

RECHERCHES SUR L'ORGANISME RESPONSABLE DE LA MALADIE DES BRANCHIES

par Paul GRAS

Les premières manifestations d'une maladie de l'huître furent observées en France en novembre 1966 chez *Crassostrea angulata* et en octobre 1967 chez *Ostrea edulis*. Les branchies et les palpes des mollusques malades présentaient des perforations et des indentations plus ou moins nombreuses et importantes.

Les essais d'identification de l'organisme responsable qui furent alors tentés par des chercheurs américains, à partir d'échantillons qui leur furent envoyés, leur firent supposer une mycose, ce genre d'affection étant tenu, aux Etats-Unis, pour responsable d'importantes mortalités chez les huîtres. On sait en effet que des champignons peuvent parasiter les larves des mollusques dans les élevages expérimentaux (*Sirolopidium zoophthorum*) et les adultes eux-mêmes (*Dermocystidium marinum*). De même l'épizootie qui a sévi en Europe de 1919 à 1925 fut aussi attribuée à un champignon.

Cependant on ne peut a priori écarter l'hypothèse d'une infestation d'origine bactérienne ou virale. C'est pour cela que nous avons fait, en plus des observations microscopiques extemporanées de dilacérations avec et sans coloration, de nombreux essais de cultures à partir de tissus d'huîtres saines et malades sur milieux mycophiles et autres.

Méthodes d'études.

1°) Prélèvements et ensemencements.

Les examens ont été pratiqués sur du naissain, des huîtres malades et des huîtres apparemment saines provenant des principales régions ostréicoles françaises et étrangères.

Des fragments de branchies, prélevés avec le maximum d'asepsie sur le pourtour des lésions, ainsi que des broyats de ces organes, d'huîtres entières et de naissain sont ensemencés sur différents milieux de cultures. Pour chaque lot examiné des cultures témoins sont faites avec des huîtres aux branchies non altérées.

2°) Milieux de cultures utilisés.

La plupart des cultures sont faites sur des milieux spéciaux utilisés en mycologie. Ce sont le milieu de Sabouraud et le milieu au thioglycolate. Ils sont préparés soit à l'eau de mer soit à l'eau douce, de façon à tenir compte de l'halophilisme strict de certains champignons.

Milieu I : milieu de Sabouraud maltosé dont la composition par litre est la suivante : peptone mycologique (oxoid) : 10 g; maltose : 40 g; agar : 15 g. Le pH est ajusté à 5,2.

Milieu II : milieu de Sabouraud dextrosé dont la composition par litre est la suivante : peptone mycologique (oxoid) : 10 g; dextrose : 40 g; agar : 15 g. Le pH est ajusté à 5,6.

Milieu III : milieu au thioglycolate dont la composition par litre est la suivante : extrait de levures (Difco) : 5 g; L-cystine (Difco) : 0,25 g; casitone : 15 g; dextrose : 5 g; chlorure de sodium : 2,5 g; acide thioglycolique : 0,3 g; agar : 0,75 g; bleu de méthylène : 0,002 g. Le pH est ajusté à 7,2 à 25 °C.

3°) Techniques de cultures.

a) *Microcultures sur lames à concavité.* Cinq millilitres d'eau de mer stérile contenant quelques gouttes d'antibiotiques afin d'éviter toute contamination, sont déposés au fond d'une boîte de Petri pour réaliser une humidification à saturation. Un chevalet en verre coudé en U, stérilisé à la flamme, est introduit dans la boîte et une lame à concavité, également stérile, est placée sur lui. On dépose, à l'aide d'une pipette, deux gouttes de milieu nutritif dans la concavité de la lame qui est ensuiteensemencée en son centre, après la prise de l'agar, dans le cas des milieux I et II. Avant l'ensemencement le fragment de branchies prélevé est lavé dans un bain d'eau de mer stérile contenant des antibiotiques. L'incubation est faite aux températures de 20 et 25 °C.

b) *Microcultures entre lame et lamelle.* Une goutte du milieu nutritif III, déposée sur une lame, estensemencée par un fragment d'organe. La préparation est ensuite recouverte par une lamelle dont les bords sont lutés.

c) *Microcultures en tubes inclinés.* Ce sont les cultures classiques pratiquées en mycologie. Elles sont faites avec les milieux I et II.

