

**RECHERCHE SUR L'AGENT
DE LA MALADIE DE LA GLANDE DIGESTIVE
DE *OSTREA EDULIS* LINNE**

par GRIZEL (H.), COMPS (M.), BONAMI (J.R.), COUSSERANS (F.),
DUTHOIT (J.L.) et LE PENNEC (M.A.) (1)

De nombreuses maladies ont été décrites depuis longtemps chez les huîtres des genres *Ostrea* et *Crassostrea* et principalement chez les espèces faisant l'objet d'un élevage et ayant donc un intérêt commercial.

L'absence de croissance mais le plus souvent des mortalités restent dans la plupart des cas les symptômes les plus évidents de l'état présumé de maladie. Les effets de ces épizooties sont parfois si graves qu'ils peuvent entraîner la disparition d'une population d'huîtres dans une zone déterminée comme ce fut le cas pour *Ostrea edulis* L. en 1920-1921 (DOLLFUS, 1922) sur certaines côtes d'Europe et pour *Crassostrea angulata* LMK en 1970-1971 sur les côtes françaises atlantiques et particulièrement dans les bassins de Marennes-Oléron et d'Arcachon. Ces cas peuvent être considérés comme extrêmes car le plus souvent les huîtres sont sujettes à des affections dont les effets n'ont qu'un caractère épisodique, ne touchant que partiellement les élevages.

Ainsi, depuis 1915, sur les côtes de l'île du Prince-Edouard, on a enregistré de nombreuses et importantes mortalités de l'huître américaine *Crassostrea virginica* GMELIN (NEEDLER, 1941 ; NEEDLER et LOGIE, 1947). De la même façon, au Japon, pendant plusieurs années à partir de 1961, des mortalités estivales ont dévasté des élevages de *Crassostrea gigas* THUNBERG dans la baie de Matsushima (KAN-NO et coll., 1965).

Des pertes comparables ont également été observées en Louisiane durant les périodes chaudes dans les élevages de *Crassostrea virginica* (MACKIN, 1951). On pourrait enfin rappeler les mortalités décrites par ROUGHLEY (1926) chez *Crassostrea commercialis* I. et R., huître native d'Australie.

(1) Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur VAGO, Membre de l'Institut. Nous remercions M. MAHEO, ostréiculteur à Lézardrieux et M. LE DANTEC, Chef du Laboratoire d'Arcachon pour la fourniture d'échantillons d'huîtres malades. Nous sommes également reconnaissants à M. P.H. WOLF, Biologiste à Sydney de nous avoir confié des préparations microscopiques.

En raison de l'importance économique des huîtres, leurs maladies ont toujours suscité un intérêt particulier pour les chercheurs et les services techniques préoccupés par l'ostréiculture.

Il s'est avéré toutefois, comme l'ont précisé SINDERMANN et ROSENFELD (1967) que chez les huîtres les causes de nombreuses maladies ou affections considérées comme telles n'ont jamais pu être déterminées. Ces auteurs font référence à plusieurs cas de mortalités massives bien connus. On pourrait y ajouter les récentes maladies de l'huître portugaise (maladie des branchies et mortalité de 1970) et de l'huître plate, ne serait-ce que sur les côtes françaises.

Il n'est pas douteux que certains facteurs du milieu soient à l'origine de mortalités dans les élevages d'huîtres (DEXTER, 1944 ; MERRILL et POSGAY, 1964). Très souvent, cependant, on a pensé que les mortalités étaient dues à des maladies de l'huître et c'est dans ce sens que les recherches étiologiques se sont fréquemment révélées infructueuses.

Les études de NEEDLER et LOGIE (1947), entre autres, n'ont pas abouti à définir les causes de la maladie de Malpègue supposée à l'origine de pertes enregistrées chez *Crassostrea virginica* depuis 1915 au Canada (île du Prince-Edouard). De son côté, ORTON (1924) suspectant une bactérie d'être responsable des mortalités d'*Ostrea edulis* en Angleterre n'a pu toutefois en prouver le rôle pathogène. Un problème similaire se pose pour ROUGHLEY (1926) qui envisagea une maladie d'origine bactérienne pour expliquer des mortalités survenues en Australie dans les populations de *Crassostrea commercialis*.

En France, la maladie des branchies qui sévit de 1966 à 1969 chez *Crassostrea angulata* a été attribuée à un protiste de position incertaine signalé sous le nom de *Thanatostrea polymorpha* (FRANC et ARVY, 1969). Là encore, le rôle pathogène du parasite incriminé n'a pu être démontré. Par ailleurs, aucune indication précise, relative à l'étiologie de la mortalité massive survenant deux ans après la maladie des branchies, n'a pu être avancée (COMPS, 1972).

A l'inverse, des parasites identifiés chez les huîtres ont été associés à des mortalités survenant chez celles-ci. C'est le cas de *Minchinia costalis*, Haplosporidie considérée comme pathogène pour *Crassostrea virginica*, bien que la démonstration expérimentale de ce caractère n'ait pas été réalisée. On pourrait citer également ici une Haplosporidie décrite récemment par WOLF (1972) chez *Crassostrea commercialis*.

A un parasite de nature fongique, *Labyrinthomyxa marina* (anciennement *Dermocystidium marinum*) ont été attribuées les mortalités massives observées chez l'huître américaine dans le golfe du Mexique (MACKIN, 1963).

Enfin, certains auteurs ont signalé chez les huîtres des parasites qui paraissent n'avoir aucune incidence grave sur les mollusques parasités. PRYTHORCH (1938) a ainsi décrit chez *C. virginica* une grégarine, *Nematopsis ostrearum* à laquelle il attribuait des mortalités massives de ces huîtres, mais en fait, les études ultérieures de LANDAU et GALTISOFT (1951) puis de SPRAGUE et ORR (1955) ont infirmé cette assertion.

Au cours d'essais d'implantation en Californie de l'huître plate d'Europe *Ostrea edulis*, KATKANSKY et Coll. (1969) constatèrent un manque de croissance et des mortalités dans les lots expérimentaux. Ils décrivirent à cette occasion des « micro-cellules » dans certains leucocytes infiltrés au niveau des diverticules digestifs.

Actuellement sévit encore sur la côte atlantique française une mortalité anormale frappant les élevages d'huîtres plates *O. edulis*. Depuis les débuts de cette épizootie, nous nous sommes attachés à en étudier l'évolution, la répartition géographique, l'agent pathogène et son développement, et à rechercher des méthodes prophylactiques éventuelles.

En 1969, l'examen d'huîtres plates de la région de Marennes conduisait, à partir de symptômes pouvant rappeler les lésions de la maladie des branchies de *C. angulata*, à mettre en évidence des figures d'un nouveau parasite (COMPS, 1970 a). Ce parasite a été retrouvé en Bretagne chez des

huîtres plates dans les abers Wrach et Benoît où se produisaient depuis 1968 des cas de mortalité anormale (HERRBACH, 1971). En 1970, le parasite était détecté chez des huîtres plates d'Arcachon.

L'étude histologique permit de décrire un ensemble de formes du parasite qui se révéla être essentiellement hébergé au niveau de l'épithélium stomacal et des diverticules digestifs. COMPS (1970 b) schématisa les principales formes dont il indiqua l'évolution. Toutefois ces premières observations ainsi que les précisions fournies par HERRBACH (1971) s'avèrent insuffisantes pour définir la nature du parasite et spécifier son appartenance à un groupe donné.

L'étude du parasite a été entreprise en microscopie électronique par BONAMI et Coll. en 1971. Ces derniers ont donné une description détaillée des formes considérées comme les plus évoluées du parasite chez l'huître et ont notamment indiqué la présence de particules dont la nature n'a pu être déterminée par les seuls examens histologiques. Par la suite, GRIZEL et Coll. (1974) se sont attachés à examiner, sur coupes ultrafines, d'autres formes de l'organisme et ont montré leur processus évolutif.

Dans la présente note, l'étude en microscopie photonique et en microscopie électronique des différents stades du parasite chez l'huître nous a permis de décrire un cycle d'évolution, d'en étudier la position systématique et d'approfondir sa pathogénèse.

Matériel et méthodes.

Les huîtres plates provenaient essentiellement du Bassin d'Arcachon où, malgré les pertes causées par la maladie, étaient maintenus quelques élevages. Ces huîtres étaient soit natives d'Arcachon, soit natives de Bretagne. Quelques examens ont cependant été effectués sur des huîtres, et notamment du naissain, élevés en Bretagne.

Des huîtres plates de gisements naturels de Méditerranée (région de Sète), encore non touchées par la maladie, constituaient les lots témoins d'huîtres saines.

Pour les examens histologiques, les huîtres étaient fixées selon les cas par les liquides de Bouin, Davidson ou encore de Zenker et exceptionnellement de Carnoy. Les coupes étaient colorées par les méthodes générales habituelles qui s'étaient antérieurement révélées aptes à colorer au mieux le parasite. L'hémalun-vert sulfo s'est montré suffisant pour les examens de contrôle du taux d'infestation. Pour colorer les formes simples du parasite, le Mann-Dominici, la thionine phéniquée ou le trichrome de Masson donnèrent de bons résultats alors que l'azan d'Heidenhain convint mieux pour les formes les plus évoluées. La réaction de Feulgen et la coloration de Vago-Amargier furent aussi pratiquées.

Le matériel destiné à l'étude en microscopie électronique a été fixé par le glutardialdéhyde et par l'acide osmique ; l'inclusion a été faite dans l'araldite.

Observations.

Dès les premiers travaux sur la maladie de l'huître plate, il est apparu que la microscopie photonique ne suffisait pas à préciser nombre de points relatifs à la morphologie et au développement du parasite. Le recours à la microscopie électronique permit de compléter les connaissances acquises en histologie classique et de faire apparaître des éléments structuraux nouveaux.

Dans une première note, BONAMI et Coll. (1971), en décrivant la structure fine des formes les plus évoluées du parasite, mirent l'accent sur des formations très opaques aux électrons, correspondant aux granules réfringents déjà visibles sur frottis, et sur des formations renfermant des particules ovoïdes montrant certaines analogies avec des particules virales ; leur nature n'avait pourtant pas pu être alors déterminée.

La poursuite de l'étude sur coupes ultrafines amena GRIZEL et Coll. (1974) à apporter des précisions sur les premières phases connues du développement du parasite. La présence d'une ou plusieurs petites cellules incluses dans le cytoplasme d'une première cellule fut ainsi démontrée.

