

**MISE EN EVIDENCE D'HAPLOSPORIDIUM SP.
(HAPLOSPORIDA - HAPLOSPORIDIIDAE) PARASITE
DE L'HUITRE PLATE *OSTREA EDULIS* L.**

Evelyne BACHERE et Henri GRIZEL

ISTPM, Laboratoire « Ressources Aquacoles », 12, rue des Résistants, La Trinité/mer

Abstract

STUDY OF *Haplosporidium* sp. PARASITE OF THE OYSTER *Ostrea edulis* L.

A new Haplosporidia has been observed in oysters, *Ostrea edulis*, from the Mediterranean sea. Different development stages have been described in photonic and electronic microscopy. The spore characteristics, especially the occurrence of four sporal filaments, at least, enable us to distinguish this Haplosporidia from these previously described in Atlantic oysters.

Résumé

Une nouvelle Haplosporidie a été observée chez des huîtres plates *Ostrea edulis* provenant de Méditerranée. Divers stades de développement ont été décrits en microscopie photonique et électronique. Les caractéristiques des spores notamment la présence d'au moins quatre filaments sporaux permettent de distinguer cette Haplosporidie de celles déjà décrites chez des huîtres plates des côtes atlantiques.

Différentes haplosporidies ont été décrites chez l'huître. Certaines sont connues comme pathogènes, *Minchinia costalis* (ANDREWS *et al.*, 1962 et 1978 ; COUCH, 1967) et *Minchinia nelsoni* (HASKIN *et al.*, 1966 ; FARLEY, 1968 et 1975), d'autres identifiées récemment ont été signalées comme parasites occasionnels (VAN BANNING, 1977).

Au cours de recherches réalisées sur *Bonamia ostreae* (PICHOT *et al.*, 1980), une haplosporidie a été mise en évidence chez des huîtres plates originaires de Méditerranée et servant d'hôtes pour des essais d'infestation expérimentale.

Matériel et méthodes.

Les huîtres examinées, provenant de gisements naturels de l'étang de Thau, ont été mises en stabulation au laboratoire ISTPM de La Trinité/mer. Un relevé des mortalités a été effectué journalièrement pour contrôle pathologique.

Des empreintes de filaments branchiaux ont été colorées par la méthode de May-Grunw Giemsa. Les glandes digestives et branchies correspondantes ont été fixées par le liquide de Boumgarth. Les coupes histologiques colorées par la triple coloration de Papanicolaou, variante de Gabe. Pour l'étude en microscopie électronique, les tissus ont été traités par la double fixation glutaraldéhyde-osmium et inclus dans l'araldite.

Résultats.

Sur 700 huîtres plates, 11 ont été trouvées parasitées par l'haplosporidie décrite ci-après. Les sujets infestés ne présentaient pas de signes cliniques macroscopiques distincts, à l'exception d'un dont la masse viscérale et les branchies étaient colorées très nettement en gris-bleu. L'observation sur frottis a révélé, pour cette huître, la présence de spores.

Les premiers stades sont des cellules de 2 à 4 μm de diamètre (fig. 1) de morphologie variable. Le noyau peut être central ou excentré et présente une chromatine très dense ou lâche. Les figures laissent penser à une importante activité mitotique (FARLEY, 1967). Les divisions nucléaires successives

