

# ÉTUDES HISTOLOGIQUES ET ULTRASTRUCTURALES DES LÉSIONS DE PARASITOSE HÉMOCYTAIRE CHEZ *O. EDULIS*

## CONTAMINATIONS EXPÉRIMENTALES +

par Mikael PODER, Annie CAHOUR et Georges BALOUET

Laboratoire de Pathologie, CHU Université de Bretagne Occidentale, Brest

### RESUME

Depuis sa première observation en FRANCE (Bretagne) en 1979, un petit protozoaire s'est rapidement développé dans les huîtres plates de la plupart des centres d'élevages bretons, d'où il a pu s'étendre à d'autres zones. Il y est associé à des mortalités importantes. Récemment, ce parasite a été dénommé *Bonamia ostreae* g.n., sp.n.

Dans le présent travail, nous avons voulu mettre en évidence la spécificité de la position intra-hémocytaire du parasite et les modifications pathologiques qu'il provoque dans les cellules.

Il nous a été aussi possible de démontrer la transmission directe du parasite d'huîtres sans hôte ni stade parasitaires intermédiaires, sa grande capacité d'extension et son pouvoir pathogène renforcé par des conditions de stress.

### SUMMARY

Since its first observation in FRANCE (Brittany) in 1979, a small protozoan has rapidly spread over european oyster stocks in most breton farming areas and in some foreign countries. It's now associated with important mortalities. Recently, this parasite has been labeled *Bonamia ostreae* g.n., sp.n.

In this paper, we mean to point out the specificity and the pathological aspects of the intra-hemocytic location of the parasite, and to give the results of experimental contaminations : it has been possible to demonstrate the direct transmission of the disease from infected oysters to healthy ones without the need of any other host and parasitic stage, and also the activity and pathogenic power of the parasite which can be enhanced by stress conditions.

### INTRODUCTION

Des mortalités anormales d'huîtres plates avaient été signalées sur certains parcs à l'ILE TUDY (Bretagne Sud) en Juin 1979.

+Ce travail a été en partie réalisé dans le cadre de Contrats CNEOX 79/2066 et 80/2283 (7).

Les examens histopathologiques et l'étude ultrastructurale avaient révélé la présence dans ces huîtres d'un petit protozoaire parasite (1). Depuis, ce parasite s'est rapidement propagé. C'est ainsi qu'en 1981 à peu près tous les centres ostréicoles bretons ont été atteints, de même que certains autres centres français à l'exception de ceux de Méditerranée. Le parasite s'est également développé en Hollande et en Espagne. Il est partout associé à des mortalités massives cumulatives. Au fur et à mesure de l'extension et de l'aggravation de la maladie, des huîtres de classes d'âge de plus en plus jeunes ont été touchées : un très faible taux d'infestation a été noté dans du naissain en 1981.

Ce parasite a tout d'abord été appelé "Parasite X", son classement taxonomique étant difficile à préciser. Cependant RICHOT et Coll. (2) ont créé pour lui le genre nouveau de *Bonamia* (*B. ostreae*) après une étude approfondie en microscopie électronique.

En fait, à ce jour, aucun cycle n'a été observé chez *O. edulis* et les formes parasitaires se présentent toujours comme de petites cellules de 2-3  $\mu$ m à noyau basophile dense, essentiellement retrouvées dans le cytoplasme des hémocytes granuleux réactionnels.

Nous avons donc tenté de préciser la pathogénèse du processus parasitaire, puis nous avons effectué des essais de contaminations expérimentales en milieu naturel et au laboratoire pour tenter de déterminer d'une part s'il existe un cycle de contamination en relation peut-être avec des conditions écophysiologiques saisonnières, d'autre part si les formes observées tant en histologie qu'en microscopie électronique avaient un pouvoir infectieux direct.

## MATERIEL ET METHODES

L'étude du processus lésionnel a été réalisée au cours de la surveillance parasitaire systématique effectuée au laboratoire, entre les mois de Septembre 1979 et Décembre 1981. Ceci représente l'analyse de nombreux échantillons d'huîtres plates provenant de différentes zones ostréicoles bretonnes (de CANCALE au GOLFE du MORBIHAN), soit un total d'environ 15000 spécimens.

