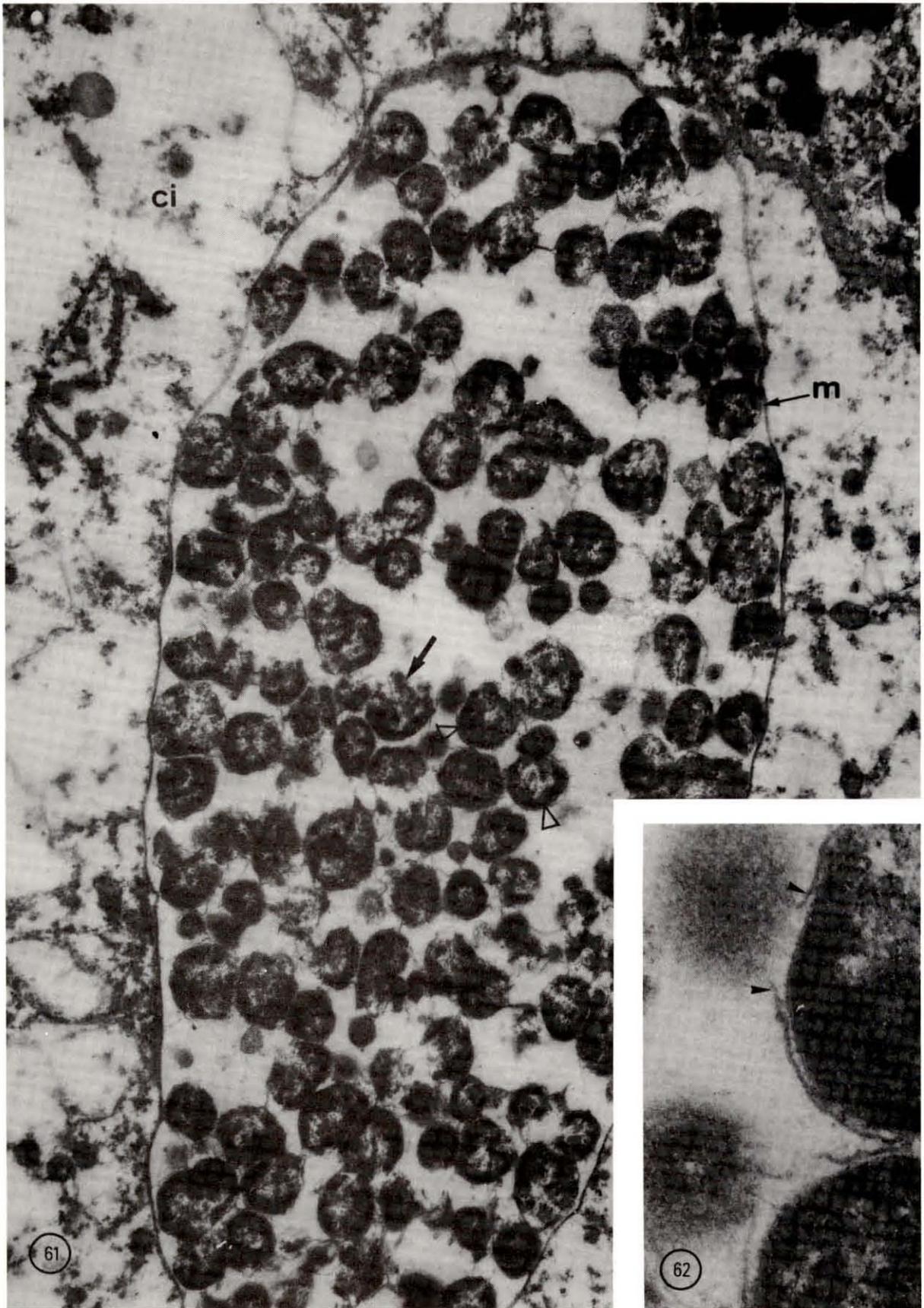


PLANCHE XXIV

Infection rickettsienne de Ruditapes philippinarum
Histologie et ultrastructure

Fig. 63. : Coupe au niveau de la glande digestive. Les microcolonies de rickettsies apparaissent sous forme d'inclusions basophiles (ib) localisées dans l'épithélium des diverticules digestifs (d). Tissu interstitiel (ti). Coloration hémalum-bleu de Mallory. X 500.

Fig. 64. : Portion d'une microcolonie formée de corps clairs. Noter le pléomorphisme des microorganismes. X 10 800.

Fig. 65. : Microcolonie ne renfermant que des corps denses. En section longitudinale (sl), les germes présentent un aspect cunéiforme. Membrane vacuolaire (►). Membrane de la cellule infectée (▷). Microvillosités (→). X 10 800.

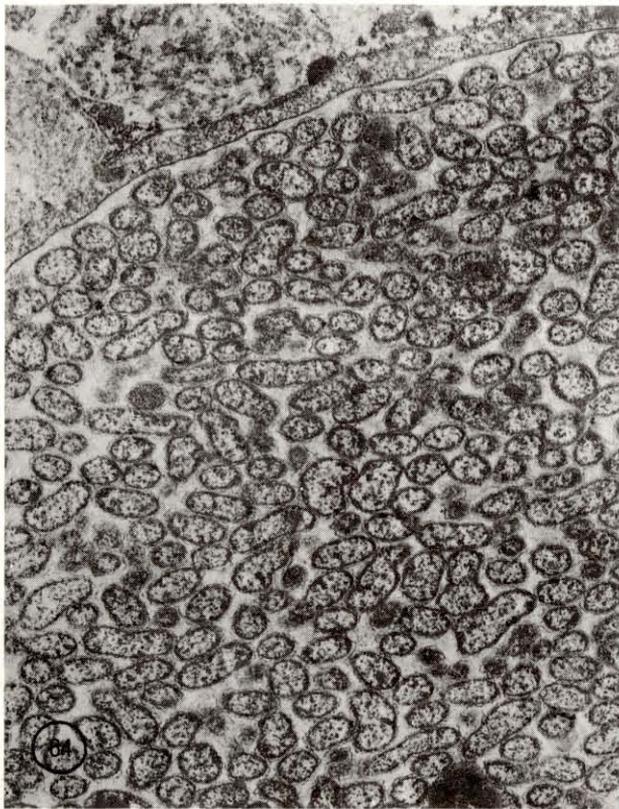
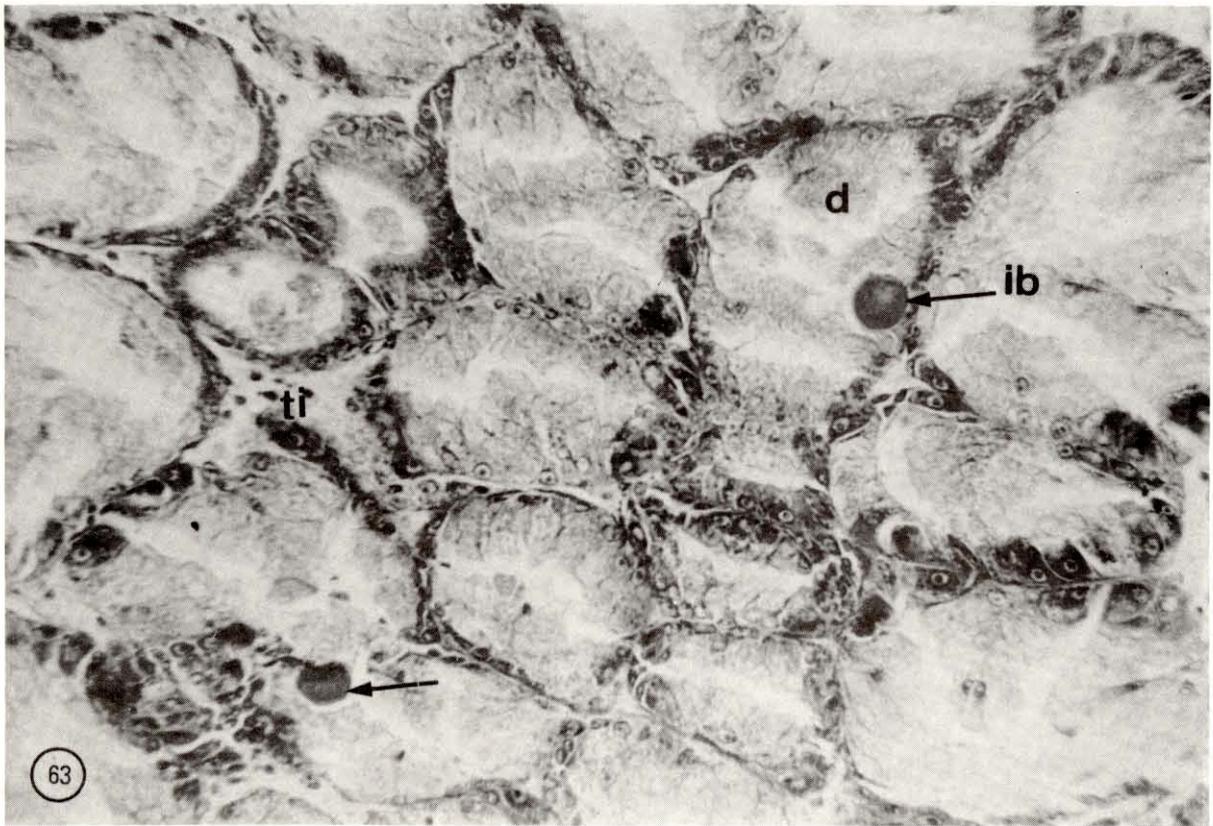


PLANCHE XXV

Infection rickettsienne de Ruditapes philippinarum
Ultrastructure

Fig. 66. : Dans certaines microcolonies de corps bacilliformes clairs apparaissent des corps denses (cd) et des corps mixtes (cm) comprenant une partie dense (►) et une partie claire (▷). Outre le pléomorphisme des particules on notera le contour sinueux de la paroi (→).
X 40 000.

Fig. 67. : Portion d'une microcolonie de corps denses (cd). Le cytoplasme est constitué de grains denses (►) répartis d'une façon homogène. De forme allongée, ils sont caractérisés par une extrémité aplatie.
X 54 000.

Fig. 68. : Détail de l'enveloppe des corps denses : les feuilletts denses (→) de la paroi (p) sont bien visibles mais la membrane plasmique (mp) confondue avec le cytoplasme est peu distincte. X 105 000.

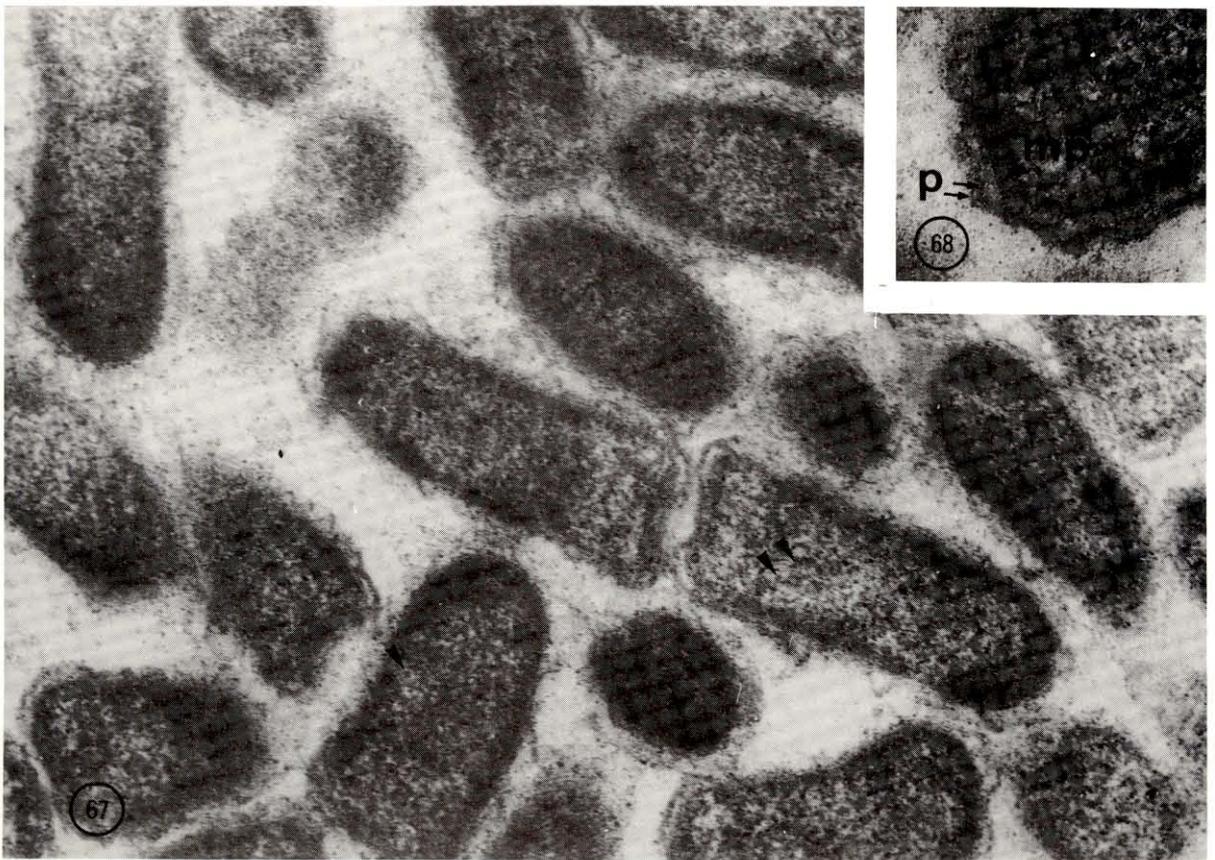
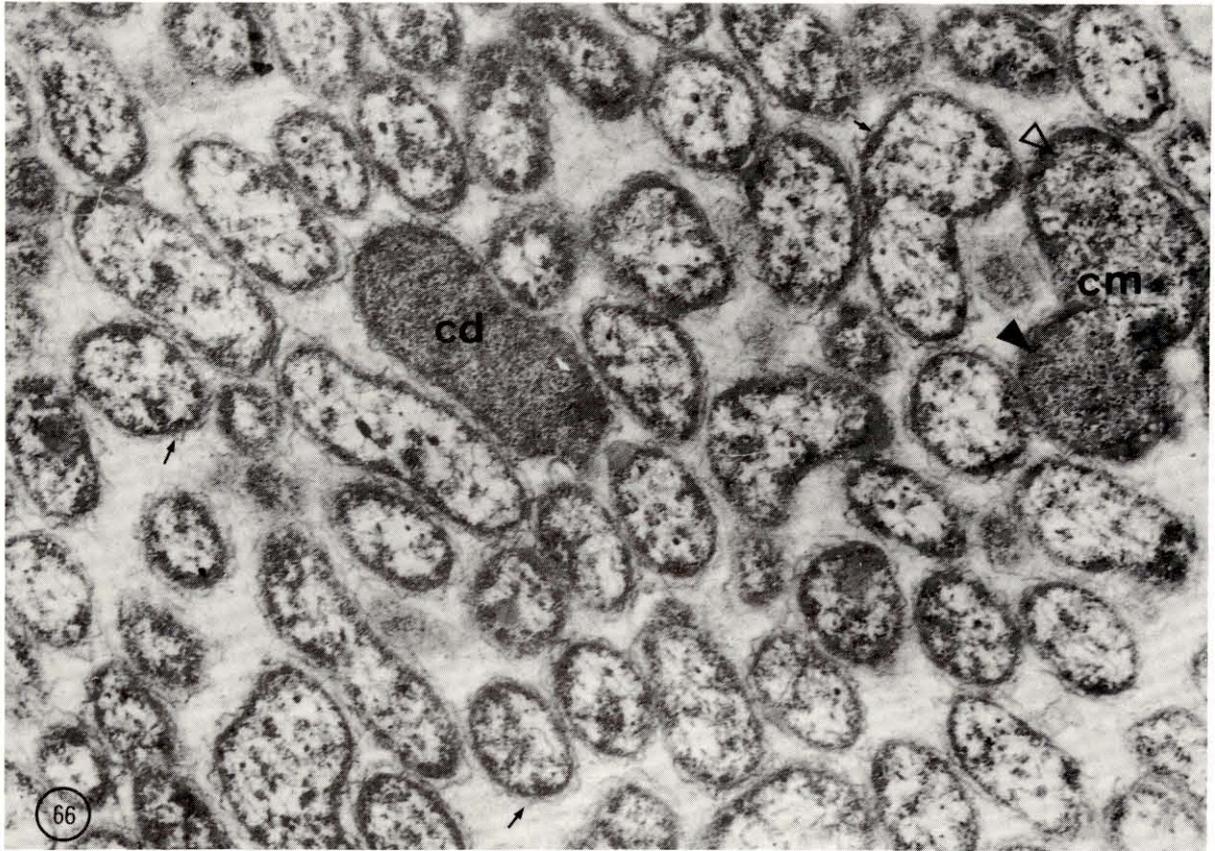


PLANCHE XXVI

Infection rickettsienne de Crassostrea angulata

Fig. 69. : Coupe au niveau de la glande digestive. A l'intérieur de la cellule sécrétrice infectée (ci) la microcolonie occupe une vacuole intracytoplasmique unique (v). Cellules sombres de remplacement (cr). Tissu interstitiel (ti). Coloration azan de Heidenhain. X 2 400.

Fig. 70. : Section d'un diverticule comportant plusieurs cellules épithéliales infectées. Les microcolonies (c) présentent un aspect granuleux hétérogène. Coupe semi-fine. Coloration bleu de Sahli. X 1 200.

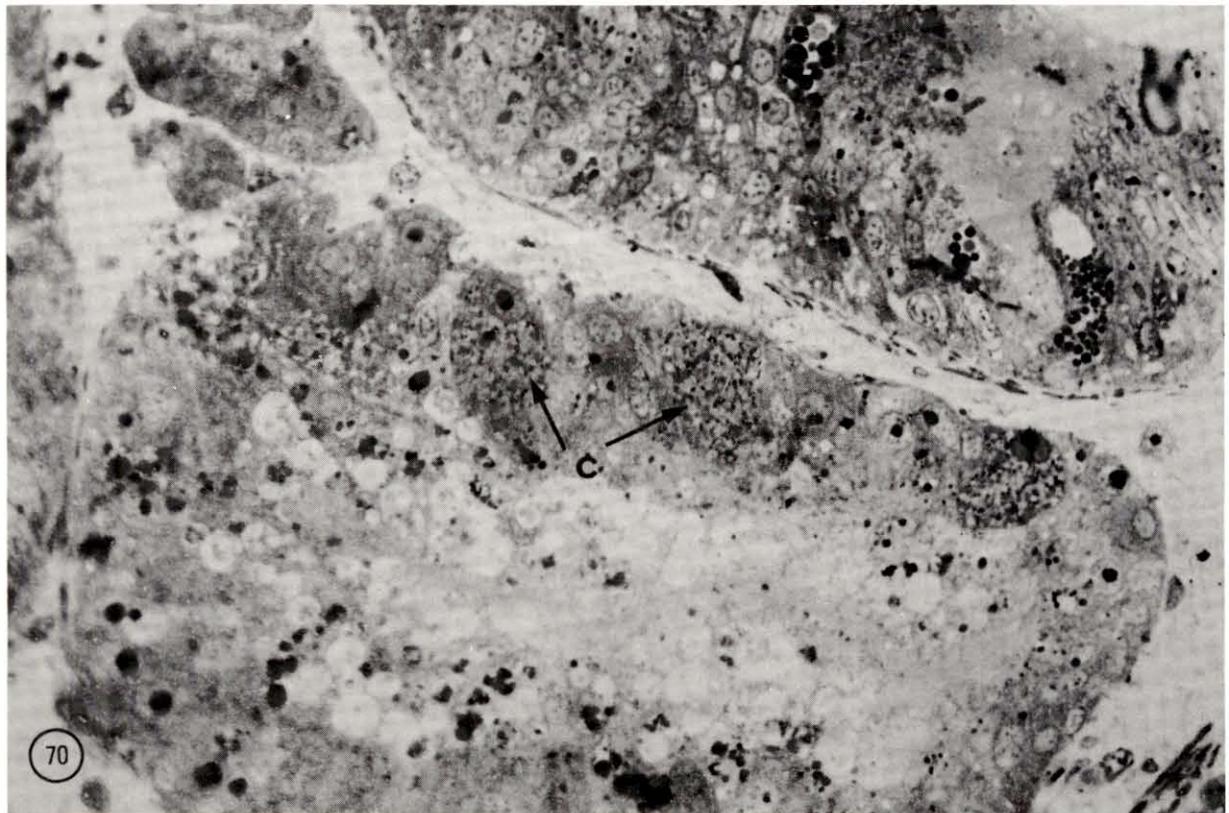
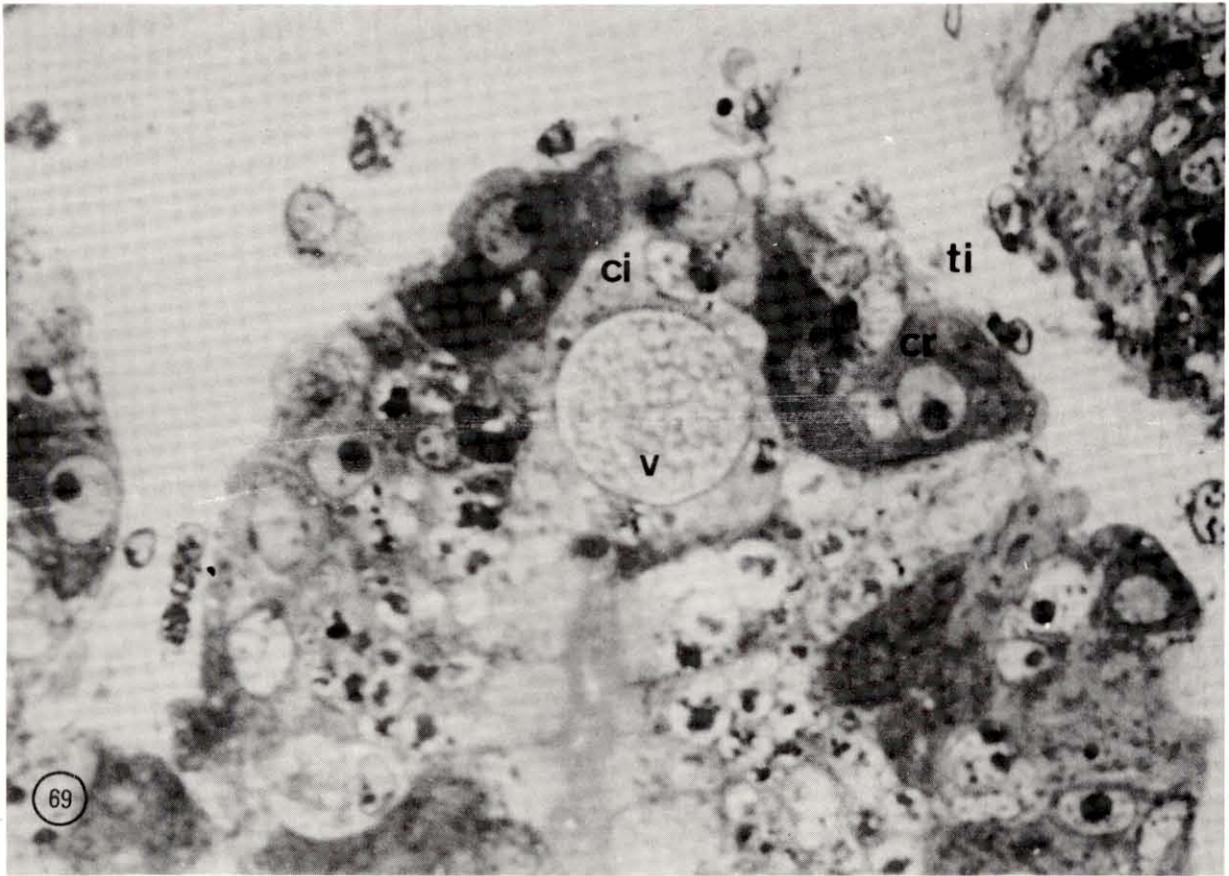


PLANCHE XXVII

Infection rickettsienne de Crassostrea angulata
Ultrastructure

Fig. 71. : Coupe passant par une cellule infectée de l'épithélium digestif. Les microorganismes sont répartis à l'intérieur de nombreuses petites vacuoles cytoplasmiques (v). Ils forment une microcolonie comportant des corps élémentaires (ce) des corps initiaux (ci) et des corps intermédiaires (cm). On note de nombreuses formes de division (cd). Entre les vacuoles à rickettsies, le cytoplasme granuleux comporte des vésicules fermées polymorphes (v). Noyau (n). Mitochondries (mi). X 19 000.