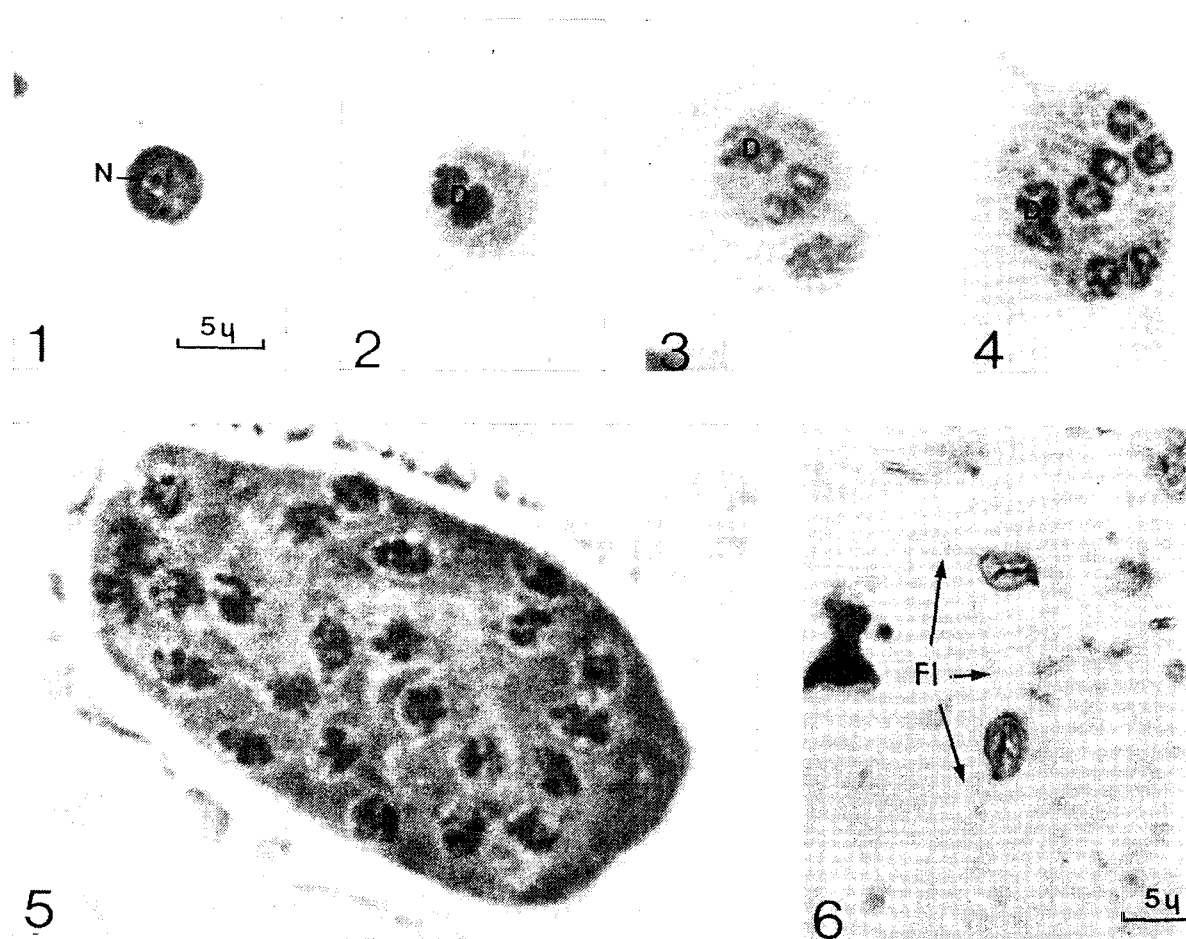


PLANCHE I

- 1) Forme uninucléée; N: noyau.
- 2) Jeune plasmode à 1 diplocaryon (D).
- 3) Plasmode à 2 diplocaryons (D).
- 4) Multiplication des noyaux conduisant à un plasmode à 4 diplocaryons (D).
- 5) Plasmode plus évolué.
- 6) Spores sur frottis; Fl: filaments sporaux.