Pour la plupart des contaminations expérimentales, nous avons utilisé des huîtres anglaises âgées de 3-4 ans, celles-ci ayant toujours été trouvées histologiquement exemptes de parasite.

- En milieu naturel, 1500 huîtres saines ont été immergées en Mars 1981 dans différentes zones ostréicoles : BINIC, PAIMPOL, CARANTEC, rivière de l'ELORN. Des échantillonnages (15 huîtres) autant que possible mensuels ont ensuite été effectués. Par ailleurs, des immersions de lots de 300 huîtres sauvages du banc de LOUMERGAT (Rade de BREST) ont été réalisées à BINIC et à PAIMPOL. Ces huîtres avaient l'intérêt de ne pas paraître histologiquement contaminées par *B. ostreae* mais d'être toujours infectées par *Marteilia refringens* (taux 50 %) et d'avoir pour ce dernier parasite une apparente résistance ;

- Pour les expériences en laboratoire, les huîtres ont été conservées dans des aquariums dont l'eau de mer est filtrée sur sable, aérée et maintenue à une salinité comprise entre 32 et 35 ‰. La température de la salle d'élevage est de 16°C  $\pm$  1°C. Les huîtres ont été

nourries 5 jours par semaine d'algues phytoplanctoniques : *Dunaliella primolacta* et *Phaeodactylum bicornutum* cultivées au laboratoire et distribuées en mélange à raison d'un litre de culture pour 10 bivalves (2 à  $3 \times 10^6$  cellules/ml).

Des techniques expérimentales de Proximity, Feeding, Injection d'hémocytes infectés dans la cavité péricardique des huîtres ont été utilisées en s'inspirant des méthodes que RAY avait développées pour l'étude de *Dermocystidium marinum* = *Perkinsus marinus* (3).

Pour ces essais, nous avons utilisé des huîtres infectées provenant de la région de PAIMPOL dont le taux d'infection histologique était au départ de 40 %.

Une autre expérience de Proximity a également été réalisée avec des huîtres sauvages du banc de LOUMERGAT.

TABLEAU I : Protocole expérimental

PROXIMITY (contaminations croisées)	PROXIMITY	FEEDING	INJECTION
30 huîtres anglaises saines  40 huîtres de LOUMERGAT  60 huîtres infectées de PAIMPOL	60 huîtres anglaises saines    60 huîtres infectées	120 huîtres anglaises saines    26 additions de broyats d'huîtres infectées (3-4 huîtres par broyat- 2-3 fois par semaine)	30 huîtres anglaises saines    Injection 0,2 ml d'hémolymphe ( $1500 \text{ cellules/mm}^3$ ) Taux d'infection du lot prélevé : 20 % - Essai renouvelé deux fois

Pour l'étude histologique et après examen microscopique, la masse digestive des huîtres avec manteau et branchies est séparée puis fixée dans un mélange formol/eau de mer tamponné, neutralisé. Après inclusion en paraffine, les coupes sont colorées à l'hémalun-éosine.

Les prélèvements destinés à la microscopie électronique ont subi un traitement classique avec fixation dans la glutaraldéhyde puis dans l'acide osmique, et inclusion en épon 812. Les coupes contrastées à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb sont observées avec un microscope Jéol 100 S.

## RESULTATS

### A - Aspects lésionnels

#### 1) Macroscopie.

Certaines huîtres présentaient des lésions isolées ou multifocales des branchies et parfois du manteau : de simples festons voire des échancrures ou de véritables perforations pouvant aboutir à une érosion complète ; un prélèvement a été effectué systématiquement sur chacune de ces huîtres.

