

**ETUDE HISTOPATHOLOGIQUE ET ULTRASTRUCTURALE
D'UNE MALADIE RICKETTSIENNE CHEZ LE CRABE
CARCINUS MEDITERRANEUS CZERNIAVSKI
(CRUSTACE DECAPODE)**

par Régine PAPPALARDO et Jean-Robert BONAMI ⁽¹⁾

Les infections à rickettsies observées chez divers invertébrés ne sont connues pour les crustacés que chez un isopode terrestre, *Armadillidium vulgare* (VAGO *et al.*, 1970), et un amphipode d'eau douce, *Crangonyx* proche de *C. floridanus* (FEDERICI *et al.*, 1974). Les microorganismes responsables de ces affections sont rapprochés des *Rickettsiella*.

Dans le milieu marin, de telles maladies ont été récemment décrites chez les mollusques. HARSHBARGER *et al.* (1977) ont observé des procaryotes d'allure rickettsienne chez *Mercenaria mercenaria* et *Mya arenaria*. COMPS *et al.* (1977, 1978) font état de maladies rickettsiennes en relation avec des mortalités naturelles, dont les agents sont rapprochés des *Coxiella* chez *Crassostrea gigas* et *Donax trunculus*. Egalement, une rickettsie proche des *Coxiella* est mise en évidence chez *Tellina tenuis*, à la suite d'une étude sur les facteurs biotiques intervenant sur les fluctuations des populations naturelles de ce mollusque (BUCHANAN, 1978). Dans tous les cas, il s'agit d'infections localisées aux cellules épithéliales des tubules de la glande digestive et aucune infection expérimentale n'a été rapportée à la suite de ces observations.

Au cours d'une étude écopathologique réalisée sur des crabes *Carcinus mediterraneus* des étangs languedociens et se rapportant à une maladie virale (PAPPALARDO *et al.*, 1979), des animaux récoltés dans l'étang de Thau et maintenus au laboratoire ont montré des mortalités sans symptôme précis, si ce n'est un affaiblissement et une absence de prise de nourriture. Les contrôles virologiques habituels n'ont pas permis d'attribuer ces mortalités à une des maladies virales connues chez ce crustacé et les examens microbiologiques usuels à une affection bactérienne ou fongique. En revanche, nos recherches ont abouti à l'isolement et à l'étude d'un microorganisme pathogène, d'allure rickettsienne, chez ce crabe.

1. Matériel et méthodes.

Pour l'histologie, les tissus ont été fixés par le mélange de Davidson (SHAW et BATTLE, 1957). Des coupes de 6 µm d'épaisseur ont été colorées selon la méthode de Mann Dominici, de Feulgen (MARTOJA et MARTOJA, 1967) ou de Weigert pour le Gram (HUMASSON, 1962).

(1) Laboratoire de Pathologie Comparée, C.N.R.S.-E.P.H.E.-I.N.R.A., Université des Sciences, 34060 Montpellier Cedex. Travail réalisé dans le cadre d'une convention C.N.E.X.O.-I.N.R.A.

Pour la microscopie électronique, le matériel, après double fixation glutaraldéhyde-tétraoxyde d'osmium (PERKINS, 1969), a été inclus dans l'Epon. Les coupes semi-fines ont été colorées à chaud au Bleu de Toluidine à 1 % en présence de borate de sodium à 1 %. Les coupes ultrafines ont été contrastées selon REYNOLDS (1963).

Les infections expérimentales ont été réalisées à partir de broyats d'hépatopancréas de crabes malades dans un milieu minéral isotonique en inoculant 0,2 ml par crabe.

2. *Etude histopathologique.*

Sur des coupes d'hépatopancréas de crabe malade, la réaction nucléale de Feulgen met en évidence des plages cytoplasmiques Feulgen positif au niveau des cellules du tissu interstitiel. La coloration de Mann Dominici montre que ces plages sont formées d'éléments en bâtonnet, basophiles, de type bactérien, de 1,5 à 2 μm de long sur 0,7 μm de large. Ces microorganismes forment des colonies contenues dans des vacuoles cytoplasmiques de 10 à 20 μm de diamètre. La coloration de Gram sur coupes précise leur nature Gram négative. A ce stade, leur morphologie est difficilement décelable car ils forment une masse compacte intravacuolaire, rejetant le noyau à la périphérie de la cellule. A un stade ultérieur du développement, la membrane cytoplasmique, distendue, limite une colonie volumineuse au sein de laquelle n'apparaît plus que le noyau. Cet état aboutit à l'éclatement de la cellule.

