

PATHOLOGY IN MARINE AQUACULTURE (PATHOLOGIE EN AQUACULTURE MARINE). 1986.  
C.P. Vivarès, J.-R. Bonami, and E. Jaspers (Eds). European Aquaculture  
Society, Special Publication No. 9. Bredene, Belgium.

SPORULATION D'HAPLOSPORIDIUM SP. (HAPLOSPORIDA, HAPLOSPORIDIIDAE)  
CHEZ L'HUITRE OSTREA EDULIS L. DU BASSIN D'ARCACHON (FRANCE)

Y. PICHOT

Laboratoire de Pathologie, IFREMER  
Sète, France

RESUME

Le cycle de développement d'Haplosporidium sp., Haplosporidie récemment observée chez des Huitres plates natives du bassin d'Arcachon, et dont les caractéristiques de la spore ont déjà été présentées (Pichot *et al.*, 1979), a été étudié en microscopie électronique. Les premiers stades de la sporulation sont représentés par deux types de plasmodes. A partir des sporontes, la sporogenèse semble se dérouler selon deux processus. Dans un premier processus un "syncytium" est formé, suivi de la condensation du cytoplasme qui aboutirait à l'individualisation de sporoblastes uniucléés et de fragments cytoplasmiques anucléés. Les spores pourraient résulter de l'enveloppement des sporoblastes par les fragments cytoplasmiques. Dans un second processus la différenciation des spores s'opère directement dans les sporontes.

MOTS CLES : Sporulation, Haplosporidium sp., Pathogène d'Huitre, Ostrea edulis, Bassin d'Arcachon (France).

ABSTRACT

SPORULATION OF HAPLOSPORIDIUM SP. (Haplosporida, Haplosporidiidae)  
IN THE FLAT OYSTER OSTREA EDULIS L. IN THE BAY OF ARCACHON (FRANCE)

The life cycle of Haplosporidium sp., Haplosporida recently observed in the flat oyster of the bassin d'Arcachon (France), and the spore characteristics of which have already been presented (Pichot *et al.*, 1979), has been studied by electron microscopy. The first stages of sporulation are represented by two types of plasmodia. After the stage of sporonts, sporogenesis seems to develop according to two sequences. In a first sequence a cytoplasmic syncytium is formed, followed by the condensation of cytoplasm that would lead to the individualisation of uninucleate sporoblasts and anucleate cytoplasm fragments. The spores could result from the enclosing of the sporoblasts by the cytoplasmic fragments. In a second sequence the spores differentiation happens directly in the sporonts.

KEY WORDS : Sporulation, Haplosporidium sp., Pathogen of oyster, Ostrea edulis, Bassin d'Arcachon (France).

## INTRODUCTION

Plusieurs parasites du groupe des Haplosporidies ont été signalés chez l'Huître plate européenne *Ostrea edulis*. Deux affectaient des Huîtres originaires des eaux atlantiques Bretonnes. Il s'agit de *Minchinia armoricana* parasite mis en évidence par van Banning (1977) et d'une Haplosporidie non identifiée observée par Vivarès et al. (1982).

Récemment une Haplosporidie nouvelle (*Haplosporidium* sp.) a été décrite par Bachère et Grizel (1982) chez des Huîtres de Méditerranée. Enfin un cas semblable d'infestation d'*Ostrea edulis* par un Haplosporidie a été observé chez des sujets natifs du bassin d'Arcachon (Pichot et al., 1979). Pour ce dernier cas, si les caractéristiques morphologiques de la spore nous ont conduits à inclure le parasite dans le genre *Haplosporidium*, première Haplosporidie d'Huître de ce genre, l'étude ultrastructurale de la sporulation a révélé que le pathogène montrait également sur ce plan les caractères originaux que nous présentons dans cette note.

## MATERIEL ET METHODES

Les Huîtres plates, *Ostrea edulis*, proviennent de la région d'Arcachon, côte Atlantique française.

