

## ETUDE MORPHOLOGIQUE D'UNE INFECTION RICKETTSIENNE DE LA PALOURDE *Ruditapes philippinarum* ADAM et REEVES

Michel COMPS

Laboratoire de Pathologie, ISTPM., 1, rue Jean Vilar, 34200 Sète.

### *Abstract*

MORPHOLOGICAL STUDY OF A RICKETTSIAL INFECTION  
OF ASARI CLAMS *Ruditapes philippinarum* ADAM AND REEVES.

Intracytoplasmic microcolonies of a new rickettsia were observed in epithelial cells of the digestive gland of *Ruditapes philippinarum*. The intracellular development includes several stages with peculiar structure. The systematic position of this procaryote is discussed.

### *Résumé*

Des microcolonies intracytoplasmiques d'une nouvelle rickettsie ont été observées chez la palourde *Ruditapes philippinarum*. Les différents stades du développement du microorganisme sont décrits et sa position systématique est discutée.

Signalées seulement depuis quelques années chez les mollusques bivalves marins (HARSHBARGER *et al.*, 1977 ; COMPS *et al.*, 1977), les rickettsies représentent un groupe d'agents infectieux dont le rôle vis-à-vis de ces hôtes est encore mal connu.

Plutôt rares chez les lamellibranches comme les huîtres, les rickettsies paraissent être plus régulièrement associées aux bivalves fouisseurs dont certains, tel *Donax trunculus*, recèlent des microorganismes de façon quasi-permanente avec des taux d'infestation pouvant atteindre 46 % (COMPS et RAIMBAULT, 1978).

La mise en évidence récente d'une infection rickettsienne chez *Ruditapes philippinarum* confirmerait cette tendance qui pourrait révéler un lien entre la sensibilité de l'hôte et son mode de vie. Le procaryote mis en cause dans cette nouvelle infection a été décelé chez 12 % des individus d'une population de palourdes de Vendée affectée par des mortalités. Ses caractéristiques originales par rapport à celles des rickettsies actuellement connues chez les pélécyodes marins sont décrites dans la présente note.

Basée sur des examens histologiques, cette étude a été réalisée à partir d'animaux fixés dans le liquide de Davidson par la microscopie photonique et de tissus ayant subi la double fixation glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium en tampon cacodylate de sodium pour la microscopie électronique.

### Examen en microscopie photonique.

Comme dans tous les cas antérieurement décrits, l'infection se manifeste au niveau de l'épithélium des diverticules digestifs par la présence de plages finement granuleuses, de forme sphérique ou ovoïde dont la taille varie entre 20 et 25  $\mu\text{m}$ . Ces formations ont un contenu basophile, rose à la réaction de Feulgen et Gram négatif (Pl. 1 - 1). Sur coupes semi-fines, on observe qu'elles sont intracellulaires et correspondent à une vacuole intracytoplasmique occupée par de nombreux microorganismes. Deux types de plages coexistent : des plages à granulations très chromophiles et des plages dont les granulations ont une affinité moins marquée pour le bleu de toluidine.

