LA PROGÉNÈSE CHEZ LES TRÉMATODES DIGÉNÉTIQUES

(suite)

Technique et recherches personnelles

Par Alice BUTTNER

III. TECHNIQUE

Détection des gîtes et des animaux infestés. Réserves d'animaux neufs servant d'hôtes expérimentaux et biologie des élevages. Techniques d'observation sur le vivant. Techniques de fixation et de coloration des distomes : coupes et préparations in toto. Techniques particulières à l'étude de la progénèse : action de la lumière, de la température ; étude des kystes mélanifères ; digestion artificielle des tissus et culture de métacercaires non encore progénétiques sur différents milieux.

Un problème constant se pose, au cours de l'expérimentation chez les trématodes, c'est celui de l'identification certaine du parasite étudié chez les différents hôtes où il poursuit son évolution.

En particulier, dans l'étude du déterminisme de la progénèse qui fait l'objet de ce mémoire, il nous a fallu mettre au point une technique de travail suffisamment précise pour pouvoir, à tous moments, suivre le développement expérimental de nos distomes et ne le point confondre avec les infestations spontanées préexistant chez l'hôte.

Nous avons eu plusieurs fois l'occasion de constater l'incertitude qui pèse sur certains résultats, du fait que l'auteur n'a pas spécifié s'il utilisait des animaux neufs d'élevage ou des hôtes pris dans la nature et par conséquent susceptibles de présenter des infestations spontanées, étrangères à celle qu'il poursuit expérimentalement.

La même incertitude existe lorsqu'un observateur identifie avec soin une cercaire particulière, après plusieurs semaines d'examen minutieux, et donne ensuite un pourcentage d'infestation des mollusques parasités dans la nature par la même cercaire. Il est évident qu'on ne peut, pour chaque animal infesté, refaire une étude morphologique aussi détaillée

de la cercaire qu'il émet ; il n'y a donc là qu'une probabilité d'infestation, basée sur une approximation morphologique, probabilité qui est peut-être très loin de la réalité, car la même espèce de mollusque peut héberger un grand nombre de cercaires appartenant au même groupe, mais à des espèces de trématodes essentiellement différentes. Ces cercaires sont souvent très difficiles à distinguer les unes des autres. Aussi, ne ferons-nous appel aux statistiques d'infestation spontanée qu'avec une extrême réserve, à moins qu'il ne s'agisse d'un parasitisme par métacercaires, stade auquel le distome est parfois assez évolué pour donner lieu à une détermination générique.

Nous nous étendrons un peu plus longuement, au cours de ce chapitre, sur la constitution de réserves d'hôtes expérimentaux indemnes de toute infection et sur l'étude de leur biologie, qui, pour n'être pas une part très spectaculaire de nos recherches, n'en représentent pas moins leur base essentielle, celle qui a nécessité, sans défaillance, nos efforts et notre attention.

Gîtes explorés. Récolte des animaux infestés

Nous nous sommes appliquée à rechercher, chaque fois que cela nous a été possible, des souches vivantes de trématodes présentant le phénomène de la progénèse, afin de pouvoir comparer leur processus d'évolution.

— Le phénomène nous est apparu pour la première fois à la Station expérimentale de Richelieu (Indre-et-Loire) chez *Paralepoderma* (= *Plagiorchis*) *brumpti* (A. Buttner 1950), espèce nouvelle que nous avons trouvée au stade de métacercaire progénétique chez des têtards d'*Alytes obstetricans* parasités par des cercaires de *Planorbis planorbis* ; ces mollusques ont été récoltés dans des petits canaux de drainage du Domaine Universitaire où se trouve la Station.

— Parmi les autres gîtes où nous avons récolté notre matériel, nous avons été parfois surprise de constater la pérennité de certaines infestations d'un caractère cependant si particulier. C'est ainsi que nous avons pu retrouver chez 2 discoglosses sur 18, provenant du Jardin d'Essais d'Alger, les métacercaires progénétiques de *Ratzia joyeuxi*, découvertes par E. Brumpt dans ce même gîte en 1922. Pour étudier l'évolution de ce parasite, nous avons obtenu, d'autre part, des *Melanopsis* des environs de Biskra (Algérie) et du Maroc.

— Dans les petits ruisseaux du Bois de Boulogne qui bordent et traversent l'allée de Longchamp, de la Porte-Maillot au lac supérieur, nous avons retrouvé chez des *Gammarus pulex* L., ainsi que chez un nouvel hôte, la larve de *Sialis lutaria* (névroptère, planipenne), les métacercaires progénétiques de *Pleurogenes medians*

(Olss.), découvertes dans ce gîte, en juillet 1924, par P. Mathias. Nous avons en outre récolté dans les fonds vaseux plusieurs centaines de *Bithynia tentaculata*, mollusque abritant dans 12-15 p. 100 des cas la cercaire « virgule » donnant naissance à ce distome. Nous avons reçu du Maroc (1) une demi-douzaine de *Chameleon vulgaris*, chez lesquels nous avons pu suivre l'évolution de ce parasite aussi aisément que chez des batraciens anoures ou urodèles.

— A Saint-Jean-de-Losne (Côte d'Or), en avril 1932, le regretté P. Paris avait observé dans la masse viscérale de *Planorbis planorbis* (L.), récoltés dans les marais environnants, des métacercaires enkystées et libres, toutes progénétiques ; d'autres métacercaires plus petites et plus jeunes ne renfermaient pas encore d'œufs. Nous avons pu obtenir du même gîte des *Planorbis planorbis* (L.) (2) qui présentent des métacercaires non progénétiques, enkystées dans les viscères, et qui, morphologiquement, ont une grande ressemblance avec celles découvertes par Paris et décrites à cette époque par R.-Ph. Dollfus.

— Nous avons également reçu (3), des environs de Rennes, où Pontallié a signalé en 1851, chez des tritons, une métacercaire progénétique rapportée par lui à *Distoma crassicolle* Rud. 1809 [= *Brachycoelium salamandræ* (Frölich 1789)], une trentaine de jeunes tritons que nous avons conservés à fin d'autopsie.

— Enfin, nous avons recherché dans certaines régions pluvieuses (Normandie, environs de Paris, Indre-et-Loire) de jeunes oiseaux encore au nid, susceptibles de présenter des kystes de *Collyriclum faba* (Bremser, in Schmalz, 1831), ainsi qu'un certain nombre de mollusques terrestres hébergeant vraisemblablement la cercaire de ce trématode dont l'évolution, encore inconnue, s'apparente peut-être à la progénèse. Nous ne pourrions ici qu'ébaucher cette étude dont la substance fera elle-même l'objet d'un travail ultérieur.

Nous avons dû renoncer à l'étude sur le vivant des *cercaires progénétiques*, les quelque 200 mollusques prosobranches américains, vecteurs de ces distomes, que nous n'avons pu recevoir en temps utile, s'étant révélés indemnes d'infestation. Nous nous sommes donc bornée à les examiner sur préparations fixées et colorées (4).

(1) Ces animaux nous ont été procurés par l'obligeant intermédiaire du Docteur A. Maurice, Chef de Service à l'Institut d'Hygiène de Rabat.

