

PATHOLOGIE DES INVERTÉBRÉS. — *Développement de protistes parasites en culture cellulaire de l'huître japonaise Crassostrea gigas Th.* Note (*) de MM. François Cousserans, Jean-Robert Bonami, Michel Comps et Henri Grizel, présentée par M. Constantin Vago.

L'obtention de cultures prolongées de cellules cardiaques d'huîtres a permis de mettre en évidence plusieurs stades du développement d'un parasite présent à l'état latent dans les tissus du mollusque.

Les cultures cellulaires, bases de nombreuses études modernes en pathologie médicale, présentent, depuis quelques années, un grand intérêt dans les recherches relatives aux maladies affectant les invertébrés. Toutefois de telles cultures concernant les mollusques bivalves marins obtenues la première fois par Vago et Chastang⁽¹⁾ et progressivement perfectionnées depuis [(²) à (¹⁰)] n'ont pas encore été employées pour des études pathologiques.

Les maladies des mollusques marins économiquement importants notamment celles des huîtres, présentant un intérêt considérable et rencontrant en même temps des difficultés d'étude bien connues, nous avons tenté d'adapter les cultures cellulaires d'huîtres à la recherche de la présence, du développement et des cycles de micro-organismes pathogènes ou facultativement pathogènes aux *Crassostrea* en particulier à l'espèce *gigas* récemment introduite sur les côtes européennes.

MISE AU POINT DE LA CULTURE CELLULAIRE DE CRASSOSTREA GIGAS. — En suivant le principe des milieux à fractions standard⁽¹¹⁾ nous avons constitué progressivement le milieu Cg 10 adapté aux conditions physico-chimiques du milieu intérieur de *C. gigas*. Ce milieu est caractérisé par une pression osmotique de 1 123 mOsm, soit Δt de $-2,08$ °C, un pH de 6,8 et un rapport Na/K voisin de 23.

Il est constitué d'une partie constante comprenant :

— Fraction A : partie organique du TC 199 concentré 5 fois dans l'eau de mer	40 ml
— Fraction B : sérum de veau fœtal	10 ml
sérum de poulet	5 ml
— Fraction C : antibiotiques	
et d'une partie variable :	
— Fraction D : eau de mer ultrafiltrée	100 ml
— Fraction E : taurine	10 mg
glycocolle	5 mg
alanine	5 mg
acide aspartique	3 mg
acide glutamique	3 mg
glucose	100 mg

En utilisant d'une part les méthodes de culture à partir d'explants, d'autre part la dissociation enzymatique des tissus avec un mélange trypsine-EDTA à 0,25 %

nous obtenons à partir des tissus de la membrane péricardique, du manteau et de la glande digestive, la migration de nombreuses cellules de type fibroblastique (*fig. 1*). Ces cellules forment rapidement un tapis cellulaire dans lequel apparaissent des cellules de type épithélial qui se maintiennent de nombreuses semaines.

DÉVELOPPEMENT DE PARASITES. — Dans de nombreuses cultures de tissu cardiaque de *C. gigas* provenant de la région méditerranéenne et de la côte atlantique nous avons observé une vacuolisation importante du cytoplasme des cellules de type épithélial ainsi que l'apparition de corps réfringents sphériques à l'intérieur de celui-ci (*fig. 2*). Les cellules se lysent 8 à 15 jours après la mise en culture. A ce stade, seuls des éléments sphériques, abondants, persistent dans le milieu de culture.

A l'examen en contraste de phase, ces éléments de 10 à 20 μ , sont fortement réfringents et montrent des subdivisions en deux ou plusieurs sous-unités. La réaction nucléale de Feulgen met en évidence, dans ces cellules, des zones intensément positives. Avant le terme de la dégénérescence cellulaire, des stades intra-cellulaires du parasite ont été détectés par cette technique ; leur diamètre varie de 8 à 12 μ .