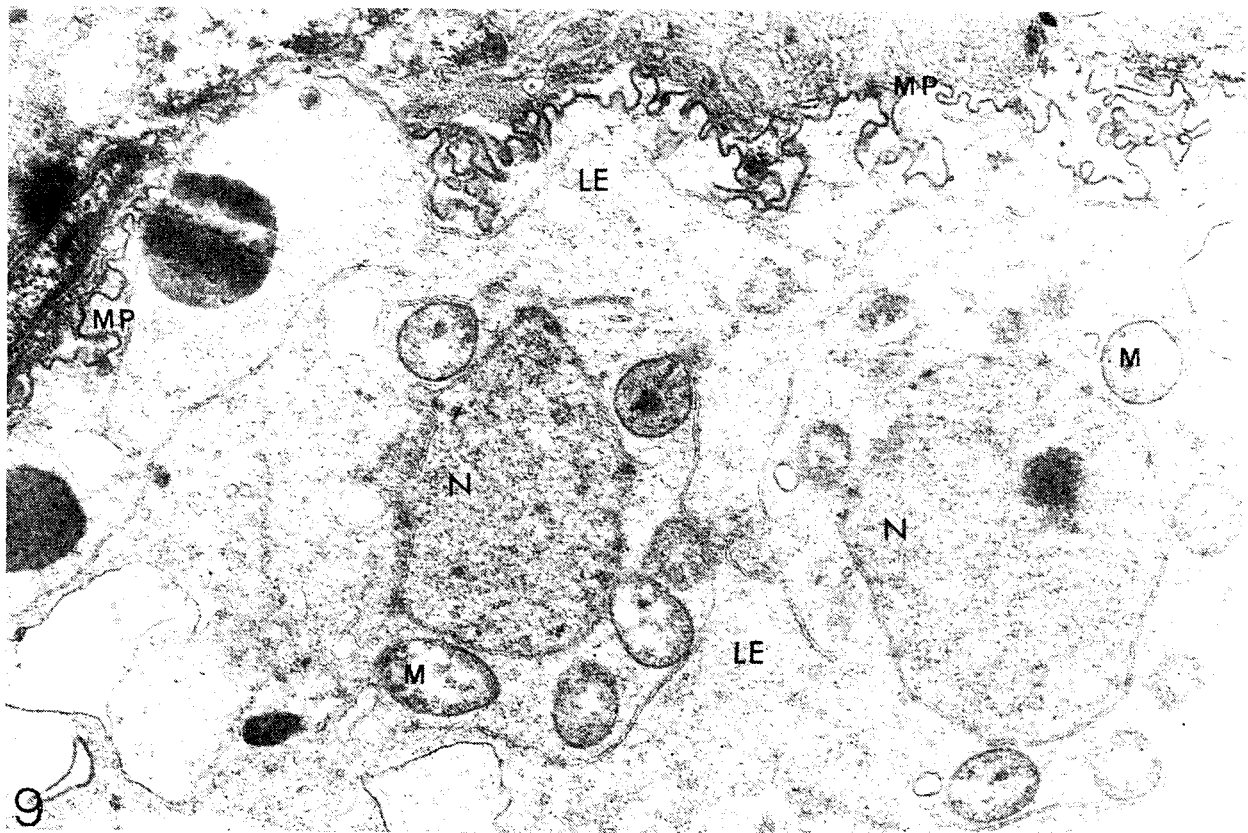
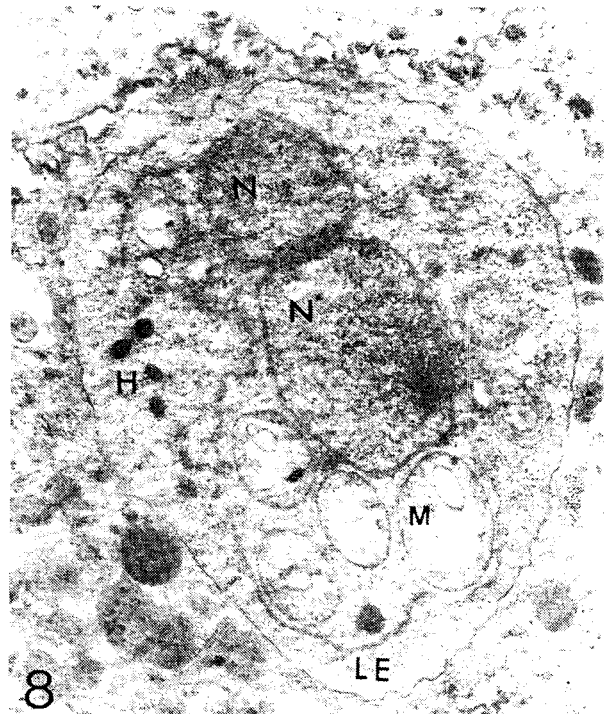
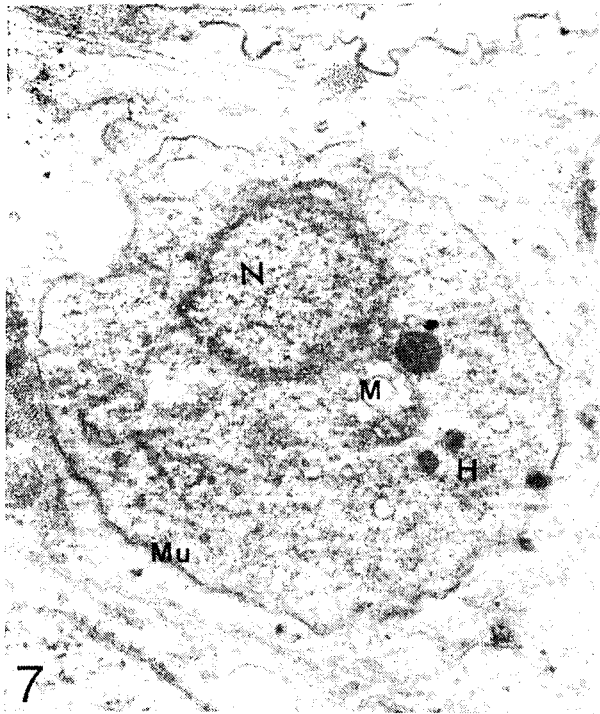