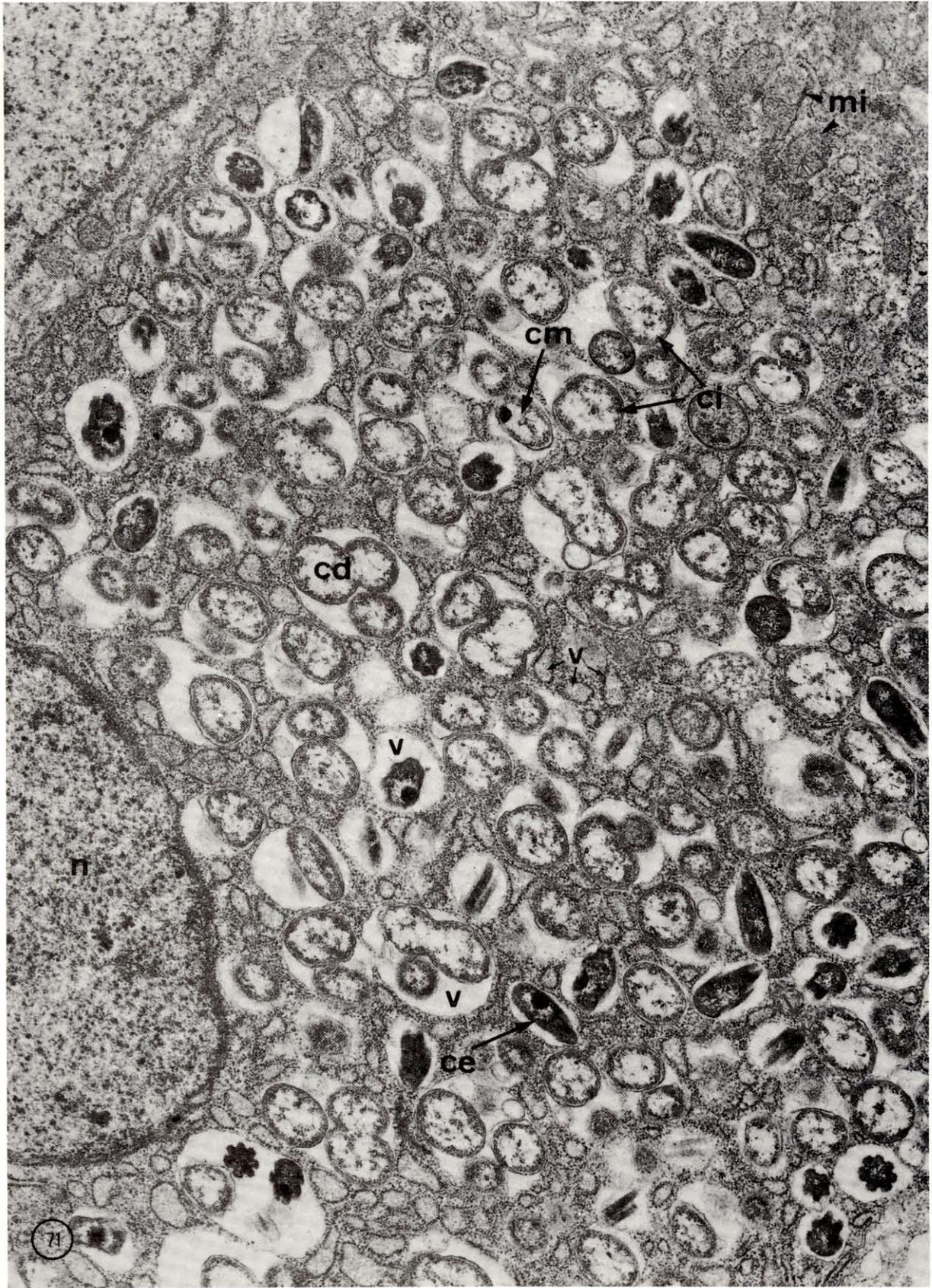


PLANCHE XXVIII

Infection rickettsienne de Crassostrea angulata
Ultrastructure

Fig. 72. : Corps initiaux. La paroi (p) et la membrane plasmique (m) sont séparées par un espace périplasmique. Le cytoplasme comporte un réseau de fibrilles (f) associées aux ribosomes (r). X 60 000.

Fig. 73. : Corps initiaux. Forme végétative en cours de division présentant une constriction médiane (►). Le réseau cytoplasmique intervacuolaire est riche en ribosomes (r) et particulièrement à la périphérie de vésicules polymorphes (→). X 50 000.

Fig. 74. : Corps intermédiaire. De forme plus allongée que les corps initiaux, les corps intermédiaires (cm) sont caractérisés par la présence d'un nucléoïde (n) vers lequel convergent des fibrilles (f). Paroi (p). X 40 000.

Fig. 75. : Portion d'une microcolonie renfermant principalement des corps élémentaires. Les sections transversales (st) présentent un profil crénelé caractéristique. Sur les sections longitudinales (st), le nucléoïde est apparent (►). Mitochondrie (mi). X 26 500.

Fig. 76. : Section longitudinale de corps élémentaires. Le nucléoïde (n) accolé à l'enveloppe est entouré d'une zone cytoplasmique claire (*). X 66 500.

Fig. 77. : Détail d'un corps élémentaire en section transversale montrant la structure pentalamellaire de l'enveloppe (≡). X 73 000.

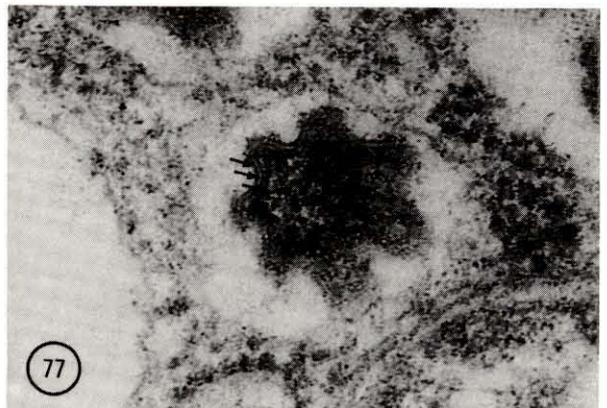
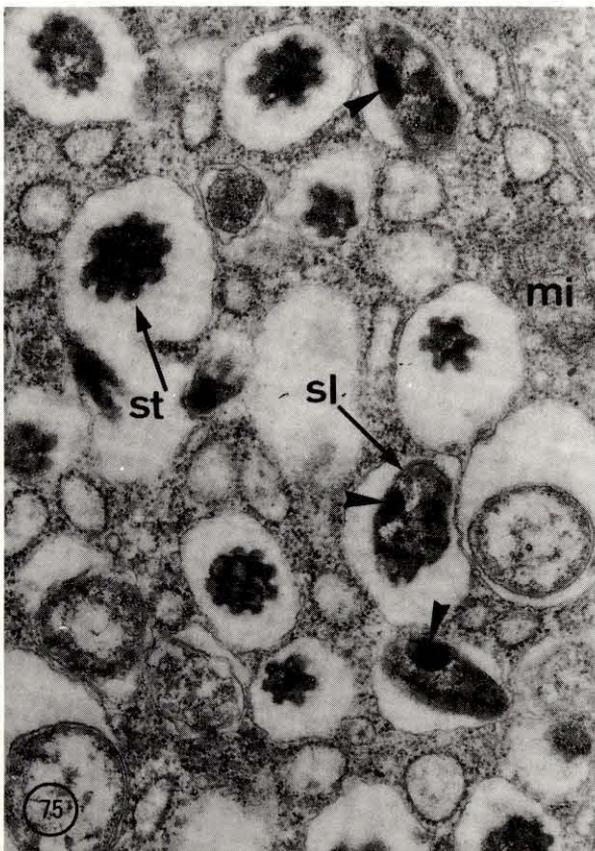
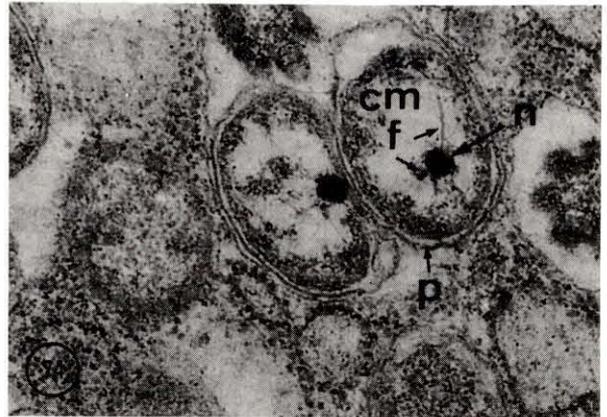
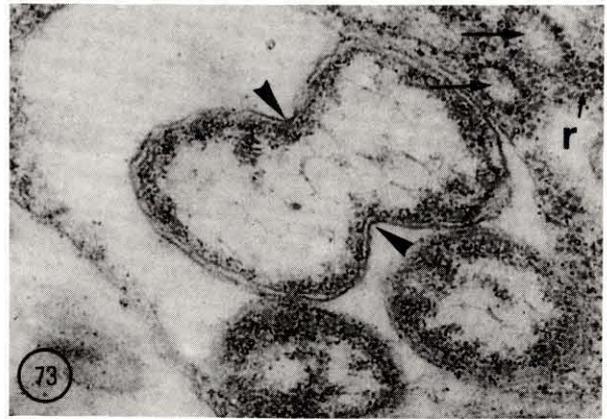
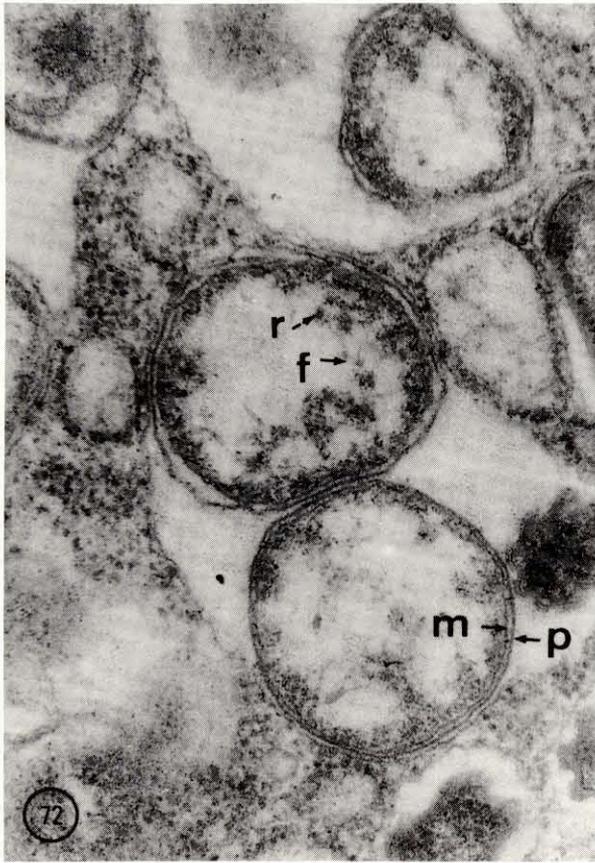


PLANCHE XXIX

Infection rickettsienne de Crassostrea angulata

Ultrastructure

Fig. 78. : Microcolonie regroupant à l'intérieur d'une vacuole cytoplasmique unique une majorité de corps intermédiaires (cm) et des corps initiaux (ci) dont certains en division (cd). Dans le cytoplasme de la cellule infectée, de nombreuses mitochondries (mi) s'observent au voisinage de la membrane vacuolaire (→). X 30 000.

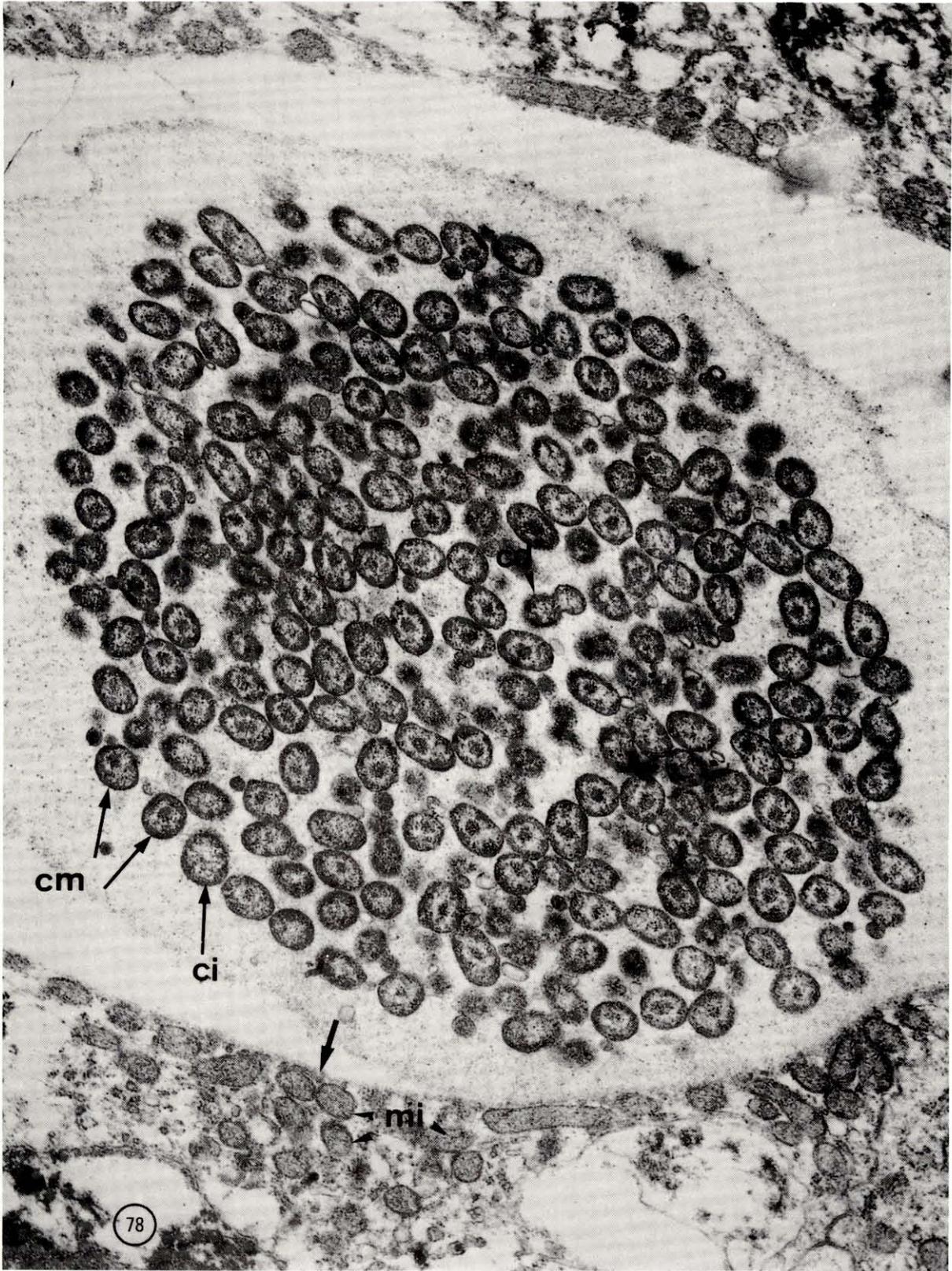


PLANCHE XXX

Infection rickettsienne de Crassostrea angulata
Ultrastructure

Fig. 79. : Coupe au niveau d'une microcolonie comprenant des formes de division (cd), des corps intermédiaires et un corps géant (cg). On distingue dans les cellules rickettsiennes un réseau de fibrilles (f) paraissant se condenser en nucléoïde dans la zone centrale. Sur certaines sections de particules, la structure de l'enveloppe est visible : paroi (p) ; membrane plasmique (m). X 53 000.

Fig. 80, 81 et 82. : Phases initiales de la multiplication des corps intermédiaires suivant un processus de bourgeonnement. L'enveloppe du bourgeon ne comporte qu'une membrane (►) correspondant à une extension de la paroi (p) de la cellule mère. X 53 000.

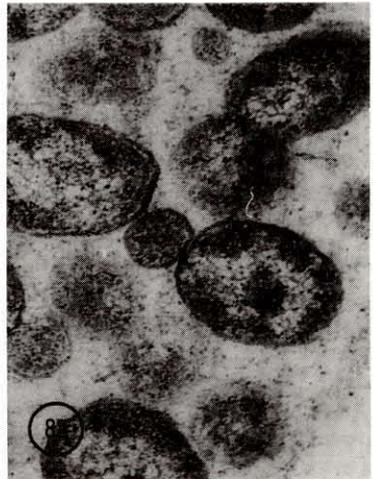
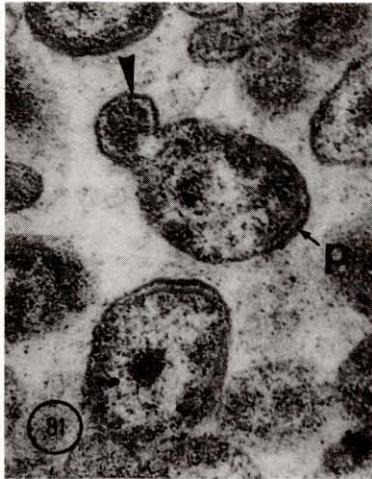
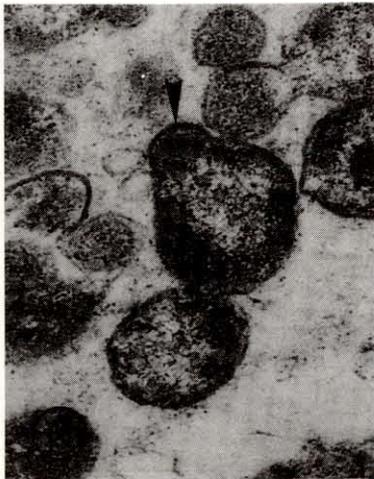
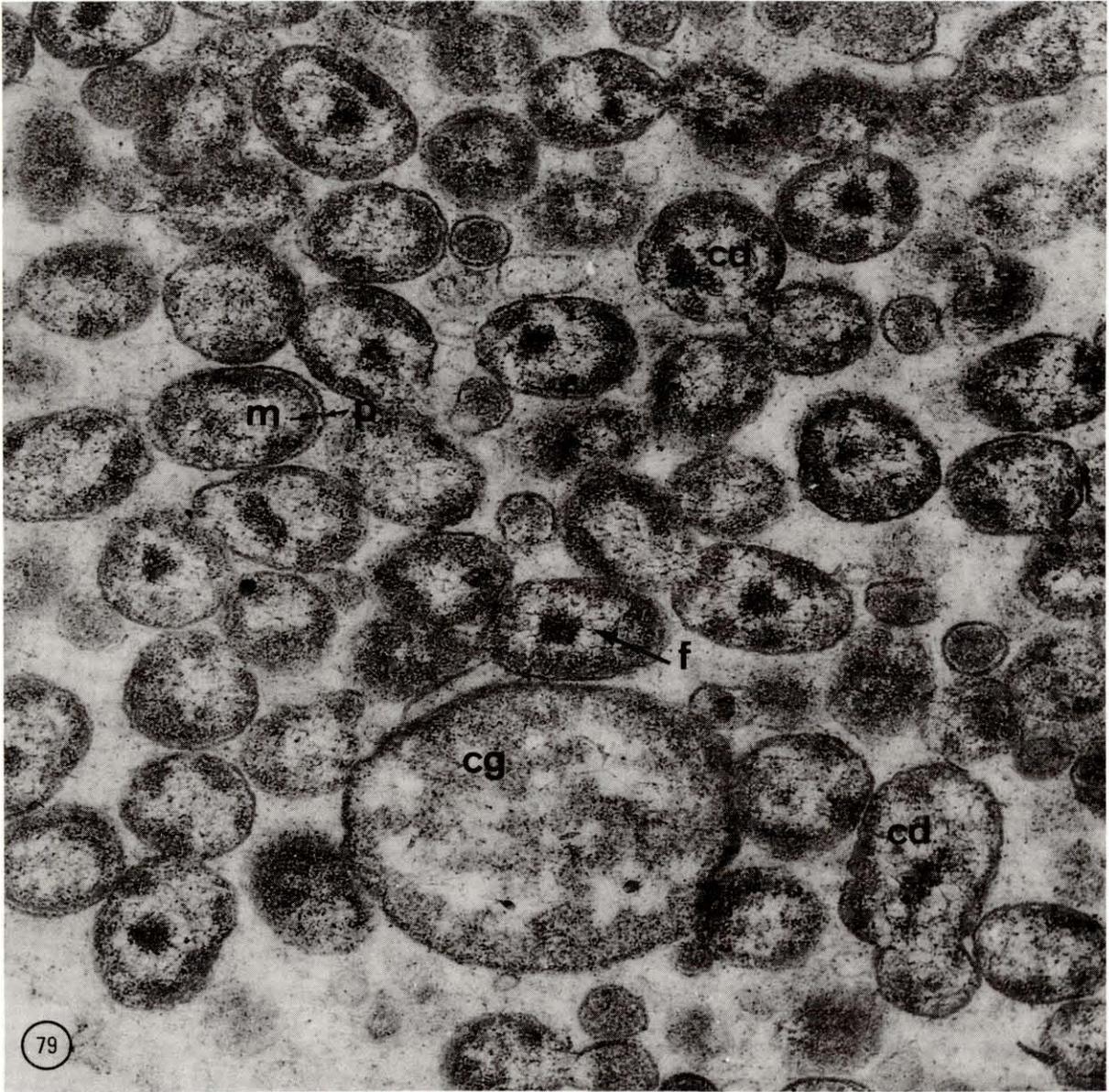


PLANCHE XXXI

Infection rickettsienne complexe de Scrobicularia piperata

Histologie

Fig. 83. : Rickettsie du type 1. La lésion rickettsienne correspond à une inclusion intracytoplasmique (i) d'aspect granuleux. La cellule digestive infectée (ci) renferme comme les cellules saines voisines (cs) de nombreux granules de sécrétion (g). Tissu interstitiel (ti). Basale (b). Coupe semi-fine, coloration bleu de Sahli. X 1 400.

Fig. 84. : Rickettsie de type 2. La cellule sécrétrice infectée est caractérisée par la présence d'une inclusion uniformément basophile (ib). Dans son cytoplasme peu chromophile, les granules de sécrétion (g) sont rares. Coupe semi-fine, coloration bleu de Sahli. X 1 400.

Fig. 85. : Rickettsie de type 3. Au cours du développement du microorganisme, la microcolonie forme une inclusion cytoplasmique granuleuse (i) présentant deux zones distinctes : l'une dense fortement basophile (★), l'autre faiblement colorée par le bleu de Sahli. (★). Cellules sécrétrices de l'épithélium digestif (cs). Coupe semi-fine, coloration bleu de Sahli. X 1 400.

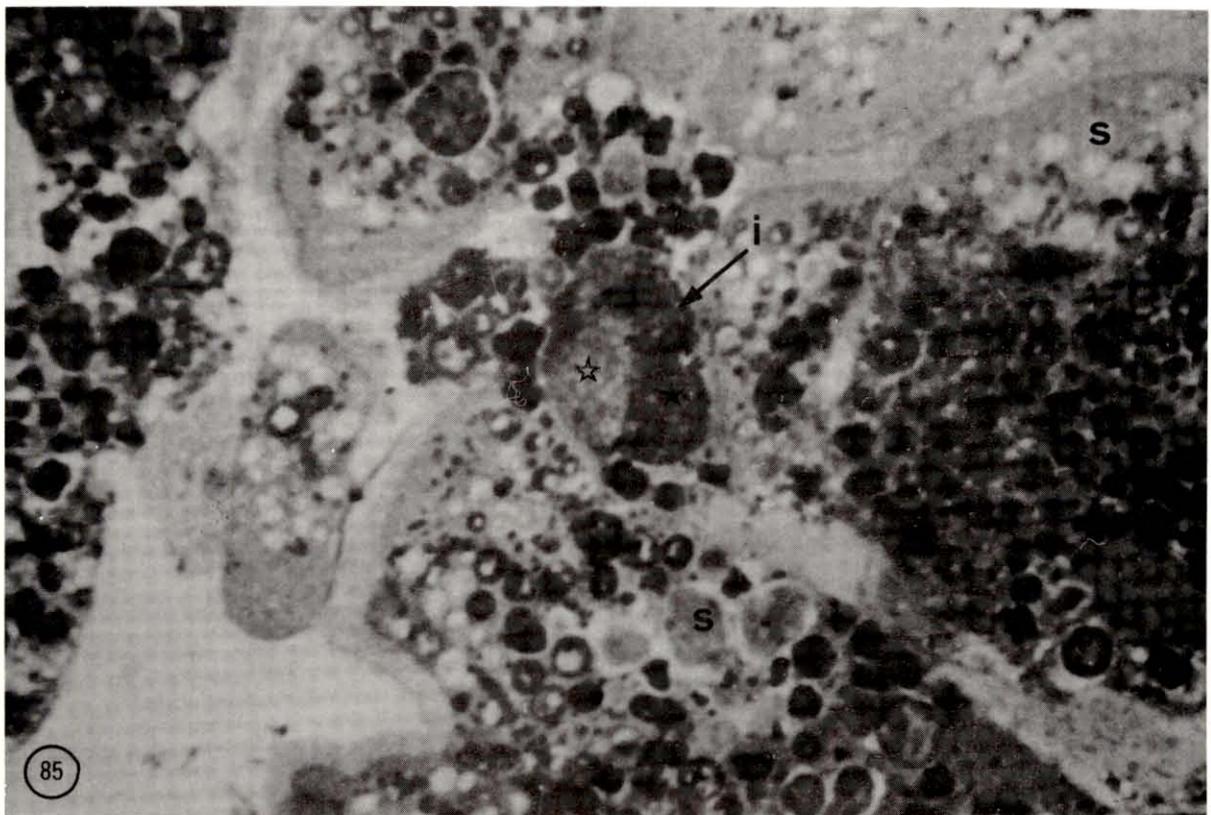
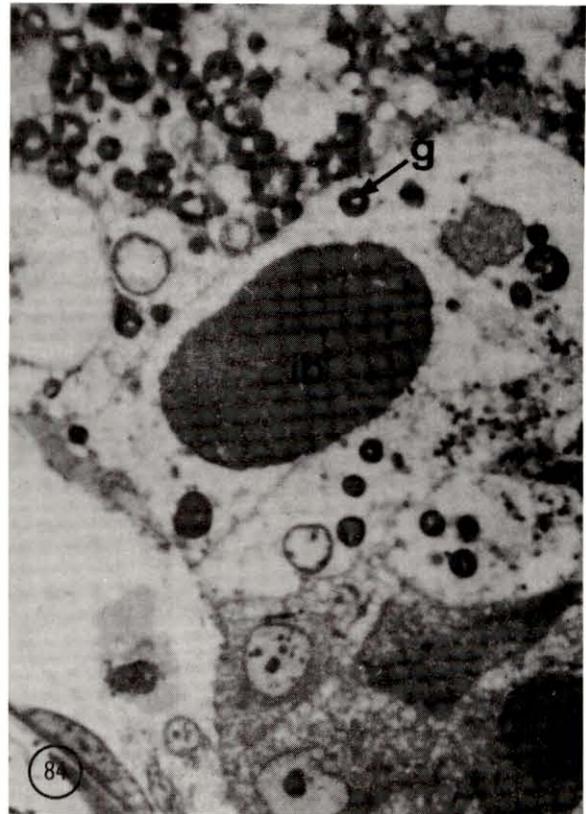
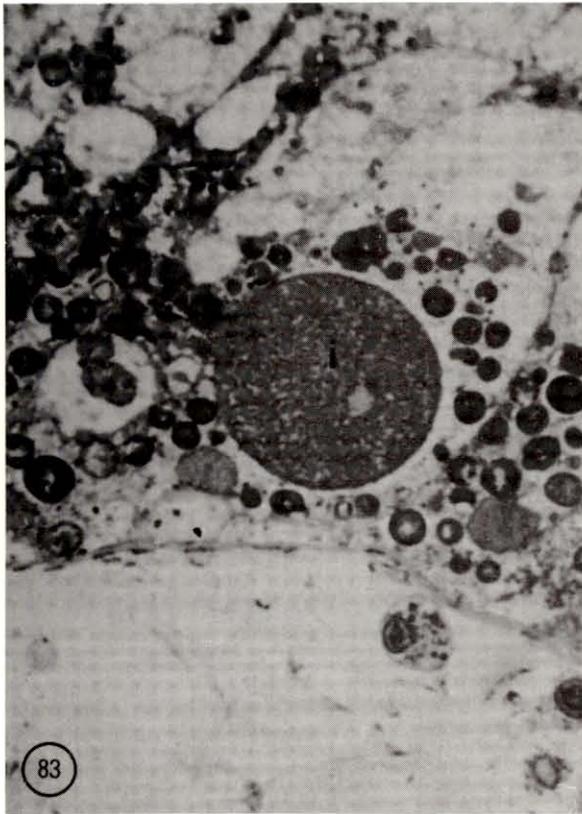


PLANCHE XXXII

Infection rickettsienne complexe de Scrobicularia piperata
Ultrastructure

Rickettsie de type 1

Fig. 86. : Section d'une microcolonie délimitée par une épaisse membrane vacuolaire (mv) et comprenant un seul type de germes coccoïdes. Cellule infectée (ci). Granules de sécrétion (g). X 3 200.

