

SUR QUELQUES ASPECTS INÉDITS DU CYCLE DE *MARTEILIA REFRINGENS* GRIZEL ET COL. 1974, PARASITE DE L'HUÎTRE PLATE *OSTREA EDULIS* L.

par

André Franc

Laboratoire de Biologie animale IV, Université P. et M. Curie (1)

Résumé

A la suite d'études faites en microscopie électronique, *Marteilia refringens* a été placé par Perkins (1976) dans le groupe des Haplosporidies. Son cycle apparaît cependant plus complexe que celui qui a été décrit. Il semble bien, en effet, d'après des recherches de microscopic optique qu'outre une phase possible de schizogonie, il existe deux autres phases de développement distinctes mais qui montrent un certain parallélisme et pourraient concourir à la production d'éléments peut-être impliqués dans une phase sexuée.

Introduction

Depuis sa mise en évidence par Comps (1970) et Herrbach (1971), *Marteilia refringens*, le parasite vraisemblablement responsable de la très grave affection qui, dès 1968, a atteint les huîtres plates de nos côtes, a fait l'objet d'au moins deux importantes publications, l'une de Grizel et col. (1974), l'autre de Perkins (1976).

Les premiers ont figuré le cycle de développement tel qu'ils le concevaient et ils ont abordé l'étude ultrastructurale de ce Protiste. Perkins a repris plus en détail ce dernier type d'étude en décrivant le curieux mode de formation des spores par un bourgeonnement endogène qui a lieu aussi bien dans le « plasmode » initial que dans les stades intermédiaires.

La découverte d'autres formes de *Marteilia*, peu après, a donné lieu à d'intéressantes recherches (Ginsburger, Desportes et Zerbib, 1976 ; Perkins et Wolff, 1976 ; Comps, 1977, 1978 ; Desportes et Ginsburger, 1977), de sorte que les stades les plus courants sont maintenant bien connus du point de vue ultrastructural.

Dès 1969, nous avons tenté de suivre en microscopie optique le déroulement du cycle de *M. refringens* et, si nous avons vite reconnu les diverses étapes du bourgeonnement endogène, il nous est apparu

(1) 105, boulevard Raspail, 75006 Paris.

qu'un certain nombre d'éléments cellulaires ne s'intégraient pas dans le schéma de développement proposé par Grizel et col. En particulier, les complexes cellulaires où sont engendrées les spores — ensembles de cellules « primaires », « secondaires » et « tertiaires » de ces auteurs — étaient de trois types distincts qui permettaient de déceler trois lignées assez bien caractérisées.

Plus récemment, la découverte de l'éclosion de sortes d'amoebules par rupture de la paroi de « sporanges » nous a montré que ces petites formes pouvaient être à l'origine de trois lignées cellulaires.

Par ailleurs, des coupes sagittales d'une huître ont révélé que de nombreux stades de *Marteilia* s'insinuaient à l'extérieur de l'huître dans l'épithélium péribuccal ou dans celui du tout début de l'œsophage et qu'auprès de ces formes, certaines, accolées ou fusionnées deux à deux à des degrés divers évoquaient des phénomènes de conjugaison.

Nos préparations, enfin, nous ont prouvé l'existence de nombreux « sporanges » — d'une seule des trois lignées — dans le conjonctif de la masse viscérale, à bonne distance des diverticules digestifs et du tube digestif.

Matériel et méthodes

Les huîtres étudiées, provenant de Bretagne, d'Oléron, mais aussi de l'étang d'Urbino (Corse), récoltées en différentes saisons, ont été fixées au Bouin alcoolique, au Regaud, au Carnoy, au glutaraldéhyde, puis colorées au May Grünwald-Giemsa, à l'azan de Heidenhain, à l'hématoxyline, au Mann-Dominici, au Feulgen et au violet de crésyl (Heaton et Pauley, 1969). Les coupes ont été faites à 5,4 et 3 um. Des examens *in vivo* ont été pratiqués après adjonction de bleu de toluidine.

Conception actuelle du cycle de *M. refringens*

C'est dans les acini de la glande digestive, ou dans leurs conduits et en bordure de l'estomac, qu'ont été observés les aspects les plus courants du parasite.

Pour Grizel *et al.*, la structure de base du parasite est représentée par une « cellule primaire », d'une taille variant de 10 à 30 µm, qui contient une ou plusieurs « cellules secondaires » au sein desquelles naissent des « cellules tertiaires ».