(2) Aimablement récoltés par M. Bitsch, assistant du Professeur Denis, de la Faculté des Sciences de Dijon, que nous remercions pour son obligeant concours.

(3) C'est au Dr Patay, de Rennes, que nous devons d'avoir pu étudier cet intéressant matériel, et nous lui exprimons ici nos sincères remerciements.

(4) Provenant des collections de Mrs. M. W. Horsfall.

Réserves et élevages d'animaux neufs

Nous avons déjà signalé l'importance des hôtes expérimentaux neufs pour l'étude du développement d'un distome ou pour élucider son cycle évolutif. La constitution de ces réserves doit être souvent prévue fort longtemps à l'avance. Elle porte sur les trois catégories d'hôtes favorisant normalement les trois stades de développement des trématodes digénétiques : cercaire, métacercaire et adulte.

Première catégorie : les mollusques : technique d'élevage

Les trématodes digénétiques ont une spécificité très marquée pour leur premier hôte intermédiaire et on peut admettre, en règle générale, que les espèces d'une même famille évoluent toujours chez des mollusques appartenant au même ordre. C'est ainsi que toutes les espèces d'*Opisthorchiidae* et d'*Heterophyidae*, par exemple, parasiteront des gastéropodes prosobranches, tandis que celles des *Plagiorchiidae* n'infesteront que des pulmonés.

La biologie de ces divers mollusques est assez différente et il est nécessaire, pour posséder en temps opportun des exemplaires jeunes, mais suffisamment évolués pour résister aux infestations expérimentales, de connaître à la fois leurs conditions d'élevage, leur époque de ponte et leur durée de développement. Nous avons pu nous familiariser avec ces techniques d'élevage grâce aux souches de schistosomes que nous conservons au laboratoire depuis plusieurs années sur des mollusques pulmonés des genres *Bullinus* et *Planorbis*.

Nous avons utilisé pour nos expériences sur la progénèse les mollusques suivants dont nous avons obtenu l'élevage : *Planorbis planorbis* L. (gastéropode pulmoné), *Bithynia tentaculata*, *Melanopsis* (gastéropodes prosobranches).

Les planorbes (*Planorbis planorbis*) sont élevés dans des cuves de 5 litres, d'un diamètre de 20 cm. environ. L'eau de Seine au pH assez élevé (7,1) est généralement préférable à l'eau potable. Cette eau est chambrée en hiver, afin d'éviter de brusques refroidissements de température lorsqu'on change l'eau. Des plantes aquatiques (*Myriophyllum*, *Ceratophyllum*, *Potamogeton*, et surtout certaines confervacées) flottent dans le bocal et l'oxygène dégagé conserve à l'eau sa pureté. Des feuilles mortes retirées des ruisseaux ou des bassins sont soigneusement séchées et exposées au soleil, après en avoir éliminé tout organisme vivant (mollusques, sangsues, etc...). Elles sont alors déposées dans le fond des cuves et se décomposent lente-

ment, servant d'aliment aux planorbes qui rampent volontiers sur elles. On peut ajouter un peu de salade crue, fraîche ou séchée, dont ils ne se nourrissent d'ailleurs qu'accessoirement.

Les cuves sont placées dans de grandes armoires, chauffées par des ampoules électriques en hiver et bien exposées au midi. La température moyenne doit être de 18 à 20° C. L'eau n'est changée que tous les trois ou quatre jours, l'exposition à la lumière et la présence de végétaux aquatiques lui assurant une bonne aération.

Les pontes sont déposées sur les parois du bocal et la disposition des œufs sur un seul plan, en une masse ovulaire, est caractéristique. Elles se produisent au printemps et en été. Quand les parois du verre en sont assez abondamment couvertes, on sépare ces pontes des adultes qui, sans cette précaution, les dévorent presque aussitôt. Il reste à surveiller le développement des jeunes, plus sensibles aux eaux légèrement polluées, qui se produit en 4-6 semaines ; pour ne pas perdre les mollusques venant d'éclore, lorsque l'eau est changée, on verse le contenu du bocal dans un filet en soie à bluter que l'on retourne et plonge ensuite dans la cuve à nouveau remplie d'eau.

Pour la conservation des mollusques parasités, la technique est la même ; toutefois, il faut veiller avec plus de soin à l'aération et la pureté de l'eau et retirer immédiatement les spécimens qui meurent.

Les *Bithynia* ont été placés dans une grande cuve rectangulaire en verre, de 90 cm. de long sur 40 cm. de large et 30 cm. de haut, bien exposée au soleil dans une pièce chauffée. Le fond de la cuve était tapissé de sable et de gravier, recouvert par une boue riche en diatomées et végétaux en décomposition ; de nombreuses feuilles mortes, préalablement séchées, s'y trouvaient également, ainsi que des végétaux aquatiques prélevés dans un bassin privé de mollusques. Dans ces conditions, les *Bithynia* se sont admirablement développées et les parois de la cuve étaient couvertes de leurs pontes allongées dès le début du printemps. L'eau restait limpide et il suffisait de remplacer de temps en temps ce qui disparaissait par évaporation. En six semaines à deux mois, les petites *Bithynia* peuvent être utilisées pour des infestations expérimentales.

Bien que végétariens, ces animaux sont également carnivores et on les voit souvent dévorer le corps d'un animal mort.

Les *Melanopsis* ont été conservés dans les mêmes conditions que les *Planorbis planorbis* ; toutefois, ils ne subsistent que dans une eau très aérée et courante ; une petite pompe nous a permis d'obtenir ce résultat ; l'eau était changée chaque jour, et seules des feuilles mortes et des herbes aquatiques servaient de nourriture.

Observons que ces divers mollusques vivent dans la nature à des températures inférieures ou supérieures à celle maintenue au laboratoire, qui nous paraît réaliser les conditions optima pour un développement rapide. Ces animaux présentent aussi spontanément une très grande résistance à la dessiccation. Remarquons en particulier que les *Planorbis planorbis* récoltés dans les canaux de drainage de Richelieu vivent en anhydrobiose pendant une grande partie de l'année (juin à novembre).

Deuxième catégorie : batraciens larvaires et larves d'insectes

Pour suivre, chez le second hôte intermédiaire, l'enkystement de la cercaire, il nous a fallu, suivant les cas, des têtards de batraciens ou des larves d'insectes.

Nous avons prélevé au Bois de Boulogne et de Vincennes, et dans le Domaine de Richelieu, des pontes de divers batraciens dès la fin de mars ou le début d'avril : c'est ainsi que nous avons pu avoir à notre disposition des têtards de grenouilles rousses et agiles, de crapauds, de tritons et même de discoglosses, indemnes de toute infestation vermineuse. Ces têtards, nourris de boue à diatomées ou de viande, ont été conservés dans différents bassins du Domaine de Richelieu ou de la Faculté de Médecine de Paris ; certains d'entre eux (*Alytes obstetricans*), provenant d'une ponte tardive, maintenus à une température assez basse et dont la nourriture était volontairement peu abondante, ont pu être aisément conservés à l'état de têtards pendant plus d'un an.