Fig. 87. : Portion d'une microcolonie comportant des formes en cours de division caractérisées par une constriction médiane (►): de petites vésicules sont visibles dans le cytoplasme intravacuolaire (→). Noter l'épaississement des deux feuillets denses (→) de la membrane de la vacuole X 11 000.

Fig. 88. : Détail de la structure du microorganisme. Paroi (p). Membrane plasmique (mp). Ribosomes (r). Fibrilles (f). X 72 000.

Rickettsie de type 2

Fig. 89. : Section d'une microcolonie formée de corps bactériens allongés se multipliant à l'intérieur d'une vacuole au contenu cytoplasmique granuleux et dense. La membrane vacuolaire (mv) est épaisse et sinueuse. Dans le cytoplasme altéré de la cellule digestive infectée quelques mitochondries (mi) et des grains de sécrétions (►). X 7 000.

Fig. 90. : Détail de rickettsies en cours de division. La paroi (p) s'invagine au niveau de la zone de séparation du cytoplasme (►); fibrilles (f); ribosomes (r). X 55 000.

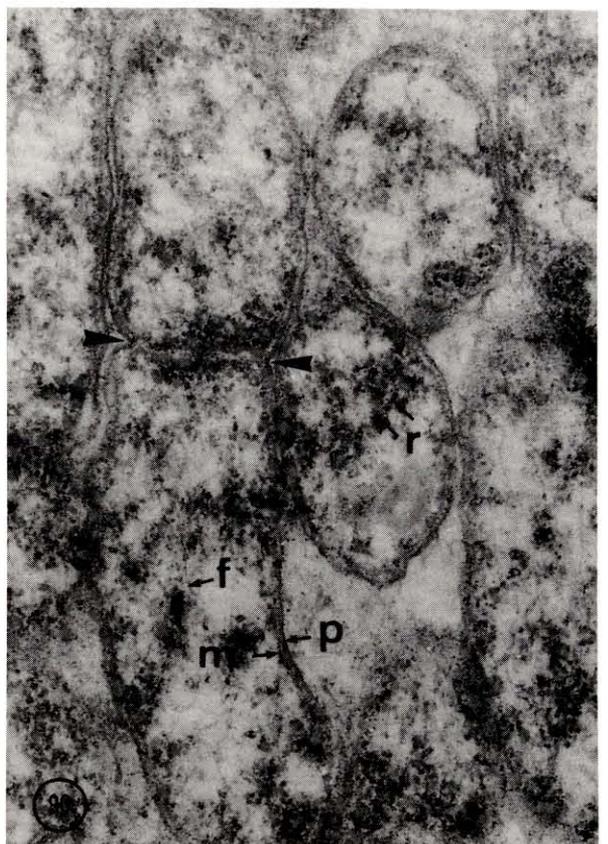
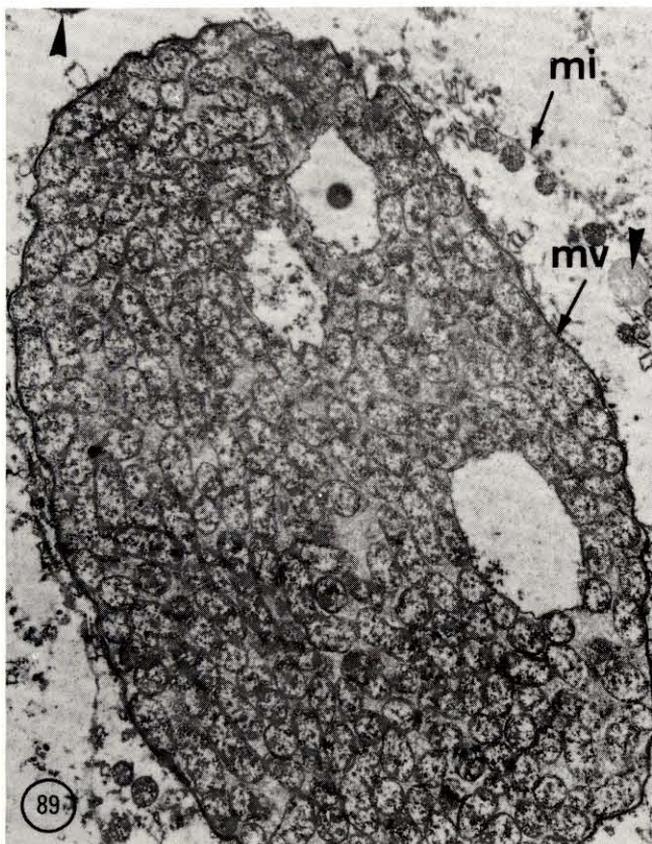
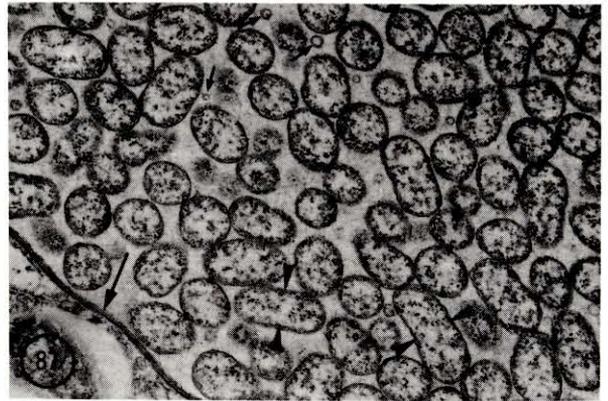


PLANCHE XXXIII

Infection rickettsienne complexe de Scrobicularia piperata
Ultrastructure

Rickettsie de type 3

Fig. 91. : Coupe au niveau d'une microcolonie constituée de formes végétatives (ci) et de formes denses (ce), réparties en deux secteurs distincts. Noter la disposition caractéristique des corps denses empilés en petits groupes. X 13 200.

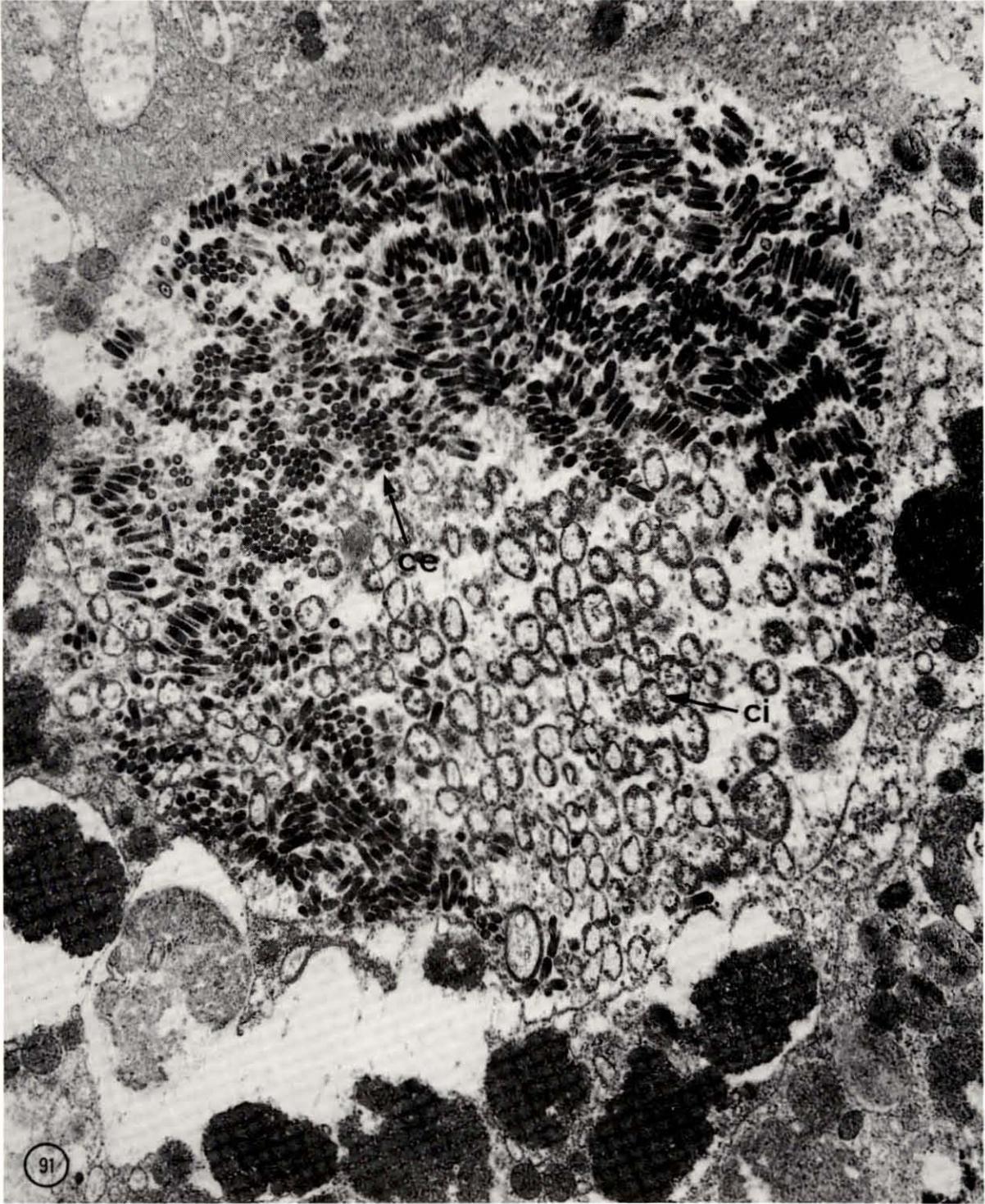


PLANCHE XXXIV

Infection rickettsienne complexe de Scrobicularia piperata

Ultrastructure

Rickettsie d type 3

Fig. 92. : Coupe d'une microcolonie au niveau des corps initiaux (ci). L'aspect clair de leur contenu contraste avec celui du cytoplasme intravacuolaire (★) dans lequel sont visibles de petites vacuoles (►). X 70 000.

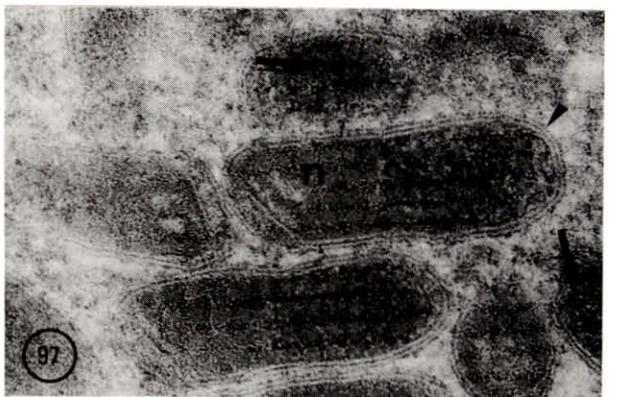
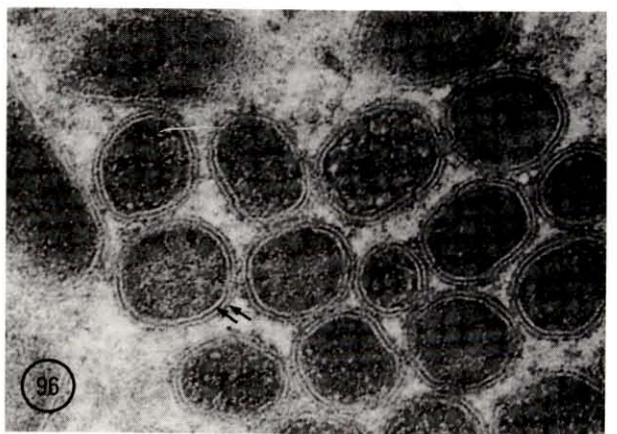
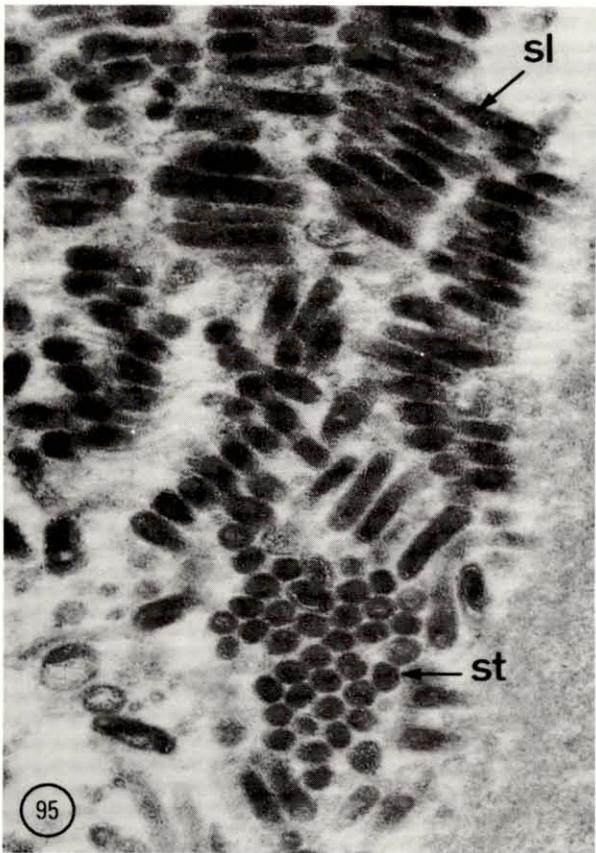
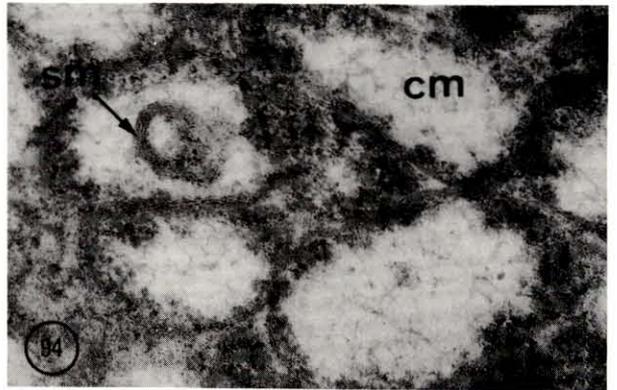
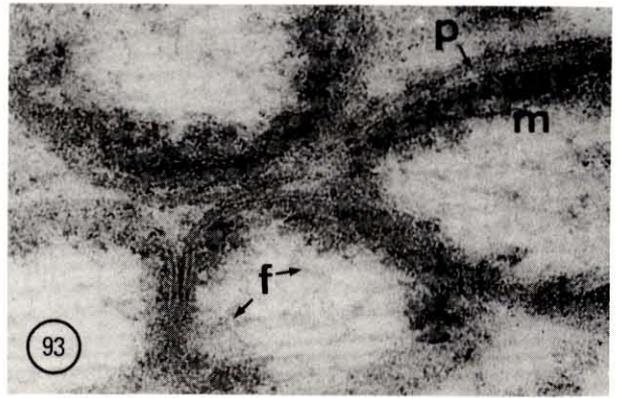
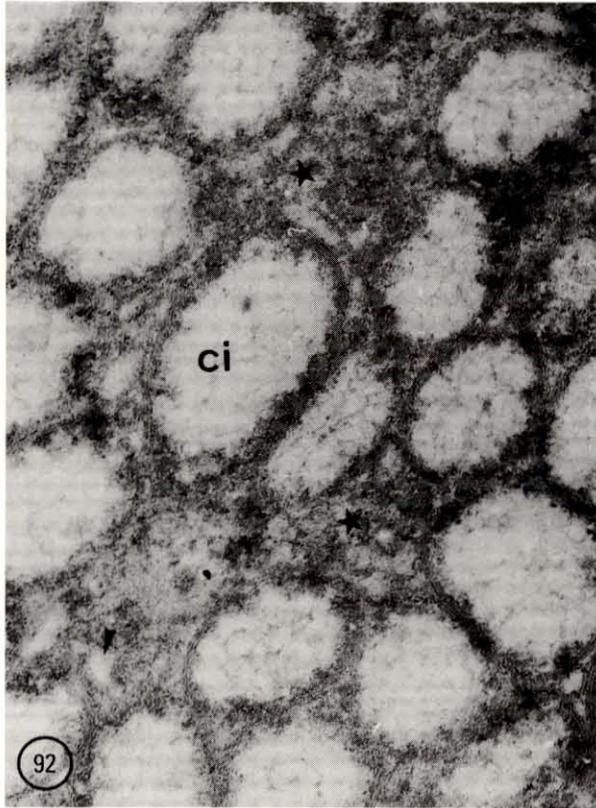
Fig. 93. : Corps initiaux montrant en section transversale des ribosomes périphériques (r) et un fin réseau de fibrilles (f) ; paroi (p) ; membrane plasmique (m). X 111 000.

Fig. 94. : La transformation des corps initiaux en corps élémentaires passe par des formes intermédiaires (cm) plus allongées. Système membranaire interne (sm). X 70 000.

Fig. 95. : Portion d'une microcolonie renfermant de nombreux corps élémentaires en section longitudinale (sl) et en section transversales (st). X 30 000

Fig. 96. : Coupe transversale de corps élémentaires montrant la structure pentalamellaire de l'enveloppe (⇌). Suivant le plan de coupe, les sections transversales se situent au niveau du nucléoïde (n) ou au niveau d'une zone cytoplasmique riche en ribosomes (r). X 110 000.

Fig. 97. : Sur les sections longitudinales des corps élémentaires la redistribution du contenu cellulaire en deux secteurs est apparente : cytoplasme (cy), nucléoïde (n). Suivant les sections, les ribosomes se présentent alignés (→). Par endroits, la paroi paraît perforée (►). X 110 000



CHAPITRE VI

ETUDE DE L'INFECTION CAUSEE PAR BONAMIA OSTREA CHEZ L'HUITRE
PLATE OSTREA EDULIS

L'étude de mortalités survenues en Bretagne dans le secteur de l'île Tudy au cours de l'été 1979 nous a conduit à observer chez l'huître plate O. edulis l'existence d'un parasite intracellulaire d'un type nouveau jusqu'alors inconnu sur les côtes françaises (Comps et coll., 1980). Rapidement, cette parasitose allait s'étendre à la plupart des zones ostréicoles de Bretagne comme devait le montrer la situation épidémiologique établie au mois de mai 1980 par Tigé et coll. (1980).

A cette époque, les populations d'huîtres les plus touchées se trouvaient à Etel et à l'île Tudy pour la Bretagne sud et à Paimpol pour la Bretagne nord avec des taux d'huîtres parasitées supérieurs à 10 % ; dans la région de Cancale, le taux d'infestation était inférieur à 10 % , tandis que dans les centres de Morlaix et de Binic, il n'atteignait pas 5 %.

Vraisemblablement à la suite de transferts d'huîtres de Bretagne, quelques lots d'huîtres parasitées par Bonamia ostrea ont été décelés dans le Bassin d'Arcachon et dans le Bassin de Marennes-Oléron. Par contre aucun des examens de contrôle de parasitisme effectués sur les huîtres de l'étang de Thau n'a révélé la présence du parasite dans ce secteur ostréicole.

Parallèlement au suivi épidémiologique de la maladie nécessité par la gestion des stocks, des recherches approfondies ont été développées afin de définir les caractéristiques du Protiste incriminé, notamment sa structure et son cycle de développement, et de préciser son action pathogène.

I - ETUDE DU PARASITE BONAMIA OSTREA Pichot et coll., 1980.

Dès sa mise en évidence sur coupes histologiques d'huîtres malades de l'île Tudy, il est apparu indispensable de recourir à la microscopie électronique pour aborder dans le détail la description du nouveau pathogène de l'huître plate. Ces examens ultrastructuraux ont été effectués sur des huîtres provenant de Cancale, de Binic, de Paimpol ainsi que de l'île Tudy l'échantillonnage ayant été réalisé régulièrement pour chaque saison durant les années 1979 (à partir de juin) et 1980.

A - Localisation.

Comme nous l'avons montré initialement (Comps et coll., 1980 ; Pichot et coll., 1980), le parasite est localisé dans le tissu interstitiel où généralement il occupe une position intracellulaire, dans les cellules sanguines de l'huître. On le trouve donc dans les sinus sanguins, aussi bien au niveau du conjonctif englobant la glande digestive qu'au niveau des filaments branchiaux (fig.101, 102). Plus caractéristique encore de la maladie est la localisation d'hémocytes infectés au sein de petites lacunes formées entre les cellules de Leydig. Par ailleurs, dans quelques cas, des formes du parasite ont été observées dans le tissu cardiaque et dans l'épithélium stomacal (fig.103).

A côté des stades intracellulaires, on trouve dans l'hémolymphe des formes libres provenant vraisemblablement de cellules sanguines éclatées.

B - Morphologie et structure du Parasite.

L'observation à partir de frottis frais ou sur frottis colorés par la méthode de Giemsa n'apporte en raison de sa petite taille que peu d'indications sur ce parasite. Aussi a-t-il fallu pour en préciser les caractéristiques procéder à des examens histologiques et cytologiques en microscopie photonique et en microscopie électronique.

On notera d'ailleurs qu'en dehors des cas où des symptômes externes au niveau des branchies étaient visibles, seul l'examen histologique pratiqué couramment dans les études épidémiologiques permet d'établir un diagnostic précis de la parasitose.

1 - Microscopie photonique.

Sur coupes à la paraffine, le parasite se présente sous forme de petites cellules arrondies de 2 à 3 μm de diamètre. Les colorations générales, comme l'azan de Heidenhain ou la coloration de Mann-Dominici (notamment après fixation au Zenker), révèlent un cytoplasme fortement basophile. Par contre, les colorations à base d'hématoxyline ou d'hémalum mettent en évidence une zone centrale, à caractère Feulgen positif, évoquant la présence d'un noyau ; ce point, comme on le verra plus loin, a été confirmé par l'étude ultrastructurale.

A partir de coupes semi-fines colorées par le bleu de Salhi différencié par l'alcool éthylique à 50°, on peut distinguer deux catégories de cellules en fonction de leurs affinités tinctoriales (fig.102) :

- des cellules faiblement basophiles (peu nombreuses) : de forme arrondie ou légèrement allongée, elles mesurent de 3 à 5 μm ; sur certaines images, on reconnaît dans le noyau un nucléole en position pariétale,

- des cellules fortement basophiles représentant la forme la plus fréquente du parasite ; de forme parasphérique, ces cellules mesurent de 2 à 3 μm ; dans le cytoplasme, intensément coloré par le bleu, on observe une ou deux petites vacuoles claires mais on ne distingue aucune structure nucléaire.

2 - Microscopie électronique.

Les données cytologiques acquises en microscopie photonique ont été pour partie confirmées par l'étude ultrastructurale qui, par ailleurs, a permis de mettre en évidence des organites intracellulaires et une organisation constituant des caractères originaux pour ce parasite.