## 2) Histopathologie.

La présence du parasite dans les tissus de l'huître s'accompagne toujours d'une réaction hémocytaire intense, focale ou diffuse dans les cas les plus avancés : près de l'estomac, dans les gonades mais surtout au niveau du manteau et des branchies. Les vaisseaux hémolymphatiques ont alors une paroi épaissie et leur lumière est parfois obstruée par de très nombreux granulocytes réactionnels agrégés et souvent infectés. Dans certains cas, nous avons pu constater une proportion plus importante d'hémocytes hyalins.

Les lésions de nécrose associées sont parfois importantes au niveau du tissu interstitiel, à proximité de l'estomac ou des diverticules. La basale de l'épithélium digestif est souvent rompue et on observe une exocytose massive des hémocytes granuleux qui à la limite réalise une couche pseudo-épithéliale. Au niveau des branchies, nous avons pu constater dans certains cas un gonflement des filaments branchiaux avec disparition de la trame conjonctive et atrophie des cellules de l'épithélium branchial qui prennent un aspect endothélioforme. Cette lésion peut peut-être être assimilée à un oedème inflammatoire, mais le gonflement correspond aussi souvent à une réaction hémocytaire granuleuse intense. Parallèlement, les cellules de l'épithélium cilié ainsi que les cellules sécrétrices de mucus peuvent présenter des altérations dégénératives avec condensation cytoplasmique homogène, pycnose nucléaire puis caryolyse aboutissant au maximum à une nécrose de liquéfaction.

Comme nous avons pu le rapporter par ailleurs (4), dans presque tous les cas les formes parasitaires sont intracellulaires ; après leur phagocytose il semble qu'elles ne soient pas digérées mais au contraire qu'elles se multiplient dans les cellules hôtes. En effet sur coupe semi-fine, nous avons pu observer des zones intra-cytoplasmiques claires autour des parasites et il nous a été possible de dénombrer jusqu'à 10 parasites dans une même cellule. Ce phénomène a été bien mis en évidence dans des tentatives de dépistage utilisant la méthode des empreintes de la masse viscérale des huîtres, après coloration au bleu de Toluidine ou au Giemsa : les granulocytes ont alors une forme arrondie, leur noyau est condensé, déjeté contre la membrane cellulaire et leur cytoplasme peut contenir de très nombreux parasites. Les formes parasitaires sont parfois libres, probablement par lyse des granulocytes.

## 3) Microscopie électronique.

En dehors des caractéristiques ultrastructurales propres au parasite qui ont amené PICHOT et Coll. (2) à la création d'un genre nouveau, et que nous avons nous-mêmes retrouvées, l'aspect parasitaire intra-granulocytaire est confirmé par l'étude en microscopie électronique.

La position intra-cytoplasmique des parasites s'accompagne de modifications dégénératives de la cellule hôte (éléments vésiculaires, amas de pigments, formations pseudo-myéliniques uni ou multicentriques) tandis que le parasite comporte des micro-tubules au niveau du noyau ainsi que des lamelles concentriques dans les mitochondries, qui neuvent traduire une importante activité métabolique. Aucun stade

sporogonique n'a été observé et il est vraisemblable qu'étant donné la rareté des figures de mitose et l'absence de stade de division caractéristique, le parasite se multiplie par schizogonie rapide.

### B - Expérimentation

Les résultats des expériences de contamination sont rapportés dans les 3 tableaux suivants : (Tableaux II - III - IV)

TABLEAU II : Taux d'infestation histologique par échantillonnages mensuels après immersion en Mars 1981 de lots d'huîtres saines.

NOMBRE D'HUITRES	AVRIL	MAI	JUIN	JUIL	AOUT	SEPT	OCT	NOV
	15	15	15	15	15	15	15	15
BINIC (Parc en eau profonde)	-	0	-	①	60 %	-	20 % + ①	33 % + ①
PAIMPOL (Parc découvrant)	-	0	7 %	13 % + ①	40 % + ①	-	64 %	80 % + ①
CARANTEC (Parc découvrant)	0	②	0	0	②	0	13 %	7 % + ①
ELORN (Parc découvrant)	-	-	0	13 %	23 %	40 % + ②	53 %	66 %
BINIC (Parc en eau profonde)					Immersion au mois d'Août de lots d'huîtres de LOUMERGAT	-	-	0
PAIMPOL (Parc découvrant)						-	-	7 % + ①

○ Nombre d'huîtres suspectes (densité et localisation de la réaction hémocytaire).