Pour la microscopie électronique à transmission, les Huîtres sont fixées dans une solution de glutaraldehyde à 3 % tamponnée par le cacodylate de sodium (0,4 M) additionnée de NaCl, postfixées par le tétroxyde d'osmium à 2 % dans le cacodylate de sodium (0,4 M). L'inclusion est réalisée dans l'araldite. Les coupes ultra-fines sont colorées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

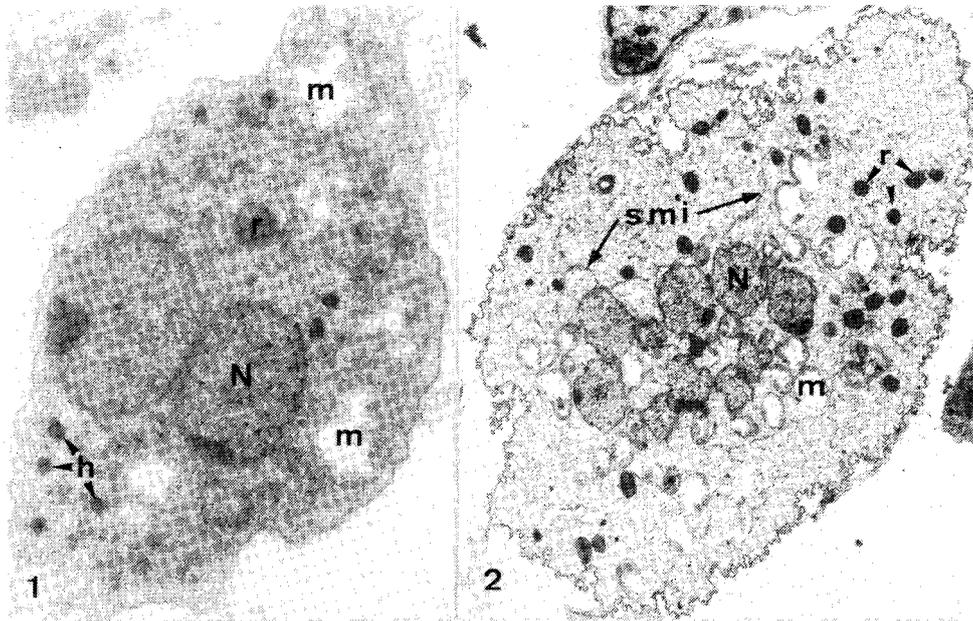
## RESULTATS

Les Huîtres infestées sont caractérisées par une coloration blanchâtre de la masse viscérale et des branchies. Aucune lésion externe n'est observée. Des squashes réalisés à partir de tissu frais montrent des spores de forme ovoïde mesurant de 3,5 à 5 µm, avec un pôle tronqué doté d'un opercule. De chaque pôle de la spore partent deux prolongements effilés ou "queues" de 20 µm de long en moyenne.

En microscopie photonique les différentes formes du parasite apparaissent localisées dans les branchies et dans la masse viscérale de l'hôte. Dans la glande digestive le parasite peut envahir complètement le conjonctif interstitiel.

En microscopie électronique les premiers stades du cycle de développement du parasite sont représentés par deux types de plasmodes. Le premier type (Fig. 1) correspond à des petits plasmodes de forme le plus souvent arrondie et dont le diamètre varie de 4 à 5 µm. Limité par une membrane plasmique peu plissée, le cytoplasme riche en ribosomes renferme de volumineuses mitochondries pouvant atteindre 1 µm de diamètre, des gouttelettes lipidiques et des haplosporosomes sphériques de 150 à 200 nm de diamètre. Dans ces plasmodes le plus souvent binucléés, les noyaux arrondis, de 1,5 µm de diamètre, sont généralement appariés en diplocaryon.

Le second type (Fig. 2) correspond à des plasmodes de forme allongée, au contour très sinueux. Leur longueur varie de 12 à 20 µm et leur largeur est comprise entre 6 et 10 µm. Le cytoplasme moins dense que celui des plasmodes précédents ne contient pas d'haplosporosomes. Il renferme un grand nombre de gouttelettes lipidiques et de nombreuses mitochondries dont les plus grandes atteignent



(N) noyau; (m) mitochondrie; (r) gouttelette de réserve; (h) haplosporosome;  
(smi) système membranaire interne; (S) sporoblaste; (Sp) sphérule; (Fc) fragment  
cytoplasmique; (ps) paroi sporale; (ec) extrasporoplasme; (f) filament.

Fig.1. Petit plasmode à diplocaryon. G x 44 000.

Fig.2. Grand plasmode polynucléé. G x 8 700.

1,3  $\mu\text{m}$  de diamètre. Dans ces plasmodes les noyaux dont le nombre sur un même plan de coupe peut atteindre 10, sont de forme irrégulière et ont un diamètre moyen de 2,2  $\mu\text{m}$ . Ils sont généralement regroupés au centre du plasmode. Le plus souvent en position diplocaryotique ils peuvent être aussi associés par trois. Certains noyaux en cours de division présentent un faisceau de microtubules parallèles appartenant à l'appareil mitotique.