Résultats et discussion.

L'examen microscopique montre que les microorganismes rencontrés dans les cultures faites à partir d'inoculum provenant aussi bien d'huîtres saines que de malades, font partie de la flore bactérienne normale des océans et des estuaires. Aucune espèce n'a été rencontrée avec une plus grande fréquence chez les animaux malades.

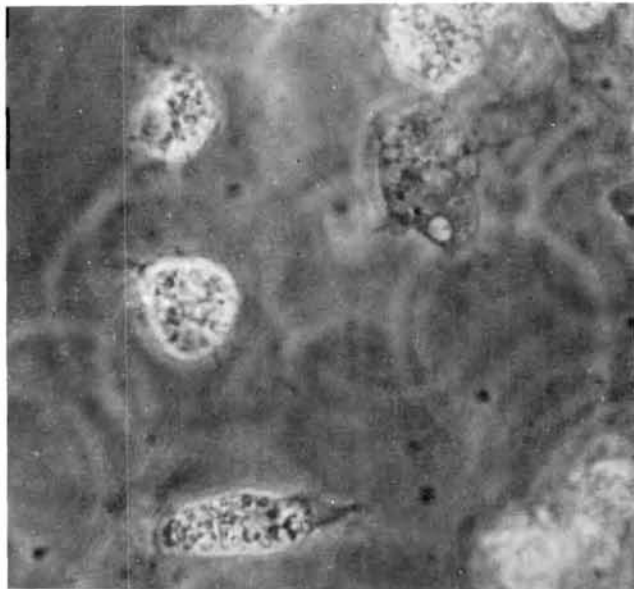


FIG. 1. — Amibocytes et phagocytes sur le pourtour d'une lésion branchiale ($\times 1\ 000$).

De même, les levures, moisissures, champignons filamenteux et lévuriformes, *Penicillium* et *Aspergillus* qui ont été trouvés ne peuvent être tenus pour responsables de la maladie des branchies. Ils sont communément rencontrés dans l'eau de mer. Malgré l'emploi de colorants spéciaux (bleu coton lactique, lugol) destinés à mettre en évidence les formes mycéliennes, les examens microscopiques n'ont pu révéler la présence de mycélium sur des fragments de branchies fraîchement prélevés.

La présence d'un cilié a été mentionnée par ARVY et FRANC (1968) sur les palpes et les branchies des huîtres de la région de Marennes-Oléron. Il a été observé surtout chez les huîtres malades *Crassostrea angulata* LMK provenant des régions ostréicoles françaises de l'Atlantique. Il se pourrait que ce protozoaire provoque des lésions qui constitueraient une voie d'entrée à d'autres

parasites et diminueraient d'autant la résistance du mollusque. L'observation *in vivo* de fragments branchiaux révèle en effet une grande abondance d'amibocytes et de phagocytes au niveau des altérations (fig. 1).

Plusieurs structures se retrouvent avec une grande fréquence chez les huîtres malades, plus rarement chez les huîtres saines. Elles ont été obtenues en culture dans le milieu III, selon la technique utilisée par RAY (1952 a, 1952 b, 1954 a). Des tubes contenant 10 ml de ce milieu à différentes concentrations (1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100) étaientensemencés avec des broyats (1 ml par tube) et des fragments de branchies d'huîtres fortement atteintes. Malgré l'ad-

dition d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine), de nombreux tubes étaient contaminés par des bactéries après quelques jours d'incubation.