Certains éléments, de morphologie différente, présentent une réaction positive à la coloration de Gram, ce qui traduit des modifications de la structure de la paroi. Entre les tubules digestifs, seuls quelques hémocytes conservent une apparence saine.

L'étude réalisée sur les autres tissus de l'animal montre que ces microorganismes se retrouvent dans le tissu interstitiel au niveau du tractus digestif, des branchies, des gonades ; mais la prolifération n'atteint pas le degré d'infestation observé dans l'hépatopancréas.

Ces résultats, en particulier le développement intravacuolaire au niveau des cellules du tissu interstitiel, sont confirmés par l'étude histopathologique réalisée sur des coupes semi-fines (planche I, fig. 1 et 2).

3. *Etude ultrastructurale.*

La microscopie électronique a permis de mettre en évidence plusieurs types structuraux au cours du développement de cet agent pathogène :

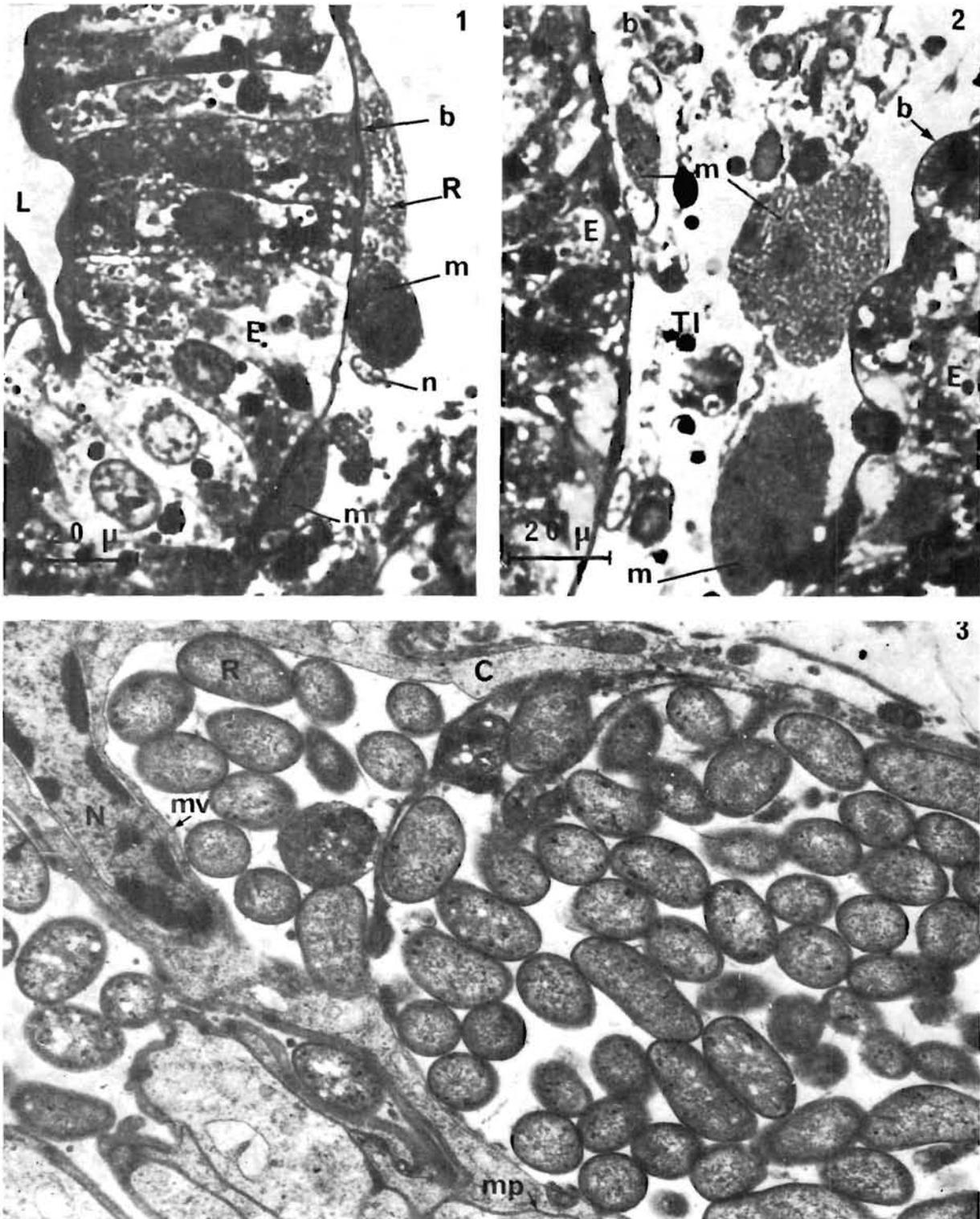
a) Formes de multiplication.