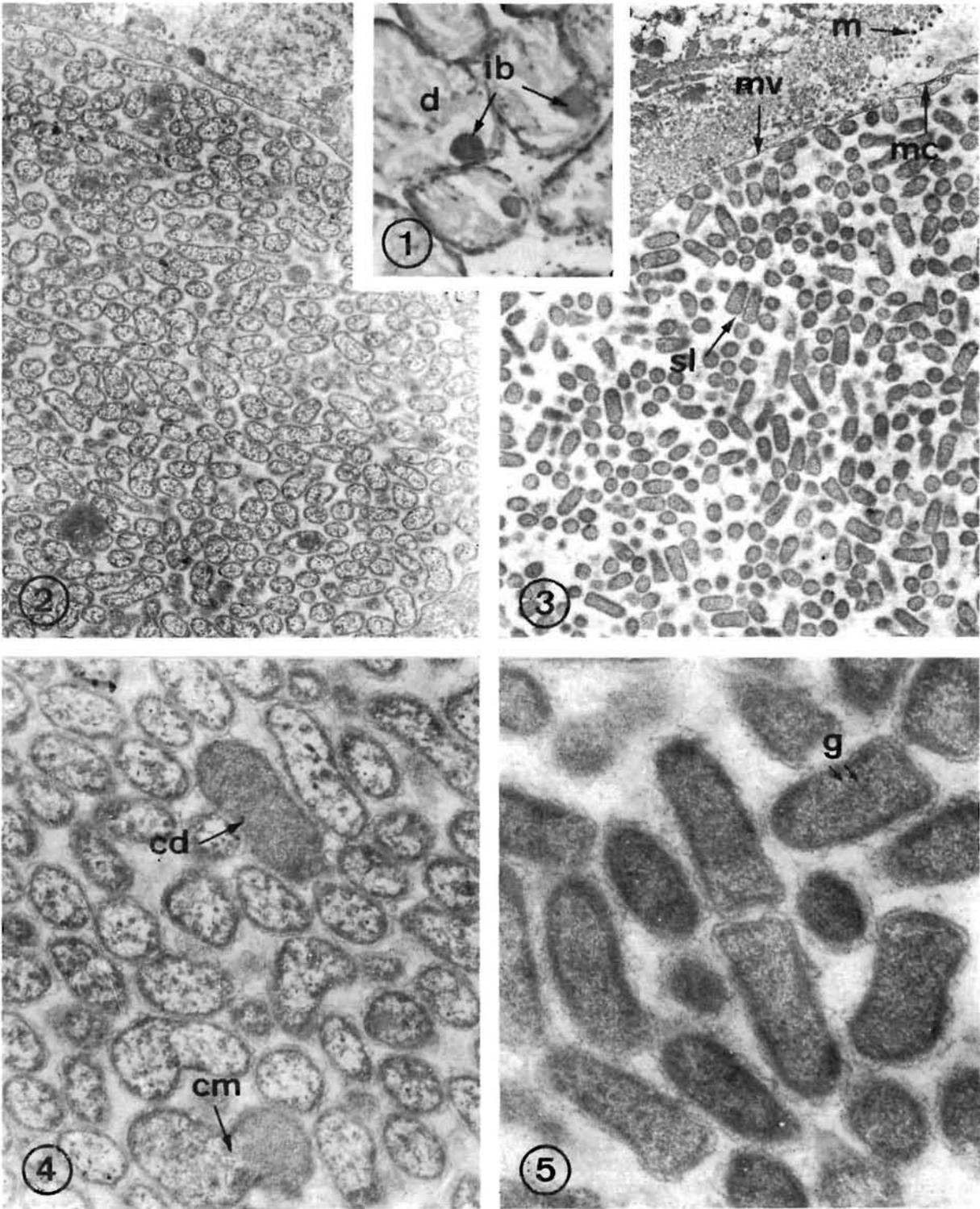
### Examen en microscopie électronique.

L'étude du microorganisme a permis de noter l'existence de deux types structuraux correspondant à la distinction établie en fonction du caractère basophile des microcolonies.

#### *a - Forme claire* (Pl. 1 - 2 et 4).

Généralement bacilliformes, ces microorganismes présentent un certain pléomorphisme. Leur longueur varie de 200 à 1 400 nm, et leur diamètre entre 400 et 600 nm. Certains microorganismes sont réniformes, d'autres montrent une double constriction latérale indiquant le début d'une division binaire. Ils sont limités par un ensemble paroi-membrane plasmique de 15 à 20 nm d'épaisseur ; la paroi a un contour sinueux. Le contenu cytoplasmique de nature granulo-fibrillaire leur confère un aspect réticulé : des grains denses assimilables à des ribosomes sont regroupés en petits amas dont la densité est plus grande au voisinage de la membrane plasmique ; un fin réseau de fibrilles est associé à ce matériel granuleux dense.