Les premiers de ces éléments sont décrits par Perkins comme des « plasmodes » qui, par bourgeonnement endogène, produisent des « presporanges » — cellules uninucléées ou cellules secondaires de Grizel *et al.* Les « plasmodes » devenus des « primordia sporangiaux », ou « sporangiosores » diffèrent par voie endogène huit « sporanges » dans lesquels apparaissent 3 ou 4 primordia de spores (cellules tertiaires) consistant en trois sporoplasmes uninucléés de tailles différentes. Le plus petit se trouve dans une vacuole du sporo-

plasme de taille moyenne qui, lui-même, est contenu dans une vacuole du plus grand.

En fait, par analogie avec le cycle de *Myxobolus*, comme le notent Desportes et Ginsburger (1977), la cellule primaire est plutôt un *pseudoplasmode* au sein duquel les cellules secondaires évoluent en pansporoblastes. De même, les cellules tertiaires ont valeur de sporo-blastes.

On ne sait rien du sort réservé à la spore et de l'origine des cellules primaires.

Recherches personnelles

I. - Les formes de la glande digestive

Les dites « **cellules primaires** », ou « **plasmodes** ».

La définition même par les auteurs des termes « **plasmode** » et « **cellules primaires** » donne à penser que ces formations sont bi- ou pluricellulaires, en tous cas bi- ou plurinucléées. Or *Marteilia* se voit fréquemment sous la forme d'éléments uninucléés dont les dimensions varient de 4,5-5 µm à 23 µm selon nos observations, de sorte que si les plus petits peuvent être des précurseurs des cellules primaires il est douteux que les plus gros connaissent le même sort, car si la taille de celles-ci varie entre 10 et 30 µm « elle est en particulier fonction du nombre de cellules secondaires et de l'état de ces dernières » (Grizel *et al.* 1974, p. 11).

L'évolution des formes uninucléées les plus grandes reste énigmatique et il en est de même de leur origine.

Il nous paraît cependant vraisemblable que ces cellules proviennent du développement des amoebules issues de certains « **sporanges** », amoebules qui se présentent comme de petits germes mesurant de 4 à 5,5 µm, qui doivent correspondre aux cellules souches amiboides à corps multivésiculaires figurés chez *Marteilia* sp. par Desportes et Ginsburger. Ces éléments s'accroissent puis s'enrichissent d'un second noyau lorsque leur taille atteint de 8 à 10 µm, stades où de légères différences nous semblent perceptibles dans les caractères de colorabilité.

Les différentes lignées.

a) *Lignée A.* — Certains de ces derniers éléments acquièrent en grandissant (Planche I, 1 à 4) un contour régulier plus ou moins asymétrique, leur paroi s'étirant souvent en un petit bec. À leur intérieur, l'abondance des fibrilles ne permet guère de voir le détail des processus de bourgeonnement qui aboutit à la formation des petites cellules d'aspect amoéboïde à l'éclosion.

Nous nommons cycle A ce cycle caractérisé par des pseudo-plasmodes à paroi assez fortement colorable, à fibrilles abondantes

dans lesquels nous n'avons jamais vu de grains réfringents et qui produit des sortes de petites amoebules (Planche I, 8).

Un tel cycle pourrait être de type schizogonique.

D'autres éléments, de 10 µm environ, montrent avec netteté la dualité de leur constitution car après traitement au May Grinwald-Giemsa l'un des noyaux, à inclusion brune, baigne dans un cytoplasme rose alors que l'autre, à inclusion violacée, est cerclé d'une zone bleue ou violacée. C'est là le résultat de la première mitose et nous désignons ce stade, d'où divergent en toute probabilité les deux autres lignées B et C, le *stade III*.

b) *Lignée B*. — C'est celle qui a été décrite par les différents auteurs et que l'on retrouve le plus couramment ; aussi noterons-nous seulement quelques particularités.

1. La première cellule secondaire demeure étroitement incluse dans la cellule mère, cette dernière élaborant des fibrilles plus ou moins abondantes.

2. Dans les cellules secondaires, apparaissent des corps réfringents verts après le Feulgen-vert lumière (Planche I, 5) sur lesquels se voit fréquemment une très petite sphère rouge franc qui semble constante. Par cette même technique, la chromatine des noyaux prend parfois une teinte mauve, ou bleu verdâtre, ou même verte, ce qui nous semble être en rapport avec les stades de division.