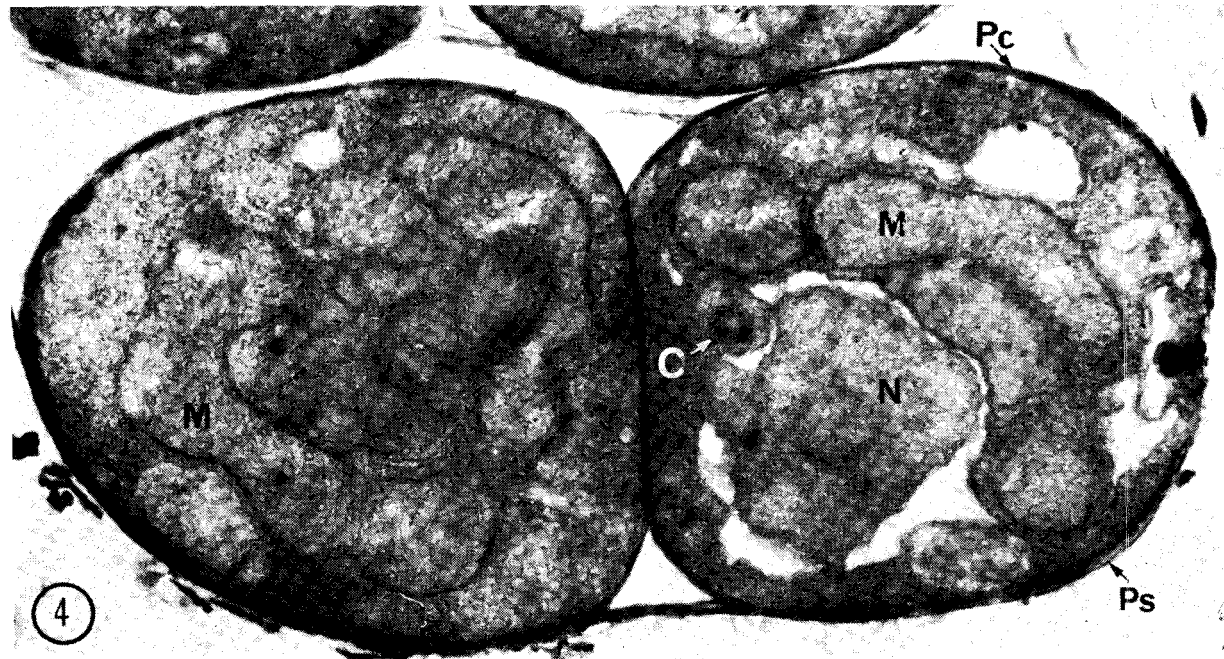
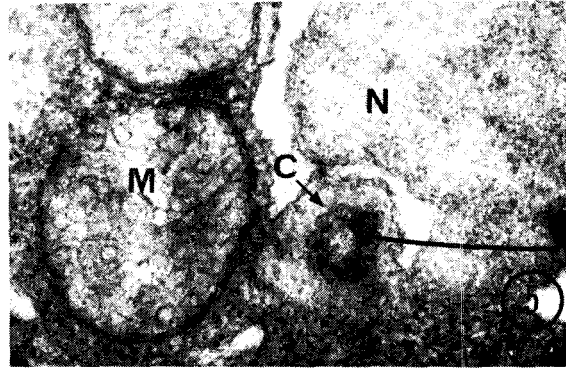
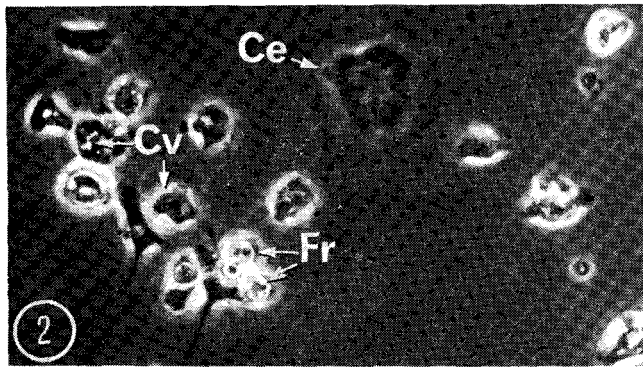
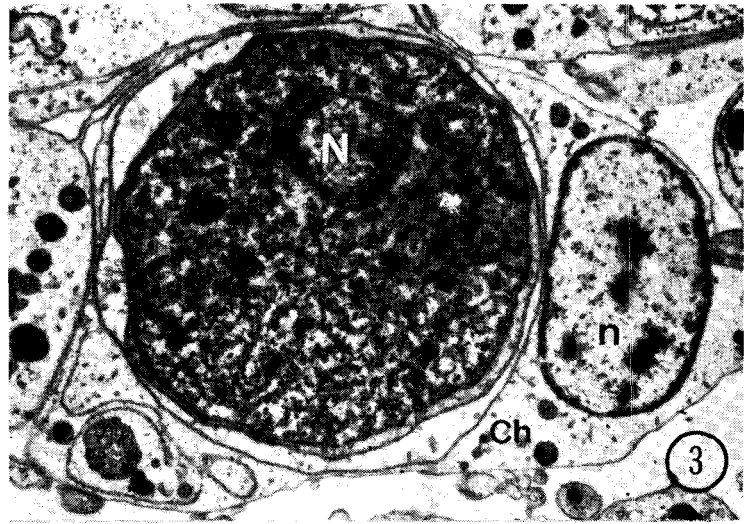
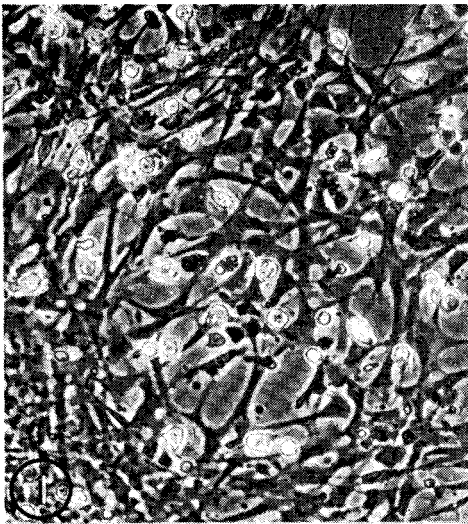
L'étude en microscopie électronique, après fixation au glutaraldéhyde et à l'acide osmique du tapis cellulaire et du surnageant de la culture a permis d'observer la structure du parasite intracellulaire et des stades libres.