PLANCHE II

- 7) Forme mimulée en microscopie électronique; H: haplosporosomes; M: mitochondrie; MU: membrane unitaire; N: noyau; G \times 6 650. 8) Jeune plasmode renfermant un diplocaryon; H: haplosporosomes; LE: lamelle ergastoplasmique; M: mitochondrie; N: noyau; microscopie électronique G \times 5 550. 9) Vue partielle d'un plasmode montrant deux de ses noyaux (N), le complexe mitochondrial (M) - lamelles ergastoplasmiques (LE) et les invaginations de la membrane (MP); microscopie électronique G \times 4 700.



PLANCHE III

- 10) Coupe d'une spore en microscopie électronique montrant l'insertion de 4 filaments sporaux (Fl) au niveau de la paroi de la spore; C: clapet; H: haplosporosomes; N: noyau; Sp: sphérule.
 11) Coupe d'une spore mettant en évidence les 4 filaments sporaux (Fl) au niveau de la paroi de la spore; C: clapet; Se: sporoplasme externe; G \times 20 500.
 12) Coupe d'une spore en microscopie électronique montrant les organites dans le sporoplasme externe (Se) et interne (Si); Fl: filaments sporaux; H: haplosporosome; M: mitochondrie; N: noyau; G \times 20 500.

donnent naissance à des plasmodes (fig. 2, 3, 4 et 5) dont les plus évolués, de 13 à 45 μm , contiennent plus de 50 noyaux. Les sporoblastes s'individualisant dans les sporontes, de 17 à 40 μm , qui donnent des sporocystes dont la taille varie de 25 à 43 μm sur 25 à 62 μm . Ils peuvent renfermer jusqu'à 100 spores. Celles-ci sont de forme oblongue et mesurent de 2,5 μm à 4 μm de large sur 4 μm à 6 μm de long. Operculées elles présentent des formations filamenteuses de 12 à 15 μm de long. (fig. 6). L'étude histologique montre la présence de ces stades d'évolution dans le tissu conjonctif interstitiel de la glande digestive et des branchies.

L'étude ultrastructurale a permis de préciser la morphologie et la structure de certains stades. Les cellules uninucléées (fig. 7) sont limitées par une membrane unitaire. Le cytoplasme, dense, renferme de nombreux ribosomes, des lamelles ergastoplasmiques et des granules opaques de 0,2 à 0,4 μm de diamètre. Situées près du noyau, les mitochondries, à crêtes arrondies, sont souvent enveloppées par une lamelle ergastoplasmique.

Les plus petites formes plasmodiales (fig. 8) contiennent un diplocaryon chacun mesurant en moyenne 1,5 μm . Leur cytoplasme pariétal contient des haplosporosomes de structure identique à celle décrite par PERKINS (1968) et dont la taille varie entre 150 et 400 nm. Le complexe mitochondrial-lamelle ergastoplasmique est similaire à celui reporté par VIVARES *et al.* (1982) (fig. 8 et 9).

Au cours du cycle d'évolution, la membrane des plasmodes et des sporontes forme des invaginations caractéristiques (fig. 9). Celles-ci ont été notées par CAHOUR *et al.* (1980) et par VIVARES *et al.* (1982).

Dans les sporocystes, les spores sont intimement accolées par leur exosporoplasme. La spore présente une paroi épaisse de 170 nm, composée d'une couche externe dense de 47 nm, d'une partie médiane claire et d'une zone interne, plus large, de 88 nm. Le sporoplasme interne est limité par une membrane unitaire, le plus souvent attenante à la paroi. La spore est fermée, en sa partie apicale, par un opercule aplati (fig. 10). La paroi donne naissance à des filaments visibles dans l'exosporoplasme. Sur certaines coupes ils sont au moins au nombre de 4. Un antérieur, un postérieur situé dans un même plan que le précédent et deux médians opposés (fig. 10 et 11). Le sporoplasme interne est très dense chez les spores matures. Il renferme de nombreux ribosomes formant une couche plus dense à la périphérie, des haplosporosomes de 110 à 350 nm et quelques mitochondries. Le noyau est situé dans la partie postérieure du sporoplasme, à l'opposé de la sphérule composée de nombreuses vésicules.