TABLEAU III : Taux d'infestation histologique au cours de contaminations expérimentales par *B. ostreae*.

MOIS D'EXPE- RIMENTATION	NOMBRE D'HUITRES →	I <sup>er</sup>		II <sup>e</sup>		III <sup>e</sup>		IV <sup>a</sup>		V <sup>a</sup>		VI <sup>e</sup>							
		OBSERVEES	SUSPECTES	OBSERVEES	SUSPECTES	OBSERVEES	SUSPECTES	OBSERVEES	SUSPECTES	OBSERVEES	SUSPECTES	OBSERVEES	SUSPECTES	OBSERVEES	SUSPECTES				
PROXIMITY	E	0		0		10	2	1	10	3	0	10	6	0	19	15	1		
	M	0		0		2	0		2	0					1	1			
FEEDING	E	10	0	0	10	0	0	10	2	0	10	3	0	10	6	1	45	35	2
	M	0		0		4	0	0	5	3	0	2	1	0	4	4	0		
INJECTION	E	10	0	0	10	1	1												
	M	5	0	0	1	0	0												
INJECTION	E	0		10	0	0	18	3	1										
	M	1	0	1	0		0												

E : Echantillonnages mensuels.

M : Huître (s) mourante (s) prélevée (s) entre deux échantillonnages.

TABLEAU IV : Taux d'infestation histologique au cours de contaminations expérimentales par *B. ostreae* (BO) et *M. refringens* (MR).

MOIS D'EXPERIMENTATION NOMBRE D'HUITRES PROXIMITY		I <sup>er</sup>			II <sup>e</sup>			III <sup>e</sup>			IV <sup>e</sup>			V <sup>e</sup>			VI <sup>e</sup>		
		OBSERVEES	INFECTEES	SUSPECTES	OBSERVEES	INFECTEES	SUSPECTES	OBSERVEES	INFECTEES	SUSPECTES	OBSERVEES	INFECTEES	SUSPECTES	OBSERVEES	INFECTEES	SUSPECTES	OBSERVEES	INFECTEES	SUSPECTES
Huitres du banc de LOUMERGAT	E	0			0			7	4MR		7	5MR	1	7	4MR		14	4MR	
	M	0			0												2	2BO 1MR	
Huitres d'origine anglaise	E	0			0			5	1BO OMR	1	5	1BO OMR	1	10	7BO OMR				
	M	0			3	1BO OMR		1	OBO OMR		1	1BO OMR							

E : Echantillonnages mensuels.

M : Huitre (s) mourante (s) prélevée (s) entre deux échantillonnages.

## DISCUSSION

Aspect macroscopique.

Les lésions macroscopiques des branchies ou du manteau (échancrures et perforations) sans être spécifiques sont assez caractéristiques pour aider au dépistage. Elles se distinguent par leurs formes régulières et la présence d'un épaissement blanchâtre réactionnel les limitant.

Physiopathologie ; pathogénèse.

- Contrairement à d'autres affections parasitaires (*Marteilia refringens*, *Minchinia armoricana*), l'aspect qui est actuellement très caractéristique de toute infection par *B. ostreae* est la réaction hémocytaire granuleuse, dense, focale ou étendue. Ceci a une implication pratique très intéressante au niveau du dépistage histologique dans la mesure où dans l'état actuel de la pathologie ostréicole, la plus petite lésion de ce genre, surtout localisée dans les branchies est à priori évocatrice d'une infection par *B. ostreae*. Même si aucune forme parasitaire évidente ne peut être observée, la réaction granuleuse intense nous paraît devoir être considérée comme suspecte.