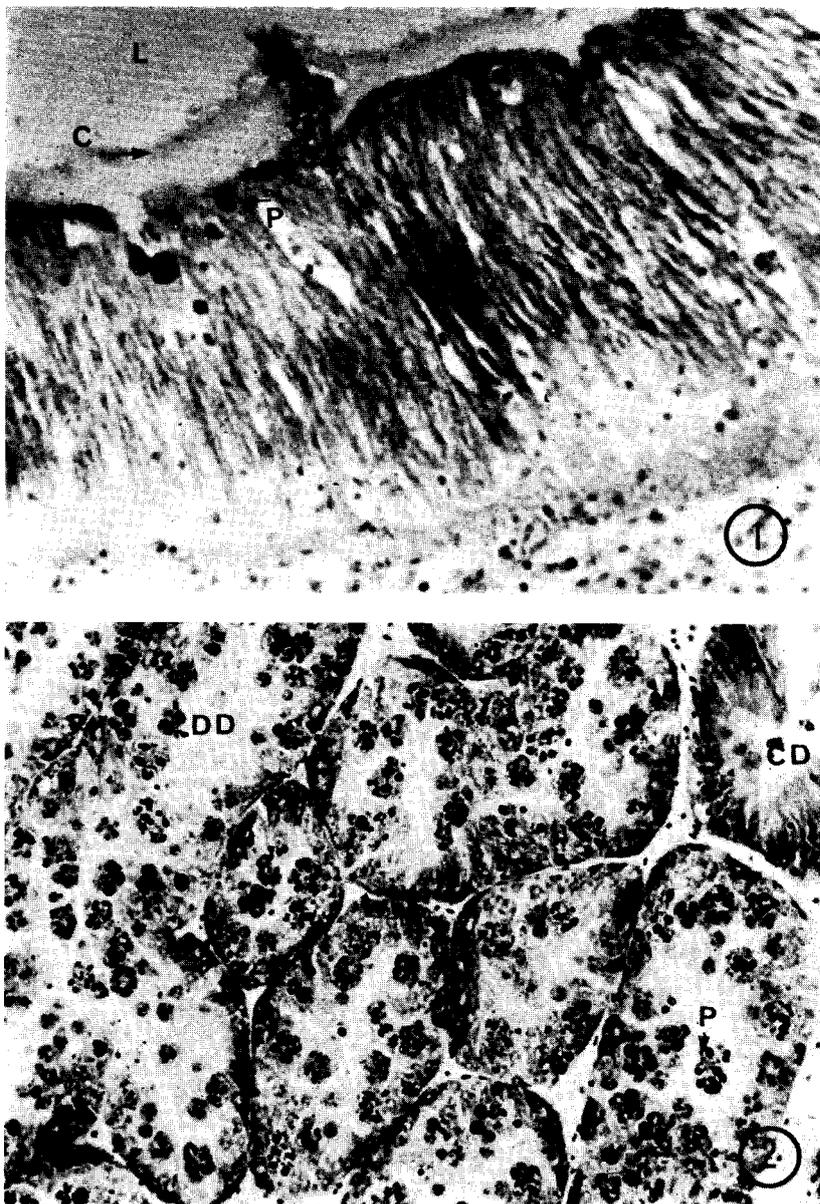


FIG. 1 et 2. — Jeunes stades du parasite en bordure de l'épithélium stomacal ; Mann-Dominici (G \times 400) (en haut). Stades évolués du parasite situé dans les diverticules digestifs ; Azan (G \times 250) (en bas). C — cils ; L — lumière de l'estomac ; CD — canal digestif ; DD — diverticule digestif ; P — parasite).

Cet ensemble représente la figure de base du parasite. On conviendra par la suite de nommer *cellule primaire* la cellule renfermant les petites cellules, celles-ci étant dites *cellules secondaires*.

1. - Observations en microscopie photonique.

Les différents stades de développement du parasite chez *Ostrea edulis* se situent principalement au niveau de l'appareil digestif : estomac (fig. 1), canaux et diverticules digestifs (fig. 2), intestin (fig. 11) et rectum. On peut y rattacher des formes morphologiquement très proches observées dans quelques cas sur les branchies.

a) Branchies.

Des cas de nécrose de branchies d'huître plate ont été signalés par COMPS (1970 a et b). Au sein des tissus nécrosés, ou en voie de nécrose, sont observées des formes de 6 à 10 μ , plus ou moins sphéroïdes ou ovoïdes, renfermant un ou plusieurs « éléments cellulaires » (4 μ de diamètre), parfaitement individualisés « uninucléés » ou « binucléés » et se colorant intensément par la thionine (fig. 3).

Les analogies existant entre ces formations et les figures encore peu évoluées, observées notamment dans l'estomac, permettent de les considérer comme pouvant appartenir au parasite.

b) Appareil digestif.

Dans les différentes parties du tractus digestif de l'huître, la structure de base du parasite est représentée par une *cellule primaire* contenant, incluses dans son cytoplasme, une ou plusieurs *cellules secondaires*. La taille de la cellule primaire varie entre 10 et 30 μ : elle est en particulier fonction du nombre de cellules secondaires et de l'état de ces dernières.

La cellule primaire possède un noyau généralement peu chromophile, doté d'un nucléole. Son cytoplasme, qui suivant les fixations peut paraître finement réticulé (Zenker), comporte des inclusions légèrement réfringentes en forme d'aiguilles. Leur caractérisation biochimique n'a pas été réalisée. On a montré toutefois qu'elles répondaient positivement à la réaction de VAGO-AMARGIER ce qui pourrait indiquer une nature protéinique.

La cellule secondaire dépasse rarement 4 à 5 μ de diamètre. De forme légèrement oblongue, elle possède un cytoplasme basophile. Du noyau, on ne distinguerait que le nucléole apparemment volumineux (fig. 4). Ces cellules incluses peuvent aussi se présenter sous la forme d'un ensemble très basophile sphérique, contenant deux noyaux (fig. 5).

Le mode de division de ces cellules reste encore imprécis. Cependant, au cours d'une expérience, où l'action de la salinité sur le parasite était testée, nous avons noté la présence de figures mitotiques en particulier chez les huîtres soumises à des salinités de 15 ‰. La position des cellules en mitose situées en bordure de l'épithélium stomacal et des diverticules digestifs, et la taille de ces cellules permettraient de suggérer un rapprochement avec le parasite. Ces remarques sont validées par les figures de prophase (fig. 6 a). Toutefois, des réserves doivent être émises car au cours de la métaphase (fig. 6 b), où le fuseau mitotique est bien visible, et de la fin d'anaphase (fig. 6 c) les contours cellulaires sont mal définis. De plus il est difficile de se prononcer sur l'appartenance du noyau en division (cellulaire primaire ou cellules incluses). Malgré cela, il n'est pas exclu que les divisions cellulaires se produisent.

Par la suite, la morphologie de base du parasite évolue dans le sens d'un accroissement du nombre de cellules secondaires, puis d'une « maturation » au cours de laquelle de profonds remaniements morphologiques et chimiques du parasite s'effectuent.

Dans l'estomac et les canaux digestifs, les cellules primaires sont généralement ovoïdes avec un noyau excentré. Le nombre de cellules secondaires incluses dans leur cytoplasme dépasse rarement 4 ou 5 (fig. 7 a).

Ces figures sont toujours observées au niveau de la bordure marginale de l'épithélium stomacal et de celui des canaux. Rien ne permet d'affirmer qu'elles sont intra-cellulaires. Au contraire les

FIGURES 3 à 10.

3. — *Jeune stade du parasite localisé dans l'épithélium branchial* (C1 — cellule primaire ; C2 — cellule secondaire). Thionine phéniquée ($G \times 2\,300$).

4. — *Jeunes stades, à deux cellules secondaires, en bordure de l'épithélium stomacal*. Mann-Dominici ($G \times 2\,200$).

5. — *Jeune stade à cellule secondaire binucléée* ; on notera le cytoplasme basophile. Mann-Dominici ($G \times 2\,500$).

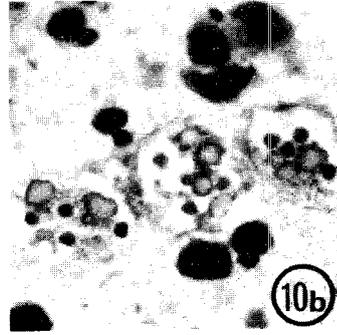
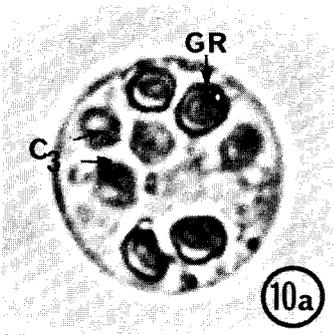
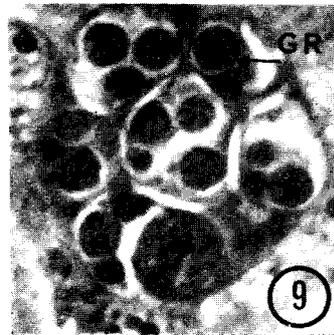
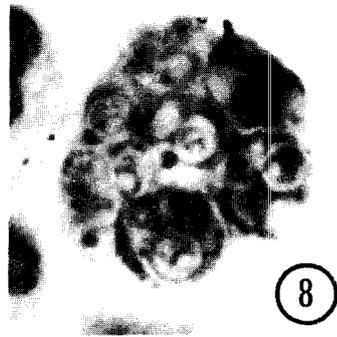
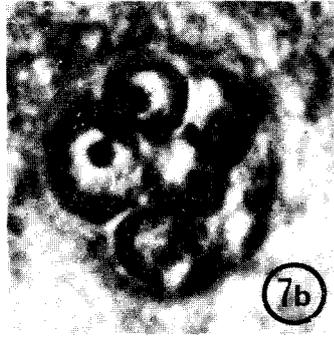
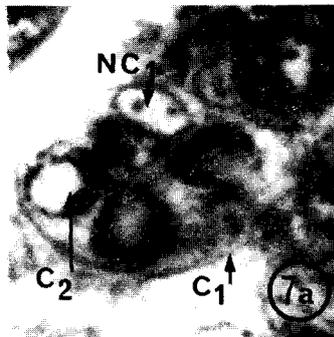
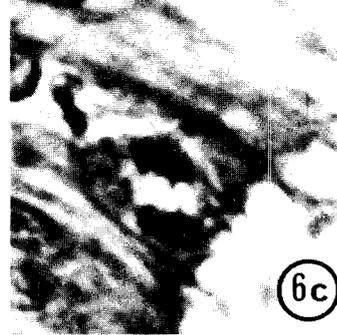
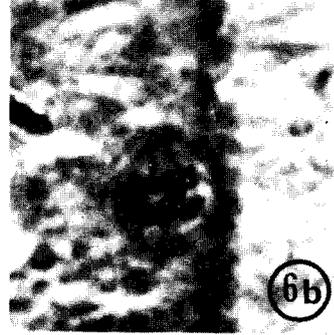
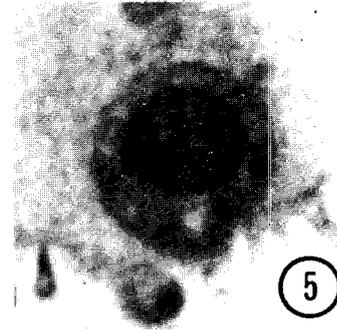
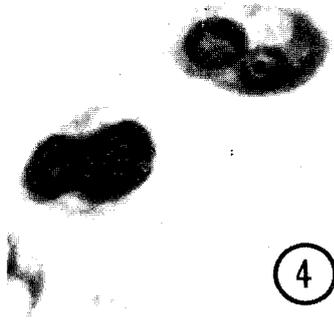
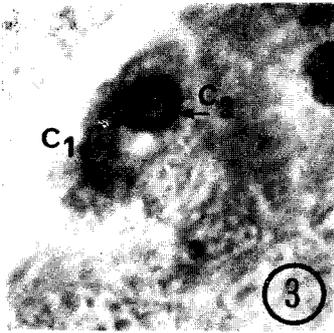
6. — *Phases de divisions cellulaires en bordure de l'épithélium de l'estomac et des diverticules digestifs* : a) noyau en prophase ; b) métaphase (on note la présence d'un fuseau achromatique) ; c) fin d'anaphase. Hémalum-vertsulfo ($G \times 2\,000$).