Les premières lésions histologiques sont caractérisées par la présence de microcolonies uniquement constituées de formes de multiplication. De type bactérien, incluses dans des vacuoles de développement, elles montrent un certain pléomorphisme et sont le plus souvent allongées de 1 500 à 2 300 nm sur 700 nm de large, parfois reiniformes ou sphériques (planche I, fig. 3). Elles sont limitées par deux membranes de type unitaire séparées par un espace de 1,5 nm d'épaisseur. La plus externe, ou paroi, mesure 7,5 nm d'épaisseur et la membrane plasmique, de 7,5 nm, renferme un matériel granulaire assimilable à des ribosomes ainsi que des granulations denses aux électrons, de 20 à 40 nm de diamètre, dont la structure rappelle une accumulation de ribosomes. La partie centrale contient un réseau lâche et fibreux, caractéristique de l'ADN limitant des zones claires aux électrons. Quelques microorganismes présentent une constriction transversale indiquant un mode de multiplication par division binaire (planche II, fig. 4, 5, 6 et 7).

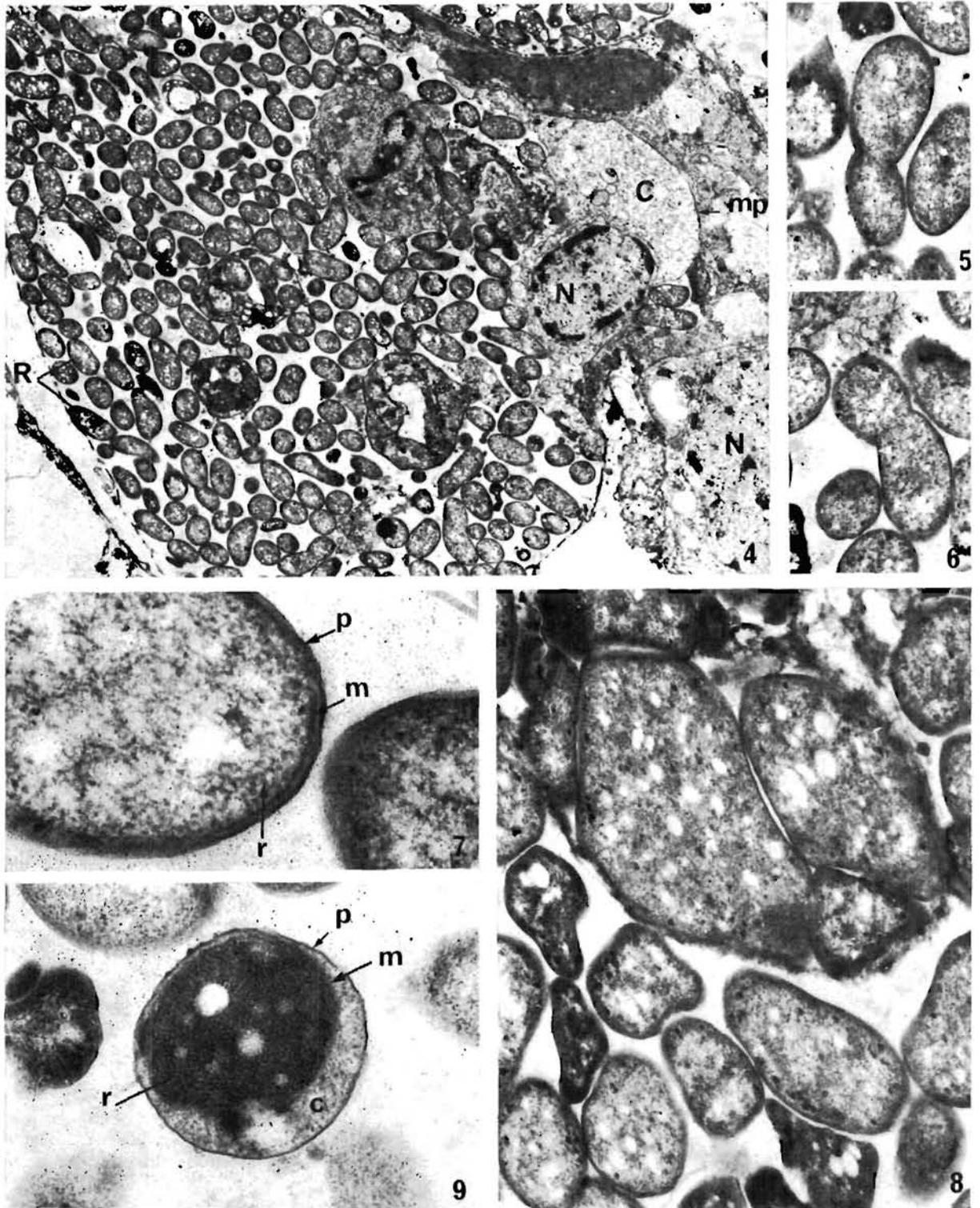
b) Autres types de microorganismes.

