

PATHOLOGIE ANIMALE. — Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa : *Ascetospora*) parasites de bivalves marins. Note de Eric Mialhe, Evelyne Bachere, Claude Le Bec et Henri Grizel, présentée par Constantin Vago.

Les protozoaires du genre *Marteilia*, parasites des mollusques *Ostrea edulis* et de *Mytilus edulis*, ont été isolés et purifiés grâce à la mise au point d'une méthode originale chez ce groupe de protozoaires. L'étude en microscopie électronique à balayage et à transmission des pansporoblastes purifiés de *Marteilia refringensa* permis de vérifier l'intégrité des parasites et d'établir certaines caractéristiques ultrastructurales.

ANIMAL PATHOLOGY. — Isolation and purification of *Marteilia* (Protozoa: *Ascetospora*) parasites of marine Bivalvia: ultrastructural study of pansporoblasts.

Marteilia (Protozoa: *Ascetospora*) parasites of *Ostrea edulis* and *Mytilus edulis*, have been isolated and purified by an original method. The electron microscopic study of the purified pansporoblasts and spores confirms the integrity of the parasite and shows some new characteristics.

Les parasites du genre *Marteilia* Grizel et coll. [1], pathogènes pour plusieurs espèces de bivalves d'intérêt conchylicole ([1] à [4]) ont été l'objet de travaux qui ont déjà permis de préciser leurs caractéristiques morphologiques et d'estimer leur impact sur les populations de l'Huître plate *Ostrea edulis* L. [5].

Compte tenu de l'originalité de ces parasites et de la gravité des épizooties dont ils sont responsables, les problèmes posés par les marteilioses correspondent à ceux définis par Vago [6] pour la pathologie des mollusques marins. En France, l'étude des marteilioses a un caractère d'urgence, de nombreux aspects de ces parasitoses restant encore mal connus. Il s'agit en particulier des modalités d'infection et de développement des parasites, et des mécanismes de transmission intra ou interspécifique.

Afin d'aborder ces problèmes, nous avons entrepris l'isolement et la purification des pansporoblastes qui correspondent à une forme hautement différenciée du parasite susceptible de représenter le stade infectieux.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les Huîtres *O. edulis*, âgées de 2 et 3 ans, ont été récoltées en Bretagne Sud dans le Golfe du Morbihan et dans la rivière de Saint-Philibert. Les Moules *Mytilus edulis* L., âgées de 2 ans, proviennent de la rivière de la Trinité-sur-Mer.

La méthode de purification des pansporoblastes, originale chez ce groupe de Protozoaires, est décrite en détail dans les résultats.

Les parasites purifiés destinés à l'observation en microscopie électronique à balayage, sont soumis aux ultra-sons afin de libérer les spores et les granules réfringents d'une partie des pansporoblastes. Après fixation par le formol et déshydratation dans un gradient d'alcool, les échantillons subissent un passage au point critique et une métallisation à l'or.

Pour la microscopie électronique à transmission, les suspensions purifiées sont fixées selon la méthode de double fixation par le glutaraldéhyde à 3% et l'acide osmique à 1% (tampon cacodylate de sodium 0,1M, NaCl 0,3M). Les coupes ultrafines sont contrastées par l'acétate d'uranyle en solution alcoolique et par le citrate de plomb.

PURIFICATION. — La présence de pansporoblastes de *M. refringens* est révélée par l'examen en microscopie photonique de broyats de glandes digestives d'Huîtres, *O. edulis*.

Les essais initiaux de purification de parasites ont été entrepris sur des lots de 10 glandes digestives fortement infectées, broyées à l'aide d'un homogénéiseur de type ultra-turrax dans 100 ml d'eau de mer filtrée. Les broyats sont ensuite clarifiés par centrifugation (15 mn, 350 g). Les culots contenant les pansporoblastes sont remis en suspension puis déposés à la surface de gradients de densité discontinus de saccharose (10, 20, 30 et 40%) et centrifugés à 40 g pendant 15 mn.