7. — *Stades à quatre cellules secondaires* (a) ; on note la présence du noyau (NC1) de la cellule primaire (C1) ($G \times 2\,500$) ; b) *stades à six cellules secondaires*. Hémalum-vertsulfo ($G \times 2\,700$).

8. — *Cellule primaire renfermant des « sporanges »*. Thionine picriquée ($G \times 2\,000$).

9. — *Stade avec « sporanges » évolués renfermant des granules réfringents (GR)*. Inclusion dans l'araldite, bleu de Sahli ($G \times 2\,000$).

10. — a) « *Sporange* » libéré contenant quatre cellules tertiaires (C3) et quatre granules réfringents (GR). In vivo ($G \times 3\,700$). b) « *Sporanges* » libérés. Frottis Giemsa ($G \times 1\,800$).



images obtenues sur de nombreuses coupes pourraient laisser penser que le parasite est simplement nidé dans la bordure épithéliale. A ce niveau, le parasite ne paraît pas provoquer de lésions ni entraîner de réactions leucocytaires, comme il est fréquent chez l'huître.

Dans les diverticules digestifs, on retrouve les figures décrites dans l'estomac, mais leur forme est sensiblement sphérique. Dans cette partie du tractus digestif les cellules secondaires se divisent et

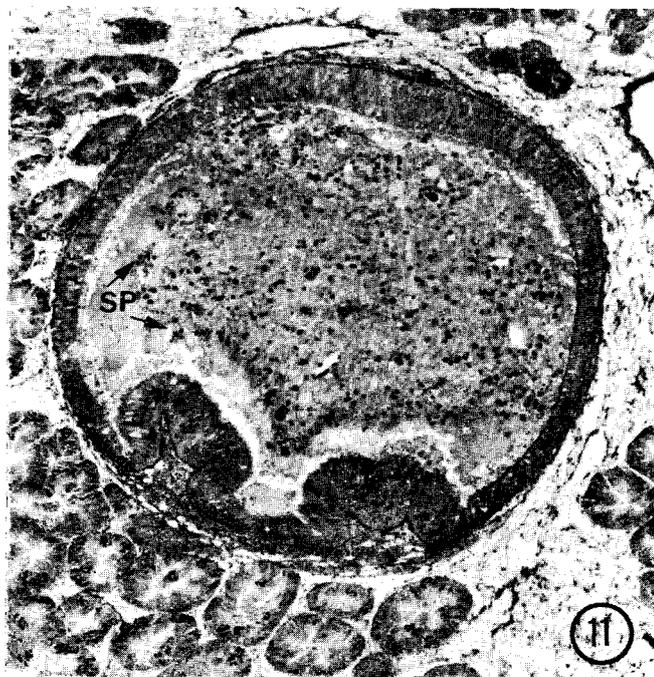


FIG. 11. — Nombreux « sporanges » libérés dans la lumière de l'intestin (SP). Azan (G \times 120).

donnent généralement huit cellules (fig. 7 b). La cellule primaire mesure alors moins de 20 μ de diamètre. A ce stade le noyau des cellules secondaires se divise à nouveau et donne naissance à une formation contenant quatre cellules. Pour des raisons de commodité, à ce stade d'évolution, nous utiliserons le terme de « sporange » par analogie avec ce type de formation chez les végétaux, sans en préjuger actuellement la valeur. Chaque cellule secondaire devient alors un « sporange », renfermant des cellules que nous nommerons *cellules tertiaires*. La cellule primaire contiendrait généralement huit « sporanges » (fig. 8).

A partir de ce stade se manifestent des modifications caractérisées par un accroissement de taille des cellules primaires dont le diamètre peut atteindre 30 μ sur le frais et par l'apparition d'inclusions dans les « sporanges » (fig. 9). Ces inclusions de forme variable, mais assez généralement ovoïdes, mesurent de 3 à 4 μ et leur coloration positive au Vago-Amargier indiquerait une nature protéinique (BONAMI et Coll., 1971). Sur frottis frais, ces inclusions sont très réfringentes et permettent une reconnaissance aisée des formes évoluées du parasite (HERRBACH, 1971). Les affinités tinctoriales du cytoplasme des cellules secondaires paraissent alors s'être modifiées dans le sens d'une atténuation du caractère basophile.

Cette dernière phase, au cours de laquelle les formes évoluées du parasite sont libérées dans la lumière des diverticules digestifs, précéderait la phase de dissémination. On trouve en effet, aussi bien au niveau des diverticules qu'au niveau de l'intestin et du rectum (observation sur le frais), les

groupes de cellules secondaires avec granules réfringents libérés après rupture de la membrane cytoplasmique de la cellule primaire. Dans quelques cas, on a pu observer sur coupes les groupes de cellules emplissant la lumière intestinale (fig. 11). Ce fait conduirait à penser que l'élimination du parasite surviendrait à un moment assez précis lorsque certaines conditions écologiques sont réunies : elle se ferait alors d'une façon massive vu l'importance du nombre des figures rencontrées sur une série de coupes.

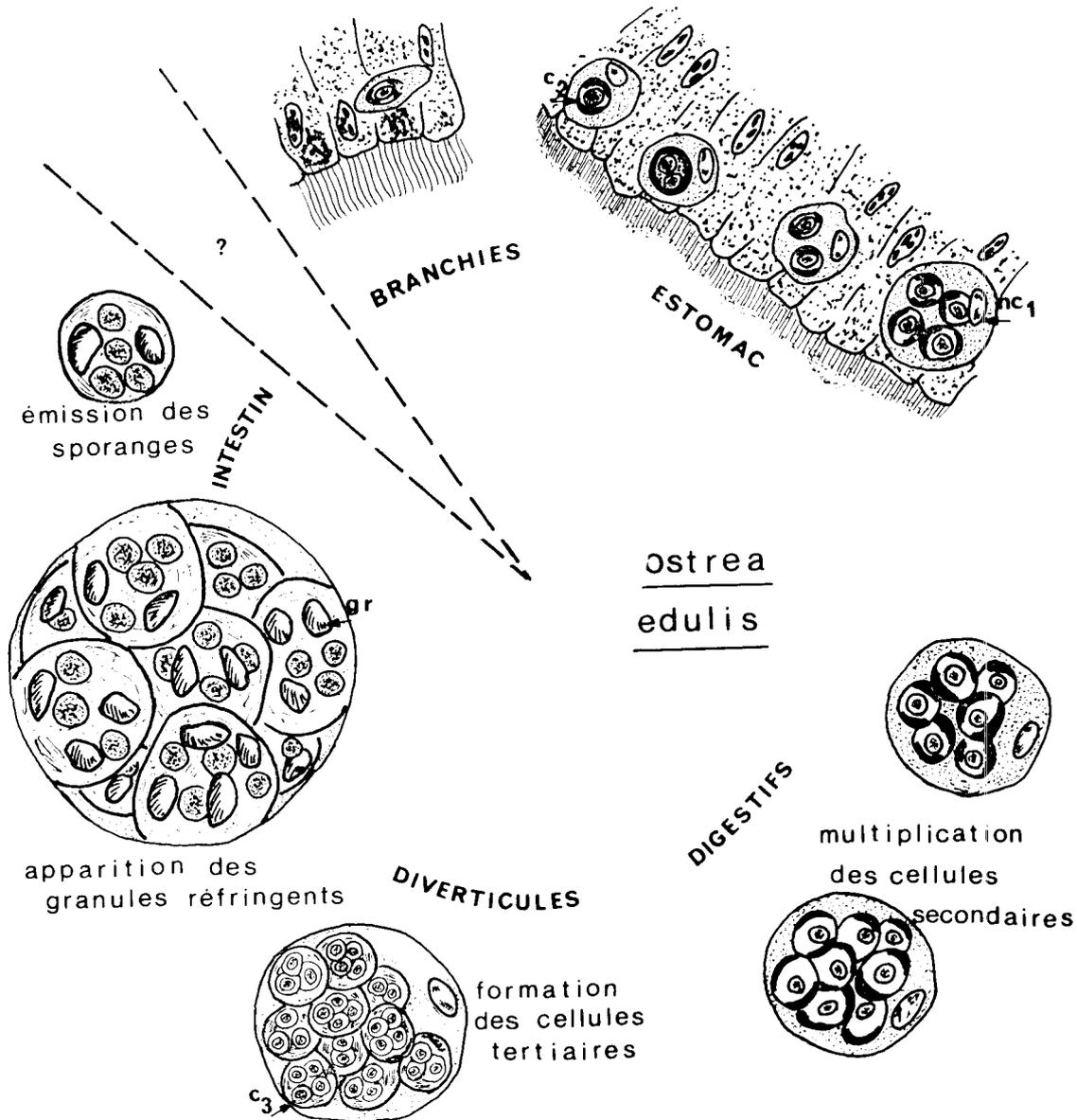


FIG. 12. — Cycle de développement de *Martelia refringens* chez *Ostrea edulis*.

On ne peut toutefois pas exclure une dissémination du parasite survenant après la mort des huîtres au cours de la dégradation naturelle de leurs tissus.