3. Nous n'avons observé aucune mitose ; toutefois, après la même coloration, se voient dans les cellules des écailles rouge vif ou des cupules opposées par leur face concave et reliées par des filets rouges plus pâles ; mais nous ne savons pas si ces images sont bien en rapport avec les divisions.

PLANCHE I
Marteilia refringens

1-4 : pseudoplasmodes de première catégorie (lignée A). Sur les figures 1 et 2 se voient, dans ces formations, des faisceaux de fibrilles représentées par des traînées sombres et sur la figure 4, entre deux pseudoplasmodes (clairs) se trouvent deux pseudoplasmodes à grains réfringents, très noirs sur la photo (x 1600, 1650, 1700, 1700).

5 : portion de pseudoplasmode de seconde catégorie (lignée B) montrant trois gros corps réfringents (x 1700).

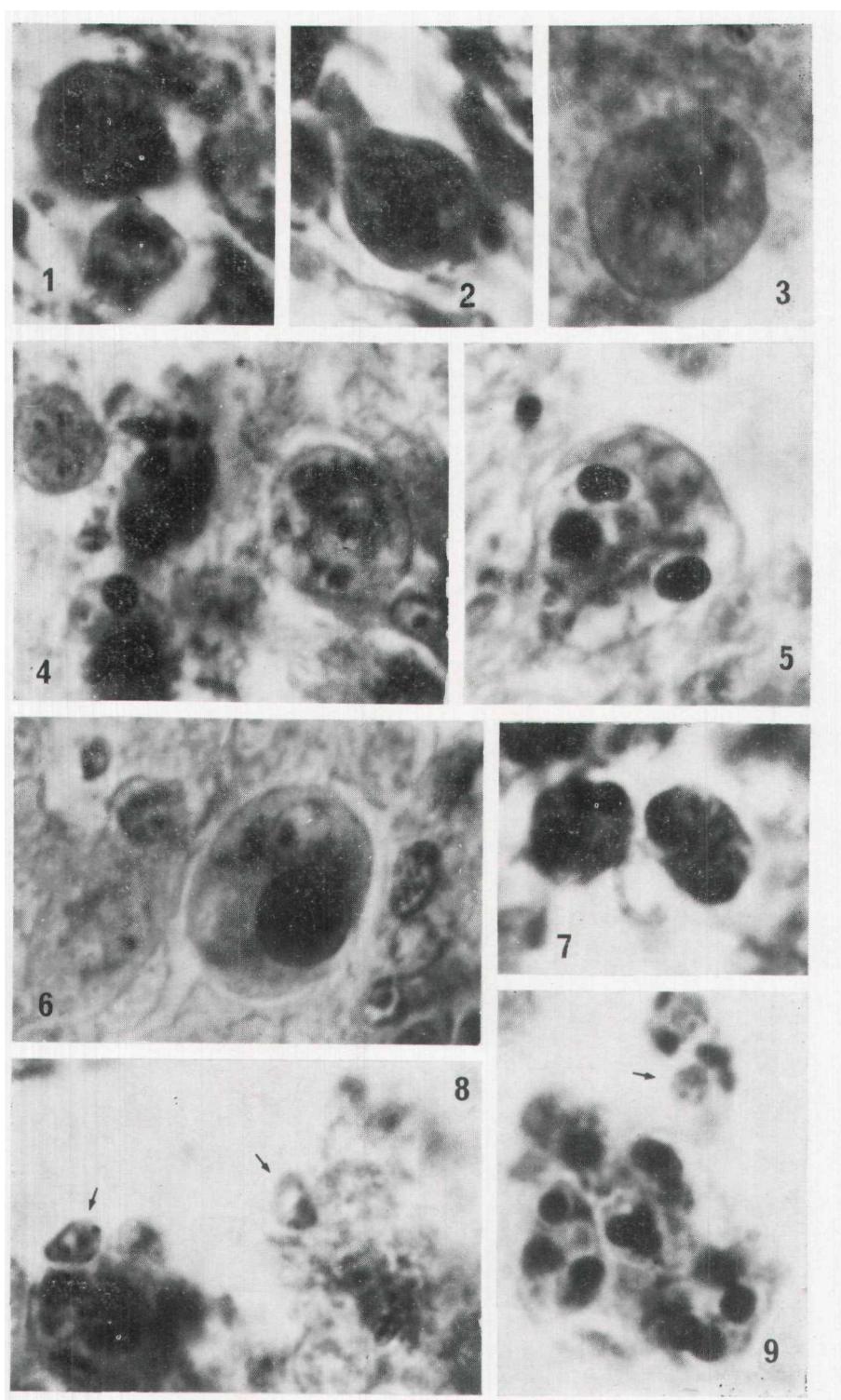
6 : pseudoplasmode de la lignée C où une délamination a isolé d'une grosse cellule (claire) à deux noyaux une cellule interne (pansporoblaste) subsphérique, à granulation colorable en rouge par l'azan (x 2000).