Dans la description détaillée du parasite on retrouvera la distinction établie en fonction du caractère basophile des cellules et correspondant en microscopie électronique à une différence d'opacité aux électrons : les cellules faiblement basophiles sont peu contrastées et les cellules fortement basophiles présentent une grande opacité aux électrons ; elles peuvent être interprétées respectivement comme formes végétatives et comme formes de résistance (Pichot et coll., 1980).

a) Organisation et structure générale du parasite.

aa) Les formes de résistance ou formes denses sont les plus répandues dans les tissus de l'huître parasitée et ont été de ce fait initialement décrites comme "cellules types" du parasite (Comps et coll., 1980). Généralement d'aspect arrondi, ces cellules montrent un certain pléomorphisme qui semblerait correspondre à un artefact de fixation et d'inclusion comme tendrait à le montrer les variations de forme constatées en utilisant différentes résines. Elles mesurent entre 2 et 3 μm ($d = 2,3 \pm 0,2$; $N = 50$) (fig.104).

Enveloppées par une membrane unitaire, elles renferment un cytoplasme riche en grains denses aux électrons uniformément répartis (fig.106). La coloration (acétate d'uranyle et citrate de plomb) après traitement des coupes à l'E.D.T.A. augmente très sensiblement le contraste de ces grains, révélant leur richesse en ARN et démontrant ainsi qu'il s'agit de ribosomes. Leur taille moyenne est de 2,5 nm alors que ceux de la cellule hôte, associés au réticulum endoplasmique, mesurent 2,8 à 3 nm (fig.111).

Le noyau, dont on distingue nettement les deux membranes qui l'entourent, a un diamètre souvent inférieur à 1 μm ; son nucléoplasme est constitué d'un matériel homogène finement granuleux dense aux électrons (fig.106).

Comme organites cytoplasmiques habituels, on trouve une ou deux mitochondries caractérisées par leur taille qui peut, dans certains cas, atteindre 1,8 μm et par une structure ne laissant apparaître que de très rares replis membranaires en forme de crête (fig.107).

Comme inclusions particulières, on note dans certaines cellules un corps sphérique de 0,5 μm de diamètre : sans structure apparente, cette inclusion pourrait être de nature lipidique.

Plus caractéristique du parasite est certainement la présence dans le cytoplasme de particules denses structurées (PDS), irrégulièrement réparties dans la zone périphérique (fig.106). De forme parasphérique, ces particules mesurent 130 à 170 nm de long pour un diamètre moyen de 130 nm (fig. 108). Il s'agit de données moyennes mais il faut dès à présent signaler que la forme et les dimensions de ces corps sont sujets à certaines variations. Ce point sera examiné ultérieurement de façon plus complète. Les particules denses structurées sont constituées d'un noyau central fortement opaque entouré d'un cortex de 20 nm comportant une couche dense large de 10 nm limitée par une couche claire externe et une couche claire interne.

Le traitement cytochimique des coupes par chélation à l'EDTA diminue le contraste de la partie centrale des particules et cela de façon comparable à la chromatine des noyaux : cette modification de la coloration indiquerait que ces particules denses sont riches en ADN (fig. 111).

ab) Les formes végétatives ou "formes claires" s'observent plutôt dans des tissus peu infectés ; de forme généralement ovoïde, elles mesurent 2,5 à 3,5 μm , certaines, plus allongées, pouvant atteindre 7 μm . Leur organisation ne diffère pas sensiblement de celle des formes de résistance et c'est essentiellement au niveau de la structure du noyau et des différents organites cellulaires qu'elles se distinguent (fig.105).

Le noyau, de forme arrondie, parfois étirée, renferme un nucléoplasme granuleux et est caractérisé par la présence d'un nucléole dense situé en position pariétale (fig.105).

Les mitochondries sont de taille inférieure à celle des formes denses mais, dans certaines cellules, elles apparaissent fortement allongées, parfois avec un étirement dans la partie médiane qui aboutit à une division binaire. Leur structure interne montre de nombreux replis membranaires caractéristiques (fig.113).

Des corps de Golgi seraient représentés par des formations membranaires en saccules aplatis empilés par deux ou trois unités, parfois quatre ; certains saccules sont isolés. Les citernes de ces saccules sont claires aux électrons. Aux corps de Golgi sont par ailleurs associées de petites vésicules qui, comme semblent le confirmer certaines images, proviendraient de bourgeonnement de l'extrémité des saccules (fig.112).

Des vésicules plus grandes (100 à 150 nm de diamètre) sont également présentes dans le cytoplasme. Limitées par deux membranes séparées par un espace clair de 3 nm de large, elles présentent la même disposition membranaire que les saccules des corps de Golgi. L'observation de vésicules incomplètement enveloppées pourrait justifier que celles-ci se forment à partir de saccules incurvés. A l'intérieur on peut observer différents stades d'accumulation de matériel granuleux dense aux électrons qui pourraient être mis en relation avec la formation de particules denses structurées (PDS).

C'est à un processus du même ordre que serait dû l'épaississement d'une portion de saccules droits, le dépôt de matériel dense dans la citerne repoussant la membrane située de part et d'autre.

Comme dans les cellules denses, on trouve ici dans le cytoplasme des particules denses à structure bipartite. Leur forme cependant paraît plus variable : certaines sont parasphériques, d'autres cunéiformes, d'autres encore sont en forme de bâtonnet, avec dans quelques cas, une constriction médiane (fig.109, 110). Les dimensions moyennes se situent entre 120 et 140 nm pour le diamètre et entre 180

et 200 nm pour la longueur. Leur structure est identique à celle des PDS décrites dans les cellules denses.

Suivant le plan de la section, on note également la présence d'un corps sphérique de 0,5 à 0,8 μm , opaque aux électrons, sans structure apparente. Cette inclusion présente les mêmes caractéristiques que celles décrites dans les formes denses et considérées comme pouvant être de nature lipidique (fig.105).

b) Les organites cellulaires particuliers : les particules denses structurées (PDS).

Du point de vue de son organisation ce parasite, comme on vient de le voir, possède une structure simple, voire rudimentaire, qui le désigne comme Protiste mais, parmi les éléments structuraux qui le caractérisent, les particules denses structurées qu'il contient lui confèrent une certaine originalité. Pour ces raisons, et aussi à cause de l'importance que ces inclusions présentent au plan de l'étude comparée avec d'autres parasites des Mollusques bivalves marins, il a paru nécessaire de développer et d'approfondir l'étude de ces particules, considérées jusqu'à présent comme organites cellulaires.

On examinera ici, par comparaison avec des particules de même type observées chez les Minchinia et chez les Marteilia, l'aspect morphologique et ultrastructural et les données biochimiques, tout en évoquant la question de la morphogénèse.

- Morphologie.

D'une façon générale, les particules denses structurées sont parasphériques, assez régulières dans les formes denses, mais dans les formes claires du parasite présentent une certaine diversité morphologique et dimensionnelle : les tailles de ces particules sont regroupées dans le tableau ci-après.

Forme PDS	Longueur (nm)	Largeur (nm) (diamètre)
sphérique	130 - 150	
oblongue	170	130
cunéiforme	190 - 200	130 - 150
bâtonnet	200 - 210	130 - 150

- Structure.

Comme cela a déjà été indiqué antérieurement les particules denses structurées (PDS) peuvent être considérées comme ayant une structure bipartite à savoir un noyau dense interne enveloppé par un épais cortex (fig.108).

Le core central est formé d'un matériel granuleux condensé d'une grande opacité aux électrons.

Le cortex a une épaisseur constante de 20 nm ; il est constitué par deux membranes bilamellaires séparées par une couche régulière de matériel granuleux dense, d'aspect comparable à celui de la zone centrale. Les feuilletts adjacents à cette couche sont souvent peu distincts de cette dernière : le cortex apparaît alors formé d'une couche dense épaisse de 15 à 20 nm séparée du core par un feuillet clair et limité à l'extérieur par une couche claire accolée à un feuillet dense.

- Nature chimique.

Relativement peu nombreuses (souvent moins de 10 par section) ces particules n'ont pu être isolées et caractérisées chimiquement. Cependant par des techniques de cytochimie ultrastructurale, notamment par l'application de l'effet chelateur de l'EDTA, des précisions ont pu être

apportées sur la nature du matériel qu'elles renferment. Par cette méthode en effet, la coloration de la partie centrale des particules régresse sensiblement, avec un contraste comparable à celui de la chromatine des noyaux du parasite ou des cellules de l'huître (fig.111).

Cette régression constatée conjointement à une augmentation du contraste des ribosomes voisins permettrait d'admettre la présence d'ADN à l'intérieur des PDS. Le fait demanderait toutefois à être confirmé par des techniques plus spécifiques.

- Morphogénèse.

Différentes phases de la morphogénèse des PDS ont été observées sur des sections de formes végétatives du parasite.

Comme on l'a noté antérieurement, le cytoplasme de ces cellules comporte plusieurs types de formations membranaires représentées par des saccules droits, incurvés et plus ou moins refermés sur eux-mêmes qui correspondraient aux stades successifs du développement de vésicules cytoplasmiques. Ces dernières peuvent être considérées comme ayant une origine golgienne, certaines étant directement issues de l'appareil de Golgi, d'autres provenant de la modification du profil de saccules assimilables à des corps de Golgi.

Avant même qu'elles ne soient entièrement refermées on observe dans la partie centrale de ces vésicules un dépôt de matériel granuleux dense aux électrons, séparé du système membranaire vésiculaire par une couche claire dont l'épaisseur varie entre 10 et 15 nm.

Dans d'autres vésicules complètement fermées, l'accumulation plus importante de matériel dense confère à celles-ci un aspect proche de celui des particules denses structurées. Elles s'en distinguent toutefois par l'absence d'un véritable cortex à la place duquel on note uniquement la présence des membranes de la vésicule initiale (fig.112). Ces particules denses incomplètes se transformeraient en PDS par différenciation du système membranaire enveloppe en cortex : au cours de

cette phase, un dépôt de matériel opaque se formerait entre les feuillettes internes des membranes aboutissant à une couche dense de 20 nm. L'observation sur coupes de sections de particules dont le cortex comporte une couche centrale dense plus ou moins épaisse confirmerait l'hypothèse d'un tel processus.

c) Multiplication du parasite. Cycle de développement.

1 - Division binaire simple.

L'existence d'un cycle de développement intracellulaire du parasite a été mise en évidence à partir de l'observation de différentes phases d'une division binaire simple des formes végétatives.

La rareté des figures de division au niveau de tissus pourtant fortement infestés suggère que l'on a affaire à un phénomène fugace, principalement pour ce qui concerne la division nucléaire.

Une élongation des formes végétatives du parasite (leur longueur peut alors atteindre 7 μ m) et concomitamment de leur noyau annoncerait le commencement de la division. Ce n'est toutefois qu'avec de profondes modifications du noyau que débute la mitose.

De forme sensiblement ovoïde, le noyau en interphase possède une enveloppe distincte à deux membranes contenant un nucléoplasme riche en grains denses lui conférant une opacité plus grande que celle du cytoplasme voisin. A l'un des pôles, on trouve un nucléole compact en contact avec la membrane nucléaire. Ce stade est principalement caractérisé par la présence d'un fuseau microtubulaire intranucléaire s'étendant entre deux corps denses granuleux (fig.115) qu'on peut admettre comme étant des centromères.

Les microtubules ont un diamètre uniforme de 20 nm.

Dans le cytoplasme de la cellule en division, on note la présence d'un appareil de Golgi, de saccules membranaires et de nom-

breuses vésicules correspondant à des particules denses structurées en cours de formation. Différents aspects de clivage des mitochondries sont également observables : la division est consécutive à un étirement accompagné d'une constriction importante de la partie médiane au niveau de la zone de séparation; dans certains cas, cette zone est marquée par un retrait des crêtes vers chaque mitochondrie fille.

L'évolution ultérieure de la mitose se manifeste par un allongement du noyau, les corps polaires du fuseau dont des portions de tubules sont encore visibles à leur voisinage se trouvant repoussées contre l'enveloppe nucléaire (fig.116).

La division nucléaire se poursuit par un étirement important du noyau et consécutivement par l'apparition d'une constriction qui entraînera la séparation des noyaux fils dont les nucléoles apparaissent sous forme de deux corps denses aplatis situés le plus souvent en position latérale.

On notera enfin qu'au cours de sa division le noyau conserve toujours son enveloppe comme c'est le cas chez certains sporozoaires et notamment des parasites de l'huître américaine, tels les Minchinia.

La division cytoplasmique semble intervenir dès la séparation des noyaux fils qui migrent aux deux extrémités de la cellule mère qui montre un profil oblong, très allongé. Autour de chaque noyau se répartissent les mitochondries et les particules denses structurées. Entre ces deux entités se différenciera une membrane constituant une cloison qui assurerait l'individualisation des deux cellules filles. Ce processus s'accompagnerait à ce niveau d'une légère invagination de la membrane plasmique qui rejoindrait la cloison interne (fig.117, 118).

2 - Formes plasmodiales.

Dans le même temps que l'on observe des formes de division binaire correspondant à un mode de multiplication de type schizogonique,

on trouve également dans les cellules infestées des formes parasitaires plasmodiales binuclées (fig.119). D'allure sphérique, ces plasmodies ont un diamètre de 3 à 4 μm . Ils possèdent deux noyaux de forme arrondie, nettement séparés, et des enclaves cytoplasmiques signalées dans les formes végétatives. Dans des cas peu fréquents (fig.120), les noyaux sont accolés à la manière des diplocaryons observables chez certaines Microsporidies ou encore de formations nucléaires voisines signalées dans les jeunes plasmodies binuclées de Minchinia sp. parasite du crabe Panopeus herbstii (Perkins, 1975b). La signification de telles formes dans le mécanisme de reproduction du parasite ne paraît pas évidente d'autant qu'aucunes autres formes auxquelles elles pourraient être associées dans une autre phase de multiplication (sporogonique par exemple) n'ont été jusqu'alors mises en évidence.

C - Données taxonomiques.

L'originalité de ce nouveau parasite de l'huître plate, tant pour ce qui concerne sa structure et son mode de développement intracellulaire, ne permettant pas de l'insérer dans un groupe connu, nous avons créé pour lui le genre nouveau Bonamia n.g., avec l'espèce B. ostreae Pichot et coll. 1980, dont nous rappellerons ici les diagnoses établies par Pichot et coll. (1980) :

Bonamia gen.nov.

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

Bonamia ostreae sp.n.

Diagnose. Formes végétatives : cellules de 2 à 4 μm 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 schizo-

gonique, par division binaire simple. Existence de formes plasmodiales binuclées.

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

Hôte : Ostrea edulis L.

Localité : Ile Tudy (Bretagne).

II - ETUDE DE L'EFFET PATHOGENE DE B. OSTREAE.

Comme nous l'avons signalé antérieurement, le parasite B. ostreae a été à l'origine découvert dans des populations d'huîtres subissant des mortalités. La relation entre l'infection parasitaire et les mortalités a d'ailleurs été confirmée expérimentalement par Tigé et coll. (1981):

Cependant, bien que l'on n'ait pas encore démontré le mécanisme précis de l'action du pathogène, il est apparu clairement, par l'étude histologique et ultrastructurale, qu'au cours de son développement intra-hémocytaire le parasite avait un rôle cytopathogène primaire accompagné de symptômes secondaires caractérisés dans tous les cas par une dégradation profonde des tissus atteints.

1 - Symptômes primaires.

a) Effet cytopathogène.

Au niveau cellulaire, les lésions parasitaires sont observables sur coupes semi-fines. On note en premier lieu une hypertrophie des cellules infectées qui semble être fonction du nombre de parasites et de l'extension d'aires cytoplasmiques peu chromophiles, comparables à des vacuoles. Des signes de pycnose nucléaire sont également visibles en microscopie photonique (fig.102).

Les examens ultrastructuraux ont permis de préciser ces différents points. Suivant le stade de l'infection, le cytoplasme est granuleux et comporte des petites vacuoles claires, des formations vésiculaires complexes, des mitochondries plus ou moins agglomérées (fig.121). Le renforcement du contraste de l'ARN par l'EDTA révèle des ribosomes associés à l'ergastoplasme. La dégradation du cytoplasme peut se manifester également par le développement d'aires lacuneuses au voisinage immédiat des parasites. Limitées de façon plus ou moins continue par une membrane, ces zones globalement claires aux électrons contiennent des vésicules fermées très polymorphes, plusieurs vésicules pouvant être regroupées à l'intérieur d'une plus grande et des inclusions denses de taille variable. Enfin, on n'y distingue ni ribosomes ni mitochondries. Dans les cas extrêmes, la totalité du cytoplasme a perdu sa texture normale : seules subsistent des formations membranaires associées à un matériel granuleux épars et un certain nombre d'inclusions denses (fig. 122).

Le noyau repoussé par les parasites subit d'importantes déformations ; il montre des signes de pycnose.

b) Réaction de la cellule infectée.

L'existence d'une membrane limitant les aires lacuneuses décrites ci-dessus peut être admise comme un premier signe de réaction de la cellule hôte. Sur certaines figures, la différenciation de cette membrane paraît même précéder la désorganisation du cytoplasme qu'elle englobe (fig.123). Dans certains cas, on observe un renforcement de cette dernière qui est doublée pour partie par d'épaisses formations membranaires. Cette tendance à l'isolement du parasite peut encore se manifester par la production autour des germes de deux feuilletts membranaires séparés par des "citernes" plus ou moins larges. Là encore il pourrait s'agir de membranes dérivant du système lysosomal de la cellule hôte.

En outre, comme on a pu le constater en culture organotypique, ce processus réactionnel peut être complété par l'action de macrophages

qui phagocytent électivement la partie infectée de la cellule (fig.124).

Il semble que l'on puisse encore comprendre dans les réactions cellulaires la densification de secteurs cytoplasmiques à proximité des parasites, certains se trouvant même inclus dans le stroma dense ainsi formé. Enfin, bien que visible chez des huîtres non parasitées, l'agglomération des mitochondries observée chez des cellules peu infectées pourrait être considérée comme la manifestation d'un mécanisme de défense de la cellule.

2 - Symptômes secondaires.

L'infection des cellules interstitielles s'accompagne d'une inflammation au niveau des sites d'infestation, c'est-à-dire des sinus et des lacunes sanguines et plus rarement de l'épithélium digestif (estomac) et enfin des branchies.

On peut distinguer les lésions internes qui concernent essentiellement le conjonctif de la masse viscérale, des lésions externes observables macroscopiquement sur les branchies.

a) Les lésions internes.

Chez les huîtres parasitées, on note une importante infiltration hémocytaire du tissu conjonctif à proximité de l'épithélium stomacal et intestinal et autour des diverticules digestifs. A partir des sinus sanguins et des zones à forte concentration hémocytaire, où l'on reconnaît des cellules du parasite, s'opère une diffusion des hémocytes entre les cellules de Leydig avec formation de petites lacunes étoilées, l'ensemble formant un réseau d'aspect réticulée (fig.125,126,127).

La dégradation des cellules infectées s'achevant par la rupture de la membrane plasmique, les parasites libérés se disséminent dans l'hémolymphe où ils peuvent infecter d'autres hémocytes et provoquer de proche en proche de nouvelles réactions inflammatoires (fig.128).

Hormis la destruction de cellules sanguines et un pouvoir

toxique direct (substances libérées dans l'hémolymphe) toujours envisageable, il est clair que le processus de développement de l'infection, conduit par la formation de nombreuses lacunes à détruire le conjonctif. Il en va de même pour l'épithélium stomacal qui peut, le fait a été rarement observé (Comps et coll., 1980), être localement endommagé : les hémocytes migrent entre les cellules épithéliales et les dissocient.

b) Les lésions externes.

L'ulcération localisée des branchies représente le seul symptôme de la parasitose accessible à l'examen direct "in vivo" mais ne constitue pas un signe constant de la maladie. Si aux lésions branchiales est généralement associée une infection du conjonctif, l'inverse est moins fréquemment vérifié.

- Examen macroscopique : les lésions branchiales se présentent sous forme d'indentations plus ou moins profondes de la bordure libre de la branchie et de perforations dont la taille atteint 2 ou 3 mm localisées sur toute la surface de l'organe et fréquemment à la base. Le nombre et les dimensions de ces différentes ulcérations est variable, indiquant leur caractère évolutif. Le pourtour des lésions présente une coloration blanchâtre caractéristique qui permet de les distinguer, notamment pour les indentations marginales, des simples déformations ou même des lésions mécaniques qu'on peut parfois rencontrer (fig.98).

- Examen au microscope à balayage : à faible grossissement (G = 200) il apparaît que l'ulcération est souvent limitée à quelques plis (1 à 5) de filaments branchiaux et que son extension s'opère dans le sens de la longueur, touchant des portions de plusieurs millimètres. En bordure des lésions, les extrémités des filaments sont enflées en forme de massue, dans certains cas, fusionnées entre elles. Les parties les plus touchées en profondeur montrent des tissus nécrosés à la surface irrégulière et tourmentée (fig.99, 100).

- Examen histologique : les sections orthogonales à l'axe des filaments révèlent d'importantes modifications de structure liées au développement de la parasitose dans les branchies. Le symptôme le plus caractéristique se manifeste par une hypertrophie des filaments qui s'étendent de façon anarchique et fusionnent entre eux pour former des masses tissulaires d'allure syncytiale. Le phénomène concerne les filaments ordinaires comme les filaments principaux. Sur coupes, on peut suivre de proche en proche, l'évolution des lésions (fig.101).

Comme pour le conjonctif, une importante inflammation des tissus est concomitante à l'infection. Les hémocytes envahissent la lumière des filaments et s'infiltrant entre les cellules épithéliales. Fortement étiré et repoussé par la masse de cellules qui encombrant le filament, l'épithélium s'amincit progressivement : la ciliation apicale et latérale disparaît ainsi que les cellules sécrétrices. A l'intérieur des filaments, l'armature chitineuse, structure de base des branchies, est détruite. Suivant les plans de coupe, on note que l'infection peut s'étendre aux liaisons interfoliaires. Celles-ci forment alors avec les filaments infectés une masse dense constituée principalement par une agglomération de cellules sanguines parasitées ou non, de formes libres du parasite et de débris cellulaires pouvant provenir de la dégradation de cellules infectées.

A la périphérie des lésions, la rupture de l'épithélium libère le matériel cellulaire qu'il contenait, assurant ainsi la formation des ulcères branchiaux. A la limite de ces zones, on trouve plusieurs types de cellules : les plus nombreuses sont des cellules polymorphes développant des pseudopodes, renfermant, au sein de nombreuses petites vacuoles, des granulations fortement basophiles ; d'autres cellules morphologiquement semblables pouvant correspondre à des cellules hyalines du sang ont un cytoplasme dense et homogène ; on reconnaît enfin de nombreuses cellules infectées.

III - DISCUSSION.

Important en tant qu'agent infectieux pathogène pour l'huître plate O. edulis, et présentant un grand intérêt à l'échelle de la pathologie générale par ses caractéristiques originales, le parasite qui vient d'être décrit pose certains problèmes pour ce qui concerne sa position systématique mais aussi son mode d'action pathogène pour l'hôte. Il paraît donc nécessaire pour aborder ces deux questions de se référer à des groupes connus et notamment des groupes comprenant des parasites d'huîtres.

- Morphologie et données ultrastructurales.

Les premières données concernant la forme, la taille et la localisation du parasite ont conduit d'emblée à la comparer à un organisme signalé aux Etats-Unis chez le même hôte O. edulis (Katkansky et coll., 1969).

Les formes parasites décrites par ces auteurs ont été trouvées dans les tissus d'huîtres plates de Milford (Connecticut) et, selon Glude (1974), chez des huîtres provenant du même site et introduites en Californie (Morro Bay, Elkhorn Slough, Drakes Esters et Tonnales Bay) : les examens d'huîtres subissant de fortes mortalités ont montré une prévalence de l'infection à "microcells" (83 % à Pigeon Point et 80 % à Morro Bay en Californie et 50 % à Chincoteague Bay dans le Maryland). Ces "microcells" mesurent 2 à 3 μm de diamètre et possèdent un noyau de 0,8 μm environ ; elles sont localisées dans les leucocytes.

En se limitant aux seules données obtenues en microscopie photonique, on doit admettre que les deux parasites montrent d'importantes similitudes.

Bien que moins évidentes, on peut également mentionner certaines ressemblances entre la parasitose due à B. ostreae et une "affection branchiale" signalée par Gras et Herbach (1971) chez des huîtres plates de la Baie du Mont Saint Michel. Il est ainsi précisé qu'au niveau de perforations et d'indentations de la branchie, les

leucocytes "sont chargés de corps étrangers plus ou moins sphériques". Bien que peu détaillée, cette description évoque les figures de cellules sanguines renfermant des formes de B. ostreae et laisserait supposer que cet agent était présent en Bretagne dès 1970-1971.

Dans les deux cas cités, l'absence de références ultrastructurales limite naturellement les possibilités de comparaison. C'est en effet à partir des examens en microscopie électronique, rendus indispensables par la petite taille du parasite, que sa nature a pu être précisée et ses caractéristiques originales mises en évidence.

Sa structure monocellulaire et son mode de division intracellulaire par voie schizogonique permettent de le ranger parmi les Protistes alors même que certaines de ses caractéristiques, richesse du cytoplasme en ribosomes et présence de particules denses structurées notamment, se retrouvent chez des Sporozoaires (Haplosporidies) et chez des organismes à structure complexe dont le caractère pluricellulaire est désormais admis (Marteiliidae ; Paramyxa paradoxa).

- Position systématique.

Devant l'impossibilité de rattacher ce Protiste à un groupe connu, Pichot et coll. (1980) ont créé pour lui le genre nouveau Bonamia n.g. avec l'espèce B. ostreae n.sp. en notant certaines similitudes (présence de PDS) et des différences avec les Haplosporidies et les parasites du genre Marteilia. Reprenant l'étude de ce parasite, Cahour et coll. (1980) le rangeaient directement parmi les Haplosporidies en ne retenant que la présence de particules denses structurées qu'ils identifient aux haplosporosomes des Minchinia ainsi nommées par Perkins (1971).