Nous avons constitué également une réserve de larves d'insectes, larves d'aéidinés, de phryganes, de *Sialis*, d'éphémérides et d'odonates. Les larves de phryganes ont été bien conservées dans une vaste cuve en ciment, située sur une terrasse exposée au midi, largement alimentée en feuilles mortes, salade et en végétaux aquatiques. Les larves de *Sialis*, très cannibales, ont été placées dans des tubes isolés avec un peu de *Myriophyllum*, des *Asellus* et quelques fragments de feuilles mortes ; elles se sont ainsi maintenues à l'étuve à 25° pendant près de cinq mois. Les larves d'éphémérides et d'odonates, ainsi que les aselles ont été placées dans de vastes plateaux remplis de feuilles mortes.

Troisième catégorie : hôtes définitifs

Nous n'en dirons que peu de choses, puisqu'ils ne nous ont été que d'un assez faible secours au cours de nos recherches. Signalons

cependant, qu'en raison de la fréquence de leur infestation naturelle, nous nous sommes servie de préférence, soit d'animaux habituellement indemnes, les grenouilles rousses et agiles par exemple, soit d'espèces exotiques telles qu'*Amblystoma mexicanum* ou *Xenopus laevis* ; nous avons conservé des poissons américains acclimatés en France et appartenant à la famille des *Centrarchidae*, *Macropterus salmoides*, en vue d'une évolution éventuelle de cercaires progénétiques ; enfin, en ce qui concerne les reptiles, nous avons utilisé et conservé des caméléons, diverses couleuvres des genres *Coluber* et *Tropidonotus*, deux grandes couleuvres africaines du genre *Zamenis* et deux vipères qui sont malheureusement mortes avant que nous ayons pu les infester ; nous les mentionnons cependant pour signaler que la vipère, protégée par sa vie terrestre des infestations par mollusques aquatiques, constitue un hôte de choix pour étudier l'évolution expérimentale des parasites de couleuvre (E. Brumpt, 1944-1945).

Techniques d'observation sur le vivant

Les mollusques parasités spontanément ou expérimentalement sont placés isolément dans des tubes à essais préalablement passés à l'acide chlorhydrique, puis à l'eau, pour rendre les parois tout à fait transparentes. L'eau en est changée chaque jour. Les tubes sont exposés au soleil à une température de 20-25° et examinés quotidiennement pour contrôler l'émission des cercaires. Les mollusques infestés sont ensuite dénombrés pour établir les pourcentages d'infestation.

Le nombre des cercaires émises par un seul mollusque est ainsi calculé : on verse dans une éprouvette de 10 cc., d'un diamètre très étroit, un volume égal de l'eau contenant les cercaires, préalablement secouée pour homogénéiser leur répartition. Celles-ci sont dénombrées rapidement à la loupe dans toute la hauteur de l'éprouvette et en profondeur, ce qui est aisé en raison de son faible diamètre. Il suffit ensuite d'évaluer le volume total d'eau contenue dans le tube ; une simple règle de trois donnera le nombre total de cercaires émises en 24 heures dans cette quantité d'eau.

Un autre procédé usité, lorsque la cercaire a une affinité certaine pour un hôte particulier, est la *xénarithmèse* (1) : on expose un *animal-piège* (chironome ou têtard), chez lequel toutes les cercaires d'une espèce donnée s'enkystent et on calcule ensuite le nombre de kystes formés en 24 heures.

(1) Voir E. BRUMPT (1944-1945) : Cycle évolutif d'*Opisthioglyphe ranæ*, p. 214.

L'étude morphologique de nos cercaires vivantes a été faite entre lame et lamelle, dans l'eau physiologique ou dans les sécrétions de

FIG. 27. — Technique d'infestation d'un têtard avec des cercaires à géotropisme positif. Technique d'évaluation approximative du poids d'un têtard

FIG. 28. — Technique d'observation rapide des tissus pour dénombrer les métacercaires.

l'hôte qui ne subissent qu'une lente évaporation. Elle n'a porté que sur des xiphidiocercaires des types *armata* et *virgula*. L'action des colorants vitaux, rouge neutre, vert de méthyle, bleu de Nil, nous a été aussi d'un secours précieux pour mettre en évidence certaines

structures. Les mensurations ont été exécutées sur des cercaires tuées par la chaleur à 60° et dans un tube à essais ou entre lame et lamelle, et après fixation au formol à 5 p. 100.

Cette étude a toujours été complétée par une étude biologique de la cercaire : *tropismes* particuliers, constants pour une espèce donnée ; phototropisme, thermotropisme, géotropisme, aétotropisme, stéréotropisme, xénotropisme, etc... Les rythmes d'émission, enfin le choix de l'hôte sont également caractéristiques : une première classification sommaire peut être établie entre les cercaires *entomophiles* et les cercaires *gyrinophiles* ou *malacophiles*. A l'intérieur de ces groupes, une spécificité plus étroite permet un *xénodiagnostic* plus précis.

L'étude de l'enkystement a été pratiquée soit expérimentalement sur un hôte d'élection (têtard par exemple) (1), soit par certains procédés artificiels (enkystement dans le milieu extérieur sous l'effet d'une solution concentrée de vert de méthyle, inoculation dans le péritoine ou le sac dorsal d'une grenouille de cercaires émulsionnées dans une eau huileuse, cercaires enfermées dans un petit sac de collodion introduit dans le sac dorsal pour observer l'action osmotique des sécrétions de l'hôte).

Technique d'autopsie et d'examen des animaux infestés

Avant de les autopsier, et dès le début des infestations, il est bon de connaître le poids des animaux mis en expérience, qui présente une grande importance quand on veut étudier le rôle pathogène de certaines cercaires : un animal petit peut être tué par quelques cercaires seulement, alors que des animaux plus gros en supportent un grand nombre sans être incommodés.

Nous nous sommes surtout servie, pour nos expériences, de têtards de batraciens, et parfois de poissons. Comme ces animaux, qui sautent et meurent souvent rapidement hors de l'eau, sont assez difficiles à peser sur un trébuchet et que leur poids spécifique est à peine supérieur à celui de l'eau, nous avons en général évalué leur poids par un procédé volumétrique, que nous décrivons ci-dessous :

Une éprouvette à pied de 10 cc. est remplie par 5-6 cc. d'eau ; l'animal y est introduit : le nombre de centimètres cubes dont s'est élevé le niveau d'eau dans l'éprouvette représente le nombre de grammes correspondant au poids de l'animal (fig. 27).

(1) Pour cela, on verse dans une éprouvette de 10 cc. un peu d'eau portant en suspension le nombre de cercaires voulu. Suivant que ces cercaires ont un géotropisme positif ou négatif, on place le têtard dans l'éprouvette, la tête en haut ou en bas, afin qu'il en ingère le moins possible (fig. 27).

Si celui-ci est très petit (très jeunes têtards d'*Alytes*, de *Rana* ou de *Triton*), on met dans l'éprouvette 10 ou 20 de ces petits batraciens, et l'on divise l'augmentation de volume dans l'éprouvette par le nombre des animaux introduits pour obtenir leur poids individuel moyen.