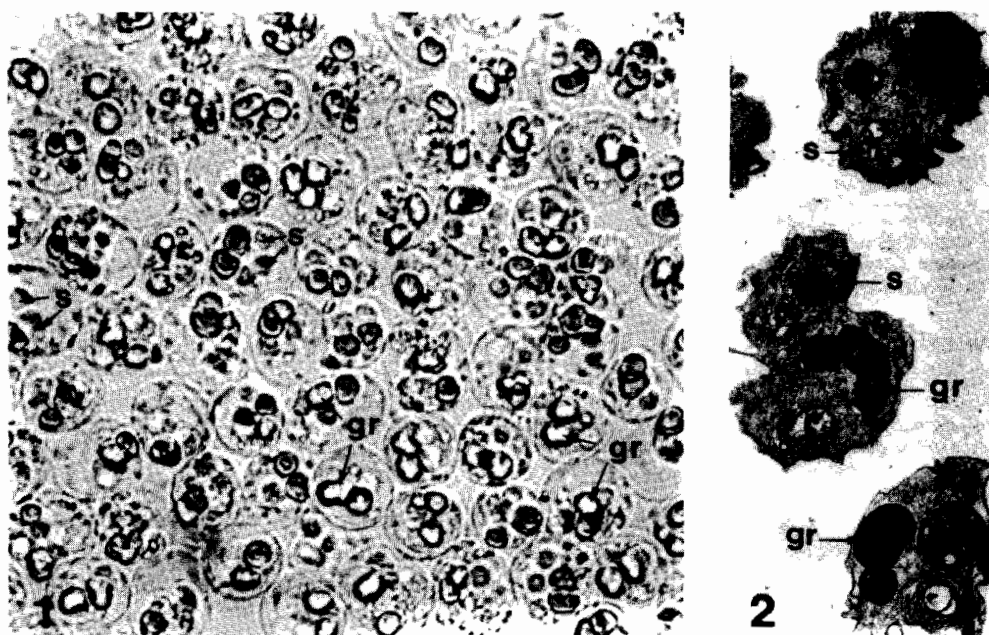


Fig. 1. — Suspension de pansporoblastes purifiés. Spores (s); granules refringents (gr) Micr. opt. (G × 1 000).

Fig. 1. — *Purified pansporoblasts. Spores (s); refringent inclusions (gr).*

Fig. 2. — Suspension de pansporoblastes purifiés. Spores (s); granules refringents (gr) Micr. électr. (G × 2 600).

Fig. 2. — *Purified pansporoblasts. Spores (s); refringent inclusions (gr).*

A ce stade, dans la fraction 20%, une bande diffuse mais bien individualisée s'avère particulièrement enrichie en parasites. D'autres sont cependant présents, en proportion

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

Fig. 3. — Pansporoblaste (ps) ouvert après traitement aux ultra-sons. Spore (s) libérée. Micr. électr. (G × 7 500).

Fig. 3. — *Pansporoblast (ps) opened by ultra-sonic treatment. Released spore (sp).*

Fig. 4. — Pansporoblaste (ps) intact. Micr. électr. (G × 5 500).

Fig. 4. — *Intact pansporoblast (ps).*

Fig. 5. — Granule refringent (gr) Micr. électr. (G × 11 000).

Fig. 5. — *Refringent inclusion (gr).*

Fig. 6. — Système membranaire de l'enveloppe du pansporoblaste (ps) en début de maturation; granule refringent (gr) Micr. électr. (G × 60 000).