7 : à droite, pansporoblaste de la troisième catégorie (lignée C) résultant de l'évolution de la cellule interne du type visible figure 6. Ce pansporoblaste, sans fibrilles, contient deux logettes où se voient, outre des grains réfringents, deux corpuscules légèrement spiralés (x 1700).

8 : d'un pseudoplasmode de première catégorie parvenu au terme de son évolution s'échappe un germe de près de 5 µm de long (flèche gauche) à noyau clair, nucléole pariétal et granulation antérieure rouge après l'azan. Une seconde « amoebule » (flèche droite) est visible plus à droite (x 1650).

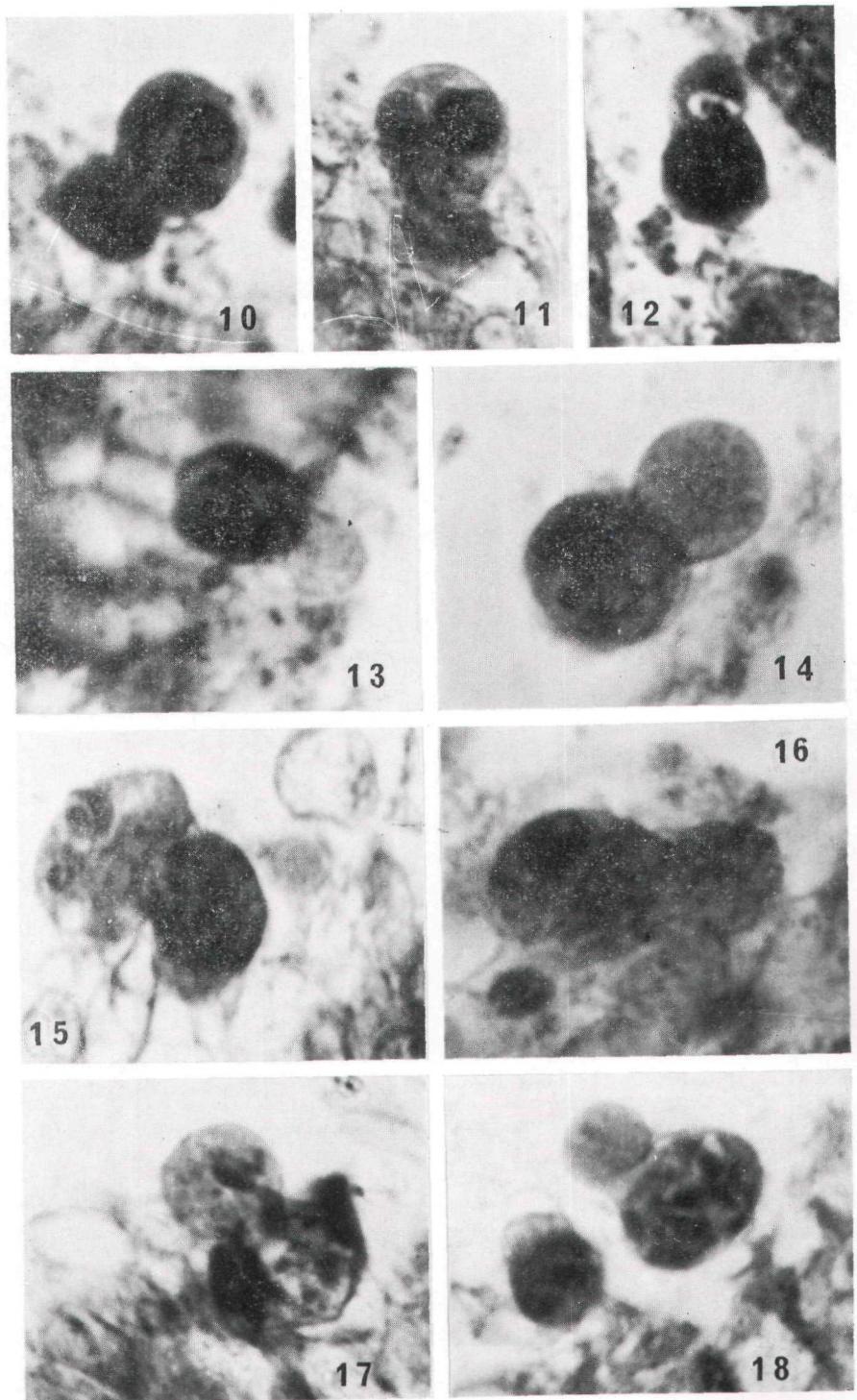
9 : pseudoplasmode de deuxième catégorie (lignée B) d'où s'est libérée une « cellule tertiaire » (flèche) subsphérique, à nouveau clair et inclusion apparemment nucléolaire (x 1600).