Ce procédé n'a pas une rigueur absolue, mais il est pratique et permettrait à de nombreux expérimentateurs d'évaluer approximativement le poids des animaux utilisés, renseignement qui apporte un élément toujours utile à connaître dans l'étude des rapports entre l'hôte et son parasite.

Après une autopsie rapide, les tissus sont écrasés entre deux lames maintenues aux deux extrémités par de fortes pinces (fig. 28). Pour examiner les mollusques, on les broie délicatement vers l'extrémité des deux lames ; le corps de l'animal est lavé dans l'eau physiologique et débarrassé des débris de la coquille, puis comprimé à nouveau entre deux lames propres ; les sporocystes sont ainsi parfaitement visibles dans la masse viscérale et l'anatomie du mollusque entièrement respectée permet de localiser aisément les points d'infestation. Chez certains animaux à téguments foncés (têtards de crapauds) ou épais (jeunes tritons terrestres, sangsues, etc...), les tissus sont finement hachés, avant d'être comprimés entre deux lames, afin de libérer le plus grand nombre possible de métacercaires.

Infestation des hôtes définitifs

Elles ont consisté à faire ingérer à différents animaux (couleuvres, grenouilles, discoglosses, tritons, caméléons) le plus grand nombre possible de métacercaires, généralement encore incluses dans les tissus. Un moyen pratique de faire avaler un grand nombre de ces parasites est de les réunir avec leurs débris tissulaires dans un morceau de peau de jeune grenouille que l'on introduit ensuite profondément dans l'œsophage de l'animal à infester.

Techniques de fixation et de coloration : préparations *in toto* et coupes

Le matériel conservé a été fixé dans le liquide de Bouin, l'alcool-formol, le formol à 5 p. 100.

Les préparations *in toto* de distomes progénétiques ont été ainsi effectuées : pour sortir la métacercare de son kyste, on absorbe légèrement, sur l'un des bords de la lamelle, avec un papier filtre,

le liquide où baigne la métacercaire préalablement isolée, de façon à lui imprimer une légère pression qui suffit en général à faire éclater le kyste ; sur une autre lamelle, on dépose une goutte d'alcool-formol et on la substitue rapidement à celle qui recouvre la métacercaire et qui est détachée en rajoutant par capillarité, à la pipette, un peu d'eau physiologique. La lame est alors portée dans une boîte de Pétri et un petit poids est déposé sur la lamelle (1). On verse dans la boîte de l'alcool-formol jusqu'à submersion de la lamelle ainsi maintenue, et on laisse agir le fixateur pendant deux heures environ. Le distome aplati est alors lavé dans l'eau distillée, puis dans l'alcool à 70°. La coloration est faite au carmin chlorhydrique, ou à l'hémalun qui donne des préparations plus nuancées, par les techniques habituelles.

Les métacercaires progénétiques de *Pleurogenes medians* présentent certaines difficultés, du fait qu'elles sont enveloppées d'une triple enveloppe kystique, dont la plus externe est souvent chitineuse. Les deux enveloppes internes sont très résistantes et le distome, après rupture mécanique des kystes, est généralement à demi lysé ou fortement endommagé. Nous avons dû procéder à la digestion artificielle des kystes par de la pepsine chlorhydrique ; on opère sous le microscope et on arrête l'opération aussitôt que la métacercaire est libérée. On aspire alors la solution d'un côté de la lamelle, tandis qu'on y introduit de l'autre, avec une pipette, de l'eau physiologique. Nous avons également utilisé, quand nous possédions assez de métacercaires, le suc gastrique naturel, en faisant ingérer un fragment de tissu très parasité à un gros têtard ; l'animal était tué deux heures plus tard, et nous retrouvions les distomes libérés de leurs kystes dans le tube digestif.

Les coupes ont été effectuées soit sur des métacercaires isolées, soit sur des métacercaires incluses dans les tissus. Les premières ont été faites sur 7 et 10 μ , ces dernières donnant fréquemment des préparations plus lisibles ; les coupes de kystes inclus dans les tissus sont de 7 μ . Les colorations les plus fréquemment employées par nous sont celles à l'hémalun-éosine ; quelques-unes ont été colorées à l'hémalun-éosine orange qui nous a donné, pour l'étude du processus de la fécondation, une meilleure différenciation cellulaire ; trois ou quatre coupes de *Ratzia joyeuxi* ont été colorées par la méthode de Mann au bleu de méthyle-éosine, qui donne également une bonne différenciation histologique.

(1) Ces poids sont constitués par des balles de plomb aplaties ou par de petits anneaux de plomb de 15-18 mm. de diamètre, 2-3 mm. d'épaisseur, 3-5 mm. de hauteur. Ces anneaux sont aisément confectionnés en sciant des tuyaux de plomb de diamètre variable ; on peut ainsi en faire varier les dimensions suivant la fragilité plus ou moins grande du matériel fixé. L'avantage de ces anneaux est de permettre de contrôler à la loupe l'état des distomes en cours de fixation.

Techniques particulières à l'étude de la progénèse

En dehors des examens sur coupes, nous avons déjà parlé de procédés de digestion artificielle des tissus destinés à isoler les kystes métacercariens sans léser le distome. Certaines métacercaires (*Pleurogenes medians*) se développent souvent dans des kystes chitineux incrustés de pigments mélaniques. En dépit de cette enveloppe, il est remarquable de constater que le distome se nourrit parfaitement par osmose et que, dans un cas, nous avons pu compter dans une telle métacercaire plus de 150 œufs.

Il eût été intéressant de pouvoir déterminer la nature histochimique de cette membrane et son identité éventuelle avec les masses mélaniques disséminées çà et là dans le corps de l'insecte. Nous n'avons pu achever cette étude qui est en cours. Signalons simplement que Schülze, cité par Lison, admet que la chitine, dans les organismes animaux, se trouve incrustée de pigments mélaniques. Les procédés que nous utilisons tendent donc à mettre en évidence la nature des incrustes et à déceler ensuite la chitine. Nos essais de dépigmentation par différents oxydants, réaction caractéristique des mélanines, ne nous ont pas donné de résultats concluants ; nous essayons la réaction argentaffine de Masson, réduction du nitrate d'argent ammoniacal sans intervention d'aucun réducteur. Pour déceler la chitine, Schülze a montré qu'après un traitement par le diaphanol (acide chlor-dioxyacétique), qui dissout les incrustes, la chitine donne régulièrement une coloration intense avec le chlorure de zinc iodé, qui constitue un bon réactif pour divers polysaccharides. Nous ne pouvons que signaler ici ces premiers essais expérimentaux qui sont encore inachevés.

