

Cette communication ne peut être citée sans l'autorisation des auteurs.

Conseil International pour
l'Exploitation de la Mer

C.M. 1982/F : 28
Comité de la Mariculture

Bonamia ostreae (Pichot et coll., 1979) parasite
de l'huître plate : comparaison de deux
méthodes de diagnostic

par

Evelyne BACHERE*, Jean-Louis DURAND** et Gilbert TIGE*

Résumé

Le diagnostic du parasite Bonamia ostreae a été effectué sur plusieurs lots d'huîtres plates de Bretagne Sud, à partir d'empreintes de filaments branchiaux colorées au May-Grunwald-Giemsa et de coupes histologiques des glandes digestives correspondantes.

La comparaison des résultats obtenus par ces deux techniques montre des différences, quantitatives portant sur le taux d'huîtres parasitées et qualitatives, relatives à la mise en évidence précoce du parasite lors de débuts d'infestation. La technique d'empreintes à partir du tissu branchial nous est apparue plus performante pour le seul dépistage de Bonamia ostreae.

Abstract

The parasite, Bonamia ostreae, was diagnosed in several South Brittany flat oyster's samples, from gills tissue's prints, stained in May-Grunwald-Giemsa and from corresponding digestive glands sections.

The comparaison of results shows quantitative differences relating to the infested oyster's rate, and qualitative differences relating to the early stages of infestation. Gill's print technic seems more interesting for the only Bonamia ostreae diagnosis.

* I.S.T.P.M. - 56470 LA TRINITE SUR MER - FRANCE -

** I.S.T.P.M. - Rue de l'Île d'Yeu - 44037 NANTES CEDEX - FRANCE -

1. Introduction

Le parasite de l'huître plate, Bonamia ostreae (Fichot et coll., 1979 ; Comps et coll., 1980), décelé en 1979 à l'île Tudy, sévit actuellement dans tous les centres ostréicoles bretons.

Cette épizootie se traduit par une mortalité importante, les animaux présentant parfois des lésions branchiales. D'une taille de 2 à 5 microns, les formes unicellulaires de Bonamia ostreae se développent essentiellement dans les hémocytes ; ceci nous a conduit à utiliser la méthode hématologique classique des frottis ou empreintes colorées. Un suivi épidémiologique mensuel étant assuré à partir de coupes histologiques de glandes digestives, nous avons comparé les deux méthodes de diagnostic, en tenant compte de l'aspect macroscopique des huîtres, signe pathologique externe.

2. Matériel et méthodes

Divers lots d'huîtres plates, Ostrea edulis, de 2, 3 et 4 ans ont été prélevés dans les secteurs ostréicoles de la Baie de Quiberon et l'île Tudy.

Des observations macroscopiques sont préalablement effectuées pour noter la présence ou l'absence de lésions branchiales. Celles-ci se traduisent par des indentations ou des perforations des feuillets branchiaux. Elles sont classées, d'après les propositions de Tigé et coll. (1980), selon leur importance en stade 1, 2 et 3 ou multiples lorsqu'elles sont nombreuses.

Les empreintes branchiales sont réalisées par apposition sur lame d'un fragment de feuillets branchiaux, de taille constante (0,25 cm² environ). Les préparations séchées sont colorées selon la méthode du May-Grunwald-Giemsa.

Les glandes digestives des huîtres correspondantes sont prélevées et fixées dans du liquide aqueux de Bouin, une à une ou en vrac, selon les lots. Après déshydratation, imprégnation et inclusion dans la paraffine, elles sont débitées au microtome en coupes fines de 7 microns d'épaisseur. Les coupes sont colorées par la triple coloration de PRENANT, variante de Gabe.

Les deux types de préparations sont observées au microscope. Le degré d'infestation est apprécié d'après l'échelle suivante que nous avons établie :

0 : pas d'infestation

I : début d'infestation ; de rares hémocytes présentent dans leur cytoplasme 1 à 2 cellules de Bonamia ostreae

II : infestation ; les hémocytes parasités sont en nombre appréciable, les parasites se multiplient dans les cytoplasmes

III : bonne infestation ; les parasites sont facilement repérés de par leur nombre

IV : très forte infestation

Les degrés III et IV sont regroupés et correspondent à une pullulation du parasite. Les hémocytes peuvent renfermer plus de 20 cellules de Bonamia ostreae. A ce stade, les parasites sont généralement libérés dans les tissus, suite à la lyse des hémocytes morts.

La comparaison des taux de parasitisme obtenus porte sur 11 lots soit 210 huîtres.

3. Résultats

Le nombre d'huîtres trouvées parasitées est plus important quand le diagnostic est effectué à partir des empreintes branchiales. Cette observation a été constatée pour les 11 lots examinés (tableau 1).

3.1. Quantification de la différence des taux observés

Les 11 lots, d'origine différente, présentent des taux de parasitisme variables (de 11 % à 50 % pour les diagnostics effectués à partir des coupes histologiques).