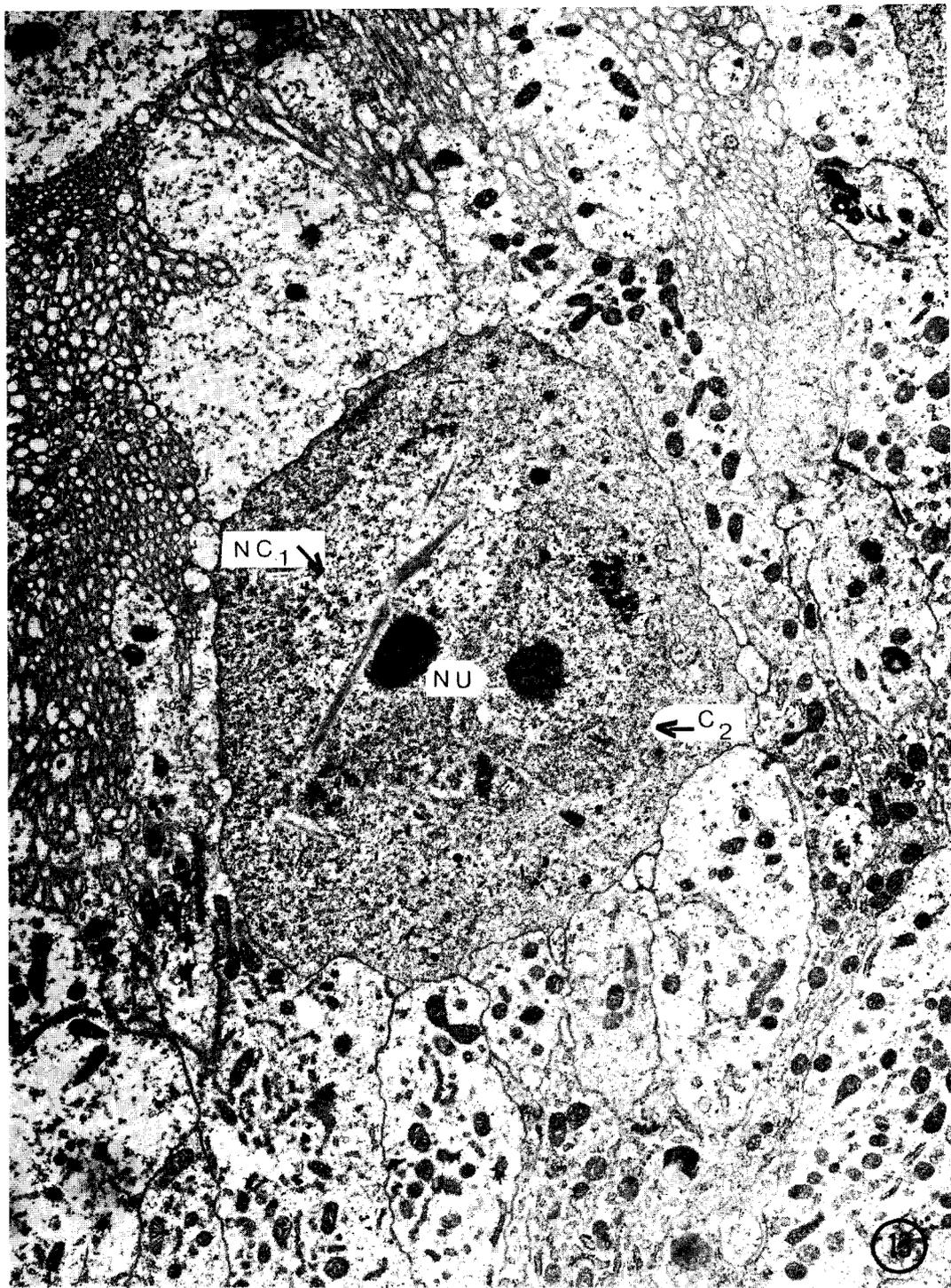


FIG. 13. — *Cellule primaire contenant une cellule secondaire* (C2 : cellule secondaire ; NC1 : noyau de la cellule primaire ; nu : nucléole). Microscopie électronique ($G \times 12\,000$).

Les groupes libres comprennent quatre petites cellules accompagnées de deux à quatre inclusions réfringentes. Les comptages sur le frais et sur frottis indiquent d'une façon plus générale un assemblage de quatre cellules pour deux inclusions réfringentes (fig. 10 a et b). Par ailleurs, il semblerait que ces groupes pourraient à nouveau se scinder pour donner deux groupes de cellules avec une inclusion. Ce point demanderait à être vérifié.

Sur la figure 12 est schématisée, suivant leur localisation, l'évolution des différentes formes connues du parasite de l'huître plate.

II. - Observations en microscopie électronique.

a) La cellule primaire.

La cellule primaire possède un noyau d'apparence normale, pourvu d'un nucléole assez volumineux (fig. 13). Ce noyau persiste au cours de l'évolution du parasite jusqu'à la destruction de la cellule primaire.

Le cytoplasme contient des ribosomes nombreux lui conférant un aspect général plus dense que celui des cellules normales de l'huître. Il contient aussi un réticulum endoplasmique formé de membranes et de vésicules. Par ailleurs il est caractérisé par la présence d'inclusions de structure paracrystalline qui apparaissent sous formes de stries alternativement claires et denses aux électrons, avec une période de 250 Å (fig. 14). Elles rappellent les inclusions striées décrites chez les spores de *Thraustochytrium sp.* par KAZAMA en 1972.

Au voisinage des inclusions se rencontrent des formations vacuolaires (de 1 µ à 3 µ) limitées par une membrane unitaire (fig. 15) et contenant des structures membranaires circulaires, ou vésicules, et linéaires. Dans le cytoplasme se rencontrent encore des particules très denses aux électrons de 100 à 230 nm, limitées par deux membranes unitaires accolées (fig. 16).

La membrane de la cellule primaire est constituée d'une unité membranaire continue qui ne paraît pas subir de modifications au cours du cycle du parasite. Elle est en contact étroit avec les membranes cellulaires de l'hôte par l'intermédiaire de microvillosités.

b) Les cellules secondaires.

Les cellules secondaires possèdent un cytoplasme de structure très proche de celui des cellules primaires. Il en est séparé par deux unités de membranes, présentant des interruptions en certains endroits. Le noyau n'offre aucune particularité ; son diamètre voisin de 2 µ est toujours plus petit que celui de la cellule primaire (fig. 17).

c) Les cellules tertiaires.

Comme nous l'avons vu antérieurement, les cellules tertiaires résultent des dernières divisions des cellules secondaires. Le cytoplasme de ces cellules est identique à celui des cellules secondaires et ne comporte, lors de son individualisation, aucune inclusion particulière (fig. 18).

L'apparition de particules d'allure virale (fig. 19) en son sein entraîne des modifications sensibles chez les « sporanges » et les cellules tertiaires.

d) Modifications cellulaires.

Les modifications se manifestent par : la formation d'une « paroi » doublant la membrane du « sporange » et celle des cellules tertiaires, la synthèse de corps denses amorphes dans le cytoplasme des « sporanges » et des transformations profondes des noyaux des cellules tertiaires.

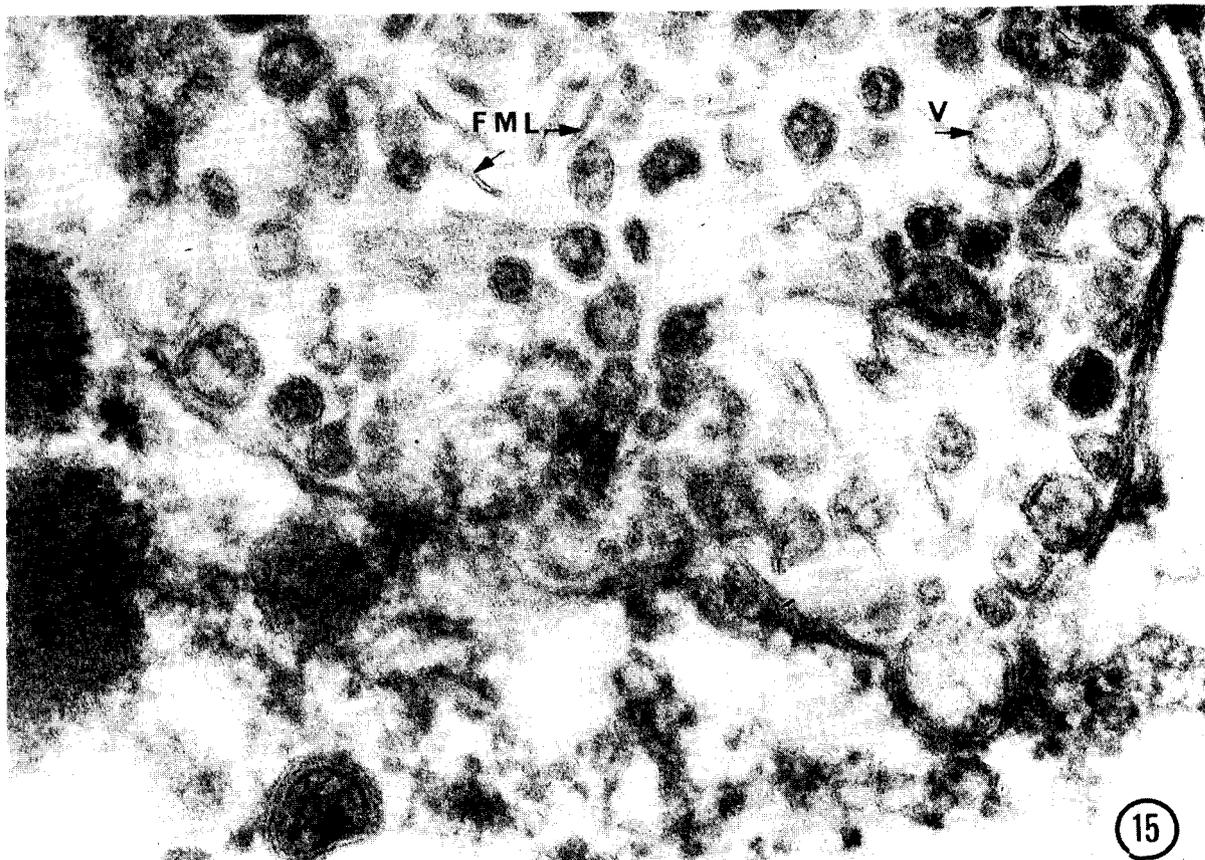
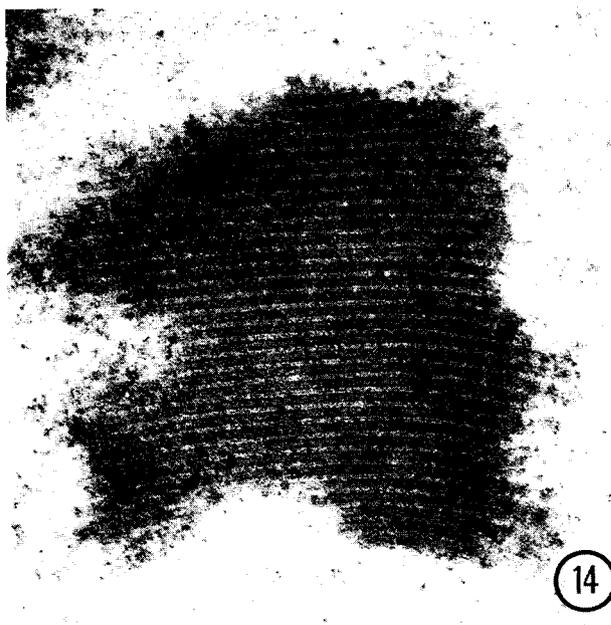


FIG. 14 à 16. — Détails des inclusions paracrystallines. Microscopie électronique ($G \times 80\,000$) : en haut, à gauche. Vue détaillée des formations vacuolaires au voisinage d'une structure paracrystalline. On note les formations membranaires linéaires (FML) et les formations membranaires fermées ou vésiculées (V). Microscopie électronique ($G \times 150\,000$) : en bas. Particules denses aux électrons dans le cytoplasme de la cellule primaire. Microscopie électronique ($G \times 48\,000$) : en haut, à droite.