Pour étudier l'action de différents éléments chimiques ou biologiques sur le développement du distome enkysté, nous avons cultivé des métacercaires de *Pleurogenes medians* sur plusieurs milieux (NNN, milieu sucré de Galliard, sérum de cheval et Ringer, milieux à l'œuf + Ringer, gélose nutritive, eau peptonée (1), etc...). Les cultures ont été réalisées soit en tube, soit en chambre à huile. Les cultures en tube comportaient des métacercaires jeunes, obtenues expérimentalement chez les larves de phrygane, incluses dans de petits fragments de tissu conjonctif. Les larves de phrygane, sommairement désinfectées par un séjour de quelques minutes dans l'eau oxygénée, puis dans l'alcool à 70°, étaient soumises à plusieurs lavages dans de l'eau physiologique stérile. Après dissection

(1) Nous remercions le Dr Lamy, Assistant du Dr Deschiens à l'Institut Pasteur, qui a bien voulu nous doser et nous préparer ces milieux.

avec deux aiguilles flambées sous le binoculaire, les fragments les plus riches en métacercaires ont étéensemencés dans les différents milieux. Pour cultiver des métacercaires isolées, nous avons constitué une chambre à huile de la manière suivante : une lame de verre assez large porte deux petits montants de verre de couleur, d'une longueur légèrement inférieure à la largeur de la lame. Disposés parallèlement et fixés au soude-grès à leur support, ils sont distants de 2 cm. (fig. 29).

Les métacercaires (au nombre de 2 ou 3) étant isolées dans de l'eau physiologique stérile, on dépose sur une lamelle 22 × 32, préalablement lavée et brossée à l'eau et au savon, puis passée à la flamme, une goutte du milieu de culture ; on prélève aseptiquement

FIG. 29. — Chambre à huile pour culture d'une ou de quelques métacercaires (vue en coupe médiane).

avec une pipette stérile les trois métacercaires isolées avec le minimum d'eau physiologique, et on les rejette dans la goutte de milieu déposée sur la lamelle, le plus près possible du verre. On recouvre le tout d'une large goutte d'huile de paraffine, puis on retourne la lamelle et on la dépose sur les supports en verre. On introduit alors entre les deux supports, sous la goutte pendante, de l'huile de paraffine, jusqu'à ce qu'il se forme une nappe homogène qui enfouire de toute part la goutte de milieu contenant les métacercaires. On peut ainsi, à tout moment, porter la chambre à huile sur la platine du microscope et suivre l'évolution des kystes cultivés. Pour renouveler le milieu, il suffit d'effiler une pipette, de la couder à son extrémité à la flamme d'une veilleuse. On introduit à plat, entre les deux supports, la pipette ainsi coudée, puis on la retourne pour que la partie coudée atteigne la goutte de milieuensemencé ; on aspire un peu du liquide sur les bords, puis, avec une seconde pipette coudée et stérile, on injecte, par le même procédé, du milieu neuf autour des kystes en culture. Ce procédé, un peu délicat à mettre au point, permet de suivre avec sûreté le développement d'une seule métacercaire. On peut confectionner ainsi toute une série de chambres à huile et comparer l'action de différents produits biologiques utilisés séparément et simultanément, dans les mêmes conditions, sur des métacercaires du même âge.

IV. RECHERCHES PERSONNELLES

Au cours de nos recherches, nous avons étudié principalement trois souches de trématodes progénétiques. En ce qui concerne les autres cas de progénèse, nous n'avons observé que le stade progénétique, soit sur le vivant, soit sur préparations fixées et colorées, sans avoir pu en suivre l'évolution.

Deux de ces souches représentent des cas de progénèse obligatoire ; nous disons bien obligatoire et non habituelle, car toutes les métacercaires, même celles qui restent naines ou plus ou moins atrophiées, présentent des œufs dans leur utérus après un temps d'évolution suffisant.

La première est celle de *Paralepoderma brumpti* que nous avons désignée, lors de sa découverte, sous le nom générique de *Plagiorchis*, mais que nous préférons ranger, pour des raisons morphologiques que nous justifierons plus loin, dans le nouveau genre créé récemment par R.-Ph. Dollfus (1950), *Paralepoderma* (1).

Nous avons pu suivre l'évolution de cette espèce nouvelle jour après jour ; elle nous a permis de démontrer expérimentalement, pour la première fois, la réalité d'un cycle abrégé à deux hôtes, le stade progénétique s'étant révélé, morphologiquement et physiologiquement, l'équivalent de l'adulte (2).

La seconde est celle de *Ratzia joyeuxi* (E. Brumpt 1922) (famille des *Opisthorchiidæ*), existant encore 28 ans plus tard dans le même gîte, sur le même hôte, bien qu'avec une moindre fréquence. Cette espèce, dont nous tentons le cycle restreint, a été étudiée plusieurs fois depuis sa découverte. Nous essaierons de démontrer que, pour ces deux espèces, le déterminisme de la progénèse dépend vraisemblablement de facteurs héréditaires.

La troisième espèce, celle de *Pleurogenes medians* (Olss. 1876) (famille des *Lecithodendriidæ*), est un cas très curieux de progénèse accidentelle. Ce phénomène est probablement d'origine héréditaire ; peut-être s'agit-il d'une race mutée, étant donné sa pérennité dans certains gîtes particuliers. W. Neuhaus (1940-1941), qui a étudié toute l'évolution de ce trématode en Allemagne, n'a jamais signalé la présence de métacercaires progénétiques. Cependant, nous pensons que différents facteurs extérieurs, température, tissus d'un

(1) *Ann. Paras.*, XXV, 1950, p. 141-149.

(2) R.-Ph. Dollfus (1929) et P.-P. Grassé (1935, p. 67) ont signalé l'intérêt qu'il y aurait à démontrer expérimentalement l'existence de ce phénomène.

hôte particulier, produits du métabolisme, peuvent également avoir une action sur la manifestation de cette progénèse. Le problème si passionnant de la coexistence chez une même espèce d'une évolution normale à trois hôtes et d'un cycle abrégé à deux hôtes sera peut-être résolu si l'on parvient à obtenir chez des *Bithynia* neuves, infestées avec les œufs mûrs d'une métacercaire progénétique évoluée, des émissions de cercaires « virgule » de *Pleurogenes medians*.

A. *Paralepoderma brumpti* (A. Buttner, 1950)

Synonymie : *Plagiorchis brumpti* A. Buttner 1950

Conditions d'observation dans la nature de *Paralepoderma brumpti* (A. Buttner 1950)

C'est au début du mois d'août que nous avons aperçu pour la première fois, dans une cuve en pierre d'un mètre de diamètre, de la Station expérimentale de Richelieu (Indre-et-Loire, chez un têtard d'*Alytes obstetricans* (Laurenti), une très grosse métacercaire sortie de son kyste, mais non progénétique. Le lendemain, un second têtard de la même provenance fut examiné : il présentait, dans la profondeur du derme, trois métacercaires progénétiques enkystées, en tous points semblables à celle de la veille, l'une à la queue, la seconde dans la patte postérieure, la troisième dans la tête.

Nous avons dès lors exploré méthodiquement la cuve, qui contenait environ 100 litres d'eau et de nombreuses plantes aquatiques : en dehors des têtards d'*Alytes*, provenant d'une seule ponte effectuée, eu égard à leur taille, fin avril ou début mai, nous avons trouvé de nombreux têtards de *Molge palmata*, mais aucun hôte définitif ; cependant, une couleuvre à collier avait été capturée dans cette cuve un mois environ avant notre observation ; en outre, la sécheresse intense laissait prévoir la visite possible d'autres couleuvres ou de batraciens adultes ; des oiseaux de passage, des chauves-souris, des musaraignes ou autres rongeurs pouvaient y avoir laissé tomber des déjections.