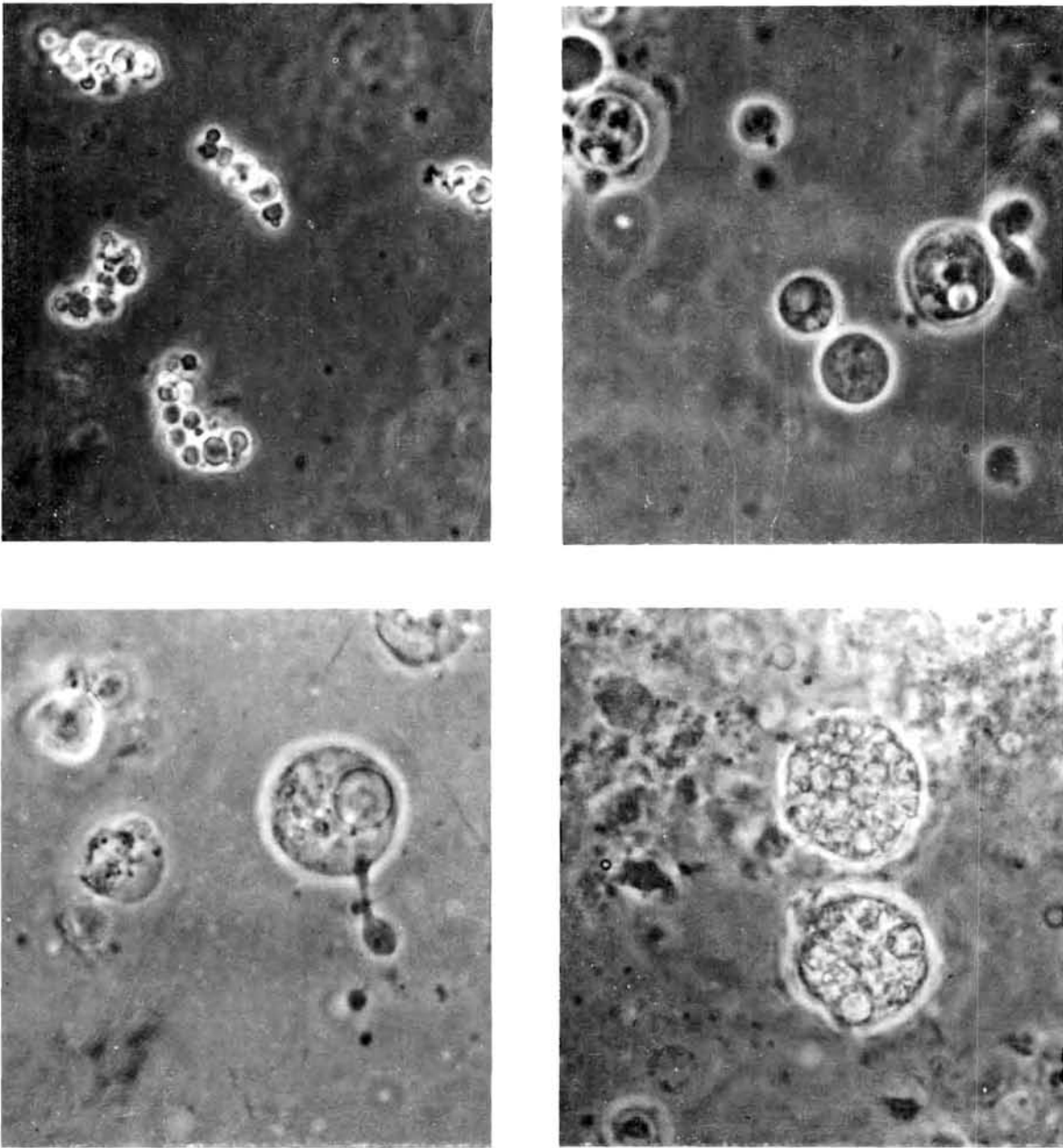


FIG. 2 à 5. — En haut, à gauche : culture de 24 h dans un milieu au thioglycolate ($\times 1\ 000$), à droite : cellules vacuolaires dans une culture de 6 jours (thioglycolate) ($\times 1\ 000$); en bas, à gauche : cellule donnant naissance à une cellule-fille par l'intermédiaire d'un prolongement cytoplasmique ($\times 1\ 000$), à droite : « sporanges » renfermant de nombreuses spores ($\times 1\ 250$).