- D'autre part nous avons vu que le parasite loin d'être éliminé par phagocytose semble se multiplier aux dépens des granulocytes d'*O. edulis*, les transformant à la limite en pseudo-kystes comparables à ceux observés chez les vertébrés dans le cas de leishmaniose et de toxoplasmose.

- De plus, il semble que la dissémination du parasite libre ou intra-cellulaire puisse se faire dans tous les tissus de l'huitre par voie hémolympatique. Il est par ailleurs probable que la réaction hémocytaire vis-à-vis du parasite soit responsable des lésions des branchies ou du manteau observées en macroscopie.

Il est alors permis de se demander si les branchies et le manteau sont les voies principales de pénétration du parasite ou bien si au contraire ils représentent une possibilité d'élimination d'éléments étrangers comme nous avons pu le constater dans de précédentes expériences visant à induire des réactions par des injections de talc dans la masse viscérale (5).

En tout état de cause, les granulocytes apparaissent comme des cellules cibles pour *B. ostreae*, les parasites n'ayant jamais été retrouvés dans d'autres cellules : épithéliales, conjonctives, hyalino cytes normaux ou tumoraux.

L'ensemble de ces observations nous permet donc de définir cette épizootie comme étant une parasitose hémocytaire.

#### Relation avec les mortalités observées sur parcs.

Hormis les altérations des branchies ou du manteau, les huîtres infectées ne présentent aucun des symptômes relevés au cours de la maladie de la glande digestive de l'huître plate (parasitose à *M. refringens* : amaigrissement, transparence (6)).

Il faut donc semble-t-il chercher les causes de ces pertes dans la mobilisation massive et l'altération du système hémocytaire (baisse des possibilités de défense, déficience nutritionnelle) avec consécutivement des lésions des branchies (anoxie partielle).

#### Expérimentation.

. En milieu naturel, il apparaît que les huîtres sont histologiquement infectées après un séjour variant de 3 à 7 mois : 3 à PAIMPOL dans une des zones actuellement les plus infectées et 7 à CARANTEC où le stock d'huîtres plates est réduit. Par la suite, le taux d'infection augmente régulièrement, atteignant 4 à 5 mois plus tard 60 à 80 %, sauf à CARANTEC et à BINIC : 13 % et 33 %. Dans le dernier cas, des mortalités sont intervenues entre les échantillonnages d'Août (60 % d'infection) et d'Octobre (20 %). (Tableau II).

La connaissance que nous avons maintenant de la maladie hémocytaire à *B. ostreae* nous permet deux remarques :

- Le parasite est plus actif en période estivale, les températures étant sans doute alors plus favorables à son développement. Cependant la contamination et même des mortalités peuvent intervenir en période froide.
- Il est également plus virulent dans les stocks d'huîtres mis sur parcs découvrants, l'émersion représentant sans doute pour les huîtres un stress supplémentaire. La maladie peut toutefois se développer en eau profonde.

. En aquarium et dans nos conditions expérimentales, l'infection a débuté au 3ème mois d'expérience Proximity et Feeding atteignant au 6ème mois des taux variant de 57 à 77 % (Tableau III). Il est important de remarquer que les huîtres de LOUMERGAT ont également été contaminées (Tableau IV) et que par conséquent leur apparente résistance à *M. refringens* n'a pas été croisée vis-à-vis de *B. ostreae*. De plus,

nous avons relevé une nombre croissant d'huîtres mourantes après infection. Il convient également de signaler qu'au 4ème mois d'expérience Proximity, seules 9 huîtres de PAIMPOL étaient encore vivantes sur les 60 de départ et qu'au 6ème mois, il n'en restait que 5 dont 2 infectées.

Ces observations mettent clairement en évidence la transmission directe du parasite, son haut pouvoir infectieux et sa responsabilité dans les mortalités enregistrées. Il est intéressant de remarquer que *B. ostreae* et *Perkinsus marinus* = *Dermocystidium marinum* (3) sont les seuls protozoaires parasites dont la transmission à des organismes sains a pu être réalisée expérimentalement en laboratoire. L'essai de contamination croisée que nous avons réalisé montre d'ailleurs que si les huîtres originaires de LOUMERGAT et d'ANGLETERRE ont été contaminées par *B. ostreae*, les huîtres anglaises dans nos conditions expérimentales n'ont pas été infectées par *M. refringens* (nouvelle tentative infructueuse).