En ce qui concerne la faune malacologique, cette cuve servait de réserve à un grand nombre de mollusques pêchés dans les cours d'eau, canaux ou mares résiduelles des alentours. Nous avons dénombré 6 *Planorbis corneus*, 150 *Planorbis planorbis*, 250 *Lim-*

næa palustris, 20 *Limnæa stagnalis*, 10 *Paludina vivipara*. Tous ces mollusques ont été isolés en tubes Borrel ou tubes à essais, et nous avons fini par découvrir, chez un seul *Planorbis planorbis*, la cercaire correspondant à nos métacercaires progénétiques.

Autopsie des porteurs naturels. Résultats des protocoles d'examen

1° *Têtards d'ALYTES* : Les métacercaires se trouvant localisées dans les muscles, en tous les points du corps, nous avons examiné les animaux écrasés entre deux lames, ainsi qu'il a été indiqué plus haut. Spécifions que, dans le cas présent, les têtards étaient déjà âgés de près de quatre mois et leurs téguments souvent très opaques ; nous avons examiné séparément la queue transparente, puis la tête isolée du corps et coupée sagittalement en deux moitiés égales, chaque moitié étant au préalable hachée ; dans la cavité générale, des métacercaires enkystées flottaient parfois librement. Nous avons extrait et observé les viscères, puis les muscles et les téguments hachés du reste du corps. Pour l'examen microscopique au fort grossissement, il est assez facile d'isoler les métacercaires à la loupe binoculaire ou même à l'œil nu : ce sont de petits kystes hyalins, ovoïdes ou sphériques, dépassant parfois le millimètre. L'enveloppe kystique est mince et il faut, pour examiner le trématode vivant, avoir soin de glisser entre la lame et la lamelle un cheveu ou une mince pellicule de tissu, afin de ne pas l'écraser. Il ne se prête d'ailleurs que peu de temps à l'examen direct (1/4 d'heure au plus dans du liquide péritonéal de têtard, préférable à l'eau physiologique), après quoi de grosses gouttelettes sarcodiques viennent sourdre au bord de la cuticule et l'animal se lyse presque aussitôt.

La plupart des têtards ainsi examinés présentaient de 3 à 10 ou 12 métacercaires progénétiques. Voici le détail de quelques protocoles :

- 25/VIII: TÊTARD 456/A.B.-I (1) : — *moignon caudal* : 0 métacercaire progénétique. Nombreuses métacercaires type *Opisthioglyphe ranæ*.
 — *tête* : 0 métacercaire progénétique.
 — *tronc* : 3 métacercaires progénétiques enkystées grandes, avec nombreux œufs.
 — *pattes* : 0 métacercaire progénétique.

(1) Tous les numéros d'expériences proviennent de notre cahier personnel d'expérimentation n° 1.

- 26/VIII : TÊTARD 463/A.B.-I : — queue : 1 métacercaire progénétique. Très nombreuses métacercaires type *Opisthioglyphe ranæ*.
— cavité générale + intestin : 1 métacercaire progénétique + métacercaires type *O. ranæ* et *Leptophallus nigrovenosus*.
— tronc : 1 grande progénétique.
— tête : 3 grandes + 5 petites, toutes progénétiques.
- 27/VIII : TÊTARD 509/A.B.-I : — moignon caudal : 2 métacercaires progénétiques avec œufs abondants. Très nombreuses métacercaires type *O. ranæ*.
— tête : 1 grande métacercaire progénétique.
— 1/2 du corps : 3 progénétiques dont une avec 3 œufs seulement.
— 1/2 du corps : 5 progénétiques plus ou moins grandes.
— pattes : 0.

2° *Têtards de MOLGE PALMATA* : Tous ces animaux avaient encore leurs branchies ; nous montrerons plus loin qu'aussitôt après la métamorphose, les téguments deviennent plus durs et opposent à la pénétration des cercaires un obstacle presque infranchissable, ce qui explique la difficulté d'infestation des tritons adultes.

Au cours de la dissection de 23 de ces têtards, nous avons trouvé chez l'un d'eux un trématode de petite taille, rempli d'œufs, libre et non enkysté, très agile, que nous avons pris tout d'abord pour une seconde espèce de métacercaire progénétique. Il s'agissait en réalité d'un distome adulte, identifié par R.-Ph. Dollfus à *Opisthioglyphe ranæ* (Frölich 1791), dont l'évolution peut s'effectuer dans le tube digestif de têtards d'*Alytes obstetricans*, comme l'a démontré E. Brumpt, en 1944. Comme ce trématode a une évolution très lente, cette constatation nous permet d'affirmer que les têtards de cette cuve avaient au moins de 80 à 106 jours (la durée de ce cycle a été établie par Looss, 1894 ; Sinitzin, 1905-1907, et E. Brumpt, 1944).

Douze spécimens sur vingt-trois se sont montrés positifs pour les métacercaires progénétiques de *Paralepoderma brumpti*. Les métacercaires progénétiques des jeunes tritons étaient sensiblement moins grandes que celles des têtards d'*Alytes*, peut-être en raison de leur âge moins avancé, peut-être aussi parce que la nature de leur corps, un chimisme différent, constituaient un milieu moins favorable au développement des cercaires.

Isolement des mollusques

Le résultat de l'examen des mollusques peuplant la cuve et isolés en tube de verre a été le suivant :

- Sur 10 *Limnæa stagnalis* : 0 positive.
- Sur 250 *L. palustris* : 60 % émettaient de petites xiphidiocercaires vraisemblablement entomophiles.
- Sur 6 *Planorbis corneus* : 2 positifs (xiphidiocercaires entomophiles).
- Sur 10 *Vivipara vivipara* : 0 positive.
- Sur 150 *Planorbis planorbis* : 1 seul positif (= 527/A.B.), avec de grandes xiphidiocercaires.

Etude du développement

Démonstration expérimentale d'un cycle à deux hôtes

Après avoir émis pendant 12 jours des cercaires en nombre variable, le planorbe infesté (*Planorbis planorbis* 527/A.B.-I) est sacrifié et autopsié.

Sporocyste : L'autopsie fit apparaître un hépto-pancréas envahi par des sporocystes assez polymorphes, de couleur jaune orangé (fig. 30). De nombreux sporocystes apparaissaient également contre l'épiderme recouvrant la masse viscérale et sur le tube digestif. Signalons qu'à l'exception de 3-4 kystes du type *Xiphidiocercaria polyxena* Brumpt (1944-45), aucune métacercaire n'était présente, ni dans le pied, ni dans le manteau du mollusque.