Une démarche similaire avait été antérieurement effectuée par Perkins (1976) et Perkins et Wolf (1976) en attribuant à ces organelles cytoplasmiques une indiscutable valeur comme critère systématique. Décrites chez des espèces des genres Minchinia et Urosporidium (Perkins 1968, 1969, 1971, 1975a), ces corps nommés haplosporosomes sont considérés comme caractéristiques de ces deux genres et plus généralement

des Haplosporea. A partir de là, assimilant à des haplosporosomes les particules denses structurées signalées chez M. refringens comme "particules d'allure virale" (Bonami et coll., 1971 ; Grizel et coll., 1974), Perkins (1976) rattachent ce parasite aux Haplosporidies. Sur des bases identiques, Perkins et Wolf (1976) confirment Marteilia sydneyi n.sp. en tant qu'Haplosporidie. Ultérieurement la présence d'haplosporosomes a été notée dans un genre voisin Paramarteilia n.g. (Ginsburger-Vogel et Desportes 1979a et b) sans toutefois leur attribuer une valeur taxonomique particulière. De la même manière, étudiant les affinités de Paramyxa paradoxa, Desportes et Lom (1981) signalent l'existence d'haplosporosomes sans la mentionner comme caractère taxonomique. De son côté Perkins (1979) a également été amené à reconsidérer en la limitant l'importance des haplosporosomes du point de vue systématique.

Les organismes connus comme possédant des particules denses structurées ou haplosporosomes peuvent être pour le moment réunis en deux groupes distincts suivant l'organisation sporale ainsi que le suggèrent Desportes et Lom (1981) et Desportes (1981):

. un premier groupe avec la classe des Paramyxea, incluant les genres Marteilia, Paramarteilia et Paramyxa dont la phase sporogonique aboutit à des spores constituées respectivement par 3, 2 et 4 cellules emboîtées,

. un second groupe correspondant à la classe des Stellasporea avec des représentants des Haplosporidiidae et des Urosporidiidae dont les spores ont une morphologie et une structure caractéristiques de chaque genre.

Par rapport à ces deux groupes qui comprennent déjà des parasites des huîtres (Minchinia nelsoni, M. costalis, Haplosporidium sp.), B. ostreae occupe certainement une position particulière comme le montre l'étude comparée de ces différents parasites.

Le caractère de parasite intracellulaire a été clairement établi pour le parasite B. ostreae. Chez les Marteilia, il n'a pas été indiqué de formes intracellulaires alors que chez Paramarteilia orchestiae la présence de cellules primaires du parasite à l'intérieur de cellules de l'hôte aurait été observée par Ginsburger-Vogel et coll. (1976). Par ailleurs, le développement de Paramyxa paradoxa s'effectuerait selon Desportes et Lom (1981) dans les cellules du tube digestif de l'Annélide. Enfin, chez les Haplosporidies la sporogénèse se déroule hors des cellules, à l'intérieur des tissus en notant toutefois que des formes uni ou bi-nuclées ont été parfois signalées (Perkins, 1969) ; il s'agirait alors de cas de phagocytose.

Si B. ostreae montre par son intracellularité une certaine originalité par rapport aux groupes précités, il se distingue également par son mode de multiplication.

En effet, si dans le cas des Stellasporea et des Paramyxea on a affaire à un processus sporogonique, on ne connaît jusqu'à présent chez B. ostreae qu'une multiplication de type schizogonique avec, à l'issue d'une succession de divisions binaires simples, transformations des formes végétatives en formes de résistance qui auraient valeur de spores.

Le mécanisme même de la division cellulaire B. ostreae est très différent de celui des Paramyxea. A la suite de la division nucléaire, la division cytoplasmique produit deux cellules filles séparées chez B. ostreae mais deux cellules emboîtées l'une dans l'autre chez les Paramyxea. Par contre on remarque d'intéressantes similitudes entre les modalités de la mitose chez B. ostreae et chez l'Haplosporidie Minchinia nelsoni (Perkins, 1975a).

On retrouve en effet dans le noyau en division de B. ostreae un ensemble de formations comparable à l'appareil de Kernstab décrit chez plusieurs Haplosporidies, à savoir un fuseau de microtubules dont les pôles sont constitués par deux corps granuleux denses aux électrons (spindle pole bodies = SPBo) en notant que le diamètre des tubules ne

dépasse pas 20 nm en moyenne chez B. ostreae alors qu'il atteint 25,5 nm chez les Minchinia. S'agissant de la multiplication du parasite, on peut encore mettre en parallèle les formes plasmodiales binuclées de B. ostreae et des Minchinia. Certaines figures de plasmodes intracellulaires de Minchinia sp. parasite du crabe Panopeus herbstii fournies par Perkins (1975) présentent la même structure générale que les plasmodes décrits chez B. ostreae : cellule comportant deux noyaux arrondis et séparés, des mitochondries et des haplosporosomes ou PDS ; les mitochondries sont toutefois plus nombreuses dans les plasmodes de Minchinia dont la taille est sensiblement plus élevée (10 à 12 μ m contre 3 à 3,5 chez B. ostreae). On notera également que comme chez Minchinia sp., on trouve des plasmodes de B. ostreae dotés de deux noyaux accouplés mais qui paraissent ne pas comporter de chambre internucléaire.

En revanche, si des plasmodes binuclés sont occasionnellement vus chez les Minchinia (Perkins, 1969), des formes uninuclées ne l'ont pas été, alors qu'elles représentent la presque totalité des figures de B. ostreae. Par contre, le signalement récent (Bréhélin et coll., 1982) de plasmodes à 4 ou 5 noyaux constituerait un argument en faveur d'un rapprochement avec les Haplosporidies.

Comme corollaire du mode de division et dans la mesure où l'on attribue aux formes denses de B. ostreae une valeur de spore, la morphologie et la structure de celles-ci confirmeraient les différences déjà notées avec les parasites évoquées dans la comparaison. La structure monocellulaire de la spore de B. ostreae indiquerait davantage d'affinité avec les Stellasporea bien qu'elles ne possèdent pas comme ces dernières de paroi, d'opercule, ni de sporoplasme externe. Par contre, ce caractère monocellulaire oppose B. ostreae aux Paramyxia dont une des principales caractéristiques réside dans la pluricellularité sporale, les différents sporoplasmes étant successivement emboîtés les uns dans les autres (Desportes et Lom, 1981 ; Ormières et Grizel, 1977 (1979)).

Enfin, pour compléter cette étude comparative, il est nécessaire d'examiner la question des particules denses structurées (PDS, haplosporosomes) qui a servi de base aux rapprochements initiaux avec les Paramyxea et les Stellatosporea.

Comme on l'a vu dans la description, les PDS de B. ostreae présentent une certaine variété morphologique rappelant le polymorphisme des haplosporosomes décrits chez les Haplosporidies comme chez les Marteiliidae ou encore chez Paramyxa paradoxa. On notera cependant l'absence chez B. ostreae de PDS vermiformes de grande taille comme il en existe chez les Marteilia (130 - 490 nm pour M. refringens ; 146 - 603 nm pour M. sydneyi) ou dans les spores de Minchinia nelsoni ; des PDS en forme de massue aussi caractéristiques que celles qui ont été décrites dans les spores de M. costalis (Perkins, 1969) ou encore chez Paramarteilia orchestrae (Ginsburger-Vogel et Desportes, 1979a) n'ont par ailleurs pas été observés chez le parasite de l'huître dont les PDS, comme chez les Marteilia et P. paradoxa ne sont pas l'objet d'une différenciation importante.

Il ne semble pas en conséquence que le critère forme puisse être valablement considéré comme discriminant.

Il en est de même pour la morphogénèse de ces inclusions. En effet, l'origine golgienne admise dans le cas de B. ostreae a également été antérieurement envisagée pour les haplosporosomes des spores de certaines Minchinia (M. louisiana, M. nelsoni) ou encore de Marteilia refringens et M. sydneyi et de Paramarteilia orchestrae.

Comme on vient de le voir la position systématique de B. ostreae pose encore de nombreux problèmes qui empêchent son insertion dans un groupe précis, justifiant par ailleurs la création d'un genre nouveau avec l'espèce Bonamia ostreae par Pichot et coll. (1980).

- Transmission et signification écopathologique.

La possibilité pour le parasite de ^{se} transmettre à des huîtres saines par simple contact avec des huîtres infectées a été démontrée par des expérimentations au laboratoire (Grizel, communication personnelle) prouvant l'inutilité d'un hôte intermédiaire. Les formes infectantes peuvent être simplement libérées au niveau des ulcérations branchiales au moment de la rupture de l'épithélium comme le montre l'évolution des lésions sur ces organes. On ne peut omettre par ailleurs l'élimination des spores dans les fèces puisque l'on constate dans quelques cas des lésions au niveau de l'épithélium stomacal. Enfin, lors d'infections généralisées à l'ensemble du conjonctif, il est probable qu'un grand nombre de parasites sont libérés peu après la mort de l'hôte à la suite de la désagrégation des tissus par la lyse cellulaire et par l'action de la faune externe (crustacés divers, protozoaires et bactéries).

L'existence de lésions externes sur les branchies pourrait signifier que ces organes jouent un rôle important lors de l'infection : les parasites présents dans l'eau filtrée par les huîtres se trouveraient mis en contact avec l'épithélium des branchies et rapidement phagocytés à la suite d'une réaction inflammatoire localisée.

Des recherches épidémiologiques sur cette parasitose (Tigé et coll., 1981) ont montré qu'à la fin de 1980 la maladie s'était étendue à toutes les côtes de Bretagne aussi bien en eau profonde qu'en terrain découvrant. Ces auteurs précisent d'ailleurs que le taux d'infection croît avec l'âge des huîtres.

L'effet pathogène paraît indiscutable au vu des lésions provoquées par le parasite et si des mortalités ont été constatées dans les populations infestées, il n'a pas été établi de relation précise entre les taux de mortalité et les taux d'infection. Cela tient vraisemblablement au fait que ces deux termes sont difficiles à déterminer, notamment le taux d'infection, les diagnostics nécessitant obli-

gatoirement des examens histologiques longs et partiellement entachés d'erreur (Tigé et coll., 1981).

Les états des situations épidémiologiques montrent déjà clairement le rôle que B. ostreae peut jouer dans l'évolution des populations d'huîtres plates en Bretagne (Tigé et coll., 1980 ; Tigé et coll., 1981), une nouvelle fois , le facteur pathologie se présentant comme prépondérant dans la production des huîtres.

Sur le plan de la pathologie des Invertébrés marins, un Protiste nouveau a été mis en évidence et décrit chez l'huître plate. L'originalité du parasite, qui a d'ailleurs conduit à la création d'un groupe nouveau, a permis d'apporter des éléments originaux en matière de pathologie des huîtres et d'enrichir un secteur de recherche qui connaît depuis une décennie des développements importants.

° °
°

PLANCHE XXXV

Infection causée par Bonamia ostreae

Fig. 98. : Vue d'ensemble d'une huître présentant des ulcérations branchiales : les unes sur la bordure libre de la lame (▷) entraînant la formation d'indentations profondes, d'autres (▶) formant des perforations plus ou moins étendues à la surface de l'organe. Les lésions sont bordées par un liseré clair d'origine réactionnelle. Observation macroscopique sur le frais. X 1,5.

Fig. 99. : Vue macroscopique montrant la nécrose des filaments branchiaux : la dégradation des tissus progresse généralement le long d'un pli de filaments laissant place à des masses tissulaires anarchiques. L'ulcération peut aboutir à la disparition d'un tronçon entier du pli de filament (☆) ; à leur extrémité libre, les filaments peuvent être soudés entre eux par un tissu cicatriciel lisse (▷). Microscopie à balayage X 175.

Fig. 100. : Détail d'une lésion branchiale : la désorganisation et la destruction des filaments branchiaux est précédée par un gonflement important de ces derniers (▷). Filaments nécrosés (◻), filaments indemnes (▶). Microscopie à balayage. X 360.

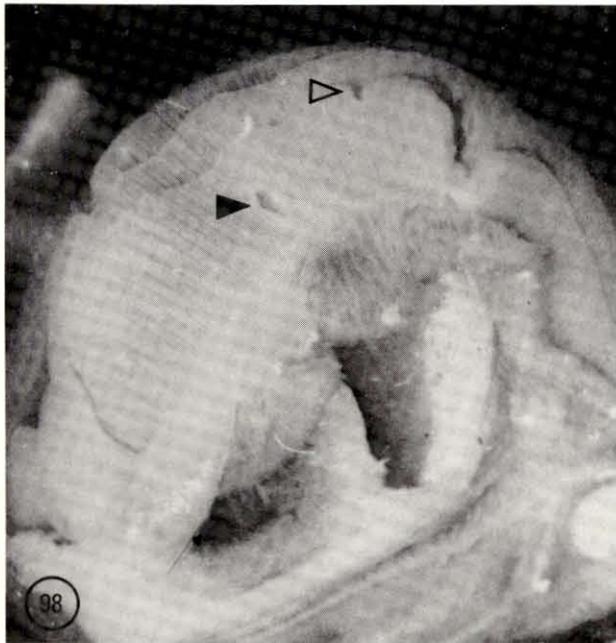


PLANCHE XXXVI

Infection causée par Bonamia ostreae

Histologie

Fig. 101. : Coupe passant par une lésion branchiale : soudés à leur base en une masse syncytiale compacte, les filaments branchiaux sont distendus dans leur partie distale ; l'épithélium dépourvu de ciliature, est très aminci, souvent à la limite de la rupture (\square). Les tissus sous jacents fortement désorganisés, sont caractérisés par la présence de nombreux petits corps arrondis très chromophiles (\rightarrow). Mann-Dominini X 250.

Fig. 102. : Coupe semi-fine passant par le tissu conjonctif d'une huître infectée. Entre les diverticules digestifs et à la périphérie de la glande digestive, la dégradation du conjonctif aboutit à la formation de lacunes où, à côté de fibrocytes sont rassemblés de nombreux hémocytes (\rightarrow) dont la plupart renferment à côté d'un noyau souvent pycnotique (n) une ou plusieurs petites cellules fortement basophile(\rightarrow). Bleu de Sahli. X 1 400.

Fig. 103. : Coupe passant par des lésions de l'épithélium stomacal (es) : des lacunes formées entre les cellules épithéliales sont occupées par de nombreux petits éléments cellulaires sensiblement sphériques, dont certains sont intracellulaires . Mann-Dominici. X 500.

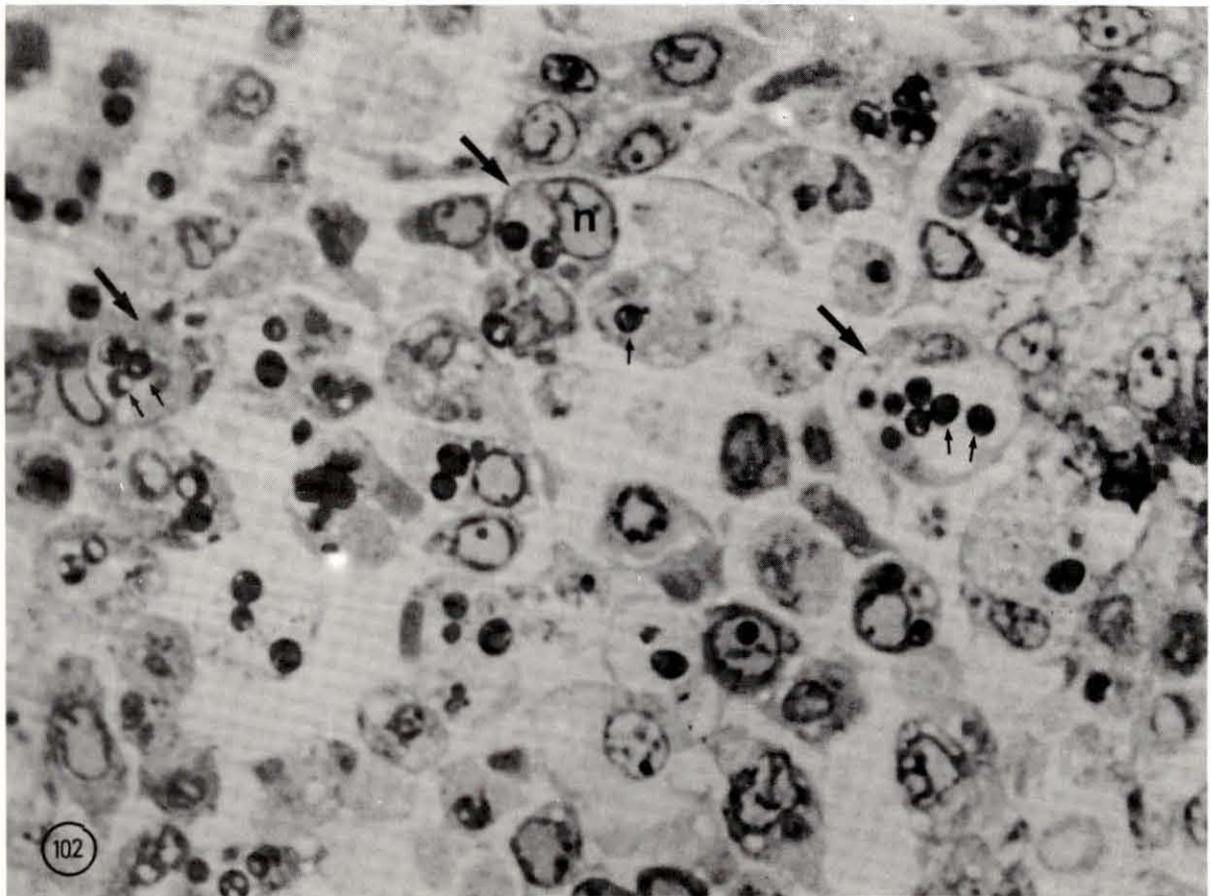
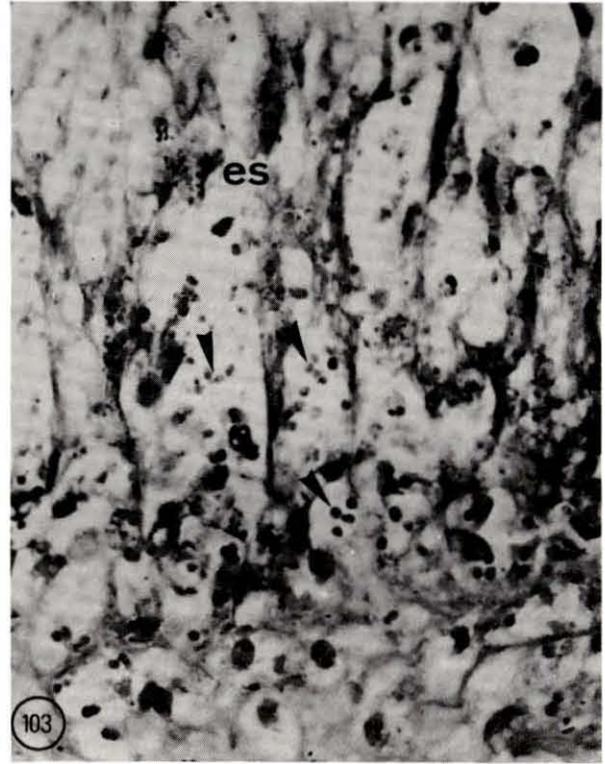


PLANCHE XXXVII

Infection causée par Bonamia ostreae
Ultrastructure

Fig. 104. : Vue générale d'une cellule sanguine infectée par des formes denses de B. ostreae : à côté de légères déformations mécaniques du noyau (n) provoquées par les parasites (p) on note dans le cytoplasme la présence de nombreuses petites vacuoles claires (▶). X 18 000.

Fig. 105. : Vue d'ensemble d'une cellule sanguine infectée par des formes claires de B. ostreae. Le cytoplasme occupé en majeure partie par les parasites (p) est fortement dégradé ; à côté de grains denses irrégulièrement disséminés, il comporte des formations vésiculeuses membranaires de taille et de forme variées (→). X 18 500.

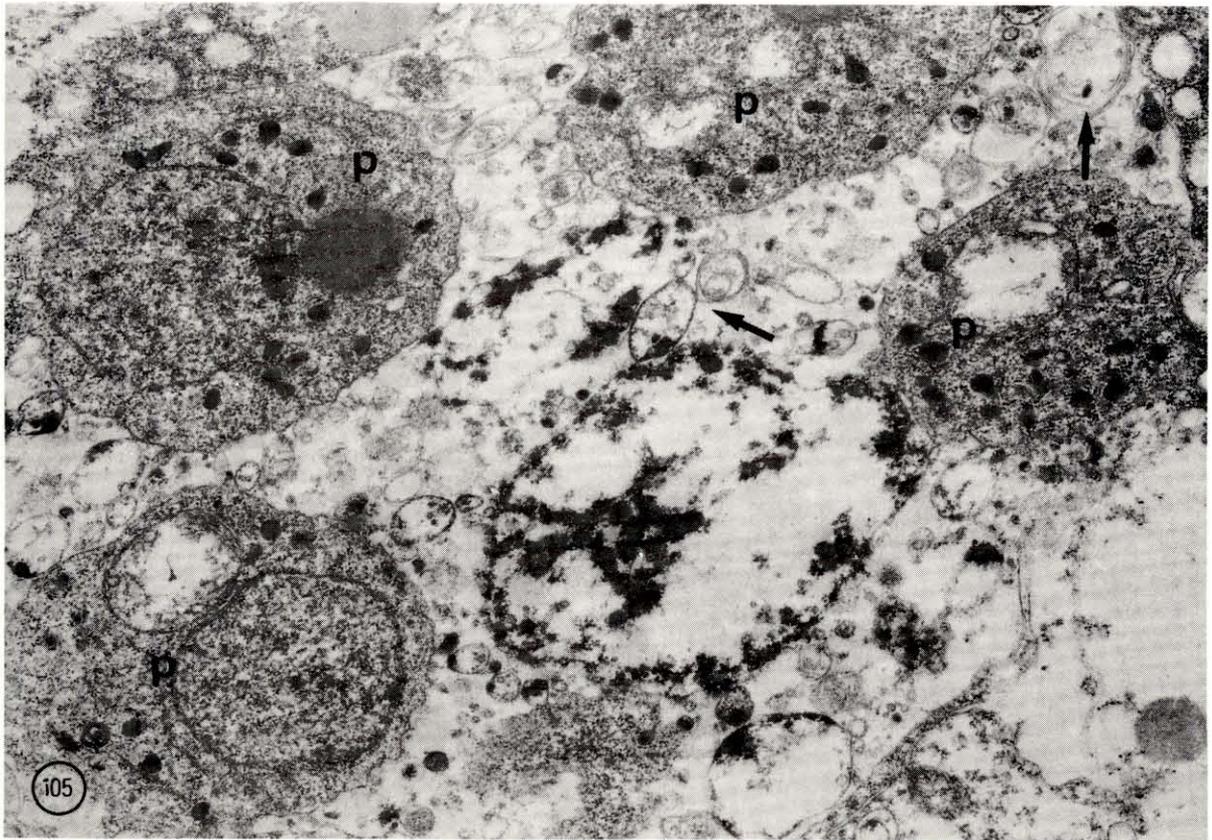


PLANCHE XXXVIII.

Infection causée par Bonamia ostreae
Ultrastructure

Fig. 106. : Forme dense de B. ostreae. Au sein d'un cytoplasme densément granuleux, des mitochondries à matrice claire (m) et des particules denses structurées (h) ; le noyau ovoïde (n) montre une zone nucléolaire pariétale peu distincte (). X 31 000.

Fig. 107. : Détail des mitochondries. A l'intérieur des mitochondries, les crêtes tubulaires (t) sont peu nombreuses ; de larges zones claires aux électrons sont occupées par un matériel granuleux très lâche. On distingue sur cette figure les membranes nucléaires (), les membranes mitochondriales () et la membrane plasmique () contiguë à la membrane vacuolaire (). X 57 000.

Fig. 108. : Coupe montrant l'organisation des particules denses structurées : noyau central dense (), cortex trilamellaire (). X 150 000.

Fig. 109, 110. : Sections de particules denses structurées montrant la diversité morphologique de ces organites : particules réniformes (hr) particules en batonnet (hb), particules cunéiformes (hc). X 48 000.

Fig. 111. : Coupe d'une forme dense du parasite colorée après traitement à l'E.D.T.A. : le contraste des ribosomes (r) et du nucléole (nu) est augmenté ; le contraste du noyau (n) et des particules denses structurées (h) est nettement affaibli. X 54 000.