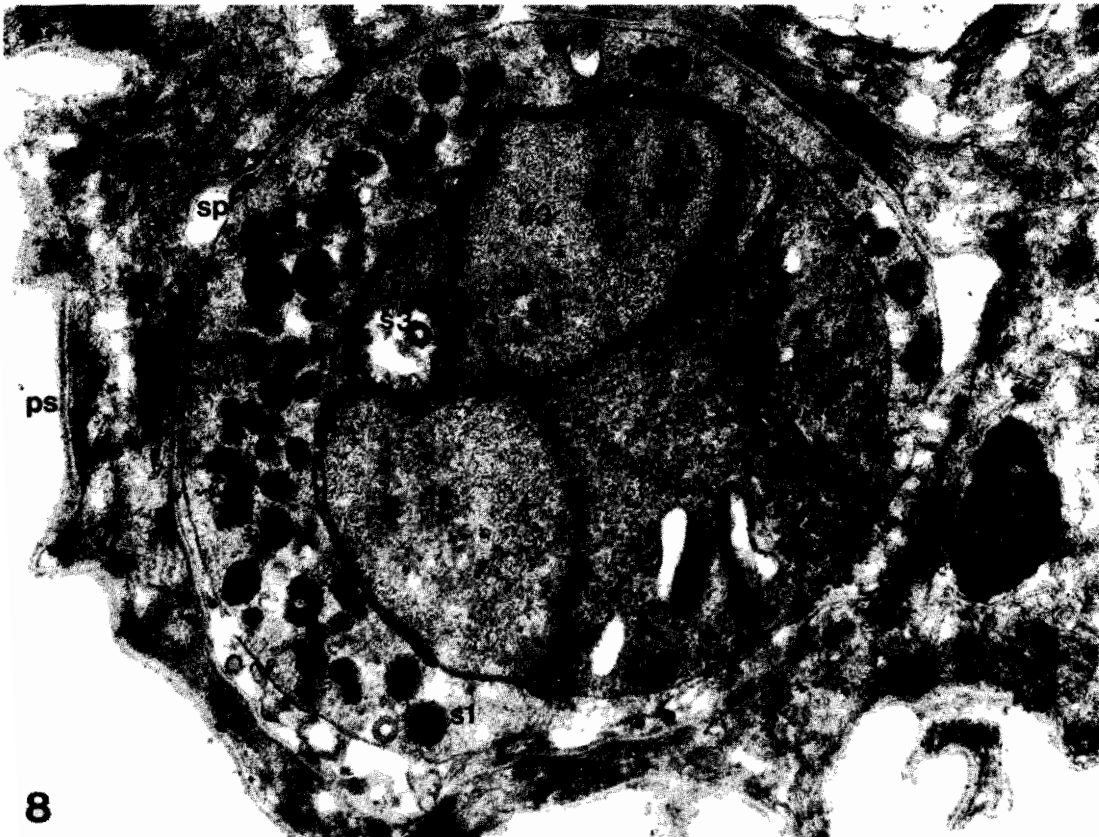
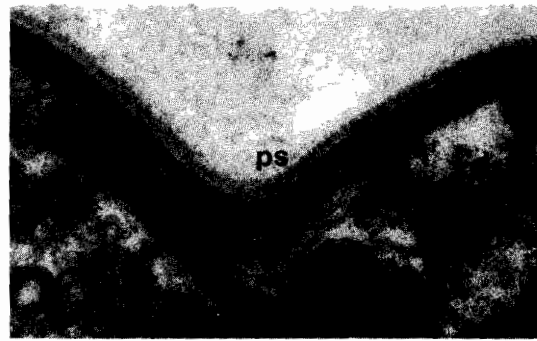
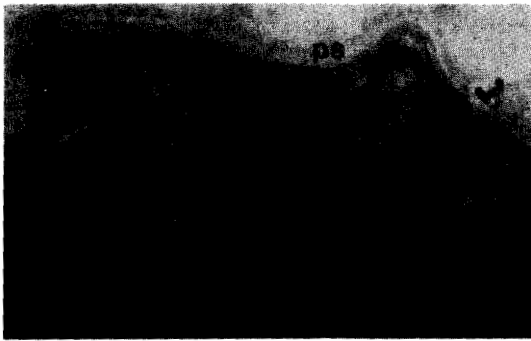
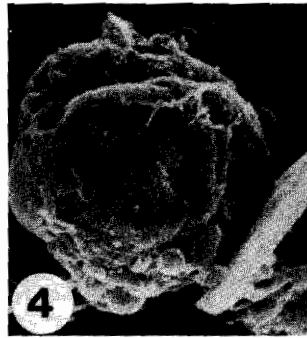
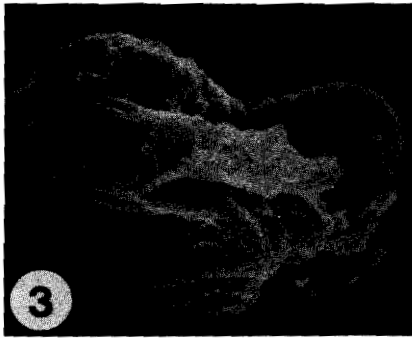
Fig. 6. — *Membrane system of the pansporoblast (ps) envelope at the maturation outset; refringent inclusion (gr).*