De structure plus ou moins moniliforme et de taille inégale, ces sporocystes avaient une longueur moyenne de 1,5 mm.-2 mm. et une largeur de 0,25 mm., dans les zones renflées contenant les cercaires immatures (fig. 30). Peut-être les étranglements qu'ils présentent sont-ils le témoignage de la production par scissiparité des sporocystes fils. Ils sont fixés sur leur support par un pied de structure épaisse et granuleuse et renferment un nombre variable de germes (2 à 6), parmi lesquels ne se trouvaient pas de cercaires mûres. Nous n'avons pas observé de tocostome.

Cercaire : morphologie et biologie. Les cercaires émises pendant 12 jours étaient des xiphidiocercaires de grande taille (1 mm. de

FIG. 30. — Localisation et détail des sporocystes de *Paralepoderma brumpti* : à gauche, hépatopancréas bourré de sporocystes de l'unique *Planorbis planorbis*, trouvé parasité dans la nature (Richelien, I.-et-L.) à droite, sporocystes isolés. (Orig.).

FIG. 30

long sur 250 μ de large en moyenne) (fig. 31). Les spécimens examinés, tués par la chaleur, présentaient les dimensions suivantes :

<i>Corps</i>	{ longueur	550 μ
	{ largeur	360 μ
<i>Queue</i>	{ longueur	510 μ
	{ largeur	50 μ (partie moyenne)
<i>Diam. vent. orale</i>		500 μ
<i>acetabulum</i>		505 μ
<i>Longueur stylet</i>		30-32 μ
<i>Prépharynx</i>		10-12 μ
<i>Pharynx</i>		20 μ
<i>Œsophage</i>		20-30 μ

Le tiers antérieur du corps est assez transparent et permet d'apercevoir le prépharynx, le pharynx, l'œsophage et la naissance des deux cæcums digestifs ; de chaque côté du corps, au-dessus de la ventouse ventrale, on aperçoit une masse de cellules appartenant aux glandes de pénétration et les canaux conduisant au stylet. Les deux ventouses sont de taille sub-égales. Le reste du corps est rendu opaque par la présence de glandes cystogènes ; néanmoins, la forme trilobée de la vésicule excrétrice est toujours bien visible et, sur l'une de nos cercaires, deux masses ovalaires, au-dessus de la vessie, semblaient des ébauches testiculaires. Nous n'avons pas réussi à voir de flammes vibratiles en raison de l'opacité de la cuticule, malgré l'emploi de colorants vitaux qui ralentissent les mouvements de la cercaire et finissent par l'immobiliser pendant un temps suffisant pour un examen soigneux au fort grossissement. La spinulation, visible sur la métacercaire, se percevait mal au stade cercaire, et nous ne saurions être sur ce point très affirmative.

Biologie : Comme toutes les cercaires armées, les cercaires de *P. brumpti* nagent sur le dos, la queue rabattue sur la face ventrale. Cependant, dès leur émission, elles tombent au fond du bocal ; de temps à autre, elles s'élèvent, nagent jusqu'à mi-hauteur du bocal, se laissent retomber à nouveau jusqu'au fond, enroulées sur elles-mêmes, comme de petits kystes. Ce caractère biologique est constant et nous l'avons retrouvé, lorsqu'après infestation expérimentale de *Planorbis planorbis* neufs, la première émission de cercaires s'est manifestée.

Pendant 12 jours, le planorbe 527, déjà infesté dans la nature depuis un temps indéterminé, a émis des cercaires à un rythme assez irrégulier. L'émission se produisait pendant la nuit à une température d'environ 25°, la pression atmosphérique étant d'en-

viron 80. La courbe marque un clocher au départ (150 cercaires le premier jour), puis elle oscille entre 30 et 70 cercaires les jours suivants, remonte à 100 cercaires le 7^e jour, pour retomber à 10 le 8^e jour et s'éteindre graduellement jusqu'au 12^e jour, date de l'autopsie du mollusque (fig. 32).

FIG. 31. — Cercaire de *Paralepoderma brumpti*. En bas, E, B, F, détails de la partie antérieure, du pharynx et du prépharynx, et du stylet. A, D, C, cercaires tuées par la chaleur, entre lame et lamelle. En D, on aperçoit l'ébauche des deux testicules. (Pour les dimensions, voir diagnose, p. 78). (Orig.).

Enkystement : La cercaire présente spontanément une tendance à l'enkystement, même en l'absence d'un hôte vivant. Nous avons obtenu sans peine, au bout de 30' (fig. 34), entre lame et lamelle, dans l'eau physiologique additionnée d'une goutte de solution concentrée de vert de méthyle, la formation d'un kyste après aban-

FIG. 33. — Enkystement expérimental sous l'effet du vert de méthyle dans l'eau physiologique. Cercaires de *Leptophallus nigrotenosus*. (Orig.)

FIG. 34. — Enkystement expérimental sous l'effet du vert de méthyle. Cercaires de *Paralepoderma brumpti* (Buttner, 1950). A : au bout de 20' ; B : au bout de 60' ; C : au bout de 1 h. 30. Noter l'accroissement rapide du kyste. (Orig.).

don de la queue (1). La cercaire, tournant sur elle-même pendant 15 à 20', laisse apparaître subitement une enveloppe très mince, encore souple, sans qu'il soit possible de discerner si celle-ci provient d'une sécrétion glandulaire ou d'un décollement soudain de la cuticule. Au bout de 60', la lame étant préservée de la dessiccation par addition sous la lamelle de quelques gouttes d'eau physiologique, le kyste avait grandi du quart de sa longueur et s'était raffermi et très légèrement épaissi (fig. 34, B). Après 1 h. 30, le kyste avait encore grandi, mais il ne tardait pas à éclater, et le distome inclus à se lyser, le milieu ne possédant plus sans doute des conditions d'isotonie suffisantes à sa subsistance. Après ce court laps de

FIG. 32. — Courbe d'émission des cercaires de *Paralepoderma brumpti* du *Planorbis planorbis* 527/A.B.-I.

temps, la métacercaire présentait déjà une taille anormalement grande, dépassant sensiblement celle des plus grandes métacercaires gyrynophiles fréquentes à Richelieu, celles de *Leptophallus nigrovenosus* et d'*Opisthioglyphe ranæ* en particulier (fig. 35, A, B, C et D).

Xénotropisme et pouvoir infectieux : L'étude expérimentale de la xénophilie de cette cercaire nous a permis d'apprécier son pouvoir infectieux :

1) Sur mollusques :

Le 12 août, environ 150 cercaires émises par le planorbe « 527 » sont mises en présence d'exemplaires jeunes et neufs de *Planorbis planorbis*, *Planorbis glabratus*, *Planorbis corneus*, *Bullinus contortus* et *Limnæa peregra* ; cette dernière espèce est particulièrement

(1) Nous avons obtenu par ce même procédé l'enkystement sur lame d'un certain nombre d'espèces de xiphidiocercaires, s'enkystant normalement dans les tissus de leur 2^e hôte intermédiaire (voir fig. 33 pour les xiphidiocercaires de *Leptophallus nigrovenosus*).

sensible aux attaques des cercaires malacotrope. Tous ces mollusques examinés après 48 heures se sont montrés indemnes. Ce caractère constitue une différence importante avec le comportement de la métacercare progénétique étudiée par R.-Ph. Dollfus, en 1932,

FIG. 35. — A, B, C, métacercaires progénétiques de *Paralepoderma brumpti*, trouvées chez un têtard de *Triton palmatus* ; comparaison avec la taille d'une métacercare d'*Opisthioglyphe ranae* (D) voisinant avec elles chez le même animal et mesurant 220 μ . (Orig.).

chez *Planorbis planorbis*, et que ce dernier auteur identifie certainement à tort à la métacercare de *Paralepoderma brumpti*. Nous avons exposé à nouveau, lorsque nous avons infesté expérimentalement des planorbes neufs qui se sont montrés positifs, des *Planorbis planorbis* à l'action de cette nouvelle génération de cercaires ;

il n'y a jamais eu d'enkystement (exp. 583'/A.B.-I), tandis que les *Planorbis planorbis* examinés par Dollfus présentaient de nombreux kystes progénétiques.