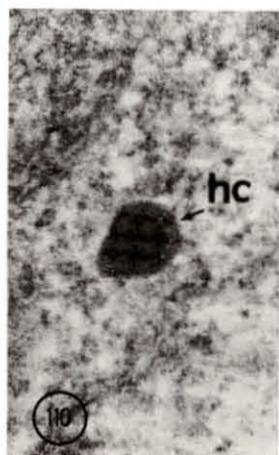
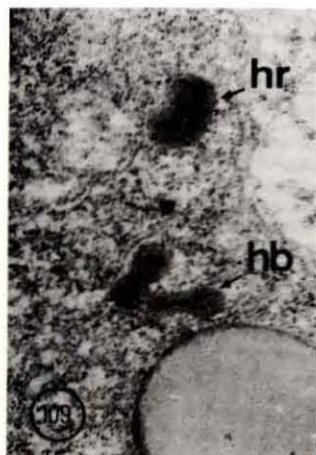
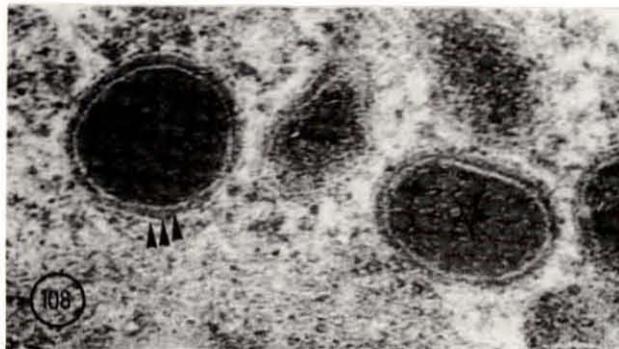
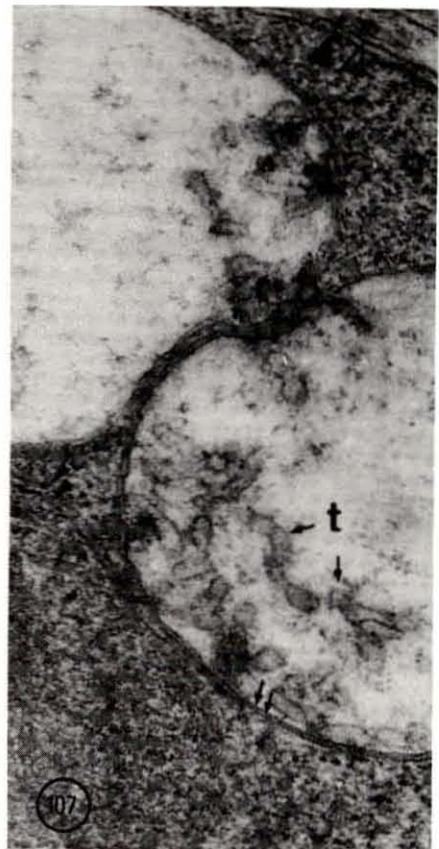
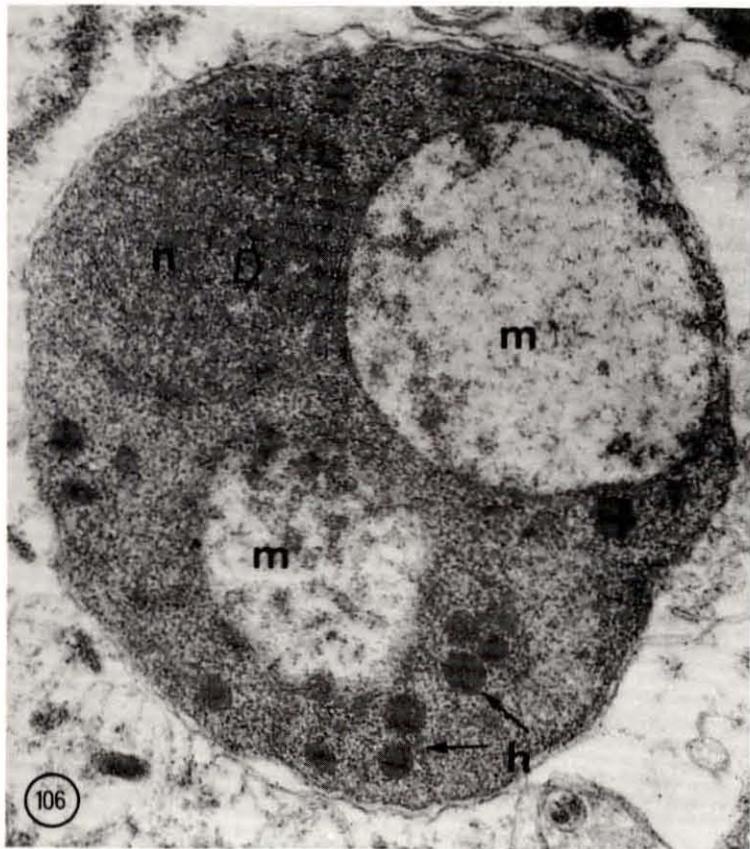


PLANCHE XXXIX

Infection causée par Bonamia ostreae
Ultrastructure

Fig. 112. : Section d'une forme claire de B. ostreae. Le cytoplasme faiblement granuleux renferme outre des mitochondries (m) et des particules denses structurées (h), des formations vésiculaires aplaties regroupées () ou isolées () et des vésicules arrondies limitées par deux membranes () ; le nucléoplasme est finement granuleux, plus dense que le cytoplasme. X 57 000.

Fig. 113, 114. : Coupe passant par une forme parasitaire en cours de division. Dans le noyau des microtubules () associés à un corps dense () forment un faisceau longitudinal. Dans le cytoplasme, on observe des figures de clivage des mitochondries () et des phases de la morphogénèse des particules denses structurées à partir de diverses formations vésiculaires (). X 37 500.

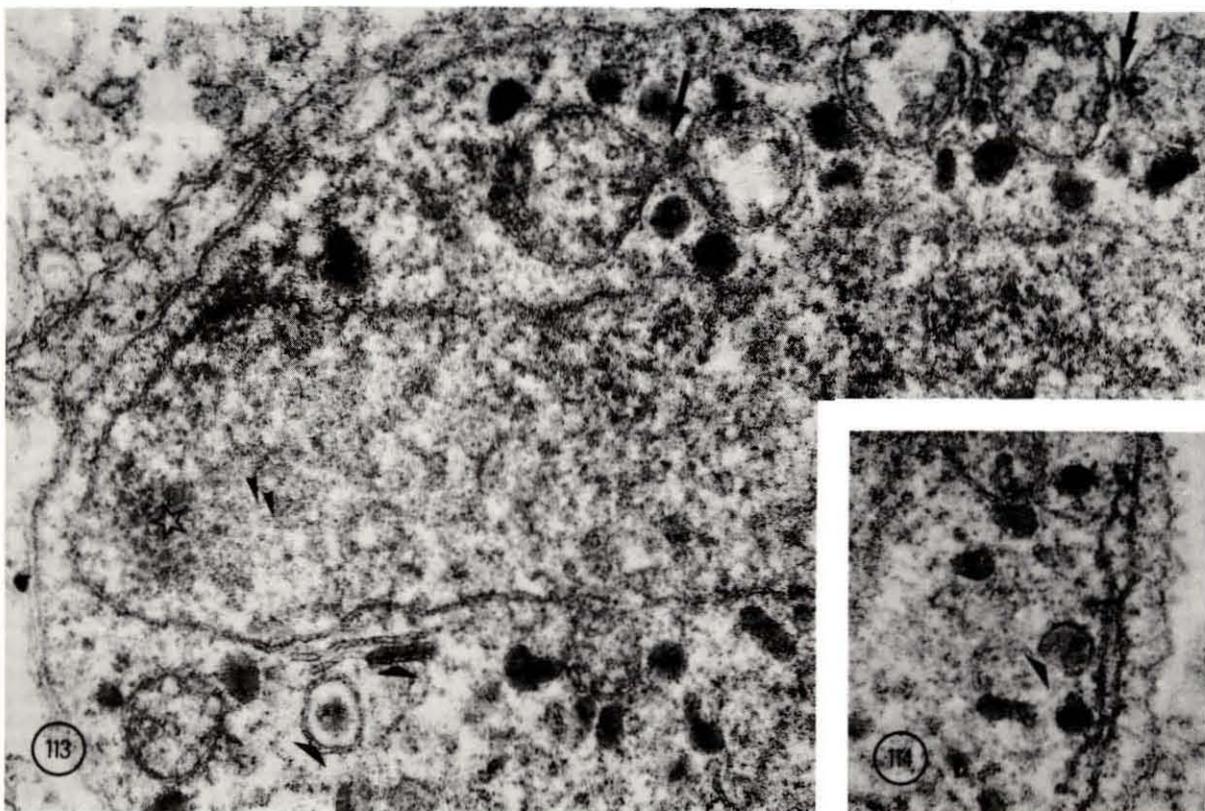
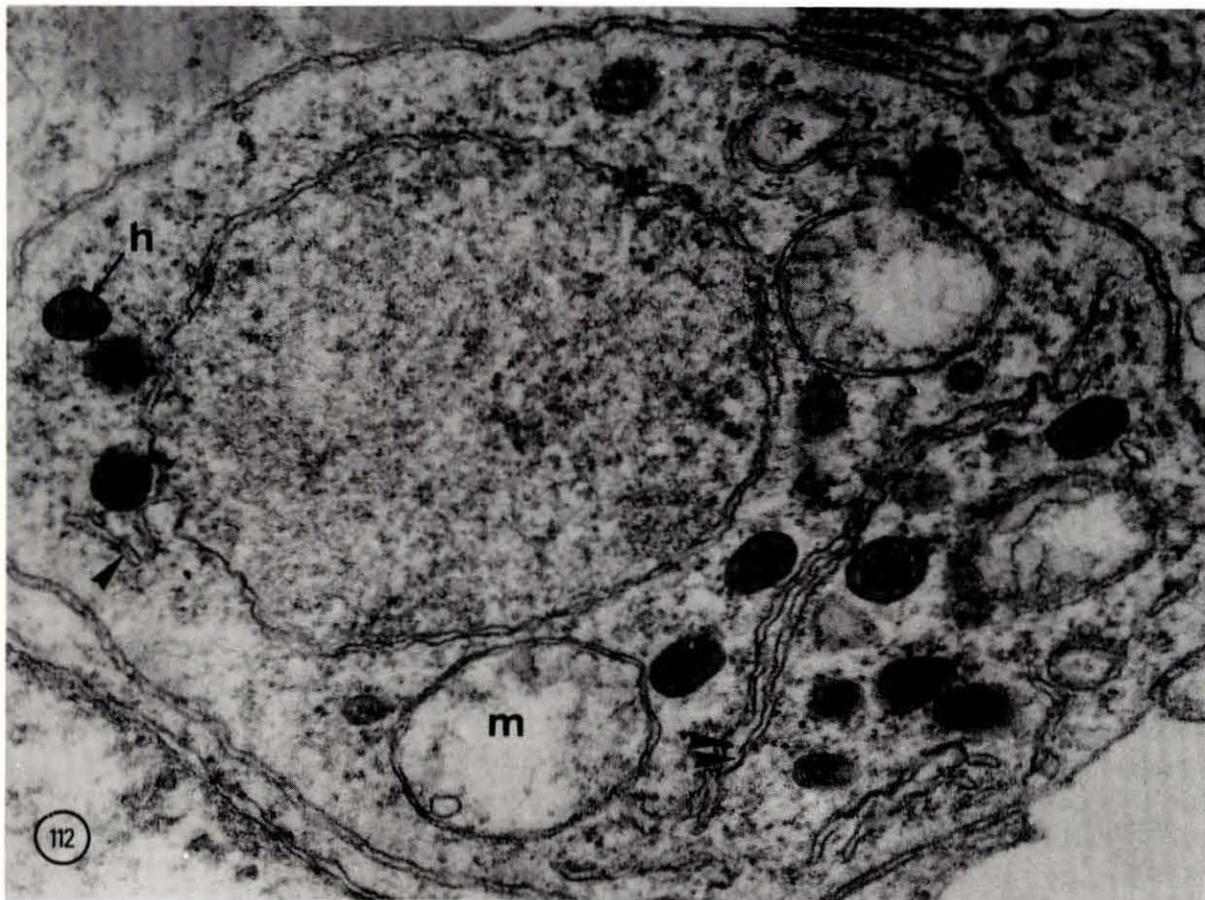


PLANCHE XL

Infection causée par Bonamia ostreae
Ultrastructure

Principales phases de la division cellulaire

Fig. 115. : Apparition à l'intérieur du noyau d'un faisceau de microtubules (►) et de corps polaires denses (☆). On reconnaît dans le cytoplasme des formations membranaires aplaties de type appareil de Golgi (◻). X 25 000.

Fig. 116. : Le noyau fortement étiré est en cours de clivage ; à ce stade les nucléoles des futurs noyaux sont déjà individualisés (⇨). X 25 000.

Fig. 117. : Clivage du cytoplasme (►) après séparation des noyaux. X 22 000.

Fig. 118. : Les deux cellules filles individualisées sont encore accolées au niveau de la zone de clivage (►). X 22 000.

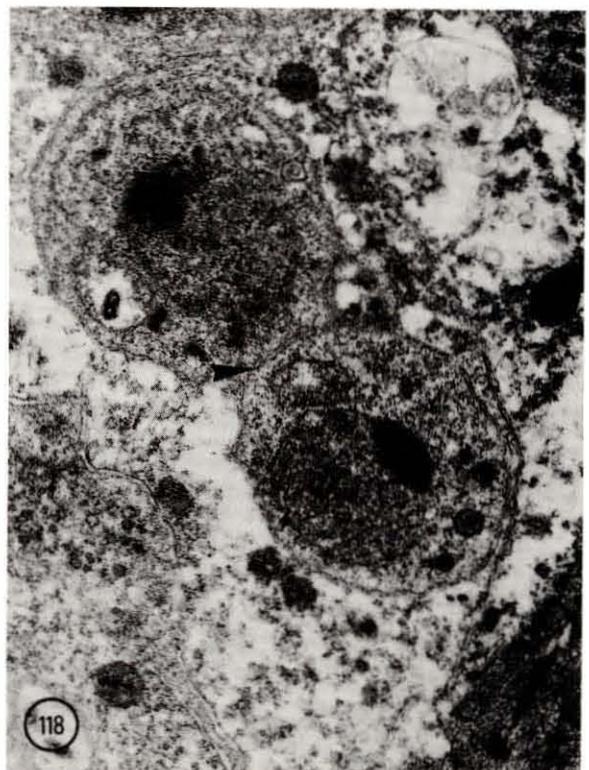
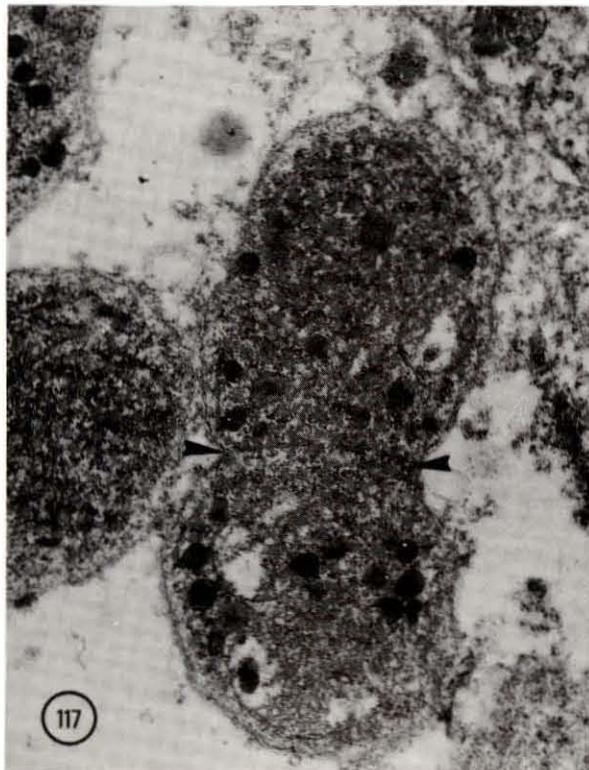
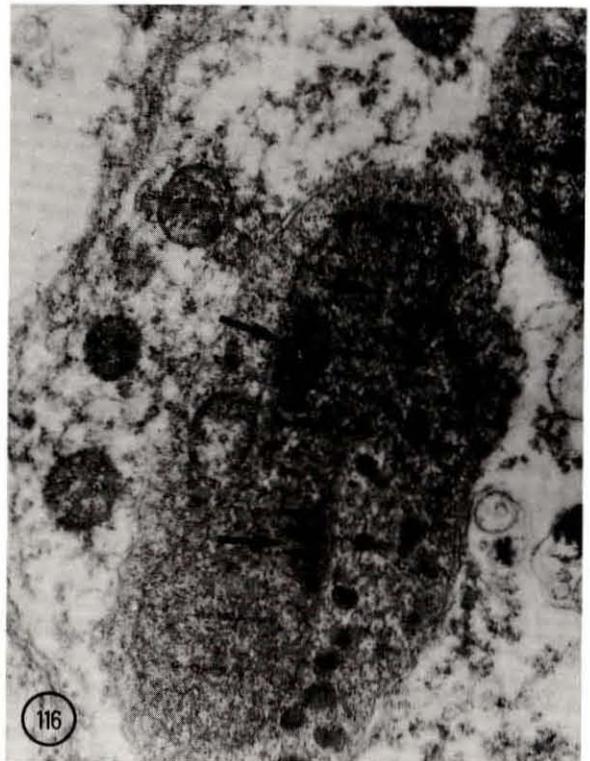
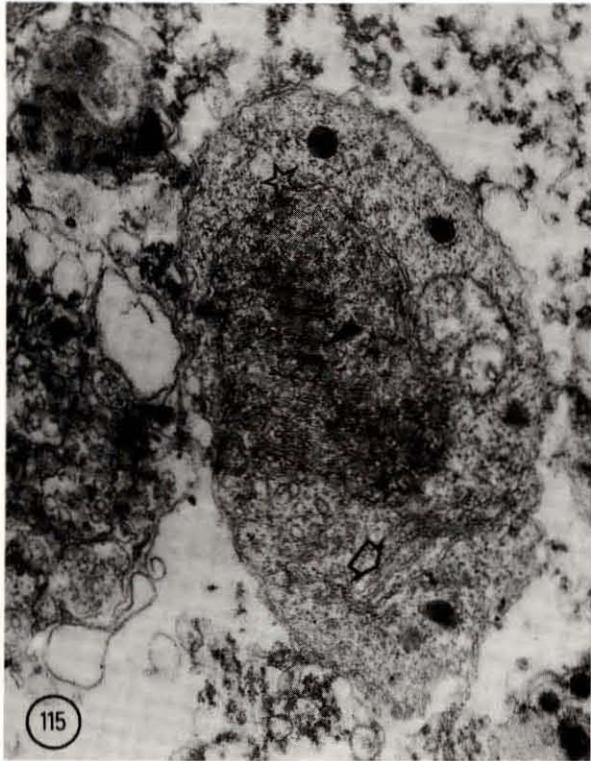


PLANCHE XLI

Infection causée par Bonamia ostreae
Ultrastructure

Fig. 119. : Section d'une forme plasmodiale binucléée : noyau (n), mitochondrie (m), inclusion dense amorphe (i). X 32 900.

Fig. 120. : Forme plasmodiale binucléée à noyaux accolés. La zone de contact des membranes nucléaires forme un disque aplati (▲). Le cytoplasme comporte également dans ce plan une inclusion dense amorphe (i). X 34 500.

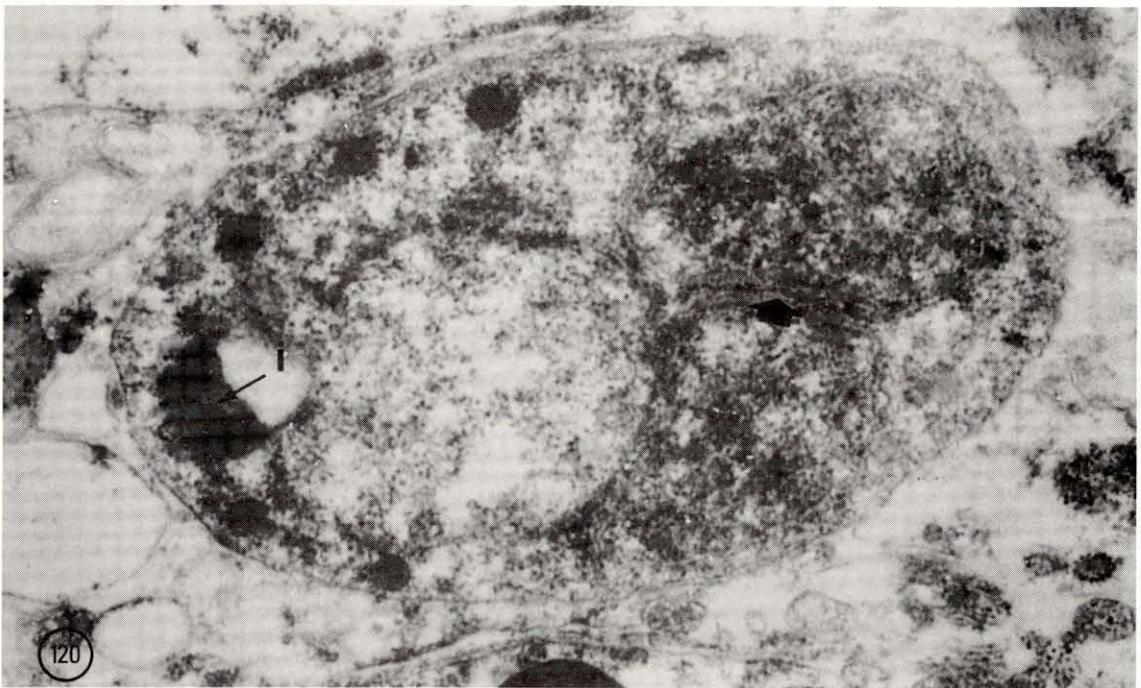
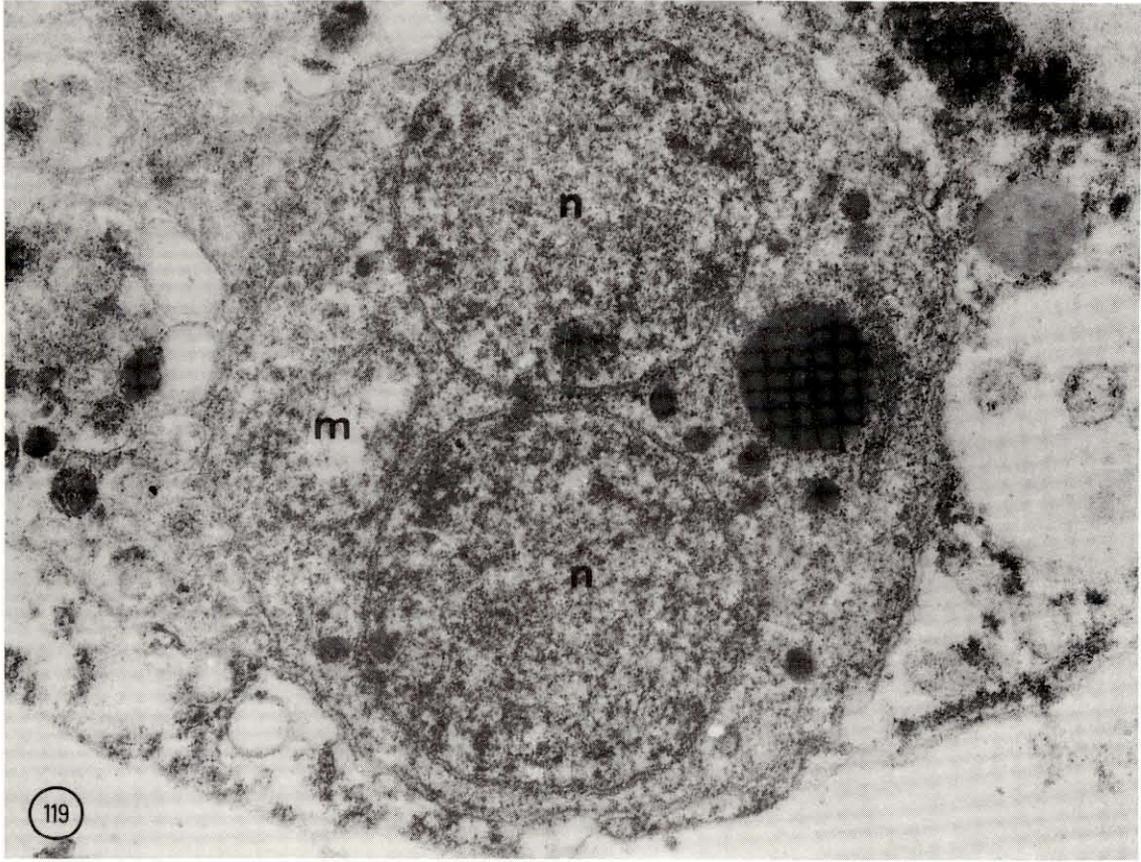


PLANCHE XLII

Infection causée par Bonamia ostreae
Ultrastructure

Fig. 121. : Coupe d'une cellule infectée présentant de profondes altérations du cytoplasme qui est constitué pour l'essentiel de nombreuses formations membranaires vésiculeuses (►), X 11 000.

Fig. 122. : Cellule parasitée à un stade avancé de l'infection. Les parasites sont regroupés dans de larges aires lacuneuses (★) à l'intérieur desquelles s'observent des formations membranaires vésiculeuses lâches auxquelles sont associées des granulations de matériel opaque aux électrons. X 10 000.

Fig. 123. : Portion d'une cellule parasitée partiellement phagocytée par un macrophage (ma). L'aire cytoplasmique (*) englobant les parasites, isolée du reste de la cellule par une membrane (►), est en grande partie profondément désorganisée. X 10 000.

Fig. 124. : Coupe d'une cellule infectée où les parasites sont isolés dans un secteur cytoplasmique délimité par une membrane (►). En dehors de cette zone, des mitochondries sont visibles dans le cytoplasme granuleux de la cellule hôte. X 10 000.