Fig. 7. — Enveloppe du pansporoblaste (ps) en fin de maturation (G × 60 000).

Fig. 7. — *Mature pansporoblast (ps) envelope.*

Fig. 8. — Spore différenciée (sp) incluse dans un pansporoblaste (ps) purifié; sporoplasme externe (S1) contenant des haplosporosomes (h); sporoplasme intermédiaire (S2) et son noyau (n2), noyau (n3) du sporoplasme interne (S3).

Fig. 8. — *Differentiated spore (sp) contained in a purified pansporoblast (ps); extern sporoplasm (S1) with haplosporosomes (h), intermediate sporoplasm (S2) with nucleus (n2); nucleus (n3) of the intern sporoplasm (S3).*





moindre, dans les fractions de plus fortes densités. Cette dispersion peut résulter d'une part de l'agrégation des éléments, d'autre part de la variabilité notable de leur taille.

La fraction contenant les pansporoblastes est ensuite diluée avec de l'eau de mer filtrée, puis homogénéisée et clarifiée pendant 15 mn à 350 g. Le culot est alors traité à nouveau comme précédemment.

La purification est achevée par centrifugation isopycnique en gradient de densité discontinu de Percoll (10, 20, 30 et 40%, NaCl 0,4 M) (30 mn, 1 000 g). Après lavage de la fraction contenant les parasites (interface 10-20%), le nombre de pansporoblastes obtenus est généralement de l'ordre de 10^6 /ml (fig. 1).

Ce protocole de purification a été adapté à des échantillons numériquement très importants, soit afin d'obtenir des quantités considérables de parasites dans le cas d'infections notoires, soit de révéler leur présence chez des hôtes faiblement infectés.

Ainsi des purifications ont été réalisées à partir d'échantillons de 500 glandes digestives d'Huîtres plates dont le taux d'infection était d'environ de 60%. Le nombre et le volume des gradients de saccharose ont été augmentés en conséquence. Les fractions enrichies en pansporoblastes sont régulièrement regroupées lors des cycles successifs de centrifugation de zone. La purification est achevée sur Percoll comme précédemment.

De la même façon nous avons pu isoler et purifier *Marteilia sp.* à partir de spécimens de *M. edulis* chez lesquels le taux d'infection était seulement de 5%.

ÉTUDE DES PRÉPARATIONS. — L'étude ultrastructurale de *Marteilia refringens* isolé d'*O. edulis* a été réalisée en microscopie électronique à balayage et à transmission.

Les suspensions purifiées examinées en microscopie à balayage ont permis de reconnaître les pansporoblastes ainsi que les spores et les granules réfringents libérés grâce aux traitements par ultra-sons. Les pansporoblastes, relativement pléomorphes (fig. 3 et 4), ne présentent à leur surface ni ornementation structurale caractéristique, ni dispositif d'ouverture. Les spores sont sphériques (fig. 3). Leur enveloppe a des microdépressions et des microreliefs répartis irrégulièrement. Les granules réfringents sont le plus souvent en forme d'haltères (fig. 5).