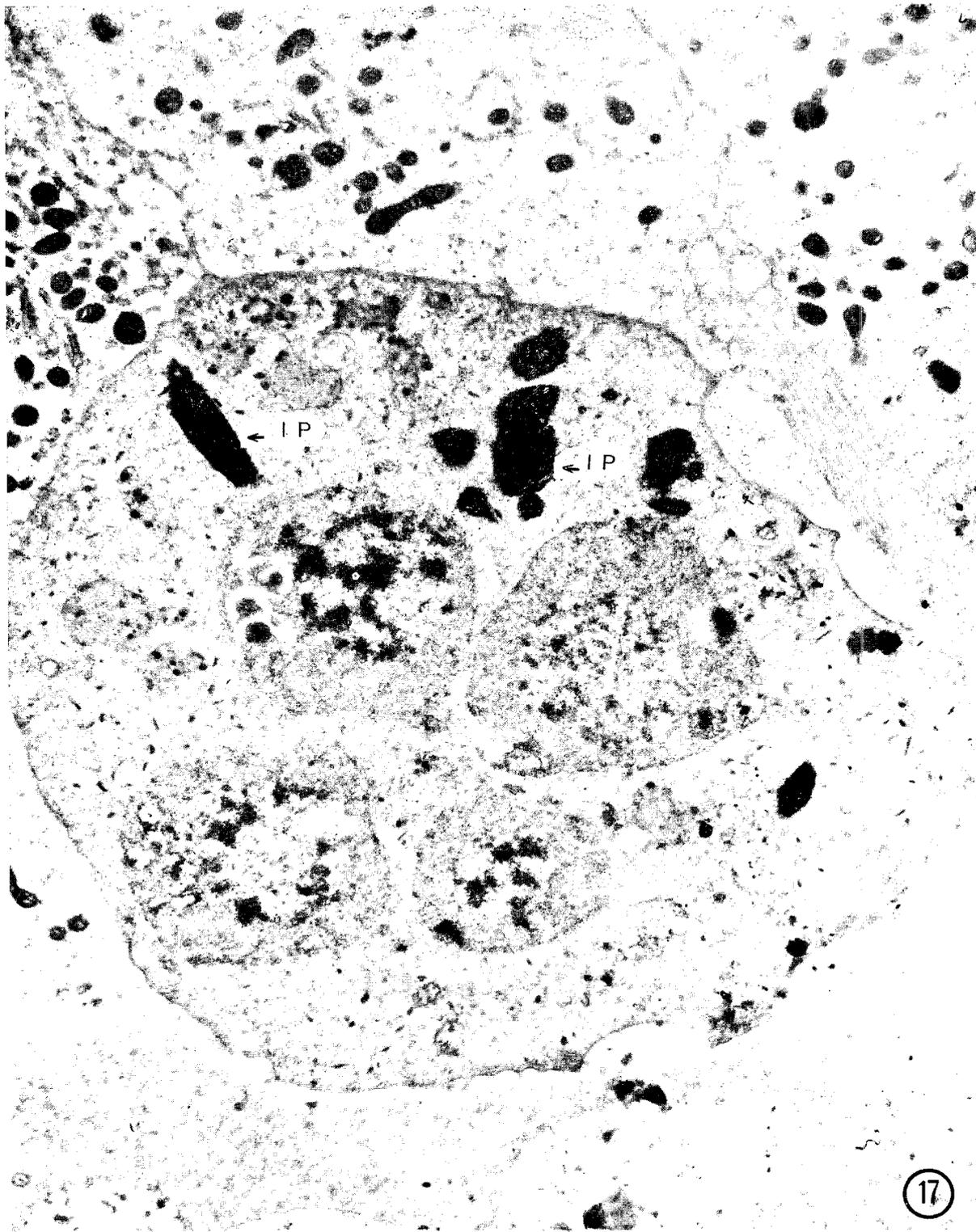


Fig. 17. Cellule primaire renfermant quatre cellules secondaires. Les inclusions paracrystallines (IP) sont ici bien visibles : le noyau de la cellule primaire n'apparaît pas sur cette coupe. Microscopie électronique $G \times 13000$.

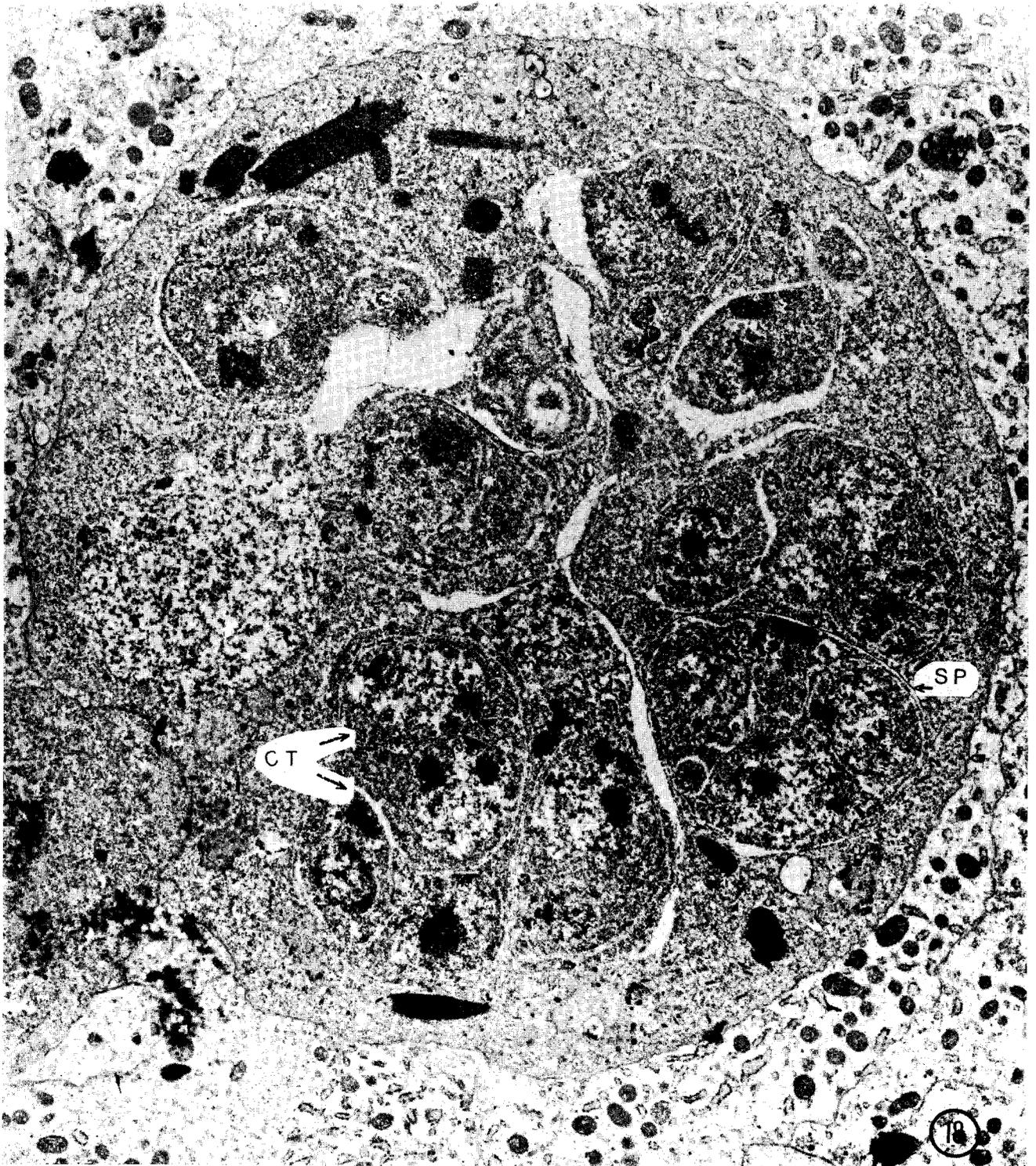


FIG. 18. — Vue générale du parasite après division des cellules secondaires donnant des « sporanges » (SP). Les cellules tertiaires (CT) possèdent à ce stade un noyau normal. Microscopie électronique ($G \times 9\,800$).