- 1 — *Coupe au niveau de la glande digestive* : les microcolonies de rickettsies apparaissent sous forme d'inclusions basophiles (ib) localisées dans l'épithélium des diverticules digestifs (d) (Mann-Dominici.  $\times 200$ ).
  - 2 — *Portion d'une microcolonie formée de corps clairs* ; noter le pléomorphisme des microorganismes (M. E.  $\times 7\ 000$ ).
  - 3 — *Microcolonie de corps denses* : en section longitudinale (sl), les germes présentent un aspect cunéiforme membrane vacuolaire (mv), membrane de la cellule infectée (mc), microvillosités (m) (M. E.  $\times 7\ 000$ ).
  - 4 — *Dans certaines microcolonies de corps bacilliformes clairs apparaissent des corps mixtes (cm) et des corps denses (cd)* (M. E.  $\times 18\ 000$ ).
  - 5 — *Portion d'une microcolonie de corps denses présentant le plus souvent une extrémité aplatie* ; le cytoplasme est constitué de grains denses (g) répartis de façon homogène (M. E.  $\times 33\ 000$ ).
- 
- 1 — *Section through digestive gland* : basophilic rickettsial inclusions (i.b.) in epithelial cells of digestive diverticulum (d), Mann-Dominici.  $\times 200$ .
  - 2 — *Microcolony of pleomorphic reticulate bodies*, E.M.  $\times 7\ 000$ .
  - 3 — *Microcolony of dense bodies* : in longitudinal section these forms appear wedge-shaped, vacuolar membrane (m.v.), infected-cell membrane (m.c.), micro-villosities (m.), E.M.  $\times 7\ 000$ .
  - 4 — *Microcolony including intermediate bodies (c.m.), and dense bodies (c.d.)*, E.M.  $\times 18\ 000$ .
  - 5 — *Dense bodies with truncated point* : the cytoplasm, ribosome rich, is finely granular (g) and homogeneous, E.M.  $\times 33\ 000$ .



*b - Forme dense* (Pl. 1 - 3 et 5).

Leur aspect est voisin de celui des formes claires mais plus régulier. En tenant compte des variations dues au plan de la section, ils se présentent comme des bâtonnets légèrement cunéiformes une des extrémités étant aplatie, l'autre plus ou moins effilée et arrondie ; ils mesurent de 800 à 1 000 nm de long et de 300 à 400 nm de diamètre.

Le cytoplasme est constitué de grains denses entourés d'une fine auréole claire, uniformément répartis sur l'ensemble du germe ; cette texture régulière contraste avec celle des formes claires. On remarque qu'un certain nombre de ces particules sont regroupées par paires, les extrémités aplaties étant contiguës : cette disposition pourrait correspondre à la fin d'une division binaire par scissiparité.

Le système-enveloppe est identique à celui des formes claires : les sinuosités de la paroi pourraient être interprétées comme des décollements anormaux de celle-ci, probablement dus à l'action du fixateur.

Si les microcolonies de corps denses sont homogènes l'observation de nombreuses cellules infectées montre que les microcolonies de formes réticulées peuvent renfermer des formes aberrantes. Généralement plus volumineuses (1 100 à 1 300 nm × 600 à 800 nm), ces formes se distinguent encore par la texture de leur cytoplasme : celui-ci peut être pour partie du type réticulé, pour partie du type dense ou encore entièrement du type dense.

#### **Effet pathogène.**

L'action cytopathogène du procaryote se manifeste principalement par une hypertrophie de la cellule épithéliale due à l'extension de la microcolonie de rickettsies aux dépens du cytoplasme. Fortement distendue, la membrane de la cellule-hôte finit par se rompre libérant ainsi, dans la lumière des diverticules digestifs, les microorganismes contenus dans une enveloppe constituée par la membrane épaissie de la vacuole de développement. On ne note pas cependant de modifications importantes du cytoplasme de la cellule infectée.

Si dans certains cas les lésions cellulaires sont relativement nombreuses, elles n'entraînent pas toutefois de dommages importants pour l'épithélium digestif, ni de réactions secondaires de type inflammatoire. On n'a pu de ce fait établir de lien précis entre l'infection et les mortalités constatées, d'autant que cette infection n'a pas été reproduite expérimentalement.