Les huîtres ayant subi une infection d'hémocytes infectés ont également été contaminées. Ceci représente un argument supplémentaire en faveur de la spécificité hémocytaire de l'affection parasitaire.

#### CONCLUSION

Le protozoaire parasite *B. ostreae* provoque chez *O. edulis* des lésions qui après étude en histologie et en microscopie électronique nous autorisent à définir cette parasitose comme étant une maladie hémocytaire. Les formes parasitaires observées chez l'huître plate sont capables de contaminer directement d'autres huîtres.

Ce parasite peut engendrer des mortalités tout au long de l'année avec cependant des maxima en période estivale et dans des conditions de stress.

Son grand pouvoir pathogène est sans doute lié au fait :

- d'une part que les petites cellules parasitaires ont un pouvoir infectieux. Si un cycle biologique existe en dehors d'*O. edulis* il n'est pas nécessaire à la contamination.
- d'autre part qu'il affecte le système hémolympatique dont les diverses fonctions sont alors perturbées.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 COMPS (M.), TIGE (G.), GRIZEL (H.) - 1980.- Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* L. C. R. Acad. Sc. PARIS, D, 2, 383-384.
- 2 PICHOT (Y.), COMPS (M.), TIGE (G.), GRIZEL (H.), RABOUIN (M.A.) - 1979.- Recherches sur *Bonamia ostreae*, gen.n., sp.n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis*. Rev. Trav. Instit. Pêche. Marit., 43, n° 1, 131-140.
- 3 RAY (S.) - 1954.- Biological studies of *Dermocystidium marinum*. The Rice Institute Pamphlet, Special issue, XI, 1 vol, 114 p.



- 4 BALOUET (G.), PODER (M.), CAHOUR (A.) - 1982.- Haemocytic parasitosis. Morphology and pathology of lesions in french flat oyster *Ostrea edulis* L. Aquaculture, en cours de publication.
- 5 PODER (M.), CAHOUR (A.), BALOUET (G.) - 1982.- Réactions hémocytaires à l'injection de corps bactériens ou de substances inertes chez *Ostrea edulis* L. Malacologia, 1982, 22, 1-2, 9-14.  
Actes du VII Congrès International de Malacologie, PERPIGNAN, 1980.
- 6 BALOUET (G.) - 1979.- *Marteilia refringens*. Considération of the life cycle and development of Abers disease in *Ostrea edulis*. Mar. Fish. Rev., 1-2, 64-66.
- 7 Rapports de Contrats CNEXO, n° 79/2066 et 80/2283 - Etudes sur la pathologie des huîtres.

PLANCHE I

## Parasitose hémocytaire :

- 1 - Perforation branchiale avec réaction inflammatoire abcédée  
x 31,25
- 2 - Très nombreuses formes du parasite *B. ostreae*, libres ou intra-granulocytaires.  
x 100
- 3 - Eléments parasitaires de petite taille, à noyau très basophile, le plus souvent en position intra-cytoplasmique : G granulocyte P : parasite.  
x 1000
- 4 - Même aspect que figure 3, sur coupe semi-fine.  
x 1000

PLANCHE II

## Parasitose hémocytaire :

- 1 - Infection parasitaire débutante d'un granulocyte.  
Altérations cytoplasmiques modérées. Ng : Noyau du granulocyte ;  
Cg : Cytoplasme du granulocyte ; Np : Noyau du parasite ;  
Cp : Cytoplasme du parasite avec des haplosporosomes (H).  
Gr 6000
- 2 - Importantes altérations dégénératives du cytoplasme d'un granulocyte avec plusieurs formes parasitaires en cours de phagocytose dans des vésicules = phagosomes ( $v_{ph}$ ).  
Gr 5000

PLANCHE I