Dans la plupart des cultures et plus précisément aux dilutions au 1/50 et au 1/25, apparaissent, 24 heures après l'ensemencement, des cellules sphériques, pouvant atteindre 3 microns de

diamètre. Elles sont disposées en grappes comme le montre la figure 2 et nous avons pu constater qu'elles grandissaient notablement.

Dans des cultures plus âgées (6 à 7 jours) on peut trouver en effet des cellules d'un diamètre de 10 à 12 microns (fig. 3) qui sont caractérisées par :

- un noyau souvent lobé,
- un cytoplasme finement granuleux et peu important,
- une vacuole, toujours présente, pouvant atteindre de grandes dimensions.

Ces cellules, qui semblent avoir terminé leur développement, peuvent aussi être observées dans des fragments de tissus branchiaux (*C. angulata*) cultivés entre lame et lamelle, mais tous les essais de repiquage se sont révélés négatifs. Il est en outre apparu que les cultures contaminées par des bactéries ou des moisissures ne montraient jamais une telle reproduction.

Une formation, plus rarement observée, mais ayant de grandes similitudes avec la description d'un stade biologique de *D. marinum*, indiqué par MACKIN (1961-1962) a aussi été mise en évidence dans ces cultures au thioglycolate. Il s'agit d'une cellule d'un diamètre de 20 microns environ donnant naissance à une cellule-fille par l'intermédiaire d'un prolongement cytoplasmique (fig. 4).

Des structures pouvant être considérées comme des « sporanges » ont été observées *in vivo* à partir d'huîtres (*C. gigas*) provenant du Japon (fig. 5). Les prélèvements étaient effectués à la base des indentations dans une zone apparemment sans structure. Ce sont des formations sphériques de 15 à 16 microns de diamètre environ. Elles renferment de nombreuses spores de 2 à 5 μ .

La synthèse de nos observations nous conduit à penser que l'organisme responsable de la maladie des branchies présente des analogies avec *D. marinum* :

- les cultures jeunes montrant des cellules en grappes paraissent semblables à celles obtenues par MACKIN avec cet organisme,
- les cellules vacuolaires de 10 à 12 microns rappellent les préhyphospores de ce parasite qui peuvent évoluer en spores résistantes pendant la mauvaise saison,
- les « sporanges » observés *in vivo* et la formation de « pousses tubulaires » à partir de certaines cellules sont autant de structures rappelant des formes biologiques de *D. marinum*.

Mais toutes ces structures ne constituent vraisemblablement que certains stades du cycle de vie de l'organisme décrit et, malgré les nombreuses analogies qu'il présente avec *Dermocystidium marinum*, nous ne pouvons affirmer que celui-ci soit responsable de la maladie des branchies car leur altération ne paraît pas être mentionnée parmi les symptômes caractéristiques des infestations provoquées par ce parasite.

AUTEURS CONSULTÉS

- 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**, sér. D : 103-105, 2 pl.
- GALTSOFF (P.S.), 1964. — The American oyster *Crassostrea virginica* GMELIN. — *Fish. Bull.*, **64** : 415-420.
- JOHNSON (T.W.) et SPARROW (F.K.), 1961. — Fungi in oceans and estuaries. — *Publ. J. Cramer* : 75-80, 160-166, 229-238, et 539-542.
- MACKIN (J.G.), 1951. — Histopathology of *Crassostrea virginica* GMELIN by *Dermocystidium marinum* MACKIN, OWEN and COLLIER. — *Bull. mar. sci. Gulf Carrib.*, **1** : 72-87.
- 1961-62. — Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. — *Publ. Inst. mar. Sci. Texas*, **7** : 132-221.