Azan de Heidenhain ; immersion.



ANDRÉ FRANC

PLANCHE I



ANDRÉ FRANC

4. Les pseudoplasmodes atteignent de 30 à 35 µm dans leur plus grande dimension. Leur forme manque de régularité ; leur paroi est certainement plus déformable que dans la lignée A.

5. Les spores où se voient les trois sporoplasmes emboîtés décrits par Perkins se retrouvent parfois en coulées denses dans les conduits des diverticules digestifs.

c) *Lignée C.* — Il existe manifestement des complexes à spores et grains réfringents de même aspect général que les pseudoplasmodes de la lignée B mais qui restent nettement plus petits car ils ne dépassent pas une taille de 15 µm. Nous pensons être en mesure d'en expliquer l'origine.

Dans certains éléments parvenus à notre « stade III », une délamination plus ou moins précoce sépare la cellule mère, à fibrilles, de la cellule fille qui, très excentrée, s'accoste à la paroi de sa mère (Planche I, 6). Après coloration à l'azan, la première reste assez pâle, mais la seconde prend une teinte violette accentuée.

Lorsque cette dernière, subsphérique, atteint de 7 à 8 µm de diamètre, elle se libère de la cellule enveloppante. Puis, dans sa masse, parfois même avant la libération, apparaissent en petit nombre des cellules tertiaires légèrement plus petites que dans la lignée B. Sur nos préparations, des plages de telles formations voisinent avec d'autres plages à pseudoplasmodes de la lignée B. De tels pseudoplasmodes contiennent en général une, deux, ou trois cellules tertiaires mais aussi quelques grains réfringents. Ce sont ces petits pseudoplasmodes qui se présentent parfois disséminés dans le conjonctif de la masse viscérale.

Après coloration au Feulgen-vert lumière, le contenu de *certaines* des logettes formées par les cellules tertiaires consiste en une sphère rouge vif d'où part une queue verte effilée, en virgule ou en courte spire. Des images tout aussi nettes ont été obtenues avec l'azan (Planche I, 7).

D'autres logettes, par contre, libèrent des sortes d'amboebules légèrement plus petites que celles de la lignée A (Planche I, 9).

PLANCHE II
Marteilia refringens

10 et 11 : cellules en partie fusionnées, à un ou deux noyaux à marge violacée (Azan x 2000).

12 : même type d'union de deux cellules (Hématoxyline) (x 1800).

13 : élément du parasite enfoncé dans l'épithélium du début de l'oesophage, auquel est annexée une enveloppe cellulaire apparemment vide (Hématoxyline ; x 1700).

14 : union de deux cellules dont l'une contient au moins quatre noyaux (un seul visible sur la photo). Remarquer la texture différente du cytoplasme des deux éléments. (Azan ; x 1700.)

15 : cellules fusionnées dont l'une contient deux noyaux. La seconde cellule s'insinue dans l'épithélium du début de l'œsophage. (Azan x 1800.)

16 : autre exemple de cellules fusionnées, au niveau de l'épithélium buccal. (Azan x 1750.)

17 : cellules en partie fusionnées montrant des faisceaux de fibrilles. (May Grünwald-Giemsa x 1700.)

18 : couple de cellules dont l'une semble contenir deux noyaux accolés ou en partie fusionnés masqués par des fibrilles. (May Grünwald-Giemsa x 1850.)