Des mitochondries, de nombreux ribosomes et des filaments sporaux en coupes sagittale et transversale sont observés dans le sporoplasme externe (fig. 12).

Discussion.

La présence de filaments sporaux et les caractéristiques générales de la spore permettent de rattacher cette haplosporidie au genre *Haplosporidium* selon la diagnose proposée par ORMIERES (1980) et reprise par PICHOT *et al.* (1979) pour *Haplosporidium sp.* parasite d'*Ostrea edulis*.

Depuis 1977, suite à la description de *Minchinia armoricana* par VAN BANNING, plusieurs haplosporidies ont été rapportées comme parasites de cet hôte. Les observations de celles-ci sont plus ou moins complètes, voire fragmentaires comme le montre le tableau 1. La comparaison des différents stades d'évolution de l'haplosporidie, décrite chez les huîtres de Méditerranée, avec ceux rapportés par les auteurs cités dans le tableau, semble indiquer que l'on soit en présence d'une espèce nouvelle, *Haplosporidium sp.* En effet, si la description des formes plasmodiales présente des similitudes avec celles décrites par CAHOUR *et al.* (1980) et VIVARES *et al.* (1982), les caractéristiques de la spore en font une espèce originale.

Concernant les plasmodes, contrairement à VIVARES *et al.* (1982) nous ne retiendrons pas les particularités cytoplasmiques et notamment le complexe mitochondries-lamelles ergastoplasmiques, pour séparer cette haplosporidie des précédentes. Cet arrangement des organites refléterait simplement une intense activité de synthèse cellulaire. Nous écarterons également comme critères de distinction, la localisation des plasmodes dans l'hôte, qui ne semble pas caractéristique des espèces, pour ce stade évolutif (COUCH, 1967 ; FARLEY, 1968 ; PERKINS, 1969) et qui dépendrait surtout, pour les

haplosporidies d'huîtres, du degré initial d'infestation (HASKIN H., comm. pers.). Par ailleurs TIGE (comm. pers.) a observé des sporocystes matures de *Minchinia armoricana* dans l'épith stomacal d'huître plate.

Auteurs / Caractéristiques	VAN BANNING 1977	PICHOT <i>et al.</i> 1979	CAHOUR <i>et al.</i> 1980	VIVARES <i>et al.</i> 1982	BACHERE et GRIZEL 1983
Taille des plasmodes observés	17 à 25 µm		2 à 11,5 µm	4 à 20 µm	2 à 45 µm
Nombre de noyaux			1 à 5		jusqu'à 50
Taille des sporocystes	35 à 50 µm				25 à 43 µm × 25 à 62 µm
Taille des spores	4,0 à 5,5 µm × 3,0 à 4,5 µm	4,5 à 5,5 µm × 3,5 à 4,5 µm	5,0 à 5,5 µm × 4,0 à 4,5 µm		4 à 6 µm × 2,5 à 4 µm
Nombre de spores	100 à 150				≈ 100
Particularités des spores	Deux queues cytoplasmiques	Deux filaments sur plan de section			Quatre filaments sur plan de section
Origine	Bretagne Côte atlantique	Arcachon Côte atlantique	Bretagne Côte atlantique	Bretagne Côte atlantique	Étang de Thau Méditerranée
Genre	<i>Minchinia</i>	<i>Haplosporidium</i>	<i>Minchinia</i>	Haplosporidie	<i>Haplosporidium</i>
Espèce	<i>armoricana</i>	<i>sp.</i>	<i>armoricana</i>	nouvelle	<i>sp.</i>

TABL. 1. — Caractéristiques des diverses Haplosporidies décrites chez *Ostrea edulis* des côtes atlantique méditerranéennes.

TABLE 1. — Characteristics of different Haplosporidia described in *Ostrea edulis* (Atlantic and Mediterranean coasts).

De plus, la réaction leucocytaire, également signalée par VIVARES *et al.* (1982) ne sera retenue parmi les critères, car elle représente un phénomène non spécifique et courant chez les huîtres (FARLEY, 1968 ; SPARKS, 1976). La présence d'au moins quatre filaments sporaux différencie les spores de celles décrites antérieurement chez *Ostrea edulis*. PICHOT *et al.* (1979), rapprochant la présence de deux filaments sur un plan de section, notent des similitudes entre les spores qu'ils décrivent et celles observées par VAN BANNING (1977) et par CAHOUR *et al.* (1980). Bien que retenues pour le moment deux espèces, ils n'excluent pas le fait qu'elles puissent être identiques. En l'absence d'images de spores données par VAN BANNING laissent supposer l'existence de filaments sporaux chez l'haplosporidie dénommée *Minchinia armoricana*.