Formes géantes.

Certains de ces procaryotes, présentant une structure interne identique aux formes de multiplication, atteignent des dimensions de 3 500 nm de long sur 1 600 nm de diamètre. Paroi et membrane plasmique restent accolées et ne subissent aucune modification par rapport aux formes végétatives. Ces formes géantes sont peu nombreuses et aucune structure cristalline n'a été observée dans leur cytoplasme (planche II, fig. 8).



PL. I. — 1 et 2: Hépatopancreas infecté: les rickettsies forment des microcolonies de grande taille dans les cellules du tissu interstitiel; certaines de ces cellules éclatent et libèrent les microorganismes; coupe semi-fine, coloration au bleu de toluidine boraté. $G \times 800$ (E: épithélium, L: lumière du tubule hépatopancréatique, TI: tissu interstitiel, n: noyau, b: membrane basale, R: rickettsies, m: microcolonie); 3: Cellules du tissu interstitiel au niveau de l'hépatopancreas renfermant des formes de multiplication du microorganisme au sein de vacuoles; microscopie électronique, $G \times 13\,200$ (N: noyau, C: cytoplasme, R: rickettsies, mp: membrane plasmique, mv: membrane vacuolaire).



Pl. II. — 4 : Cellule du tissu interstitiel hypertrophiée contenant des formes de multiplication de la rickettsie, rejet du cytoplasme et du noyau à la périphérie de la cellule, microscopie électronique $G \times 8\,000$ (C : cytoplasme, N : noyau, mp : membrane plasmique, R : rickettsies) ; 5 et 6 : Formes de multiplication en cours de division, microscopie électronique $G \times 24\,000$; 7 : Détail de la paroi et de la membrane plasmique d'un microorganisme, microscopie électronique $G \times 66\,000$ (p : paroi, m : membrane plasmique, r : ribosomes) ; 8 : Formes géantes du microorganisme, microscopie électronique $G \times 17\,250$; 9 : Forme aberrante montrant une concentration de ribosomes, une paroi épaisse et un décollement de la membrane cytoplasmique, microscopie électronique $G \times 37\,500$ (p : paroi, m : membrane plasmique, c : cytoplasme, r : ribosomes).

De rares formes aberrantes montrent un décollement de la paroi et de la membrane plasmique, limitant un espace de type cytoplasmique. La membrane interne renferme une masse de ribosomes, et la paroi, plus dense aux électrons, s'épaissit jusqu'à 8 à 10 nm (planche II, fig. 9).

Formes denses aux électrons.

Les microorganismes subissent d'importantes modifications structurales qui leurs confèrent une morphologie différente. Des vacuoles cytoplasmiques apparaissent, et parallèlement, on constate une accumulation des ribosomes contre la membrane plasmique qui met plus nettement en évidence la présence d'un matériel fibrillaire dans la zone médullaire (planche III, fig. 11). A ce stade, le germe, qui apparaît déformé, se condense progressivement pour donner des structures totalement denses aux électrons (planche III, fig. 12).