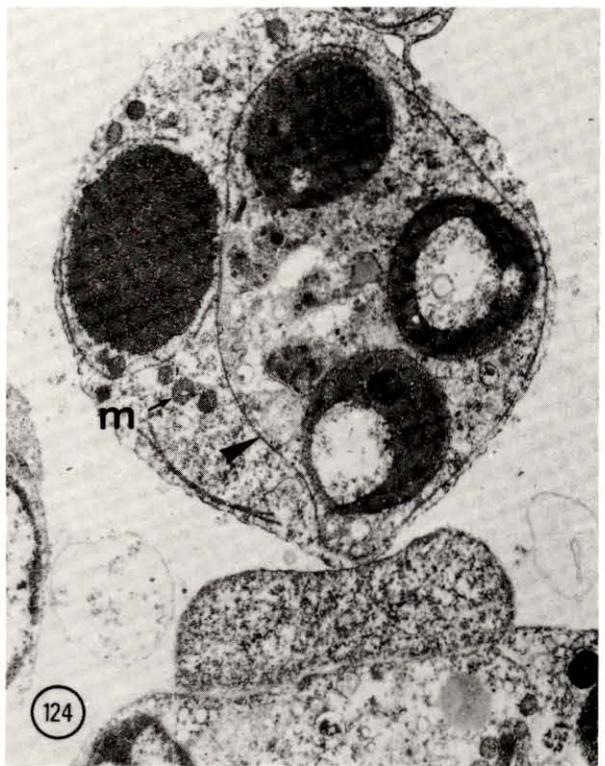
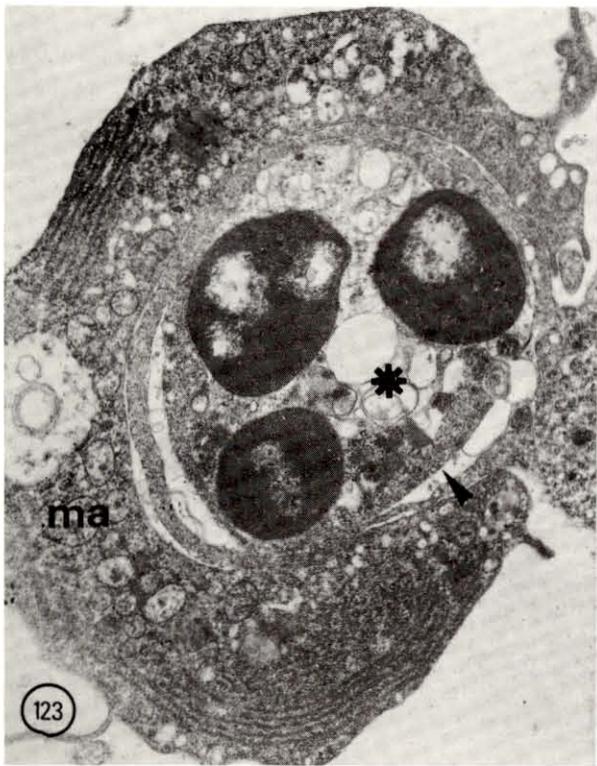
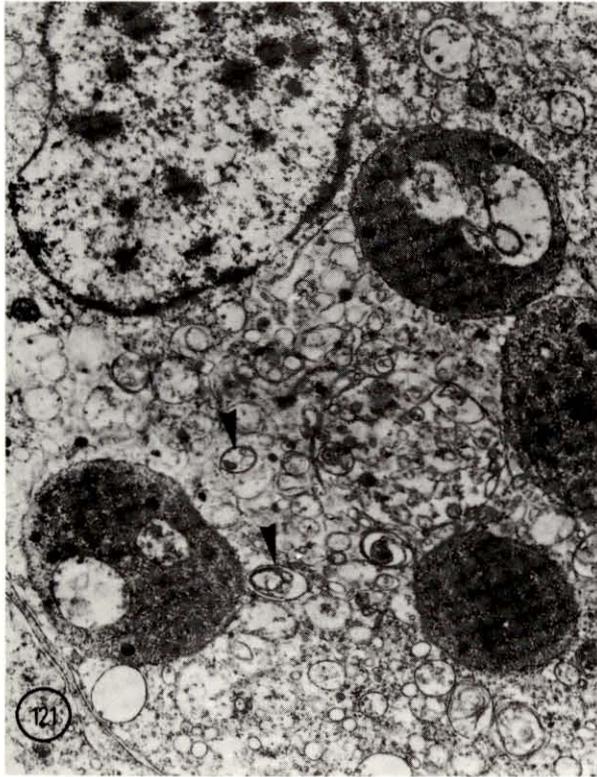


PLANCHE XLIII

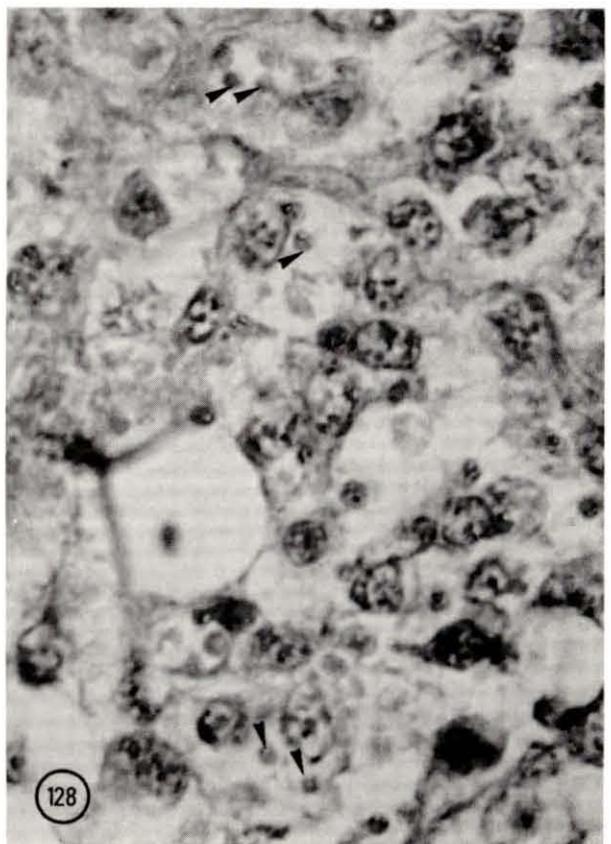
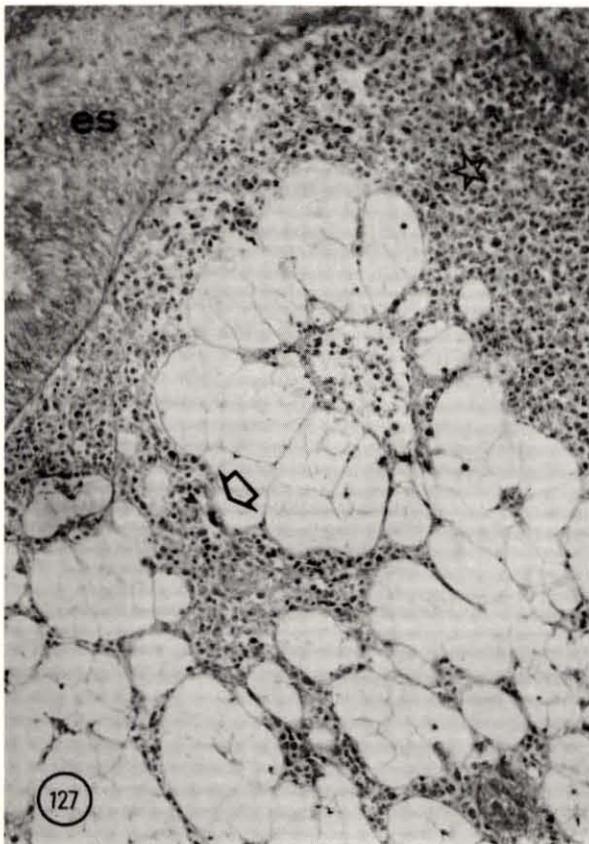
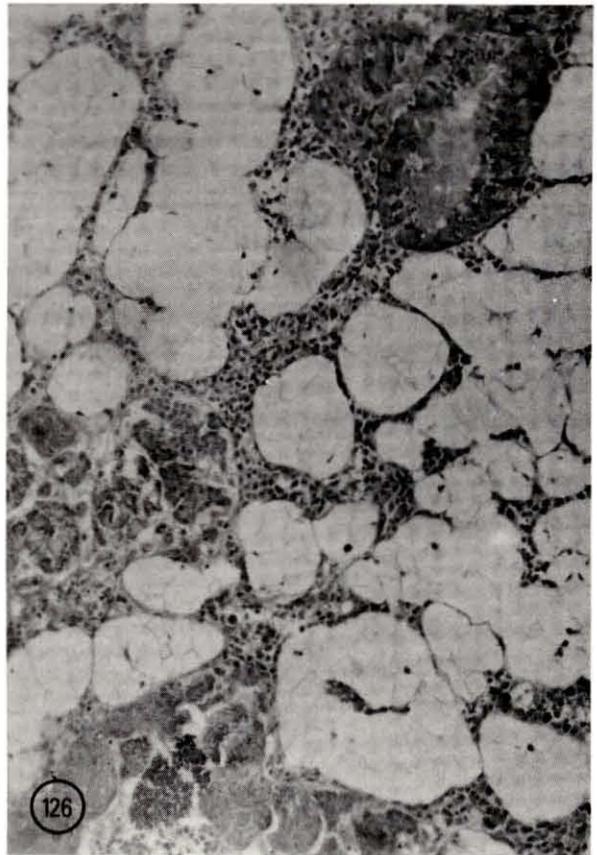
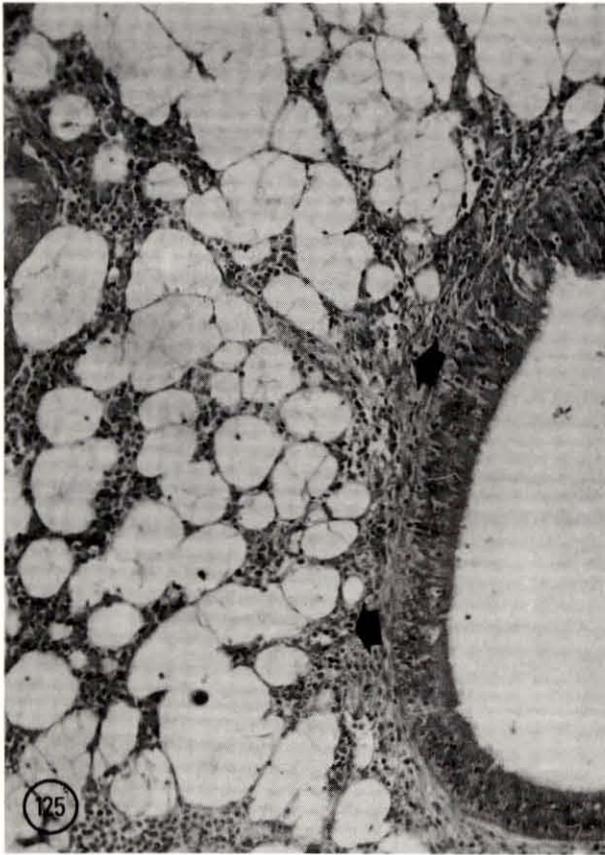
Infection causée par Bonamia ostreae

Histologie

Fig. 125. : Infection et inflammation du conjonctif à partir de la zone subépi-
théliale de l'estomac (▲). X 125.

Fig. 126, 127. : Extension progressive de l'infection par coalescence des lésions
(◻). Au voisinage de l'épithélium stomacal (es), le conjonctif est
en grande partie détruit laissant place à une masse d'hémocytes sains
et parasités (☆). X 125.

Fig. 128. : Coupe passant par une lésion du tissu conjonctif parasité (➤).
X 1 000.



CONCLUSION

Les recherches présentées dans ce travail s'inscrivent directement dans le cadre des actions menées par l'Institut des Pêches maritimes en matière de conchyliculture. Dans ce secteur économiquement dominant de l'aquiculture, les problèmes de pathologie, particulièrement importants depuis une quinzaine d'années, imposent en effet de déterminer rapidement les causes des maladies afin de rechercher et de prendre des mesures propres à en limiter les effets.

C'est donc dans cette optique et en mettant l'accent sur le diagnostic étiologique que nous avons traité différents cas de pathologie des Mollusques bivalves marins, limités toutefois aux infections intracellulaires.

Considérant la nature des agents pathogènes, ces recherches couvrent un vaste domaine puisqu'elles portent sur des viroses, des infections rickettsiennes et enfin sur une protozoose. Pour l'essentiel, elles concernent les huîtres Ostrea edulis, Crassostrea angulata et Crassostrea gigas dont les populations naturelles et les populations d'élevage ont été décimées par de graves épizooties sur la côte atlantique. On mentionnera également parmi les hôtes étudiés trois pélécy-podes fouisseurs : Donax trunculus, Scrobicularia piperata et Ruditapes philippinarum.

Les infections virales.

Jusqu'en 1975, la maladie des branchies de l'huître portugaise était considérée comme due à un Protiste et les causes de la mortalité massive étaient demeurées inconnues. La remise en question des données antérieures notamment par une approche en microscopie électronique, nous a permis de mettre en évidence la nature virale de ces deux affections.

Ainsi, deux types d'infections dues à des virus ont été décrites chez les huîtres : il s'agit des deux premiers cas de viroses en relation avec des maladies de ces mollusques observées dans le milieu naturel.

Sur ces bases nouvelles, une étude approfondie des deux maladies a été développée pour ce qui concerne les symptômes histopathologiques d'une part et les caractères ultrastructuraux des virus d'autre part.

Dans la maladie des branchies, l'infection virale est associée à de graves altérations de l'épithélium branchial. Son développement dans le cytoplasme provoque une hypertrophie des cellules et entraîne d'importantes réactions inflammatoires qui sont à l'origine d'un processus de cicatrisation des lésions.

L'agent infectieux est un désoxyribovirus icosaédrique caractérisé par sa grande taille, 380 nm, et sa structure complexe ; il se développe à partir d'une plage virogène cytoplasmique dense aux électrons. La morphogénèse virale comprend une phase de maturation dans le cytoplasme de la cellule infectée.

Le deuxième type d'infection a été également observé chez les deux espèces d'huîtres creuses élevées en France. Il se manifeste par des mortalités massives dans les populations d'huîtres atteintes.

Les hémocytes sont le siège de lésions virales provoquant leur destruction. Comme pour l'agent de la maladie des branchies, les virions se forment à la périphérie d'une aire virogène cytoplasmique. De forme icosaédrique, ces désoxyribovirus, après maturation présentent une structure et une taille proches de celle du virus de la maladie des branchies.

Les caractères de ces deux types de virus nous ont amené à les rapprocher des Iridoviridae.

Les infections rickettsiennes.

Bien qu'aucune des infections considérées n'ait pu être directement reliée à une morbidité certaine dans les populations atteintes, leur étude s'est avérée intéressante, tant sur le plan de la pathologie des Invertébrés marins que sur celui de la rickettsiologie générale.

Sept cas individuels ont ainsi été abordés par une étude approfondie au niveau histopathologique et ultrastructural, à la fois des germes et de leurs effets pathogènes.

Deux groupes principaux d'agents rickettsiens ont pu ainsi être reconnus chez les Mollusques bivalves marins :

- des rickettsies monomorphes (4 cas chez Cr. gigas, O. edulis, D. trunculus et S. piperata)

- des rickettsies à cycle de type chlamydien dont le développement fait intervenir trois types de particules (2 cas chez Cr. angulata et S. piperata).

Entre ces deux groupes s'intercale une troisième catégorie de rickettsie comportant des formes denses sans toutefois présenter un cycle de type chlamydien (1 cas chez R. philippinarum).

De l'étude de ces différents cas, il ressort quatre points essentiels :

- spécificité de tous les germes pour un type cellulaire déterminé : seules les cellules sécrétrices de l'épithélium des diverticules digestifs sont infectées, à l'exclusion de tout autre tissu ; ce caractère pourrait être mis en relation avec un mode de contamination par ingestion, ces cellules étant connues chez les bivalves comme le siège de la digestion intracellulaire.

- importance limitée des effets cytopathogènes

- possibilité d'une réaction de l'hôte : dans le cas des rickettsies monomorphes, l'épaississement de la membrane vacuolaire s'accompagne d'une dégradation des germes.

- représentation des principaux types de microorganismes rickettsiens chez les mollusques bivalves marins : à côté de procaryotes appartenant indiscutablement aux Rickettsiales on trouve aussi des agents dont le cycle de développement intracellulaire rappelle celui des Chlamydiales.

Si les premières en l'absence de paroi rigide résistent généralement peu au milieu externe et sont le plus souvent transmises par un hôte intermédiaire ou encore par voie transovarienne, les secondes forment dans leur cycle des corps élémentaires mieux adaptés pour résister à ce milieu extérieur.

L'hétérogénéité constatée sur ce plan dans les infections à rickettsies de mollusques bivalves marins s'expliquerait par les caractéristiques du milieu interne de ces animaux, très proches, au moins pour ce qui concerne la pression osmotique, du milieu ambiant, l'eau de mer.

La question de la position systématique de ces différents procaryotes a été abordée.

Les quatre rickettsies monomorphes de par leur localisation intracellulaire, leur morphologie, leur ultrastructure et leur mode de division binaire ont été incluses dans l'ordre des Rickettsiales, où des rapprochements pourraient être proposés avec les rickettsies du genre Coxiella en raison de leur développement intravacuolaire et avec les représentants de la tribu des Wolbachieae en tant que microorganismes associés à des Invertébrés.

Les procaryotes à cycle de type chlamydien posent un problème taxonomique plus complexe. Se multipliant suivant un cycle comparable à celui des Chlamydiales, ils présentent des différences, au moins pour la morphologie des corps élémentaires, avec les membres du seul genre de cet ordre, les Chlamydia, s'opposant à un rattachement à ce groupe. La comparaison avec les Rickettsiella que des études récentes visent à inclure dans les Chlamydiaceae conduit aux mêmes écueils. Enfin, pour les mêmes raisons, les procaryotes étudiés ne peuvent être insérés dans le genre Porochlamydia créé pour des agents infectieux du Scorpion Buthus occitanus et de l'araignée Pisaura mirabilis.

Il paraît aujourd'hui indiscutable que la question de la systématique de rickettsiès à cycle des Mollusques bivalves marins ne peut être précisée sans une redéfinition d'ensemble de la classification des procaryotes à cycle de type chlamydien.

Infection due à Bonamia ostreae.

Une nouvelle protozoose a été découverte et étudiée chez l'huître plate des côtes bretonnes, où depuis 1979 elle cause d'importants dommages dans les élevages.

L'agent infectieux Bonamia ostreae ng. nsp. se présente sous forme de petites cellules arrondies de 3 à 4 μ renfermant un noyau, des mitochondries et inclus dans un cytoplasme riche en ribosomes, des corps denses structurés de 130 à 200 nm. Localisé dans les cellules sanguines le parasite s'y multiplie par division binaire simple. Il existe également, toujours en position intracellulaire des formes binucléées. Des plasmodes à 4 ou 5 noyaux ont par ailleurs été signalé mais leur localisation n'a pas été précisée.

L'effet cytopathogène par destruction de la cellule hôte entraîne d'importantes réactions inflammatoires et provoque secondairement une dégradation du conjonctif et, dans certains cas, une nécrose du tissu branchial.

Sur le plan taxonomique, Bonamia ostreae représente par ses caractères morphologiques et ultrastructuraux un parasite d'un type nouveau montrant toutefois certains points communs avec les Haplosporidies, opinion renforcée par la mise en évidence de formes plasmédiales plurinucléées.

Pour le moment, en l'absence de figures plus explicites, les caractéristiques de ce Protiste et en particulier son développement intracellulaire lui confèrent par rapport aux groupes connus une certaine originalité justifiant sa place dans un genre nouveau.

Les recherches que nous avons effectuées sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins, qu'il s'agisse des grandes épizooties qui ont affecté les populations d'huîtres ou de différents cas pathologiques de moindre importance, ont permis de faire progresser la pathologie de ces animaux dans des domaines entièrement nouveaux.

La description des premières épizooties d'origine virale chez les huîtres peut ainsi être intégrée au développement que connaît depuis quelques années la pathologie des Invertébrés marins avec l'étude des viroses de crustacés, représentant dans ce contexte un nouvel élargissement de la virologie à un autre groupe important d'animaux marins.

C'est par ailleurs à l'extension de la rickettsiologie, discipline encore très peu abordée pour le milieu marin, que contribuent les études de plusieurs cas d'infections par des rickettsies où sont représentés les deux types d'agents constituant ce groupe à savoir, des procaryotes à cycle complexe de développement et des microorganismes monomorphes.

De son côté, l'infection causée par Bonamia ostrea tient parmi les protozooses une place toute particulière en raison de son intracellularité et des caractéristiques du parasite qui constituent autant de données originales en matière de protistologie.

Il convient toutefois de souligner que les connaissances acquises dans tous les domaines abordés posent, par la nature même des travaux réalisés, des questions ouvrant la voie à des recherches plus spécialisées.

Enfin, sur le plan de la pathologie des mollusques bivalves marins présentant un intérêt économique, nos recherches, considérées dans leur application, contribuent à augmenter les éléments de diagnostic servant de base aux examens zoosanitaires nécessaires à différents niveaux de la production des coquillages.

BIBLIOGRAPHIE

- ALDERMAN (D.J.) et GRAS (P.), 1969.- " Gill disease " of the portuguese oysters.- Nature, 224, n° 5219, 616-617.
- ALDERMAN (D.J.) et JONES (E.G.B.), 1971.- Shell disease of oysters.- Fishery investigations, ser.II, vol.26, n°8, 1-17.
- ARVY (L.) et FRANC (A.), 1968.- Sur un Protiste nouveau, agent de destruction des branchies et des palpes de l'huître portugaise.- C. R. Acad. Sci. Paris, 267, D, 103-105.
- BELLETT (A.J.D.), 1968.- The iridescent virus group.- Advan. Virus res., 13, 225-246.
- BERNHARD (W.), 1968.- Une méthode de coloration régressive à l'usage de la microscopie électronique.- C. R. Acad. Sci. Paris, 267, D, 2170-2173.
- BESSE (P.), 1968.- Résultats de quelques observations sur une affection branchiale des huîtres (Crassostrea angulata Lmk).- Bull. Acad. Vet., 41, 87-91.
- BONAMI (J.R.), 1980.- Recherches sur les infections virales des crustacés marins : étude des maladies à étiologie simple et complexe chez les Décapodes des côtes françaises.- Thèse Doct. Sci. Nat., Montpellier, 152 p.
- BONAMI (J.R.), GRIZEL (H.), VAGO (C.) et DUTHOIT (J.L.), 1971.- Recherches sur une maladie épizootique de l'huître plate Ostrea edulis L.- Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 35(4), 415-418.
- BONAMI (J.R.) et PAPPALARDO (R.), 1980.- Rickettsial disease in the crab Carcinus mediterraneus Czer. (Crustacea decapoda).- Experientia, 36, 180-181.
- BORNET (E.) et FLAHAULT (C.), 1889.- Sur quelques plantes vivant dans le test calcaire des mollusques.- Bull. Soc. Bot. Fr., ser. 2, 11, 147-176.
- 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. Sci. Paris, 295, III, 45-48.
- BUCHANAN (J.S.), 1978.- Cytological studies on a new species of rickettsia found in association with a phage in the digestive gland of a marine bivalve mollusc, Tellina tenuis (da Costa).- J. Fish Dis., 1, 27-43.
- BURTON (P.R.), KORDAVA (N.) et PARETSKY (D.), 1971.- Electron microscopic studies of the rickettsia Coxiella burneti: entry, lysosomal response and fate of rickettsial DNA in L cells.- Can. J. Microbiol., 17, 499-502.
- 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, 359-364.

- CAMPBELL (S.A.), 1970.- The occurrence and effects of Mytilicola intestinalis Steuer.- Marine Biol., 5, 89-95.
- COMPS (M.), 1969.- Observations relatives à l'affection branchiale des huîtres portugaises (Crassostrea angulata Lmk.).- Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 33(2), 151-160.
- COMPS (M.), 1970.- La maladie des branchies chez les huîtres du genre Crassostrea, caractéristiques et évolution des altérations, processus de cicatrisation.- Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 34(1), 23-44.
- COMPS (M.), 1970a.- Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates (Ostrea edulis L.) dans le bassin de Marennes.- Cons. Inter. Explor. Mer, C.M. 1970, K 4.
- COMPS (M.), 1972.- Aspects de la pathologie des huîtres portugaises et des huîtres plates. Essais de culture des larves d'huîtres en laboratoire. - Thèse Doct. Ing., Toulouse, 119 p.
- COMPS (M.) et BONAMI (J.R.), 1977.- Infection virale associée à des mortalités chez l'huître Crassostrea gigas Th.- C. R. Acad. Sci. Paris, 285, D, 1139-1140.
- COMPS (M.), BONAMI (J.R.) et VAGO (C.), 1977.- Mise en évidence d'une infection rickettsienne chez les Huîtres.- C.R. Acad. Sci. Paris, 285, D, 427-429.
- COMPS (M.) et DELTREIL (J.P.), 1979.- Un microorganisme de type rickettsien chez l'huître portugaise Crassostrea angulata Lmk.- C. R. Acad. Sci. Paris, 269, D, 169-171.
- COMPS (M.) et DUTHOIT (J.L.), 1976.- Infection virale associée à la "maladie des branchies" de l'huître portugaise Crassostrea angulata Lmk.- C. R. Acad. Sci. Paris, 283, D, 1595-1596.
- COMPS (M.), GRIZEL (H.) et TIGE (G.), 1972.- Sur un sporozoaire parasite de Crassostrea rhizophorae (Guilding).- C. R. Acad. Sci. Paris, 275, D, 1693-1695.
- COMPS (M.) et MASSO (R.M.), 1978.- Study with fluorescent technique of the virus infections of the portuguese oyster Crassostrea angulata Lmk.- Proc. Inter. Coll. Invertebr. Pathol., 11-17 sept. 1978., 39-40.
- COMPS (M.) et RAIMBAULT (R.), 1978.- Infection rickettsienne de la glande digestive de Donax trunculus L.- Science et Pêche, 281, 11-12.
- COMPS (M.), RAZET (D.) et COUSSERANS (F.), 1979.- Infection chlamydienne chez le lavignon Scrobicularia piperata (P.) du bassin de Marennes-Oléron. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 43(4), 413-415.
- COMPS (M.), TIGE (G.), DUTHOIT (J.L.) et GRIZEL (H.), 1977 (1979).- Microorganismes de type rickettsien chez les huîtres Crassostrea gigas Th. et Ostrea edulis L.- Haliotis, 8, 317-321.