L'analyse de l'ensemble des observations sur les haplosporidies parasites d'huîtres plates des côtes atlantiques, nous incline à émettre l'hypothèse que celles-ci sont identiques et se différencient par le nombre de filaments sporaux, d'*Haplosporidium* sp. que nous rapportons. Des observations complémentaires permettront soit de regrouper celles-ci en une seule espèce sous le générique de *Haplosporidium armoricanum* soit de créer deux espèces distinctes.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient M. COMPS, « laboratoire ISTPM de Pathologie de Sète », pour sa collaboration concernant l'étude ultrastructurale de l'Haplosporidie.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDREWS (J.D.), WOOD (J.L.) et HOESE (H.D.), 1962. — Oyster mortality studies in Virginia. — III Epizootiology of a disease caused by *Haplosporidium costale* Wood and Andrews. — *J. Insect. Pathol.*, 4 (3) : 327-343.
- ANDREWS (J.D.) et CASTAGNA (M.), 1978. — Epizootiology of *Minchinia costalis* in susceptible oysters in seaside Bays of Virginia's Eastern Shore, 1958-1976. — *J. Invert. Pathol.*, 32 : 124-138.
- CAHOUR (A.), PODER (M.) et BALOUET (G.), 1980. — Présence de *Minchinia armoricana* (Haplospores, Haplosporida) chez *Ostrea edulis* d'origine française. — *C.R. Soc. Biol.*, 174 (3) : 359-368.
- COUCH (J.A.), 1967. — Concurrent Haplosporidian infections of the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). — *J. Parasitol.*, 53 (2) : 248-253.
- FARLEY (C.A.), 1967. — A proposed life cycle of *Minchinia nelsoni* (Haplosporida, Haplosporidiidae) in the American oyster *Crassostrea virginica*. — *J. Protozool.*, 14 (4) : 616-625.
- 1968. — *Minchinia nelsoni* (Haplosporida) disease syndrome in the American oyster *Crassostrea virginica*. — *Ibid.*, 15 (3) : 585-599.
- 1975. — Epizootic and enzootic aspects of *Minchinia nelsoni* (Haplosporida) disease in Maryland oysters. — *Ibid.*, 22 (3) : 418-427.
- HASKIN (H.H.), STAUBER (L.A.) et MACKIN (J.A.), 1966. — *Minchinia nelsoni* n. sp. (Haplosporida, Haplosporidiidae) causative agent of the Delaware Bay oyster epizootie — *Science*, 153 : 1414-1416.
- ORMIERES (R.), 1980. — *Haplosporidium parisi* n. sp., Haplosporidie parasite de *Serpula vermicularis* L. — Etude ultrastructurale de la spore. — *Protistologica*, 16 (3) : 467-474.
- PERKINS (F.O.), 1968. — Fine structure of the oyster pathogen *Minchinia nelsoni* (Haplosporida, Haplosporidiidae). — *J. Invert. Pathol.*, 10 : 287-307.
- 1969. — Electron microscope studies of sporulation in the oyster pathogen, *Minchinia costalis* (Sporozoa : Haplosporida). — *J. Parasitol.*, 55 (5) : 897-920.
- PICHOT (Y.), COMPS (M.) et DELTREIL (J.P.), 1979. — Recherches sur *Haplosporidium* sp. (Haplosporida - Haplosporidiidae) parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* L. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 43 (4) : 405-408.
- 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.
- SPARKS (A.K.), 1976. — Inflammation and wound repair in oysters. — *Mar. Fish. Rev.*, 38 (10) : 2-4.
- VAN BANNING (P.), 1977. — *Minchinia armoricana* sp. nov. (Haplosporida), a parasite of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. — *J. Invert. Pathol.*, 30 : 199-206.
- VIVARES (C.P.), BREHELIN (M.), COUSSERANS (F.) et BONAMI (J.R.), 1982. — Mise en évidence d'une nouvelle Haplosporidie parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* L. — *C.R. Acad. Sci. Paris*, 295 : 127-130.