Paroi et membrane plasmique ne subissent pas de modifications notables quant à leur structure et à leur épaisseur, mais deviennent sinueuses, conférant alors à ces formes une morphologie variable (planche III, fig. 13).

La multiplication de ces procaryotes distend la cellule-hôte dont aucune structure n'est alors visible, si ce n'est le noyau. C'est à ce moment qu'apparaissent les modifications structurales aboutissant aux formes denses. Aucune figure de division binaire n'est alors décelable. La cellule distendue finit par éclater, ce qui libère des microorganismes dans le milieu intérieur de l'animal (planche III, fig. 14).

4. Infections expérimentales.

L'inoculation de broyats d'hépatopancreas de crabe malade à des animaux sains a permis de reproduire la maladie. L'évolution de cette affection est lente, sans symptôme précis, et aboutit à la mortalité des individus infectés entre le trentième et le trente-cinquième jour suivant l'inoculation. L'agent a pu être retrouvé dans les tissus des animaux infectés.

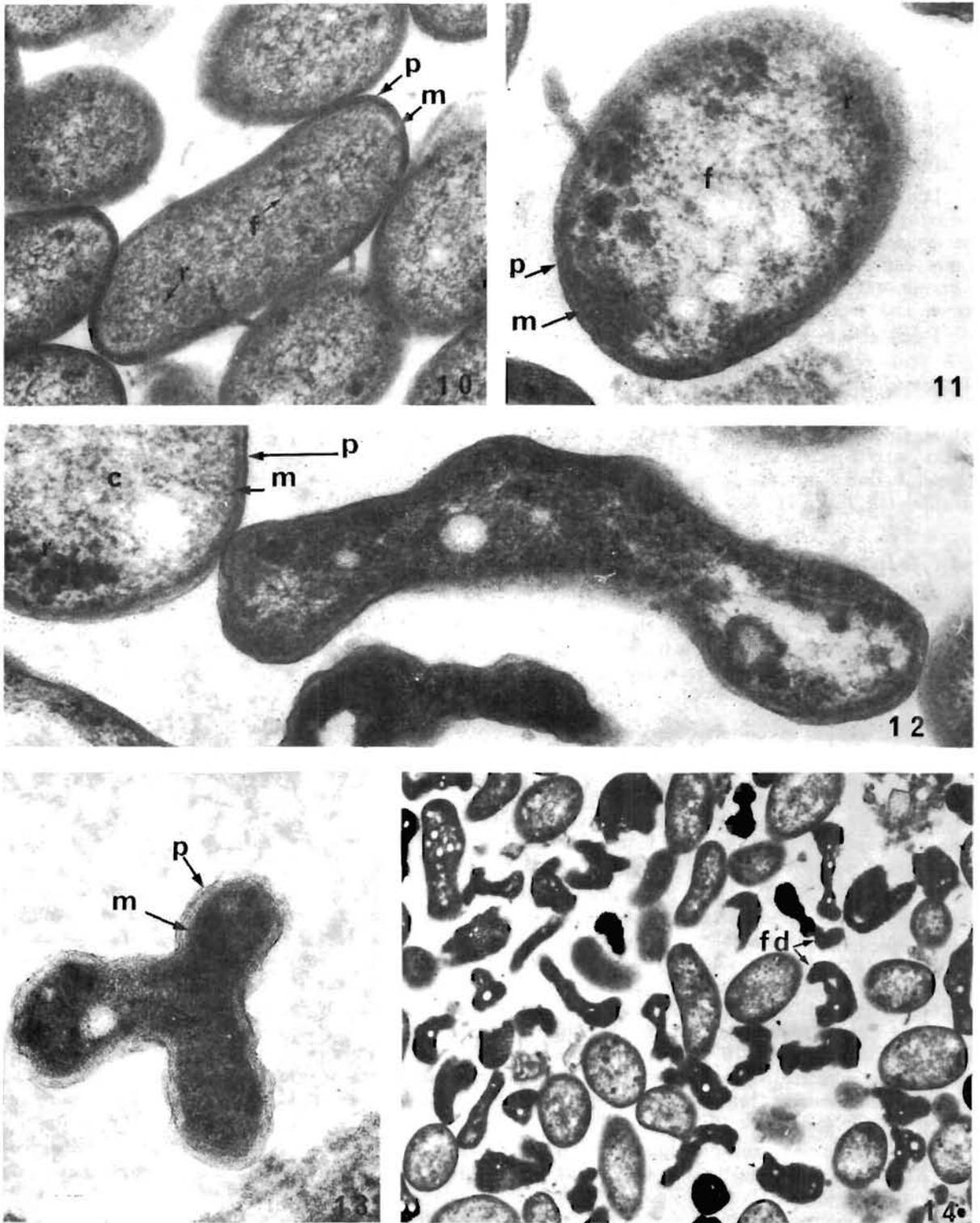
5. Discussion et conclusions.