Les plasmodes polynucléés sont également caractérisés par la présence d'un système membranaire interne qui entoure l'ensemble des noyaux et forme des replis s'insinuant entre ces derniers.

L'évolution des grands plasmodes est marquée par un accroissement de la taille et par une augmentation du nombre des noyaux alors répartis dans tout le cytoplasme. On observe également la formation d'une couche discontinue de matériel dense, vraisemblablement constituée de ribosomes, doublant le système membranaire interne (Fig. 3). A partir des "sporontes précoces" ainsi formés, la sporulation d'*Haplosporidium* sp. semble caractérisée par l'existence de deux processus de formation des spores.

Dans un premier processus se produit un découpage du cytoplasme des "sporontes précoces" par séparation des feuilletts du système membranaire interne, conduisant à des formations polymorphes et polynucléées (Fig. 4). Le découpage de celles-ci individualise des sporoblastes uninucléés et pourrait également produire des fragments cytoplasmiques anucléés (Fig. 5). Dans les sporoblastes arrondis et de 3 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre sont incluses des mitochondries et des gouttelettes lipidiques.

Les sporoblastes se transforment en présportes par acquisition d'un cytoplasme externe, qui d'après certaines figures résulterait de l'enveloppement de ceux-ci par les fragments cytoplasmiques anucléés (Fig. 6). La différenciation d'une paroi entre le sporoplasme et l'extraporoplasme et d'un opercule aboutit à la formation des spores. La paroi est formée par l'accumulation progressive de matériel à proximité de la membrane interne du cytoplasme extraporoplasmique. L'opercule quant à lui se formerait au niveau de la zone de jonction des deux lobes de l'extraporoplasme après que celui-ci ait englobé le sporoplasme.

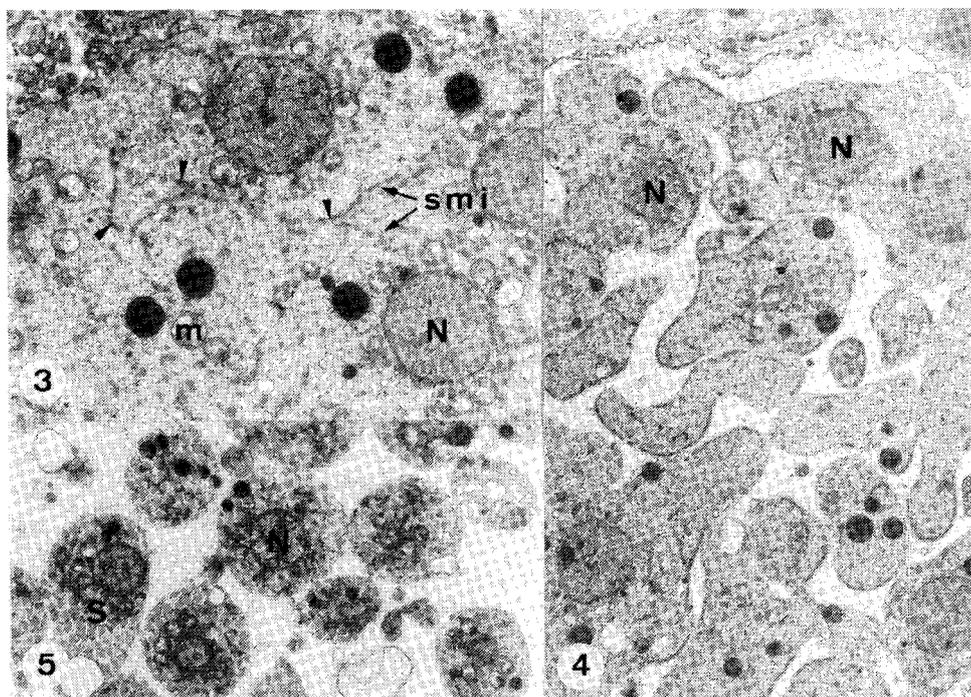
Le second mode débute directement dans "les sporontes précoces" sans formation initiale de sporoblastes. L'individualisation des spores s'opère à partir des éléments uninucléés des "sporontes précoces" délimités par le système membranaire interne (Fig. 7). La paroi et l'opercule se différencient selon le processus généralement observé chez les Haplosporidies.