II. - Formes du pourtour de la bouche et de l'entrée de l'œsophage

Parmi les nombreux stades uninucléés ou les pseudoplasmodes à deux ou trois éléments cellulaires retenus par l'épithélium de ces régions, beaucoup s'insinuent dans celui-ci, mais ne peuvent franchir la basale.

Sur des coupes sagittales d'une seule huître fixée en mars 1969 se voient en outre des cellules accolées deux à deux ou fusionnées à des degrés divers. Le diamètre de ces cellules uninucléées varie de 9 à 13 µm et, pour cette même huître, nous avons recensé une trentaine de couples. Certains sont libres, à quelque distance de l'épithélium (Planche II, 12, 14, 18) ; d'autres y sont accolés (Planche II, 16, 17), ou s'y enfoncent (Planche II, 10, 11, 13, 15).

Les éléments de ces couples, de taille subégale, diffèrent par la texture de leur cytoplasme, celle-ci étant assez lâche dans l'un d'eux, plus finement granuleuse dans l'autre. Leur colorabilité diffère aussi légèrement. Les noyaux sont assez comparables car, après le Mann-Dominici ou l'azan, on les voit centrés par un corpuscule rouge et cernés d'une marge violette. Certains de ces éléments contiennent quelques fibrilles.

Il existe des ensembles de deux cellules très largement accolées dont l'une contient deux noyaux presque identiques et d'autres où l'on n'observe de noyau que dans la plus grosse. Sur une préparation colorée par l'hématoxyline (Planche I, 13) se voit une cellule ovoïde de 11 µm à noyau entouré d'une marge noirâtre qui est à peu près complètement enfoncée dans l'épithélium. Or, accolée à cette cellule et à l'extérieur, une enveloppe très claire semble s'être vidée de son contenu. Nous avons retrouvé d'autres « fantômes » de cette sorte prolongeant des cellules plus ou moins enfoncées dans le tégument.

Ces aspects qui évoquent des phénomènes de conjugaison ont été retrouvés ça et là dans la glande digestive de plusieurs huîtres. Dans un cas, une cellule de 10 µm de diamètre à cytoplasme rose franc (azan) se délimite par une légère constriction d'une masse subhémisphérique anucléée très légèrement violacée. Ailleurs, le premier élément contient 5 noyaux alors que la masse anucléée forme un mamelon plus petit.

Après le Feulgen-vert lumière, de tels complexes apparaissent le plus souvent uniformément verts sur nos préparations (le reste étant normalement coloré), ce qui peut s'expliquer par la perte de la colorabilité déjà signalée à certains stades.

Enfin, vers l'entrée de l'œsophage comme dans la glande digestive, s'observent aussi des éléments de 8 à 18 µm à deux ou trois noyaux. Ces images semblent indiquer que le passage de la cellule souche uninucléée au pseudoplasmode peut être très retardé.

Discussion

Entreprise dès la découverte du parasite des huîtres plates qui par la suite devait être baptisé *Marteilia refringens*, la présente étude a été d'emblée orientée vers la caractérisation des différents stades de développement pour tenter d'élucider le mode de déroulement du cycle vital. En ce sens, la microscopie optique, malgré ses insuffisances, présentait certains avantages : prospection rapide de vastes champs, indications souvent précieuses fournies par des différences de coloration parfois légères, adaptation des méthodes de coloration au but recherché. C'est du reste bien cette technique qui a permis d'établir dans le passé les nombreux cycles qui servent encore de référence.

Dans le cas de *M. refringens* dont à certains égards l'évolution rappelle celle de *Myxobolus*, les résultats du bourgeonnement endogène ne nous ont pas semblé uniformes. Nous avons donc tenté d'expliquer les dissemblances qui se manifestaient au niveau des cellules dites « primaires » (souches), « secondaires » (pansporoblastes) et « tertiaires » (spores, sporoblastes) en essayant de caractériser les éléments précurseurs des premières, puis la signification de ceux qui dérivent des dernières.

Le système auquel nous sommes parvenu s'est imposé sous la forme de « lignées » de cellules de certains types dérivant les unes des autres et qui aboutissent pour deux d'entre elles à des sortes d'amoebules de taille légèrement différente et à de petites formations contenant un organite faiblement spiralisé dont la destinée demeure inconnue. Aucune indication ne permet de considérer, en particulier, qu'il s'agit là de gamètes mâles comme le suggère leur aspect.