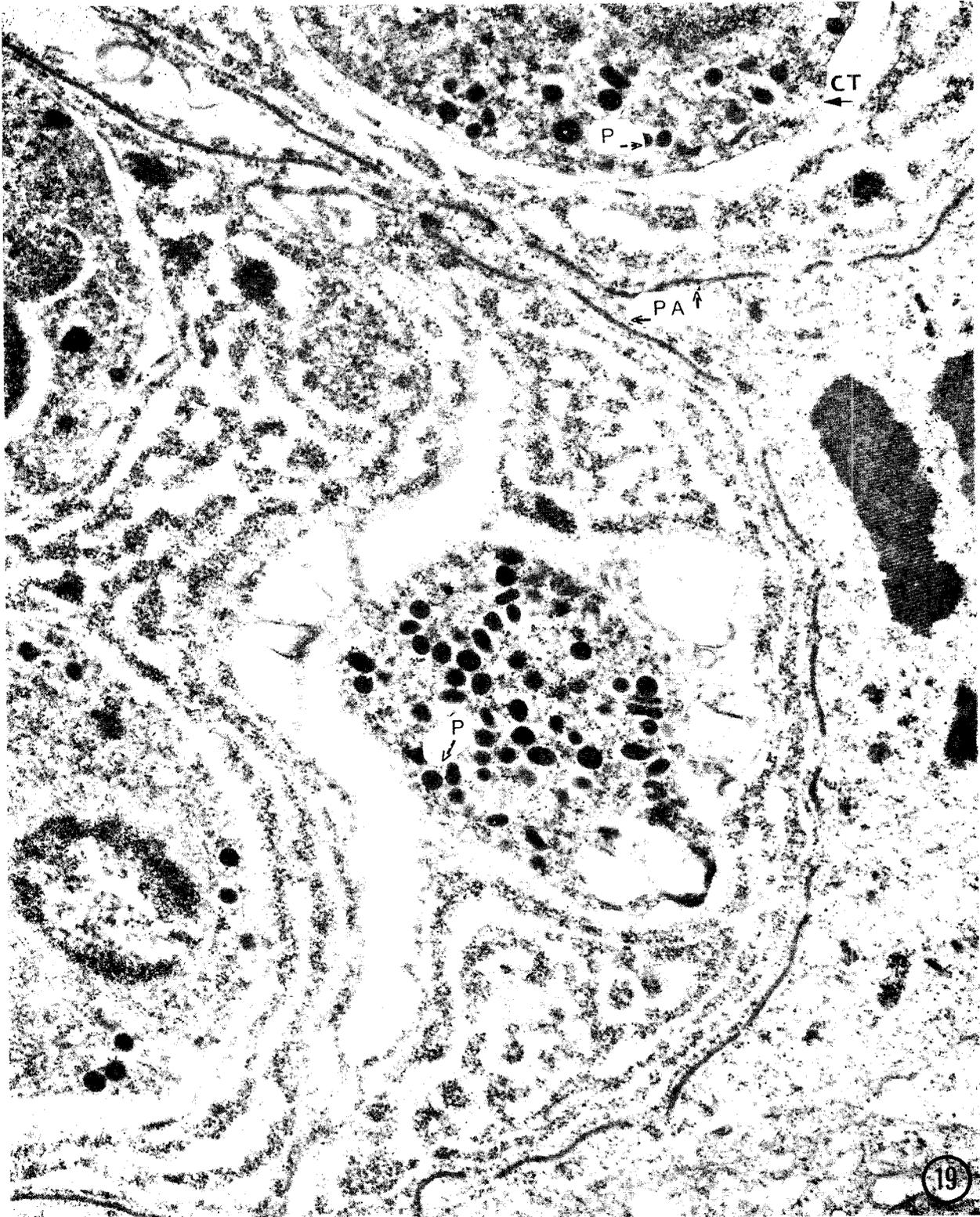


Fig. 19. — Phase de transformation des « sporanges ». On remarque la formation de la « paroi » (PA) en tronçons autour du « sporange » et l'apparition de particules denses (P) dans le cytoplasme des cellules tertiaires (CT) dont le noyau commence à perdre sa structure normale. Microscopie électronique ($G \times 13\,000$).

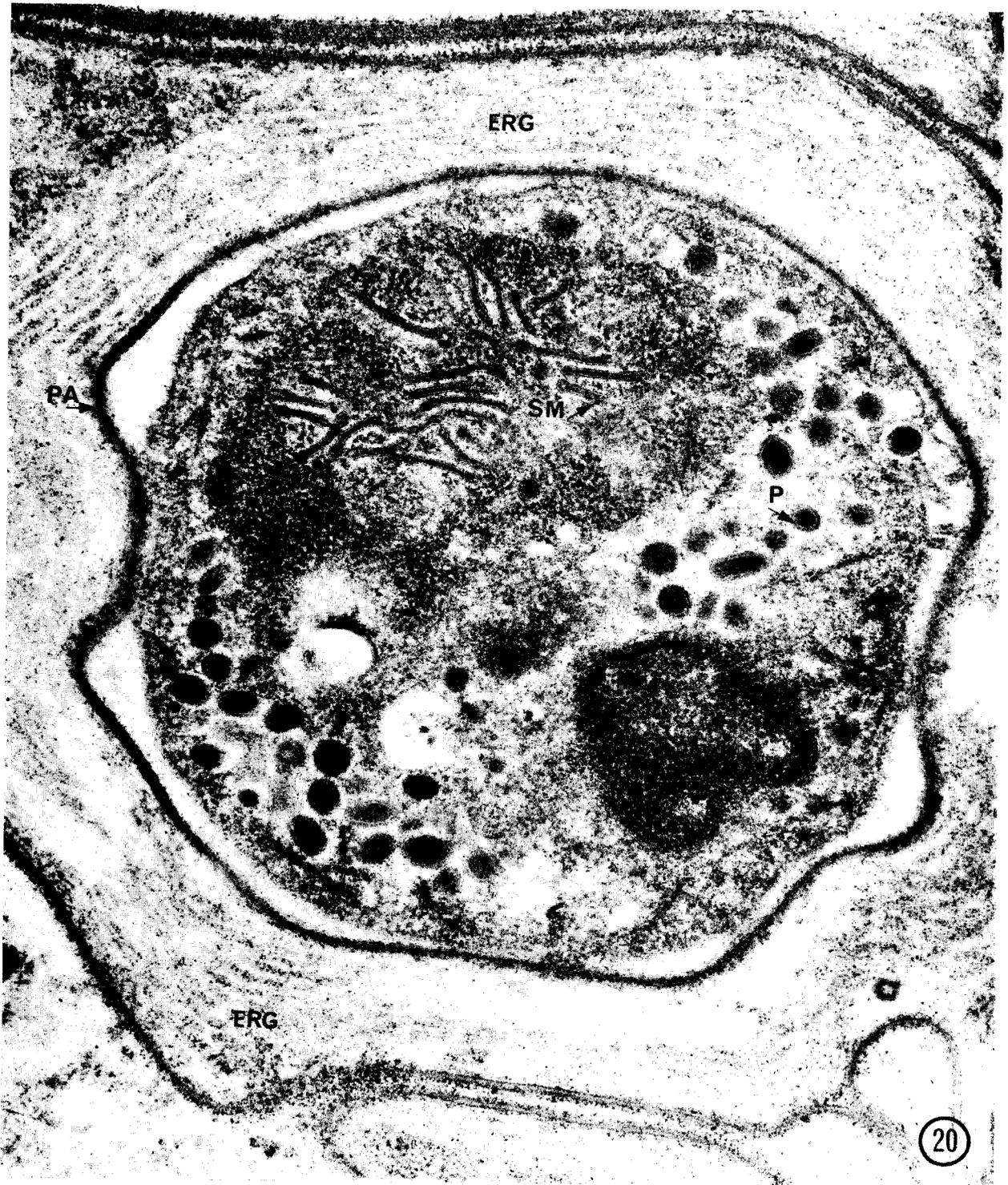


Fig. 20. — Cellule tertiaire profondément modifiée isolée au sein du sporange par une paroi épaisse (PA) ; à côté des particules d'allure virale (P) on distingue des zones à forte densité de ribosomes et des systèmes membranaires allongés et fermés (SM). Autour de la cellule tertiaire l'ergastoplasme présente un arrangement concentrique (ERG). Microscopie électronique (G \times 42 000).



21

FIG. 21. — *Vue générale du parasite à un stade avancé de son évolution.* Chaque « sporange » est délimité par une paroi épaisse et dans son cytoplasme on observe à côté des cellules tertiaires modifiées des masses protéiques amorphes (MA). On note les profonds replis de la « paroi » des « sporanges » (R). Microscopie électronique ($G \times 5800$).

La « paroi » est constituée de quatre unités membranaires, les deux centrales limitant une zone opaque aux électrons. Elle se forme tout d'abord par tronçons (fig. 18-19) puis ces derniers se rejoignent. Dans ce cas il semblerait que deux couches ergastoplasmiques puissent s'accoler en emprisonnant entre elles des ribosomes (fig. 20). Sous la « paroi » du « sporange » et autour de celle des cellules tertiaires l'ergastoplasme s'arrange en zones concentriques (fig. 20).

Les corps amorphes (fig. 21) totalement opaques aux électrons présentent des contours sensiblement ovoïdes. D'après certaines images obtenues en microscopie électronique il se situerait au sein d'une vésicule. Aucune structure n'a pu être décelée à l'intérieur.

La dégradation de l'appareil nucléaire semble débiter par un accroissement du volume de l'espace périnucléaire et parfois par la rupture de la membrane nucléaire. A l'emplacement du noyau se trouve une zone fibrillaire, rangée de façon plus ou moins concentrique, dense aux électrons et voisine d'une zone riche en ribosomes. On distingue une troisième zone contenant des structures lamellaires particulières entourées de ribosomes. Ces différentes zones sont séparées généralement par des structures membranaires. Les éléments lamellaires formés de deux membranes unitaires accolées sont des systèmes fermés, allongés et renflés à leur extrémité (fig. 20). Cette phase de transformation nucléaire peut être rapprochée de la dégénérescence de certains noyaux de *Didymium ni-*

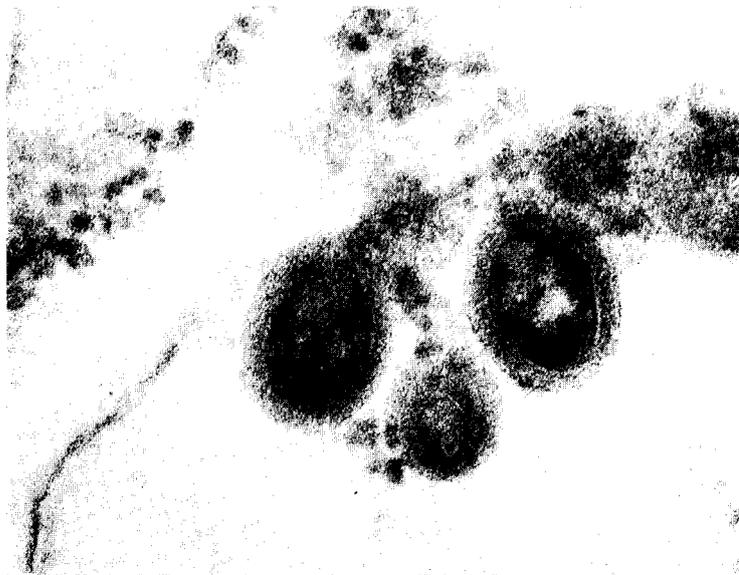


Fig. 22. — Vue détaillée des particules d'allure virale dans le cytoplasme des cellules tertiaires. Microscopie électronique ($G \times 160\,000$).

gripes lors de la sporulation ; dans ce cas le matériel nucléaire est enfermé dans une vacuole (SCHUSTER, 1969).