A l'intérieur de la cellule hôte le parasite de 8 à 12 μ apparaît sphérique, dense aux électrons (*fig. 3*), et entouré d'un système membranaire important. Du cytoplasme du parasite à celui de la cellule hôte, on observe cinq espaces limités par six membranes groupées deux à deux. Le noyau, excentré, de 2,8 à 3,5 μ , montre des amas de chromatine disposés à sa périphérie. Le cytoplasme renferme, outre un réticulum endoplasmique réduit, quelques mitochondries sphériques de petite dimension.

Libre dans le milieu de culture, le parasite (*fig. 4*) est limité par une forte paroi et est constitué d'un nombre restreint de cellules identiques caractérisées par un chondriome volumineux ; ce dernier se présente sous forme de mitochondries flexueuses à crêtes tubulaires. Le cytoplasme contient un ergastoplasme vésiculeux ainsi que des formations tubulaires. Le noyau, légèrement excentré, de 1 à 1,5 μ renferme souvent une zone médullaire plus dense aux électrons. Le centriole, partielle-

EXPLICATION DE LA PLANCHE

- Fig. 1. — Culture de cellules cardiaques de *C. gigas* ; cellules de type fibroblastique. Contraste de phase (G \times 525).
- Fig. 2. — Cellules cardiaques parasitées de *C. gigas* 20 jours après la mise en culture. Seules persistent quelques cellules, qui se vacuolisent progressivement (Cv), et renferment des formations réfringentes (Fr). Contraste de phase (G \times 735).
- Fig. 3. — Stade intracellulaire du parasite. Cellule hôte (Ch), noyau du parasite (N) et noyau de la cellule hôte (n). Micr. électr. (G \times 6 300).
- Fig. 4, 5. — Forme « sporangiale » à 4 cellules du parasite libre dans le milieu de culture. Mitochondries (M), noyau (N), centriole (C), paroi cellulaire (Pc) et paroi du « sporange » (Ps). Micr. électr. (G \times 27 700 et 54 800).