De par leur morphologie et leur structure, leur développement intravacuolaire, leur réaction négative à la coloration de Gram, l'absence de développement sur les milieux bactériologiques usuels, ces microorganismes peuvent être rapprochés des rickettsies. Les modifications structurales qu'ils subissent rappellent les formes de dégénérescence observées par plusieurs auteurs dans le cas de rickettsioses d'invertébrés.

ITO *et al.* (1975) notent, chez *Rickettsia mooseri* des formes dégénérantes présentant le même aspect dense, déformé et vacuolisé dans des vacuoles lytiques. De même, des microorganismes, au sein de vacuoles autolytiques (HAMON, 1971, et MAILLET, 1971) ou libres dans le cytoplasme de la cellule-hôte (HAYES et BURGDOFFER, 1979), montrent des enveloppes désorganisées leur conférant une apparence sinueuse avec vacuolisation du cytoplasme qui se densifie, suggérant des figures de dégénérescence. Les étapes décrites sur la planche III correspondraient à la lyse du microorganisme dont la cause peut être attribuée à une hyperinfection comme l'ont observé WRIGHT *et al.* (1978) pour *Wolbachia pipientis*. La cellule-hôte dégénérée ne fournit plus les éléments nécessaires à la survie du microorganisme. Il est à signaler que des formes dégénérantes dénommées formes pycnotiques ont été observées chez *Chlamydia psittaci* traitée au Cycloheximide (SPEARS et STORTZ, 1979).

Les formes de multiplication sont à rapprocher de celles de *Rickettsia mooseri* observées chez *Xenopsylla cheopis* (ITO *et al.*, 1975) où l'on retrouve des structures pseudo-vacuolaires dans le cytoplasme, de celles de *Wolbachia* symbiontes de *Haemaphysalis inermis* (SIXL-VOIGT *et al.*, 1977) et de microorganismes de type rickettsien observés chez diverses mouches tsé-tsé (PINNOCK et HESS, 1974).

Sa morphologie, son ultrastructure, sa localisation, son absence de cycle et son action pathogène vis-à-vis d'un Arthropode rapprochent cette rickettsie de celles appartenant à la famille des Rickettsiaceae et plus particulièrement à la tribu des Wolbachieae telles que les décrit MOULDER (1974).



PL. III. — Evolution structurale de la rickettsie, 10 : Formes de multiplication avec, à l'intérieur de leur cytoplasme, des ribosomes et un matériel fibrillaire, microscopie électronique $G \times 32\,100$ (p : paroi, m : membrane, r : ribosomes, f : matériel fibrillaire) ; 11 et 12 : Microorganisme en cours de densification, microscopie électronique $G \times 66\,000$ (p : paroi, m : membrane plasmique, r : ribosomes, f : matériel fibrillaire) ; 13 : Forme dense aux électrons, microscopie électronique $G \times 55\,500$ (p : paroi, m : membrane plasmique) ; 14 : Evolution du microorganisme dans le tissu interstitiel, microscopie électronique $G \times 10\,800$ (fd : formes denses).

Ce travail constitue la première mise en évidence d'une maladie rickettsienne chez les crustacés marins, expérimentalement transmissible. Le pouvoir pathogène élevé de ce microorganisme en fait un facteur non négligeable de la régulation des populations de *C. mediterraneus*.