Au cours du développement du parasite la cellule primaire ne se modifie pas si ce n'est que son volume augmente.

e) Particules d'allure virale.

En fin de développement du parasite, des particules d'allure virale sont observées en microscopie électronique à l'intérieur des cellules tertiaires. Ces éléments se regroupent à la périphérie de la cellule ou à l'un de ses pôles (fig. 19-20). Le volume cellulaire restant est occupé par les différentes formations décrites dans le paragraphe précédent.

Ces particules sont incluses dans un cytoplasme homogène, pauvre en ribosomes et en structures membranaires.

L'observation des particules à partir de différentes coupes a permis de déterminer leur taille, leur morphologie et d'en examiner la structure. Ces particules, de 230 nm de long sur 140 nm de large montrent une forme ovoïde de section circulaire ou hexagonale.

La zone corticale, d'une épaisseur de 22-23 nm est composée de quatre feuilletts denses aux électrons (dont deux accolés), séparés par deux espaces clairs.

La partie médullaire montre à sa périphérie une zone opaque aux électrons qui parfois envahit la totalité de la zone centrale où aucune structure n'a pu être observée (fig. 22).

L'étude ultra-structurale comparée des particules présentes dans les cellules tertiaires et des particules observées dans le cytoplasme de la cellule primaire permettrait d'envisager l'hypothèse de leur formation au sein de la cellule primaire, suivie d'une « maturation » et d'une migration vers les cellules tertiaires qui maintiennent encore à ce stade des relations par des ponts cytoplasmiques avec la cellule primaire.

Au sein du cytoplasme de la cellule primaire en effet se rencontrent des formations vacuolaires limitées par une membrane unitaire et contenant des structures membranaires (vésicules) (voir paragraphe ci-dessus). Les vésicules limitées par une membrane unitaire se densifient progressivement puis s'accolent à la membrane vacuolaire. Elles forment alors des excroissances à la surface de la vacuole puis sont libérées dans le cytoplasme de la cellule primaire. Les éléments résultants sont entourés de deux membranes unitaires, la plus externe ayant pour origine la membrane vacuolaire.

Il semblerait alors qu'il puisse se produire une migration de ces particules jusqu'aux cellules tertiaires.

Pathogénèse.

La maladie de l'huître plate se manifeste par différents symptômes parmi lesquels GRIZEL et TIGE (1973) ont retenu :

l'arrêt de croissance.

la dépigmentation de la masse digestive.

l'amaigrissement considérable du mollusque lui conférant au stade préléthal un aspect glaireux.

Toutefois la présence du parasite dans la glande digestive reste le critère le plus symptomatique de la maladie.

Si généralement les signes cliniques indiqués ci-dessus sont notés conjointement à la présence du parasite, on peut aussi observer ce dernier chez des huîtres apparemment saines, en état d'engraissement ou encore présentant des gonades normalement développées. Ces variations dans le comportement des huîtres parasitées rendent complexe l'analyse de l'action du parasite et d'autant plus que, jusqu'à ce jour, on n'a pu réaliser avec succès l'infestation expérimentale d'huîtres saines.

Les relations entre l'huître et le parasite ne peuvent donc être dans ces conditions que partiellement définies.

A l'origine, les premiers faits observables relatifs à la maladie de l'huître plate concernaient des lésions branchiales (COMPS, 1970). Les tissus étaient plus ou moins nécrosés et le plus souvent au niveau de la gouttière marginale ; des perforations étaient également visibles à la base des branchies.

Les parties nécrosées ou en voie de nécrose étaient caractérisées par une importante infiltration leucocytaire et par la présence de formations contenant des éléments « uni ou bi-nucléés ». Mais il est difficile d'apprécier le rôle du parasite dans l'apparition des lésions.

En effet, si le parasite a pu être détecté au niveau des branchies, il ne le fut que dans des cas peu nombreux. LASSERE (1969) et HERRBACH (1971), bien qu'ayant constaté des lésions des branchies chez *Ostrea edulis*, n'ont pas mentionné la présence de formes du parasite, ce qui inciterait à écarter l'hypothèse que celui-ci serait à l'origine des lésions.

Au cours de nombreux examens réalisés sur des huîtres plates depuis 1969, nous n'avons jamais observé le parasite dans les branchies, excepté un cas (observation effectuée au laboratoire de La Tremblade en 1971).

La fréquence et l'abondance des formes du parasite dans les différentes parties de l'appareil digestif laissent supposer que c'est à ce niveau que se produirait son action pathogène.

L'épithélium stomacal qui héberge dans sa partie marginale des formes jeunes du parasite fixées dans sa ciliature ou imbriquées entre des cellules épithéliales au voisinage des cils n'apparaît pas subir de modifications. Le développement du parasite y est d'ailleurs très limité : l'estomac pourrait alors représenter un site transitoire pour le parasite. Ces remarques sont valables pour les canaux digestifs qui restent intacts en dépit de la présence de très nombreuses formes peu évoluées du parasite.

Les diverticules digestifs constituent le site privilégié du développement du parasite puisqu'on y rencontre toutes les formes reconnues jusqu'à présent. La localisation est très diverse, les formes simples étant le plus généralement imbriquées entre les cellules épithéliales et au fur et à mesure de l'accroissement en taille, cette disposition tend à se modifier, le parasite apparaissant disséminé dans la lumière des diverticules.

Même très fortement parasité la glande digestive ne voit pas sa structure profondément bouleversée. La présence du parasite n'entraîne pas de réactions inflammatoires habituelles avec infiltration leucocytaire comme l'avait déjà signalé HERRBACH (1971). En outre, on ne note pas au sein du conjonctif une prolifération sensible des « cellules brunes » souvent signalées chez des huîtres sujettes à diverses affections (LASSERE, 1969) et que STEIN et Coll. (1955) considèrent comme pouvant représenter un aspect du mécanisme de défense des huîtres.

Les observations précédentes permettent d'envisager le mode d'action du parasite en tant qu'agent causal de la mortalité.

L'absence d'altérations et de déformations des cellules digestives, de leucocytose et le développement lent du parasite, nous conduisent à penser qu'il évolue progressivement aux dépens de l'hôte sans entraîner de profondes modifications des cellules de l'huître. Ceci est corroboré par le manque de glycogène dans les cellules conjonctives de réserve et de sécrétions des cellules épithéliales des diverticules digestifs de l'hôte.

Le parasite pourrait se développer aux dépens des cellules épithéliales et en limiter l'activité métabolique en perturbant les fonctions digestives de l'huître ; ainsi pourraient être expliquées la présence de microvillosités existant entre la cellule primaire du parasite et les cellules épithéliales de l'huître et l'absence de mitochondries dans le cytoplasme du parasite.

L'encombrement des diverticules digestifs par de nombreuses formes du parasite, notamment au cours de la période estivale, laisserait supposer une action mécanique de ce dernier par obturation des canaux digestifs.

Enfin, on ne peut éliminer l'hypothèse d'une sécrétion par le parasite de substances toxiques pour l'huître.

Nos travaux actuels visent à l'approfondissement de ces divers points ainsi que du rôle des particules d'allure virale. Toutefois, on ne peut écarter une synergie de ces trois modes d'action : détournement du métabolisme de l'hôte, action mécanique par obturation des diverticules digestifs et sécrétion de substances toxiques.

Enfin, en rapport avec ces actions, il faudrait envisager également le phénomène de l'enchaînement dû à l'effet secondaire de parasites rencontrés fréquemment chez les huîtres sujettes à un affaiblissement, qu'il soit d'origine écologique, mécanique ou encore lié aux pratiques mêmes de l'élevage. En effet, HERRBACH (1971) avait noté que 25 % des huîtres parasitées hébergeaient de nombreux ciliés (*Ancistrocomideae*) et que le flagellé *Hexamita* sp. était fréquent chez les huîtres les plus affaiblies.

Conclusion.

Au cours de cette étude nous avons décrit les différents stades et l'évolution du parasite chez l'huître, aussi bien en microscopie photonique qu'en microscopie électronique, abordé l'aspect systématique et étudié sa pathogénèse.

Les formes signalées dans les branchies ont pu être assimilées, en microscopie photonique, aux formes jeunes décrites dans l'estomac. Dans ce dernier et dans les canaux digestifs, ces formes ne subissent qu'une évolution partielle. Par contre leur développement a pu être suivi dans les diverticules digestifs. A ce niveau les cellules secondaires se multiplient et donnent naissance à quatre cellules tertiaires enfermées dans la cellule secondaire résiduelle appelée « sporange ».

A ce stade de nombreuses particules d'allure virale sont incluses dans le cytoplasme des cellules tertiaires qui perdent alors leur structure nucléaire. Parallèlement, s'observe la formation de « parois » et de masses amorphes incluses.

La rupture de la cellule primaire entraîne la libération des « sporanges » dans la lumière de l'intestin et du rectum. Cette libération massive pourrait être déterminée par des conditions écologiques précises.

Certaines particularités ultrastructurales du parasite ont pu être retenues, en particulier l'absence constante de mitochondries et la présence précoce, dans les cellules primaires, d'inclusions à structure para-cristalline, fondamentalement différentes des inclusions amorphes situées dans les « sporanges » et qui d'ailleurs apparaissent plus tardivement.

En outre, le cytoplasme des cellules primaires renferme des systèmes vacuolaires complexes qui seraient responsables de la formation de particules denses aux électrons ; des particules d'allure virale, semblables à celles-ci, se rencontrent en fin d'évolution dans les cellules tertiaires.

Les caractéristiques de ce parasite nous ont conduit à envisager l'étude de sa position systématique. Les travaux précédents en microscopie photonique avaient permis d'avancer des hypothèses diverses sur sa nature, toutes ces hypothèses se rapportant à des Protistes. COMPS (1970) compara les figures simples du parasite à certains stades plasmodiaux des Haplosporidies ; HERRBACH (1971) envisagea la possibilité d'un rapprochement avec les Chytridiales. Par ailleurs, à l'instar de MACKIN (com. pers.) GRIZEL et TIGE (1973) rapprochaient ce parasite au genre *Labyrinthomyxa*.

Les travaux actuels en microscopie électronique ont montré, à tous les stades, un agencement structural peu commun, confirmant l'impossibilité présente d'un rattachement à un groupe connu.

Ainsi dans sa phase initiale de développement, le parasite aurait pu représenter, dans la mesure où il ne s'agit pas d'une cellule hôte parasitée, l'équivalent d'un « pansporoblaste ». Ce type de figure est caractéristique de la formation des spores chez certaines Cnidosporidies. Mais déjà à ce niveau, des différences importantes nous séparent des espèces de ce sous-embranchement. En effet, dans une telle hypothèse, la cellule primaire qui correspondrait à l'enveloppe « pansporoblastique » est uni-nucléée, son noyau ne subissant aucune division tout au cours de l'évolution du parasite.