L'existence de couples de cellules accolées ou en partie fusionnées, évoquant une conjugaison, n'a pas non plus reçu d'explication. Mais on rappellera que des faits de sexualité sont connus chez des Coccidioides (*Sphaeromyxa*) et l'on ne peut exclure l'hypothèse de leur présence chez *Marteilia*. Ici nous pouvons envisager deux possibilités : ou bien il y a union ; ou bien ces aspects sont trompeurs et, au lieu d'une conjugaison, il y aurait perturbation profonde de la première division d'une des lignées B ou C, provoquant un bourgeonnement qui, d'endogène, deviendrait exogène ; la cellule normalement interne se différencierait à l'extérieur. Mais, le fait que lorsque deux éléments sont accolés et séparés par une constriction l'un d'eux contienne deux noyaux alors que l'autre n'en montre aucun ne plaide guère en faveur de cette hypothèse.

Il ne nous a malheureusement pas été possible de suivre mois par mois durant une ou deux années les phases par lesquelles passe *M. refringens* ; mais plusieurs différences constatées dans nos lignées sont vraisemblablement en relation avec les saisons. Enfin, d'autres différences sont perceptibles selon la provenance des huîtres (Bretagne ou Corse).

En résumé, dans cette étude, nous avons suggéré que le cycle de *Marteilia refringens* semble comporter, outre une phase de schizogonie, une autre phase plus complexe donnant lieu par deux lignées

cellulaires distinctes à la production de cellules de deux sortes d'où pourraient peut-être dériver des éléments en rapport avec des phénomènes de sexualité.

Les particularités signalées dans ce travail, s'ajoutant au mode de bourgeonnement endogène de *Marteilia* laissent douter de la possibilité d'intégrer ce Protiste au groupe des Haplosporidies, groupe qui, en réalité, demeure mal défini. Aussi la proposition de Desportes et Ginsburger de créer l'ordre des Marteiliida nous semble-t-elle tout à t'aït justifiée.

Summary

Marteilia refringens, a parasite of the flat oyster, has been included in the Haplosporidian group by Perkins (1976) from an electron microscopy study. However, its cycle appears more complex than that already described. Really, after studies in optic microscopy, it seems that besides a possible phase of schizogony exist two other distinct phases of development which exhibit a certain parallelism and might contribute to the production of elements, perhaps in relation with a sexual phase.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- COMPS, M., 1970. — Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates dans le bassin de Marennes. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 34, (3), pp. 317-326.
- COMPS, M., 1977. — *Marteilia lengehi* n. sp., parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. *id.*, 40, (2), pp. 347-349.
- COMPS, M., 1978. — Evolution des recherches et études récentes en pathologie des huîtres. *Oceanol. Acta*, 1, (2), pp. 255-262.
- DESPORTES, I. et GINSBURGER-VOGEL, T., 1977. — Affinités du genre *Marteilia*, parasite d'huîtres (maladie des Abers) et du Crustacé *Orchestia gammarellus* (Pallas) avec les Myxosporidies, Actinomyxidies et Paramyxidies. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 285, D, pp. 1111-1114.
- GINSBURGER-VOGEL, T., DESPORTES, I. et ZERBIB, C., 1976. — Présence chez l'Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas), d'un Protiste parasite ; ses affinités avec *Marteilia refringens*, agent de l'épidémie de l'huître plate. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 283, D, pp. 939-942.
- GRIZEL, H., COMPS, M., BONAMI, J.R., COUSERANS, F., DUTHOIT, J.L. et LE PENNEC, M.A., 1974. — Recherches sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Sc. et Pêches*, 240, 241, pp. 7-30.
- GIRIZEL, H., COMPS, M., COUSERANS F., BONAMI, J.R. et VAGO, C. — Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épidémie actuelle de l'huître plate. *C.R. Acad. Se. Paris*, 279, D, pp. 783-784.
- HERRHACH, B., 1971. — Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. *Rev. Trait. Inst. Pêches marit.*, 35, (1), pp. 79-87.
- PERKINS, F.O., 1976. — Ultrastructure of sporulation of the European Flat Oyster Pathogen, *Marteilia refringens*. Taxonomic implications. *Journ. Protoz.*, 23, (1), pp. 64-74.
- PERKINS, F.O. et WOLF, p.H., 1976. — Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n., Haplosporidian Pathogen of Australian Oysters. *Journ. Parasit.*, 62, (4), pp. 528-538.