BIBLIOGRAPHIE

- BUCHANAN (J.S.), 1978. — Cytological studies on a new species of rickettsia found in association with a phage in the digestive gland of the marine bivalve mollusc, *Tellina tenuis* (da Costa). — *J. Fish Diseases*, 1: 27-43.
- 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.*, n° 281: 11-12.
- FEDERICI (B.A.), HAZARD (E.I.) et ANTHONY (D.W.), 1974. — Rickettsia-like organism causing disease in a Crangonid Amphipod from Florida. — *Applied Microbiology*, 28 (5): 885-886.
- HAMON (C.), 1971. — Présence de microorganismes de type rickettsien dans l'ovaire d'*Upola reticulata* Fab. (Homoptera - Auchenorhyncha Ulopidae). — *Rev. Can. Biol.*, 30 (3): 245-248.
- HARSHBARGER (J.C.), CHANG (S.C.) et OTTO (S.V.), 1977. — Chlamydiae (with Phages), Mycoplasmas, and Rickettsiae in Chesapeake Bay Bivalves. — *Science*, 196: 666-668.
- HAYES (S.F.) et BURGDORFER (W.), 1979. — Ultrastructure of *Rickettsia rhipicephali*, a new member of the spotted fever group Rickettsiae in tissues of the host vector *Rhipicephalus sanguineus*. — *J. Bacteriol.*, 137 (1): 605-613.
- HUMASON (G.L.), 1962. — Animal Tissue Techniques. — San Francisco, U.S.A.: Freeman and C° ed., 468 p.
- ITO (S.), VINSON (J.W.) et MC GUIRE Jr (J.J.), 1975. — Murine typhus rickettsiae in the oriental rat flea. — *Ann. New York Acad. Sci.*, 266: 35-60.
- MAILLET (P.-L.), 1971. — Observations ultrastructurales et biologiques sur les microorganismes de type rickettsien trouvés chez divers homoptères auchenorhynques. — *Bull. Biol.*, 55 (2): 95-111.
- MARTOJA (R.) et MARTOJA-PIERSON (M.), 1967. — Initiation aux Techniques de l'Histologie animale. — Paris: Masson, 345 p.
- MOULDER (J.W.), 1974. — Wolbachia: in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8° ed. by Buchanan (R.E.) and Gibbons (N.E.). Baltimore: Williams and Wilkins Co., 897-900.
- PAPPALARDO (R.) et BONAMI (J.-R.), 1979. — Infection des Crustacés marins due à un virus de type nouveau apparenté aux Baculovirus. — *C. R. Acad. Sci., Paris*, 288 D: 535-537.
- PERKINS (F.O.), 1969. — Ultrastructure of vegetative stages in *Labyrinthomyxa marina* (= *Dermocystidium marinum*), a commercially significant oyster pathogen. — *J. Invertebr. Pathol.*, 13: 199-222.
- PINNOCK (D.E.) et FLESS (R.T.), 1974. — The occurrence of intracellular rickettsia-like organisms in the Tsetse flies, *Glossina morsitans*, *G. fuscipes*, *G. brevipalpis* and *G. pallidipes*. — *Acta tropica*, 31 (1): 70-79.
- REYNOLDS (E.S.), 1963. — The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. — *J. Cell. Biol.*, 17: 208.
- SHAW (B.L.) et BATTLE (H.I.), 1957. — The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). — *Canadian J. Zool.*, 35 (3): 325-327.
- SIXL-VOIGT (B.), ROSHDY (M.A.), NOSEK (J.) et SIXL (W.), 1977. — Electronmicroscopic investigations of Wolbachia-like organisms in *Haemaphysalis inermis*. — *Mikroskopie* (Wien), 33: 255-257.
- SPEARS (P.) et STORZ (J.), 1979. — Changes in the ultrastructure of *Chlamydia psittaci* produced by treatment of the host cell with DEAE-Dextran and Cycloheximide. — *J. Ultrastr. Res.*, 67: 152-160.
- VAGO (C.), MEYNADIER (G.), JUCHAULT (P.), LEGRAND (J.-J.), AMARGIER (A.), et DUTHOIT (J.-L.), 1970. — Une maladie rickettsienne chez les crustacés Isopodes. — *C. R. Acad. Sci., Paris*, 271 D: 2061-2063.
- WRIGHT (J.D.), SJOSTRAND (F.S.), PORTARO (J.K.) et BARR (A.R.), 1978. — The ultrastructure of Rickettsia-like microorganism *Wolbachia pipientis* and associated virus-like bodies in the mosquito *Culex pipiens*. — *J. Ultrastr. Res.*, 63: 79-85.