Les deux processus aboutissent à un seul type de spore.

En microscopie électronique les dimensions de la spore varient entre 2,5 et 3,5  $\mu\text{m}$  sur 3 à 5  $\mu\text{m}$ . La spore mature typique (Fig. 8) est essentiellement caractérisée par la présence, au côté des organites généralement observés chez les Haplosporidies parasites des Huîtres, de filaments directement issus de la paroi sporale. Les filaments absents chez les spores jeunes sont repliés dans deux expansions en forme de queue de l'extraporoplasme; expansions qui se font dans un axe légèrement décalé par rapport à l'axe polaire de la spore.

## DISCUSSION

Dans la comparaison générale des Haplosporidies mises en évidence en Europe chez *O. edulis*, il est clair que tous ces pathogènes présentent un certain nombre de similitudes qui permettent de supposer que l'on a affaire à un même parasite, des réserves étant faites naturellement pour l'Haplosporidie signalée par Vivarès et al. (1982) chez laquelle aucune spore n'a été décrite.

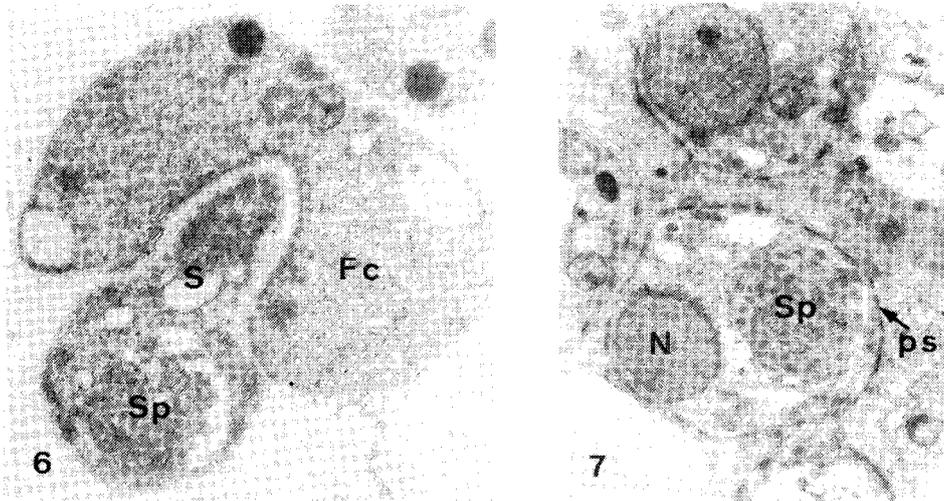


(N) noyau; (m) mitochondrie; (r) gouttelette de réserve; (h) haplosporosome;  
(smi) système membranaire interne; (S) sporoblaste; (Sp) sphérule; (Fc) fragment  
cytoplasmique; (ps) paroi sporale; (ec) extrasporoplasme; (f) filament.

Fig.3. Sporonte "précoce". Contre le système membranaire interne est visible  
l'accumulation de matériel dense (►). G x 9 400.

Fig.4. Formations cytoplasmiques polymorphes et polynucléées à l'intérieur d'un  
sporonte. G x 6 000.