Une analyse mathématique des données montre que une droite de Téssier peut représenter l'évolution des taux "empreintes" (Y) en fonction des divers taux "coupes" (X). La relation est de la forme $Y = 1,173 + 0,106X$. La pente, supérieure à 1, indique que la différence observée entre les deux méthodes ($D = Y - X$) croît, très faiblement, avec le taux de parasitisme X. Le résultat est corroboré par le calcul des paramètres de la regression entre D et X, pour une équation du type $D = VX + U$ avec $V = 0,43 \pm 0,31$ et $U = 0,04$. Cette pente V est différente de 0, ce qui confirme l'augmentation de D en fonction de X.

En utilisant la variance d'une estimation de D par droite de Téssier, la valeur du taux de différence entre les deux méthodes, pour $X = p$ donné, ainsi que son intervalle de confiance, peut être calculée par la formule $D_p = Vp + U \pm ID_p$, avec $ID_p = 0,025 + 0,008(p - 0,25)^2$.

3.2. Aspects qualitatifs

La différence constante D des taux de parasitisme semble correspondre aux stades de début d'infestation, stades où le parasite est décelable dans le cytoplasme de quelques rares hémocytes. Ainsi, pour 10 huîtres observées en début d'infestation (degré I) sur les empreintes de branchies, 2 cas seulement de parasitisme sont dépistés sur coupes histologiques de glandes digestives (tableau 2). Avec l'augmentation du degré d'infestation, les différences de diagnostic empreintes-coupes diminuent (pour degré II) et finissent par s'annuler (pour degré III et IV).

D'autre part, sur 226 huîtres, 53 présentent des ulcérations soit 23,5 % (tableau 3). L'examen des empreintes branchiales de ces 53 huîtres donne un taux de parasitisme de 77,4 % pour seulement 25,4 % des 173 huîtres intactes. La présence de Bonamia ostreae est donc fortement liée à l'existence de lésions branchiales.

En outre, en début d'infestation (degré I), la majorité des huîtres présente des branchies intactes (6 sur 8) ; l'évolution du degré d'infestation semble s'accompagner d'une augmentation des cas de lésions branchiales, de gravité croissante (tableau 2).

4. Discussion - Conclusion

Les résultats montrent que le dépistage précoce de Bonamia ostreae est plus performant par les techniques d'empreintes de branchies que par celles de coupes histologiques de glandes digestives.

Cette observation peut être expliquée par les faits suivants :

a) La technique des empreintes de branchies permet de recueillir et d'observer un plus grand nombre d'hémocytes que ne le permettent les coupes histologiques de glandes digestives. En effet, comme le signale Galtsoff P.S. (1964), chez les huîtres, les cellules sanguines ne sont pas confinées aux vaisseaux sanguins, mais circulent à travers les tissus par d'importants sinus qu'elles peuvent quitter, un grand nombre d'hémocytes tapissant la surface du manteau et des branchies.

b) Vu la taille du parasite (2 à 5 microns) et lorsque peu d'hémocytes sont parasités, la probabilité de déceler Bonamia ostreae est faible sur des coupes de 7 microns d'épaisseur qui ne correspondent qu'à une infime partie de la masse digestive.

c) Les cellules de l'huître et du parasite subissent, lors de la confection des empreintes sur lame, un étalement mettant en évidence leurs structures.

Sur coupes, les cellules, au contraire, par les traitements qu'elles subissent (fixation et déshydratation) se rétractent et apparaissent d'une taille plus faible que sur empreintes colorées (Planche 1).

Par ailleurs, la réalisation d'empreintes permet d'obtenir des résultats très rapidement, contrairement aux coupes histologiques qui demandent plusieurs jours de préparation. Toutefois, cette méthode ne peut remplacer totalement les techniques histologiques pour des contrôles zoosanitaires des huîtres ou autres coquillages, destinées à mettre en évidence divers microorganismes et parasites.

La différence de diagnostic D observée entre les deux méthodes correspond à des stades de début d'infestation du parasite dans les huîtres. Elle semble croître, toutefois très faiblement, en fonction des taux de parasitisme obtenus sur les lots. Le nombre d'huîtres en début d'infestation serait donc fonction du taux d'animaux déjà atteints dans le milieu.

Une étude ultérieure, incluant des taux de parasitisme supérieurs à 50 % permettra de confirmer ou d'infirmer ces premières constatations.

Cette méthode des empreintes de branchies a permis de vérifier les observations faites sur la présence de lésions branchiales comme indicateur de la maladie (Tigé et coll., 1980). De plus, nous avons mis en évidence que leur importance est associée au degré d'évolution de l'infestation due à Bonamia ostreae. Cette infestation se traduit par une réaction inflammatoire qui peut être localisée aux lésions alors entourées d'un bourrelet jaunâtre, ou étendue aux tissus. Toutefois, 22,6 % des cas d'huîtres à branchies ulcérées n'ont pas été trouvées parasitées : insuffisance des techniques de dépistage ou élimination du protozoaire et cicatrisation des lésions ? Une étude plus détaillée et plus complète est nécessaire pour vérifier cette hypothèse et pour appréhender les mécanismes d'infestation de Bonamia ostreae chez l'huître plate.