Parmi les nombreux parasites observés sur coupes ultrafines, aucun signe de dégénérescence ou d'altération imputable à la technique de purification n'a été remarqué.

L'ultrastructure des parasites correspond à celle des pansporoblastes matures décrits dans les tissus de l'hôte ([1], [7]) notamment au niveau des granules réfringents structurés (fig. 6) et des spores différenciées (fig. 8).

Celles-ci sont constituées de trois sporoplasmes emboîtés les uns dans les autres au sein de vacuoles (fig. 8) comme l'indique l'agencement des membranes.

Les différentes images d'organisation des enveloppes des pansporoblastes traduisent divers degrés d'évolution. Celle-ci correspond à une densification résultant de l'accolement des systèmes membranaires et de l'accumulation de matériel amorphe sur la face externe (fig. 6 et 7).

CONCLUSIONS. — Le principe et la méthode d'isolement et de purification élaborés sont originaux pour ce groupe de protozoaires et semblent particulièrement performants compte tenu d'une part de la quantité importante de parasites obtenus, et d'autre part de leur intégrité ultrastructurale. Leur intérêt est accru par le fait qu'ils soient applicables à des échantillons numériquement très importants et infectés à des taux relativement bas, comme cela était le cas pour *Marteilia sp.* isolé de *M. edulis*.

Ces résultats ouvrent plusieurs voies pour l'étude des marteilioses.

Tout d'abord, la méthode mise au point est susceptible d'être utilisable pour établir des diagnostics pour des infections d'invertébrés marins, soit directement par examen des produits de purification, soit indirectement par tests immunologiques.

En outre l'obtention des parasites purifiés permet d'entreprendre leur caractérisation ultrastructurale, biochimique et sérologique indispensable pour déterminer leurs affinités taxonomiques. De telles analyses sont actuellement en cours pour *M. refringens* isolé chez *O. edulis* et pour *Marteilia sp.* isolé chez *M. edulis*. Elles pourront contribuer notamment à une meilleure compréhension de l'épidémiologie des marteilioses en ce qui concerne d'éventuels mécanismes de transmission interspécifique.

Enfin, certains travaux de pathologie expérimentale deviennent envisageables, et dès à présent nous avons pu entreprendre des essais d'infection *per os* par ingestion forcée de suspensions hautement concentrées de pansporoblastes purifiés.

Les auteurs tiennent à remercier Debruyères chercheur au C.O.B. pour sa collaboration en S.E.M., Pothier et Cadoret, ostréiculteurs, et Dano pour leur aide, ainsi que G. Audic et Le Coguic.

Remise le 22 avril 1985.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] H. GRIZEL, M. COMPS, F. COUSSERANS, J. R. BONAMI et C. VAGO, *Comptes rendus*, 279, série D, 1974, p. 783-784.
- [2] J. R. BONAMI, H. GRIZEL, C. VAGO et J. L. DUTHOIT, *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 35, 1971, p. 415-418.
- [3] M. COMPS, H. GRIZEL, G. TIGE et J. L. DUTHOIT, *Comptes rendus*, 281, série D, 1975, p. 179-181.
- [4] F. O. PERKINS et P. H. WOLF, *J. Parasitol.*, 62, 1976, p. 528-538.
- [5] H. GRIZEL, *Thèse Doct. État*, Montpellier, 1985, p. 1-145.
- [6] C. VAGO, *Haliotis*, 8, 1979, p. 19-23.
- [7] F. O. PERKINS, *J. Protozool.*, 1976, p. 64-74.

Laboratoire de Pathologie, IFREMER, B. P. n° 26, 56470 La Trinité-sur-Mer.