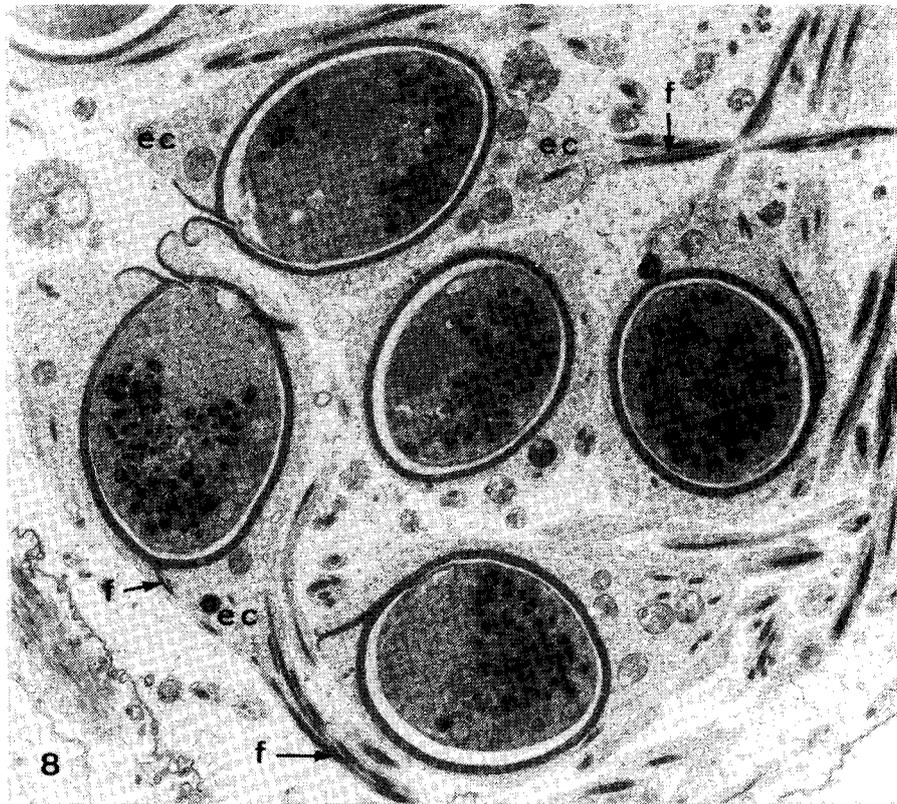
Fig.5. Sporoblastes uninucléés et fragments cytoplasmiques anucléés contenus  
dans un sporonte. G x 4 000.



(N) noyau; (m) mitochondrie; (r) gouttelette de réserve; (h) haplosporosome;  
(smi) système membranaire interne; (S) sporoblaste; (Sp) sphérule; (Fc) fragment  
cytoplasmique; (ps) paroi sporale; (ec) extrasporoplasme; (f) filament.

Fig.6. Image suggérant la formation d'une préspore par enveloppement d'un sporoblaste par un fragment cytoplasmique. G x 18 500.

Fig.7. Cas particulier de formation des spores sans individualisation initiale de sporoblastes. G x 14 300.



(N) noyau; (m) mitochondrie; (r) gouttelette de réserve; (h) haplosporosome;  
(smi) système membranaire interne; (S) sporoblaste; (Sp) sphérule; (Fc) fragment  
cytoplasmique; (ps) paroi sporale; (ec) extrasporoplasme; (f) filament.

Fig.8. Spores d'Haplosporidium sp. G x 11 200.

Ainsi les similitudes observées dans la sporulation de M. armoricana décrite par Cahour et al. (1980) et de l'Haplosporidie que nous venons de présenter, confirment le rapprochement déjà évoqué entre ces deux espèces pour ce qui concerne la morphologie de la spore. Sur ces bases on peut admettre que les deux parasites correspondent à la même espèce, qui compte-tenu des premières données taxonomiques peuvent être identifiées comme Haplosporidium armoricanum van Banning.

Quant à Haplosporidium sp. trouvé en Méditerranée, dont le mode de sporulation n'a pas été précisé, Bachère et Grizel (1982) le distinguent d'Haplosporidium sp. du bassin d'Arcachon en se basant sur le nombre de filaments.

Il est évident, que s'agissant de données obtenues à partir d'examen histologiques, le critère nombre de filaments demeure discutable, et il semble difficile au moins dans ces cas de lui attribuer une valeur fondamentale dans la distinction des espèces.

Concernant les Haplosporidies de l'huître plate une clarification de la systématique pourrait s'inspirer à la fois des données relatives à la sporogénèse et des caractères morphologiques de la spore dont l'étude devrait être abordée d'une façon plus globale, notamment en utilisant la technique de microscopie à balayage.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BACHERE E. et H. GRIZEL. 1982. Mise en évidence d'Haplosporidium sp. (Haplosporida, Haplosporidiidae) parasite de l'huître plate Ostrea edulis L. Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 46(3):226-232.
- CAHOUR A., M. PODER, et G. BALQUET. 1980. Présence de Minchinia armoricana (Haplosporea, Haplosporida) chez Ostrea edulis d'origine française. C.R. Soc. Biol. 174(3):359-368.
- PICHOT Y., M. COMPS, et J.P. DELTREIL. 1979. Recherches sur Haplosporidium sp. (Haplosporida, Haplosporidiidae) parasite de l'huître plate Ostrea edulis L. Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 43(4):405-408.
- 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., M. BREHELIN, F. COUSSERANS, et J.R. BONAMI. 1982. Mise en évidence d'une nouvelle Haplosporidie parasite de l'huître plate Ostrea edulis L. C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. III, 295:127-130.