ment inclus dans le noyau, de 180 nm de diamètre, est formé de 9 triplets composés de tubules accolés de 170 Å de diamètre (*fig. 4, 5*).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — Les observations relatées constituent la première mise en évidence d'un parasite d'huîtres en culture cellulaire. L'étude, encore partielle, en microscopie électronique du parasite se développant dans les cellules cultivées révèle de nombreuses similitudes avec les Labyrinthulales. En particulier les formes libres constituées de plusieurs cellules ont une structure très proche de celle des sporanges de *Labyrinthomyxa marina* agent d'épizooties graves d'huîtres [(¹²), (¹³)].

Il s'agit, soit d'une espèce de Labyrinthulales non ou peu pathogène, soit d'une forme potentiellement pathogène persistant en nombre très réduit et d'une manière latente dans les tissus des huîtres.

Les cellules d'huîtres cultivées *in vitro* assurent un développement intracellulaire actif du parasite et permettent ainsi de le mettre en évidence alors que d'autres moyens d'investigations peuvent difficilement rendre compte de sa présence dans les tissus de l'hôte.

Le développement du parasite ayant été très souvent observé dans les cultures cellulaires d'huîtres apparemment saines provenant des côtes atlantiques et méditerranéennes françaises, il est possible, que nos observations montrent la persistance d'un agent enzootique ou épizootique dont l'activité et la latence sont déterminées par la relative résistance de *C. gigas* et par d'autres facteurs de nature encore inconnue. C'est à l'obtention de précisions sur ce point que visent nos recherches actuelles.

Cependant, dès à présent, les résultats relatés dans cette Note montrent qu'il est désormais possible de faire appel à la culture cellulaire, méthode précieuse depuis peu dans plusieurs secteurs de la pathologie des invertébrés (¹⁴), aussi dans l'étude étiologique particulièrement difficile des grandes épizooties des mollusques marins économiquement importants.

(*) Séance du 12 août 1974.

(1) C. VAGO et S. CHASTANG, *Comptes rendus*, 250, 1960, p. 2751.

(2) M. R. TRIPP, *Ann. New York, Acad. Sc.*, 113, 1963, p. 467.

(3) M. R. TRIPP, L. A. BISIGNANI et M. T. KENNY, *J. Invert. Pathol.*, 8, 1966, p. 137.

(4) Y. CHARDONNET et G. PERES, *C. R. Soc. Biol.*, 157, 1963, p. 1593.

(5) F. O. PERKINS et R. W. MENZEL, *Nature*, 204, 1964, p. 1006.

(6) A. ROSENFELD, *Amer. Mal. Union, Inc. Ann. Rept.*, 1965, p. 30.

(7) M. F. LI, J. E. STEWARD et R. I. DRINHAM, *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 23, 1966, p. 595.

(8) J. T. CECIL, *J. Invert. Pathol.*, 14, 1969, p. 407.

(9) A. M. WALLIS, *Lab. Pract. G. B.*, 21, 1972, p. 32.

(10) Y. P. DOUTKO, *Cytologia i Genetica*, 1, 1967, p. 61.

(11) C. VAGO et J. M. QUIOT, *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 1, 1969, p. 281.

(12) J. G. MACKIN et S. M. RAY, *J. Invert. Pathol.*, 8, 1966, p. 544.

(13) F. O. PERKINS, *J. Invert. Pathol.*, 13, 1969, p. 199.

(14) C. VAGO, *Invertebrate Tissue Culture*, Academic Press, 2, 1971, p. 415.

Laboratoire de Pathologie Comparée,
Université des Sciences et Techniques du Languedoc,
CNRS et EPHE, 34060 Montpellier Cedex ;
Laboratoire de Pathologie,
Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes,
34200 Sète.