#### **Position systématique - Discussion.**

Bien que présentant un certain nombre de caractères communs avec la plupart des Rickettsiales décrites chez les mollusques bivalves, notamment par sa structure et son développement intravacuolaire, ce germe s'en distingue sensiblement par l'existence d'un deuxième type structural de particules, caractérisé par un cytoplasme dense et homogène. Par ailleurs, la présence de microcolonies réunissant les deux types structuraux, constituant un stade intermédiaire entre ces derniers, permet d'envisager, sinon l'existence d'un cycle de développement, du moins une transformation des corps réticulés en corps denses.

Cette évolution diffère notablement de celle qui est observée dans le cycle complexe qui assure la multiplication des Chlamydiales et des *Rickettsiella* : la modification fondamentale notée chez le parasite de la palourde consiste en une densification du cytoplasme sans différenciation de nucléoïde, sans redistribution du contenu cellulaire et enfin sans remaniement du système paroi-membrane plasmique.

Le polymorphisme de ce microorganisme rappelle celui d'une rickettsie récemment décrite par BONAMI et PAPPALARDO (1980) chez le crustacé *Carcinus mediterraneus* Czerniavski. Celui-ci comporte en effet des formes bactériennes qui se multiplient à l'intérieur d'une vacuole cytoplasmique : ces formes bactériennes subissent des modifications conduisant, en passant par des formes de transition, à des formes denses aux électrons. En excluant l'hypothèse d'un cycle de type chlamydien, PAPPALARDO (1981) a inclus la rickettsie du crabe dans l'ordre des Rickettsiales et

mentionné un rapprochement avec les *Wolbachieae*, tenant ainsi compte de la pathogénicité pour un arthropode, sans éclairer davantage le problème taxonomique posé.

Dans le cas de la rickettsie de la palourde, on retiendra outre ses caractéristiques générales, l'absence d'un véritable cycle de type chlamydien pour l'inclure dans l'ordre des Rickettsiales. Son association à un invertébré inciterait à la rattacher à la tribu des *Wolbachieae* alors que son mode de développement à l'intérieur d'une vacuole suggérerait de la rapprocher des *Coxiella* (MOULDER, 1974). L'existence de deux formes chez *Coxiella burneti* (ROSENBERG et KORDOVA, 1960; BURTON *et al.*, 1971) irait dans le sens d'un tel rapprochement.

Manuscrit déposé le 21 avril 1983, accepté le 15 juin 1983.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BONAMI (J.R.) et PAPPALARDO (R.), 1980. — Rickettsial disease in the crab *Carcinus mediterraneus* Czer. (Crustacea Decapoda). — *Experientia*, **36**: 180-181.
- BURTON (P.R.), KORDOVA (N.) et PARETSKY (D.), 1971. — Electron microscopic studies of the rickettsia *Coxiella burneti*: entry, lysosomal response and fate of rickettsial DNA in L cells. — *Can. J. Microbiol.*, **17**: 499-502.
- COMPS (M.), BONAMI (J.R.) et VAGO (C.), 1977. — Mise en évidence d'une infection rickettsienne chez les huîtres. — *C.R. Acad. Sci. Paris*, 285 D: 427-429.
- COMPS (M.) et RAIMBAULT (R.), 1978. — Infection rickettsienne de la glande digestive de *Donax trunculus* Linné. — *Science et Pêche. Bull. Inst. Pêches marit.*, 281.
- HARSHBARGER (J.C.), SING CHEN CHANG et OPTO (S.V.), 1977. — Chlamydiae (with Phages), Mycoplasmas, and Rickettsiae in Chesapeake Bay Bivalves. — *Science*, vol. 196: 66-668.
- MOULDER (J.W.), 1974. — Rickettsiales. in "Berbey's manual of determinative Bacteriology", 8<sup>e</sup> ed. (Buchanan R.E. and Gibbons N.E.). — *Williams and Wilkins Co.* Baltimore: 882-914.
- PAPPALARDO (R.), 1981. — Recherches sur les infections à virus et à procaryotes chez le crustacé marin *Carcinus mediterraneus* Czerniavski. — Thèse 3<sup>e</sup> Cycle, Montpellier: 155 p.
- ROSENBERG (M.) et KORDOVA (N.), 1960. — Study of intracellular forms of *Coxiella burneti* in the electron microscope. — *Acta. virol.*, **4**: 52-55.