Par ailleurs les travaux de WOLF (1972) sur un parasite de *C. commercialis* ont mené ce dernier à le comparer au parasite de l'huître plate. WOLF pensait être en présence d'une Haplosporidie nou-

velle et peu commune, mais la position systématique de cette dernière a été contestée par MIX et SPRAGUE (1974). Ces auteurs pensent tout de même qu'il existe des similitudes entre le parasite de *C. commercialis* et celui de l'huître plate. En effet, des coupes nous ont été confiées par WOLF et l'on a pu s'assurer directement que le parasite qu'il présentait à l'origine comme une Haplosporidie paraissait voisin du parasite de *O. edulis*.

Il est localisé au niveau de l'épithélium des diverticules digestifs mais le plus souvent accolé à la basale et repoussant les cellules épithéliales vers la lumière des diverticules.

Son développement paraît également s'opérer par une multiplication cellulaire et par la constitution de groupes de petites cellules assez comparables aux « sporanges » du parasite de l'huître plate.

On note enfin, à partir d'un certain stade, l'apparition comme chez l'huître plate de granules chromophiles réfringents à l'intérieur de chaque groupe de cellules. Ici les granules sont sensiblement sphériques, plus petits et d'un calibre régulier ; leur nombre est plus important et les stades du parasite apparemment les plus évolués en renfermeraient plusieurs dizaines.

Ces analogies qui inclinent à établir des affinités entre les deux parasites comme l'a déjà fait WOLF (1972) sont encore insuffisantes et seule une étude en microscopie électronique du parasite de *C. commercialis* permettrait de le vérifier.

Par ailleurs l'absence de mitochondries pouvait faire penser aux Microsporidies, mais ce caractère apparaît aujourd'hui comme peu sûr car MAURAND (1973) en signale dans le plasmode sporogonial de *Theloania moenadis*. De plus l'absence de plasmodé vrai, et de filament polaire nous éloigne de ce sous-embanchement.

Enfin, la multiplication endogène de ses cellules qui aboutirait à la formation de spores non mobiles nous conduirait à rapprocher le parasite de l'huître plate des champignons inférieurs sans que l'on puisse toutefois lui assigner une position systématique au sein de ce groupe.

L'aspect structural et le mode de développement permettent d'écarter l'appartenance au genre *Labyrinthomyxa*. Nous proposons donc de créer pour lui le nouveau genre *Marteilia* et l'espèce *M. refringens*.

L'action pathogène de *M. refringens* pourrait s'effectuer selon trois processus différents ou par leur action conjuguée ; d'une part interviendrait un détournement du métabolisme cellulaire de l'huître, ce qui est suggéré par la forte diminution du volume des sécrétions des cellules digestives et du glycogène du conjonctif de réserve.

Egalement une action mécanique par obturation des canaux digestifs par le parasite pourrait perturber le processus alimentaire de l'hôte.

Enfin l'idée d'une toxine sécrétée par le parasite ne doit pas être rejetée ; toutefois aucun signe d'une quelconque action toxique n'a pu être décelé aussi bien en microscopie photonique qu'en microscopie électronique.

Généralement le processus pathogène aboutit à la mort de l'hôte, mais le phénomène d'enchaînement dû à l'effet secondaire d'autres parasites n'est pas à négliger.

Un certain nombre de points restent encore à déterminer, en particulier le mode d'infestation, l'évolution des formes libres du parasite, ainsi que la nature des particules décrites. Pour cela, nous nous proposons de poursuivre ces travaux en pratiquant des infections expérimentales aussi bien sur des huîtres que sur des cultures cellulaires et organotypiques d'huîtres, d'isoler les particules d'allure virale afin d'en étudier leur composition et leur rôle éventuel.

Enfin, dans le cadre de l'étude prophylactique de cette maladie, des premiers essais faisant intervenir les variations des constantes physico-chimiques du milieu d'élevage, ont été déjà réalisées et seront poursuivies.

BIBLIOGRAPHIE

- BONAMI (J.R.), GRIZEL (H.), VAGO (C.) et DUTHOIT (J.L.), 1971. — Recherche sur une maladie épizootique de l'huître plate *Ostrea edulis* LINNE. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **35** (4), p. 415-418.
- COMPS (M.), 1970 a. — Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates dans le bassin de Marennes. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **34** (3), p. 317-326.
- 1970 b. — Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates (*Ostrea edulis* L.) dans le bassin de Marennes. — *Cons. Int. Explor. Mer*, C.M. n° K, p. 4 (ronéo).
- COMPS (M.E.), 1972. — Observations sur la résistance d'huîtres du genre *Crassostrea* au cours de la mortalité massive de 1970-1971 dans le bassin de Marennes-Oléron. — *Cons. Int. Explor. Mer*, Com. Crustacés, Coquillages et Benthos, C.M./K, p. 22.
- DEXTER (R.W.), 1944. — Annual fluctuation of abundance of some marine mollusks. — *Nautilus*, **58**, p. 18-24.
- DOLLEFUS (R.Ph.), 1972. — 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.
- FRANC (A.) et ARVY (L.), 1969. — Sur *Thanatostrea polymorpha* n.g., agent de destruction des branchies et des palpes de l'huître portugaise. — *C.R. Acad. Sci., Paris*, **268** (D), p. 3189-3190.
- 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), p. 2-19.
- GRASSE (P.P.), 1953. — Protozoaires : Rhizopodes, Actinopodes, Sporozoaires, Cnidosporidies. — *Traité de Zoologie*, MASSON, Paris, **1** (2), 1160 p.
- GRIZEL (H.) et TIGE (G.), 1973. — La maladie de la glande digestive d'*Ostrea edulis* LINNE. — *Cons. Int. Explor. Mer*, Com. Crustacés, Coquillages et Benthos, C.M./K, p. 13.
- GRIZEL (H.), COMPS (M.), BONAMI (R.), COUSSERAND (F.) et VAGO (C.), 1974. — Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. — *C.R. Acad. Sci., Paris, sér. D*, **279**, p. 783.
- HERRBACH (B.), 1971. — Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* LINNE. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **35** (1), p. 79-87.
- JOHNSON (T.W.) et SPARROW (F.K.), 1961. — Fungi in Oceans and Estuaries. — Weinheim published by J. CRAMER, 668 p.
- KAN-NO (H.), SASAKI (M.), SAKURAI (Y.), WATANABE (T.) et SUZUKI (K.), 1965. — Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay. I. — General aspects of the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay and its environmental conditions. — *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.*, **25**, p. 1-26.
- 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), p. 69-74.
- KAZAMA (F.Y.), 1972. — Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. Zoospores. II. — Striated inclusions. — *J. Ultrastruct. Res.*, **41**, p. 60-66.
- LANDAU (H.) et GALTISOFF (P.S.), 1951. — Distribution of *Nematopsis* infection on the oyster grounds of the Chesapeake Bay and in other waters of the Atlantic and Gulf States. — *Tex. J. Sci.*, **3**, p. 115-130.
- LASSERRE (C.), 1969. — Premiers résultats d'une étude histologique sur la maladie des branchies. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **33** (2), p. 165-166.
- MACKIN (J.G.), 1951. — Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* (GMELIN) by *Dermocystidium marinum* MACKIN, OWER and COLLIER. — *Bull. mar. Sci. Gulf Caribb.*, **1**, p. 72-87.
- 1963. — Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. — *Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Tex.*, **7**, p. 132-229.
- MAURAND (J.), 1973. — Recherches biologiques sur les Microsporidies des larves de Simulies. — Thèse, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 199 p.
- MERRILL (A.S.) et POSGAY (J.A.), 1964. — Estimating the natural mortality rate of the sea scallop (*Placopecten magellanicus*). — *Inst. Comm. Northwest Atl. Fish. Res. Bull.*, **1**, p. 88-106.
- MIX (M.C.) et SPRAGUE (V.), 1974. — Occurrence of a Haplosporidian in Native Oysters (*Ostrea lurida*) from Yaquina Bay and Alsea Bay, Oregon. — *J. Invert. Pathol.*, **23**, p. 252-254.
- NEEDLER (A.W.H.), 1941. — Development of oyster stocks resistant to an epidemic disease. — *Prog. Rep. Atlant. Cot. Stns.*, **29**, p. 15-17.
- NEEDLER (A.W.H.) et LOGIE (R.R.), 1947. — Serious mortalities in Prince Edward Island oysters caused by a contagious disease. — *Trans. R. Soc. Can.*, **41**, p. 73-89.
- ORTON (J.H.), 1924 a. — An account of investigations into the cause of the unusual mortality among oysters in English oyster beds during 1920 and 1921, part I. — *Min. Agric. Fish., Fish. Invest. London, Ser. 2*, **6** (3), p. 1-199.
- PRYTHIERCH (H.F.), 1938. — Life cycle of a sporozoan parasite of the oyster. — *Science*, **2** (88), p. 451-452.
- ROUGHLEY (T.C.), 1926. — An investigation of the cause of an oyster mortality on the Georges River, New South Wales, 1924-5. — *Linnean Soc., New South Wales, Proc.*, **51**, p. 445-491.

- SCHUSTER (F.L.), 1969. — Nuclear degeneration during spore formation in the true flume mold, *Didymium nigripes*. — *J. Ultrastruct. Res.*, **29**, p. 171-181.
- SINDERMAN (C.J.) et ROSENFELD (A.), 1967. — Principal diseases of commercially important marine bivalve Mollusca and Crustacea. — *Fish. Bull.*, **66** (2), p. 335-380.
- SPARROW (F.K.), 1960. — Aquatic Phycomycetes. — The University of Michigan Press, 1187 p.
- SPRAGUE (V.) et ORR (P.E.), 1955. — *Nematopsis ostrearum* and *N. prytherchi* (Eugregarinina : Porosporidae) with special reference to the host-parasite relations. — *J. Parasit.*, **41**, p. 89-104.
- STEIN (J.E.), DENISON (J.G.) 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*. — *Tex. J. Sci.*, **7**, p. 422-429.
- WOLF (P.H.), 1972. — Occurrence of a Haplosporidan in Sydney Rock Oysters (*Crassostrea commercialis*) from Moreton Bay, Queensland, Australia. — *J. Invert. Pathol.*, **19**, p. 416-417.

Laboratoire de Pathologie
Institut des Pêches Maritimes
34200 SETE

Laboratoire de Pathologie comparée
I.P.H.E.
Université des Sciences et Techniques
du Languedoc
34000 MONTPELLIER