La technique des empreintes colorées, fiable et rapide, sera utilisée pour les recherches de base concernant l'épizootie due au parasite Bonamia ostreae.

BIBLIOGRAPHIE

- COMPS (M.), TIGÉ (G.) et GRIZEL (H.), 1980 - Etude ultrastructurale d'un parasite de l'huître plate Ostrea edulis L. - C.R. Acad. Sci., Paris, 290, série D : 383-384.
- GALTSOFF (P.S.), 1964 - The American oyster, Crassostrea virginica Gmelin - Fishery Bulletin Vol. 64 ; U.S. Government printing office - Washington.
- PICHOT (Y.), COMPS (M.), TIGÉ (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.
- TIGÉ (G.), GRIZEL (H.) et COMPS (M.), 1980 - Données sur le nouveau parasite de l'huître plate. Situation épidémiologique - Comm. Cons. Int. Explor. Mer, Réu. spéci. Copenhague 1980, n° 39, 9 p. ronéo.

(Empreintes de branchies(Y):	Coupes glandes(X))
(3/6	:	2/6)
(2/9	:	1/9)
(12/30	:	9/30)
(6/15	:	3/15)
(7/10	:	5/10)
(5/13	:	3/13)
(5/13	:	4/13)
(15/35	:	8/35)
(5/20	:	3/20)
(9/30	:	4/30)
(13/29	:	7/29)

Tableau 1 : Comparaison des taux de parasitisme obtenus d'empreintes de branchies et de coupes histologiques de glandes digestives.

(Degré d'infestation	: Degré d'infestation	: Aspect macroscopique)
(observé sur les	: observé sur les	: des huîtres)
(empreintes de branchies	: coupes de glandes digestives)
0 : 28 huîtres	: 0 : 27 huîtres : I : 1	: non obs. : 2 : br. int. : 21 : L. 1 : 3 : L. 2 : 1 : L. 3 : 0 : L. m. : 1	huîtres
I : 10	: 0 : 8 : I : 2	: non obs. : 2 : br. int. : 6 : L. 1 : 1 : L. 2 : 0 : L. 3 : 0 : L. m. : 1	
II : 7	: 0 : 4 : I : 3 : II : 0	: non obs. : 0 : br. int. : 5 : L. 1 : 0 : L. 2 : 1 : L. 3 : 0 : L. m. : 1	
III et IV : 10	: 0 : 0 : I : 2 : II : 3 : III et IV : 5	: non obs. : 2 : br. int. : 2 : L. 1 : 0 : L. 2 : 1 : L. 3 : 2 : L. m. : 3	
TOTAL : 55 huîtres		: non obs. aspect macroscopique non observé : br. int. branchies intactes : L. 1 Lésions stade 1 : L. 2 Lésions stade 2 : L. 3 Lésions stade 3 : L. m. Lésions multiples	

Tableau 2 : Comparaison des degrés d'infestation observés à partir des deux méthodes de diagnostic.

	:nb huîtres : sans : lésions :branchiales:	:nb huîtres : avec : lésions : stade 1	:nb huîtres : avec : lésions : stade 2	:nb huîtres : avec : lésions : stade 3	:nb huîtres : avec : lésions : multiples :	: Totaux)
Total	: 173	: 19	: 7	: 10	: 17	: 226)
Non parasitées	: 129	: 6	: 2	: 2	: 2	: 141)
Parasitées	: 44	: 13	: 5	: 8	: 15	: 85)
		: (68 %)	: (71 %)	: (80 %)	: (94 %)	:)

- Pourcentage d'huîtres à branchies ulcérées : 23,5 %
- Pourcentage d'huîtres à branchies ulcérées trouvées parasitées : 77,4 %
- Pourcentage d'huîtres intactes trouvées parasitées : 25,4 %

Tableau 3 : Relation lésions branchiales - parasitisme

LEGENDE DES PHOTOS DE LA PLANCHE 1

Figure n° 1

Coupe histologique de glande digestive (tissu conjonctif) chez une huître plate parasitée par Bonamia ostreae (infestation degré IV)

GR X 1 600 *

Figure n° 2

Infestation degré IV observée à partir d'empreintes de feuillets branchiaux

GR X 1 600

Figure n° 3

Forte infestation observée au niveau de coupe histologique de tissu conjonctif de glande digestive

GR X 4 000

Figure n° 4-5-6

Hémocytes d'huître plate parasités par Bonamia ostreae, observés sur empreintes de feuillets branchiaux

GR X 4 000

Figure n° 7

Lyse d'un hémocyte et libération des formes parasitaires

GR X 4 000

fl : forme libre de Bonamia ostreae

fi : forme intracellulaire du parasite

h : hémocyte parasité

* Les grossissements comportent le grossissement au microscope et le grossissement au tirage des photographies.

PLANCHE 1