- COMPS (M.), TIGE (G.) et GRIZEL (H.), 1980.- Recherches ultrastructurales sur un Protiste parasite de l'Huître plate Ostrea edulis L.- C. R. Acad. Sci. Paris, 290, D, 383-384.
- COUTEAUX-BARGETON (M.), 1953.- Contribution à l'étude de Mytilus edulis L., parasité par Mytilicola intestinalis Steuer.- J. Cons., 19, 80-84.
- CROIZIER (G.), MEYNADIER (G.), MOREL (G.) et CAPPONI (M.), 1975.- Comparaison immunologique de quelques Wolbachiae et recherche de communautés antigéniques avec d'autres membres de l'ordre des Rickettsiales.- Bull. Soc. Pathol. exot., 68, 133-141.
- CULLING (C.) et VASSAR (P.), 1961.- Desoxyribose nucleic acid. A fluorescent histochemical technique.- Arch. Path., 71, 76-92.
- DART (L.) et TURNER (T.R.), 1959.- Fluorescence microscopy in exfoliative cytology.- Laboratory investigation, 8(2), 1513-1522.
- DAVIS (H.C.), LOOSANOFF (V.L.), WILLIAM (H.W.) et CHRISTOPHER (M.), 1954.- A fungus disease in clam and oyster larvae.- Science, 120, 36-38.
- DELTREIL (J.P.), 1969.- Remarques sur la croissance en élevage suspendu de Crassostrea angulata Lmk. affectée par la maladie des branchies dans le bassin d'Arcachon.- Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 33(2), 176-180.
- DESPORTES (I), 1981.- Etude ultrastructurale de la sporulation de Paramyxa paradoxa Chatton (Paramyxida) parasite de l'annélide polychète Poecilochaetus serpens.- Protistologica, 17(3), 365-386.
- 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. Sci. Paris, 292, III, 627-632.
- DESVOIGNE (D.M.) et SPARKS (A.K.), 1968.- The process of wound healing in the Pacific oyster Crassostrea gigas.- J. Invertebr. Pathol., 12(1), 53-65.
- DEVAUCHELLE (G.), 1977.- Ultrastructural characterization of an Iridovirus from the marine worm Nereis diversicolor (O.F. Müller).- Virology, 81, 237-246.
- DEVAUCHELLE (G.) et DURCHON (M.), 1973.- Sur la présence d'un virus du type Iridovirus dans les cellules mâles de Nereis diversicolor (O.F. Müller).- C. R. Acad. Sci. Paris, 277, D, 463-466.
- DEVAUCHELLE (G.), MEYNADIER (G.) et VAGO (C.), 1972.- Etude ultrastructurale du cycle de multiplication de Rickettsiella melolonthae (Krieg), Philip, dans les hémocytes de son hôte.- J. Ultrastruct. Res., 38, 134-148.
- DEVAUCHELLE (G.) et VAGO (C.), 1971.- Particules d'allure virale dans les cellules de l'estomac de la seiche Sepia officinalis L. (Mollusques, Céphalopodes).- C. R. Acad. Sci. Paris, 272, D, 894-896.
- DEVAUCHELLE (G.), VAGO (C.) et MEYNADIER (G.), 1971.- Ultrastructure comparée de Rickettsiella melolonthae (Rickettsiales, Wolbachiae) et de l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne (Rickettsiales, Chlamydiaceae).- C. R. Acad. Sci., 272, D, 2972-2974.

- DOLLFUS (R.Ph.), 1922.- Résumé de nos principales connaissances pratiques sur les maladies et les ennemis de l'huître.- Notes et mémoires Off. Sci. Techn. Pêches marit., n° 7.
- DRINNAN (R.E.) et ENGLAND (L.A.), 1965.- Further progress in rehabilitating oyster stocks.- Fish Res. Bd. Can., Gen. Ser. Circ. Biol. Sta. St. Andrews, N. B., 48, 4p.
- DUTKY (S.R.) et GOODEN (E.L.), 1952.- Coxiella popilliae n. sp. a rickettsia causing blue disease of Japanese beetle larvae.- J. Bacteriol., 63, 743-750.
- EB (F.), DEVAUCHELLE (G.) et ORFILA (J.), 1972.- Etude ultrastructurale de l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne (Rickettsiales, Chlamydiaeae).- J. Microscopie, (Paris), 13, 47-56.
- EB (F.), ORFILA (J.) et LEFEBVRE (J.F.), 1976.- Ultrastructure comparée de Coxiella burneti et de Chlamydia psittaci en cultures cellulaires.- J. Microscopie Biol. Cell., 25, 207-210.
- ELSTON (R.), 1979.- Viruslike particles associated with lesions in larvae pacific oysters (Crassostrea gigas).- J. Invertebr. Pathol., 33, 71-74.
- ELSTON (R.), 1980.- Ultrastructural aspects of a serious disease of hatchery reared larval oysters, Crassostrea gigas Thünberg. - J. Fish. Disea., 3, 1-10.
- ENGLE (J.B.) et ROSENFELD (A.), 1963.- Progress in oyster mortality studies. - Proc. Gulf Carib. Fish Inst. 15th. Annu. Sess., 116-124.
- EYRE (J.W.H.), 1924.- An account of investigations into the cause or causes of the unusual mortality among oysters in English oyster beds during 1920 and 1921, part II.- Appendix D, Final bacteriological report. Min. Agric. Fish., Fish. Invest., London, Ser. 2, 6(4), 29-39.
- FARLEY (C.A.), 1967.- A proposed life cycle of Minchinia nelsoni (Haplosporida, Haplosporidiidae) in the american oyster Crassostrea virginica.- J. Protozool., 14, 616-625.
- FARLEY (C.A.), 1976.- Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve mollusks.- Prog. exp. Tumor Res., 20, 283-294.
- FARLEY (C.A.), 1978.- Viruses and viruslike lesions in marine mollusks.- Mar. Fish. Rev., 40, 18-20.
- FARLEY (C.A.), BANFIELD (W.G.), KASNIC (G.) et FOSTER (W.), 1972.- Oyster herpes-type virus.- Science, 178, 759-760.
- FENNER (F.), 1976.- Classification and Nomenclature of viruses.- Intervirol., 7, 1-115.
- FERREIRA (P.S.) et DIAS (A.A.), 1973.- Sur la répartition et l'évolution de l'altération des branchies de Crassostrea angulata dans le Tage, le Sado et l'Algarve.- Cons. Inter. Explor. mer, C. M. 1973 /K : 6.

- FRANC (A.), 1980.- Sur quelques aspects inédits du cycle de Marteilia refringens Grizel et coll. 1974, parasite de l'huître plate Ostrea edulis L.
- Cahiers de Biologie Marine, 21, 99-106.
- FRANC (A.) et ARVY (L.), 1969.- Sur Thanatostrea polymorpha ng, nsp, agent de destruction des branchies et des palpes de l'huître portugaise.
- C. R. Acad. Sci. Paris, 268, D, 3189-3190.
- FRANC (A.) et ARVY (L.), 1970.- Données sur l'évolution de la "maladie des branchies" chez les huîtres et sur son agent causal : Thanatostrea polymorpha FRANC et ARVY 1969.- Bull. Biol., 1(2), 2-19.
- GIARD (A.), 1894.- Sur une affection parasitaire de l'huître (Ostrea edulis L.) connue sous le nom de maladie du pied.- C. R. Sean. Soc. Biol., 46; 401-403.
- GINSBURGER-VOGEL (Th.), 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. Sci. Paris, 283, D, 939-942.
- GINSBURGER-VOGEL (Th.) 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.
- GINSBURGER-VOGEL (Th.) et DESPORTES (I.), 1979 b.- Structure and biology of Marteilia sp. in the amphipod Orchestia gammarellus.- Mar. Fish Rev., 41(1-2), 3-7.
- GLUDE (J.B.), 1974.- A summary report of Pacific coast oyster mortality investigations 1965-1972.- Proc. Third U.S. Japan Meet. Aquac. Tokyo, Japan, Oct. 15-16, 1974 (Special publication of Fishery Agency, Japanese Government and Japan sea regional fisheries research laboratory.), 1-28.
- GRAS (P.), COMPS (M.), DAVID (A.) et BARON (G.), 1971.- Observations préliminaires sur la reproduction des huîtres dans le bassin de Marennes en 1971.- Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit., n° 207, 16 p.
- GRAS (P.) et HERRBACH (B.), 1971.- Etude sur les affections branchiales de l'huître plate Ostrea edulis Linné.- Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 35(2), 229-234.
- 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, n° 240.
- GROBEN, 1888.- Die Pericardialdrüse der Lamellibranchiaten.- Arb. Zool. Inst. Univ. Wien, 7, 355-444.
- GUILLARD (R.R.L.), 1959.- Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria.- Biol. Bull. (Woods Hole), 117, 258-266.

- HARSHBARGER (J.C.), SING CHEN CHANG et OTTO (S.V.), 1977.- Chlamydiae (with Phages), Mycoplasmas, and Rickettsiae in Chesapeake Bay Bivalves. - Science, vol. 196, 666-668.
- HASKIN (H.H.), STAUBER (L.A.) et MACKIN (F.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'huitre plate Ostrea edulis L.- Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 35(1), 79-87.
- HEWATT (W.G.) et ANDREWS (J.D.), 1956.- Temperature control experiments on the fungus disease, Dermocystidium marinum, of oysters.- Proc. Nat. Shellfish. Ass., 46, 129-133.
- HILL (B.J.) et ALDERMAN (D.J.), 1977 (1979).- Observations on the experimental infection of Ostrea edulis with two Molluscan viruses.- Haliotis, 8, 297-299.
- HUGER (A.) et KRIEG (A.), 1967.- New aspects of the mode of the reproduction of Rickettsiella organisms in insects.- J. Invertebr. Pathol., 9, 442-445.
- HUMASON (G.L.), 1962.- Animal tissue techniques.- San Francisco, U.S.A. : Freeman and C° ed?, 468 p.
- JOLY (J.P.) et COMPS (M.), 1979.- Etude ultrastructurale d'une Haplosporidie parasite de la palourde Tapes decussatus L.- Comm. Cons. Int. Explor. mer, C. M. 1979 /F : 20.
- JOLY (J.P.) et COMPS (M.), 1980.- Etude d'un micro-organisme de type chlamydien chez la palourde Ruditapes decussatus L.- Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 44(3), 285-287.
- JONES (H.), RAKE (G.) et STEARNS (B.), 1945.- Studies on lymphogranuloma venereum III the action of the sulfonamides on the agents of lymphogranuloma venereum.- J. Infect. Dis., 76, 55-69.
- KATKANSKY (S.C.), DAHLSTROM (W.A.) et WARNER (R.W.), 1969.- Observations on survival and growth of the European flat oyster, Ostrea edulis, in California.- Calif. Fish. and Game, 55(1), 69-74.
- KELLY (D.C.), 1976?- Iridescent virus type 22 replication in Aedes albopictus cells in culture.- J. Invertebr. Pathol., 27, 415-418.
- KELLY (D.C.) et ROBERTSON (J.S.), 1973.- Icosahedral cytoplasmic desoxyriboviruses.- J. Gen. Virol. (suppl. 20) : 17-41.
- KELLY (D.C.) et TINSLEY (T.W.), 1972.- The proteins of iridescent virus types 2 and 6.- J. Invertebr. Pathol., 19, 273.

- KELLY (D.C.) et TINSLEY (T.W.), 1974?- Iridescent virus replication : a microscope study of Aedes aegypti and Antherea eucalypti cells in culture infected with iridescent virus types 2 and 6.- Microbios, 9; 75-93.
- KORRINGA (P.), 1948.- Shell disease in Ostrea edulis- its dangers, its cause, its control.- Conv. Add. Nat. Shellfish. Ass. 1948, 86-94.
- KORRINGA (P.), 1951.- Le Mytilicala intestinalis Steuer (Copepoda parasitica) menace l'industrie moulière en Zélande.- Rev. Trav. Off. Pêches marit., 17, 9-13.
- KRIEG (A.), 1958.- Vergleichende taxonomische, morphologische und serologische untersuchungen an insektenpathogenen Rickettsien.- Z. Natur. Forsh., 13 b, 555-557.
- LASSERRE (Cl.), 1969.- Premiers résultats d'une étude histologique sur la maladie des branchies.- Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 33(2), 165-166.
- LEENHARDT (H.), 1926.- Quelques études sur Gryphea angulata (Huître du Portugal) Ann. Inst. Oceanogr., n.sér., 3(1) : 1-90.
- LEGER (L.) et HOLLANDE (A.C.), 1917.- Sur un nouveau protiste à faciès de Chytridiopsis, parasite des ovules de l'huître.- C. R. Séanc. Soc. Biol., 80, 61-64.
- LEIBOVITZ (L.), ELSTON (R.), LIPOVSKY (V.P.) et DONALDSON (J.), 1978.- A serious disease of larval Pacific oysters (Crassostrea gigas).- Proc. 9. th. Ann. Meet. world Mariculture Soc., 603-615.
- LEIBOVITZ (L.), 1978.- A study of vibriosis at Long Island shellfish hatchery? - New York Sea Grant Reprint Series. NYSG-RR- 79-02. N.Y. Sea Grant Institute, Albany, N.Y. 12246.
- LEVINE (N.D.), 1978.- Perkinsus gen. n. and other new taxa in the Protozoan phylum Apicomplexa.- J. Parasitol., 64(3), 549.
- LEVINE (N.D.), CORLISS (J.O.), COX (F.E.G.), DEROUX (G.), GRAIN (J.), HONIBERG (B.M.), LEEDALE (G.F.), LOEBLICH (A.R.), 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.

- LOGIE (R.R.), DRINNAN (R.E.) et HENDERSON (E.B.), 1960.- Rehabilitation of disease - depleted oyster populations in eastern Canada.- Proc. Gulf. Carib. Fish. Inst. 13 th Ann. Sess., 109-113.
- LOUIS (C.), 1980.- Recherches ultrastructurales sur les cycles de Procaryotes intracytoplasmiques d'arthropodes.- Thèse Doct. Sci. Nat., Montpellier, 191 p.
- LOUIS (C.), MOREL (G.), NICOLAS (G.) et KUHL (G.), 1979.- Etude comparée des caractères ultrastructuraux de rickettsies d'arthropodes, révélées par cryodécapage et cytochimie.- J. Ultrastruct. Res., 66, 243-253.
- LOUIS (C.), YOUSFI (A.), VAGO (C.) et NICOLAS (G.), 1977.- Etude par cytochimie et cryodécapage de l'ultrastructure d'une Rickettsiella de crustacé. - Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 128 B, 177-205.
- Mc AUSLAN (B.R.) et ARMENTROUT (R.W.), 1974.- The biochemistry of icosahedral cytoplasmic desoxyviruses.- Curr. Top. Microbiol. Immunol., 68, 77-105.
- MACKIN (J.G.), 1960.- Status of researches on oyster diseases in North America. - Proc. Gulf. Carib. Fish. Inst. 13 th. Ann. Sess., 98-109.
- 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.), KORRINGA (P.) et HOPKINS (S.A.), 1952.- Hexamitiasis of Ostrea edulis and Crassostrea virginica G.,- Bull. Mar. Sci. Gulf Carib., 1, 266-277.
- 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.) et RAY (S.M.), 1966.- The taxonomic relationship of Dermocystidium marinum Mackin, Owen et Collier.- J. Invertebr. Pathol., 8, 544-545.
- MARTEIL (L.), 1968.- La maladie des branchies.- Cons. Inter. Explor. Mer, CM.K5.
- MATSUMOTO (A.) et MANIRE (G.P.), 1970.- Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of Chlamydia psittaci. - J. Bacteriol., 101, 278-285.
- MATERN (C.F.), HRUSKA (J.F.) et DIAMOND (L.), 1974.- Virus of Entamoeba histolytica. V. Ultrastructure of the polyhedral virus V 301.- J. Virology, 247-249.
- MENZEL (R.W.), 1974.- Portuguese and japanese oysters are the same species. - J. Fish. Res. Bd. Can., 31(4), 453-456.
- MEYERS (T.R.), 1979.- Preliminary studies on chlamydial agent in digestive diverticular epithelium of hard clams Mercenaria mercenaria(L.) from great south Bay, New-York.- J. Fish Dis., 2, 179-189.

- MEYERS (T.R.), 1960.- Experimental pathogenicity of reovirus 13p2 for juvenile american oysters Crassostrea virginica (Gmelin) and bluegill fingerlings Lepomis macrochirus (Rafinesque).- J. Fish Dis., 3, 187-201.
- MEYNADIER (G.) et MONSARRAT (P.), 1969.- Une rickettsiose chez une cétoine de Madagascar.- Entomophaga, 14, 401-406.
- MORE (P.), 1969.- Contribution à l'étude des protéines solubles du muscle adducteur de l'huître.- Thèse, Doct. Pharm., Nantes, 186 p.
- MOREL (G.), 1976.- Studies on Porochlamydia buthi g.n., sp.n. an intracellular pathogen of the scorpion Buthus occitanus.- J. Invertebr. Pathol., 26, 167-175.
- MOREL (G.), 1977.- Etude d'une Rickettsiella (Rickettsie) se développant chez un arachnide, l'araignée Pisaura mirabilis.- Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 128, A, 49-59.
- MOREL (G.), 1978.- Isolement de deux chlamydiales (Rickettsies) chez un arachnide: l'araignée Pisaura mirabilis Cl., Experientia, 34, 344-345.
- MOREL (G.) 1979.- Recherches sur les maladies infectieuses de deux arachnides. Etude de rickettsioses et de viroses chez le scorpion Buthus occitanus A. et l'araignée Pisaura mirabilis Cl.- Thèse, Doct. Sci. Nat., Montpellier, 138 p.
- MOULDER (J.W.), 1974.- Rickettsiales. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 8e éd. (Buchanan R.E. and Gibbons N.E.), Baltimore, Williams and Wilkins Co., 882-914.
- NEEDLER (A.W.H.) et LOGIE (R.R.), 1947.- Serious mortalities in Prince Edward Island oysters caused by a contagious disease.- Trans. Roy. Soc. Can., ser.3, sec.5, 41, 73-89.
- ORMIERES (R.) et GRIZEL (H.), 1977 (1979).- Les Haplosporidies parasites de Mollusques.- Haliotis, 8, 49-56.
- ORTON (J.H.), 1924a.- An account of investigations into the cause or causes of the unusual mortality among oysters in english oyster beds during 1920 and 1921, part I.- Min. Agr. Fish. Fish. Invest., London, ser. 2, 6(3), 1-199.
- ORTON (J.H.), 1924b.- An account of investigations into the cause or causes of unusual mortality among oysters in english oyster beds during 1920 and 1921, part II.- Min. Agr. Fish., Fish. Invest., London, ser 2, 6(4), 3-14.
- OWEN (H.M.), WALTER (L.L.) et BREGAN (L.B.), 1952.- Etiological studies on oyster mortality. I, Nematopsis ostrearum Prytherch 1940 (Sporozoa: Porosporidae).- J. Mar. Res., 10, 82-90.
- PAGE (L.A.), 1974.- Chlamydiales. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 8 éd. (Buchanan R.E. and Gibbons N.E.), Williams and Wilkins Co., Baltimore, 914-918.
- PAPPALARDO (R.), 1981.- Recherches sur les infections à virus et à procaryotes chez le crustacé marin Carcinus mediterraneus Czerniavski.- Thèse, 3ème cycle, Montpellier, 155 p.

- PERKINS (F.O.), 1968.- Fine structure of the oyster pathogen Minchinia nelsoni (Haplosporida, Haplosporidiidae).- J. Invertebr. Pathol., 10, 287-305.
- PERKINS (F.O.), 1969.- Electron microscope studies of sporulation in the oyster pathogen, Minchinia costalis (Sporozoa : Haplosporida).- J. Parasitol., 55, 897-920.
- PERKINS (F.O.), 1971.- Sporulation in the trematode hyperparasite Urosporidium crescens Deturk, 1940, (Haplosporida : Haplosporidiidae)- an electron microscope study.- J. Parasitol., 57, 9-23.
- PERKINS (F.O.), 1975a.- Fine structure of the haplosporidan Kernstab, a persistent, intranuclear mitotic apparatus.- J. Cell. Sci., 18, 327-346.
- PERKINS (F.O.), 1975b.- Fine structure of Minchinia sp. (Haplosporida) sporulation in the Mud Crab, Panopeus herbstii.- Mar. Fish. Rev., 37(5-6), 46-60.
- PERKINS (F.O.), 1976.- Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen Marteilia refringens. Taxonomic implications.- J. Protozool., 23(1), 64-74.
- 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 WOLF (P.H.), 1976.- Fine structure of Marteilia sydneyi sp.n. haplosporidan pathogen of Australian oysters.- J. Parasit., 62(4), 528-538.
- PICHOT (Y.), COMPS (M.), TIGE (G.), GRIZEL (H.) et RABOUIN (M.A.), 1980.- Recherches sur Bonamia ostreae gen.n., sp.n., parasite nouveau de l'huître plate Ostrea edulis L.- Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 43(1), 131-140.
- RANSON (G.), 1951.- Les huîtres, biologie, culture.- Lechevalier, Paris, 260 p.
- RAY (S.M.), 1952.- A culture technique for diagnosis of infections with Dermocystidium marinum Mackin, Owen et Collier in oysters.- Science, 116, 360-361.
- RAY (S.M.), 1954.- Experimental studies on the transmission and pathogenicity of Dermocystidium marinum, a fungous parasite of oysters.- J. Parasit., 40, 235.
- RENO (P.W.), PHILLIPON-FRIED (M.), NICHOLSON (B.L.) et SHERBURNE (S.W.), 1978.- Ultrastructural studies of piscine erythrocytic necrosis (PEN) in Atlantic herring (Clupea harengus harengus).- J. Fish. Res. Bd. Can., 35, 138-154.
- ROSENBERG (M.) et KORDOVA (N.), 1960.- Study of intracellular forms of Coxiella burneti in the electron microscope.- Acta. Virol., 4, 52-55.
- ROSENFELD (A.), 1969.- Oyster diseases in North America and some methods for their control, proceedings of the conference on artificial propagation of commercially valuable shellfish. Oysters. Oct. 22-23, 1969, 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(5), 921-941.
- RUNGER (D.), RASTELLI (M.), BRAENDLE (E.) et MALSBERGER (R.G.), 1971.- A viruslike particle associated with lesions in the muscles of Octopus vulgaris.- J. Invertebr. Pathol., 17, 72-80.
- RUSSEL (W.C.), NEWMAN (C.) et WILLIAMSON (D.H.), 1975.- A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses.- Nature, 253, 461-462.
- STEIN (J.E.) et MACKIN (J.G.), 1955.- A study of the nature of pigment cells of oysters and the relation of their numbers to the fungus disease caused by Dermocystidium marinum.- Texas J. Sci., 7, 422-429.
- STOLZ (D.B.), 1972.- The structure of icosahedral cytoplasmic desoxyriboviruses. - J. Ultrastruct. Res., 43, 58-74.
- TAKATSUKI (S.), 1934.- Beiträge zur Physiologie des Austerhensens unter besonderer Berücksichtigung der vier physiologischen Reaktionen.- Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku, sect.B, 2, 56-62.
- TAKEUCHI (T.), TAKEMOTO (Y.) et MATSUBARA (T.), 1960.- Hematological study of bacteria-infected oysters.- Rep. Hiroshima Prefect. Fish. Exp. Sta., 22, 1-7.
- TIGE (G.), GRIZEL (H.) et COMPS (M.), 1980.- Données sur le nouveau parasite de l'huître plate. Situation épidémiologique.- Cons. Inter. Explor. Mer, Spec. Sess. Copenhague 1980, n° 39.
- 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. Evolution au cours de l'année 1980.- Science et Pêche, n° 315, 13-20.
- TINSLEY (T.W.) et KELLY (D.C.), 1970.- An interim nomenclature system for the iridescent group of insect viruses.- J. Invertebr. Pathol., 16, 470-472.
- TUBIASH (H.S.), CHANLEY (P.E.) et EINAR (E.), 1965.- Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology.- J. Bacteriol. 90, 1036-1044.
- VAGO (C.), 1966.- A virus disease in Crustacea.- Nature, 209, 1290.
- VAGO (C.) et AMARGIER (A.), 1963.- Coloration histologique pour la différenciation des corps d'inclusion polyédriques de virus d'insectes.- Ann. Epiphyties, 14(3), 269-274.
- VAGO (C.) et MEYNADIER (G.), 1965.- Une rickettsiose chez le criquet pèlerin (Schistocerca gregarina Forsk.).- Entomophaga, 10, 307-310.
- VAGO (C.), MEYNADIER (G.), JUCHAULT (P.), LEGRAND (J.J.) et AMARGIER (A.), 1970. - Une maladie rickettsienne chez les crustacés isopodes.- C. R. Acad. Sci. Paris, 271, D, 2061-2063.

- WALKER (R.) et SHERBURNE (S.W.), 1977.- Piscine erythrocytic necrosis virus in Atlantic cod, Gadus morhua, and other fish : ultrastructure and distribution.- J. Fish. Res. Bd. Can., 34, 1188-1195.
- WALKER (R.) et WEISSENBERG (R.), 1965.- Conformity of light and electron microscopic studies on virus particle distribution in lymphocystis tumor cells of fish.- Ann. N. Y. Acad. Sci., 126, 375-395.
- WOOD (J.L.) et ANDREWS (J.D.), 1962.- Haplosporidium costale (Sporozoa) associated with a disease of Virginia oysters.- Science, 136, 710-711.
- ZWILLENBERG (L.O.) et WOLF (K.), 1968.- Ultrastructure of Lymphocystis virus. - J. Virol., 2(4), 393-399.

o

o o