2) Sur hirudinées :

Le 18 août, d'assez nombreuses cercaires (75-100) sont mises en contact avec trois *Helobdella algira*, un *Hemiclepsis tessellata*, provenant de nos élevages neufs de laboratoire ; autopsiées quelques jours plus tard, toutes ces sangsues se montrent négatives.

3) Sur insectes :

Des larves de *Chironomus plumosus* sont exposées à environ 60-70 cercaires ; aucune larve ne s'infeste, ce qui était à prévoir, les cercaires gyrintropes ne s'enkystant jamais chez les insectes.

4) Sur poissons :

Deux vairons, une loche, une épinuche et une épinochette sont mis en présence d'une dizaine de cercaires provenant, non du planorbe initial « 527 », mais des infestations obtenues par nous expérimentalement ; aucun d'eux ne s'infeste, bien que, dans d'autres cas, nous ayons pu observer leur attirance pour un bon nombre de xiphidiocercaires gyrintropes ou entomophiles.

5) Sur batraciens :

a) *Tritons* : Un têtard de *Molge palmata* est exposé aux cercaires du *Planorbis planorbis* « 527 ». L'enkystement se fait rapidement, en deux heures, et nous avons pu suivre au binoculaire l'enkystement de plusieurs d'entre elles entre les doigts des pattes postérieures (fig. 36). Un second têtard de triton palmé est mis au contact de ces cercaires ; deux heures plus tard, il présente 15 métacercaires bien formées, portant encore leur stylet et facilement reconnaissable à leur grande taille, leur grosse vessie trilobée et les proportions des ventouses.

Nous avons ensuite comparé les modalités d'enkystement chez des têtards de triton et chez de jeunes tritons palmés venant de se métamorphoser, récoltés dans un autre gîte (réservoir) (1). Des

(1) Dans son travail sur le cycle évolutif d'*Opisthioglyphe ranæ*, E. BRUMPT (1944-1945, p. 223-224) constate également la répugnance des cercaires de ce trématode à s'enkyster dans la peau de tritons palmés devenus terrestres, et il admet que cette répulsion tient à la transformation des téguments et aux glandes qui se développent après la métamorphose. A propos du rôle chimiotropique exercé sur les cercaires par les téguments attaqués, E. BRUMPT signale en note que LEIGH et van CLEAVE (1945) ont cherché à connaître les raisons qui déterminent les cercaires de *Glypthelminis quieta* à s'enkyster dans l'épiderme de *Rana pipiens* et à refuser de s'enkyster chez les têtards dépourvus de pattes de cette même espèce. Ces deux auteurs ont observé que dès l'apparition des pattes, et

coupes transversales de ces batraciens, avant et après la métamorphose, nous ont permis de constater la transformation histologique des téguments, dont l'épaisseur et la dureté rendent sans doute la pénétration des cercaires beaucoup plus malaisée.

FIG. 36. — Patte postérieure de triton ; à gauche, métacercaires de *Paralepoderma brumpti* enkystées expérimentalement depuis quelques heures. (Orig.).

bien que l'appendice caudal soit encore développé, les cercaires s'enkystent sur les pattes et le corps, jamais sur la queue. En accélérant la métamorphose de jeunes têtards de *Rana calesbiana* par de l'extrait thyroïdien, ces auteurs ont obtenu l'enkystement chez les têtards ainsi traités.

Douze jeunes tritons témoins, provenant d'un réservoir fréquenté par des couleuvres, des grenouilles et peuplé de nombreuses *Limnaea stagnalis*, furent autopsiés : ils ne portaient que quelques rares métacercaires, aisément reconnaissables, d'*Opisthioglyphe ranæ* et de *Leptophallus nigrovenosus*. Neuf autres jeunes tritons du même gîte furent exposés à d'assez nombreuses cercaires du planorbe « 527 ». Au bout de 24 heures, quatre étaient morts, et il restait encore des cercaires vivantes dans le bocal les contenant, ce qui contraste avec la pénétration presque immédiate de ces cercaires chez tous les têtards de batraciens. Ces quatre exemplaires autopsiés ne présentaient aucune métacercaire imputable au planorbe « 527 ». Les cinq tritons demeurés vivants ont été sacrifiés et autopsiés après 48 heures : le premier était négatif ; le deuxième avait deux métacercaires de « 527 » ; le troisième et le quatrième hachés ensemble montrèrent dix métacercaires de « 527 », tandis que le cinquième n'en présentait qu'une seule.

b) Têtards d'*Alytes obstetricans* : Un certain nombre de ces animaux, indemnes de toute infestation parasitaire, parce que provenant d'un bassin dépourvu de mollusques, sont successivement exposés aux attaques des cercaires « 527 » : ces cercaires sont comptées dans une éprouvette mince de 10 cc., ainsi qu'il a été indiqué dans la technique ; pour suivre le comportement des cercaires, on les déverse dans une éprouvette de même volume, mais d'un diamètre moins étroit, et le têtard y est engagé, la queue dirigée vers le bas, afin que les cercaires, que leur géotropisme positif attire vers le fond, ne soient pas ingérées par l'animal. On suit facilement à la loupe leur pénétration à travers les téguments. Elles se fixent immédiatement dans la queue, puis en un point quelconque du corps et, de là, migrent en profondeur dans les muscles et la cavité générale. L'enkystement est toujours de 100 p. 100.

Cinq têtards indemnes de toute infestation ont été mis en contact avec des cercaires du planorbe « 527 », le premier avec 20-30, le second avec 70, le troisième avec 45, le quatrième avec 35, le cinquième avec une dizaine de cercaires provenant des dernières émissions du planorbe « 527 ».

Une première autopsie est pratiquée sur l'un de ces têtards, trois jours après son infestation (27 août) : les métacercaires sont localisées dans la tête, le corps, la queue et les pattes. La métacercaire de trois jours (fig. 37) a perdu son stylet ; elle mesure dans son kyste 500 μ de long sur 350 μ de large ; le diamètre de la ventouse orale est de 110 μ ; celui de l'acetabulum de 95-100 μ . La structure interne se distingue mal en raison de l'opacité des cellules parenchymateuses. Sortie de son kyste, la métacercaire laisse apparaître

FIG. 37. — *Paralepoderma brumpti* : métacercaire de 3 jours obtenue expérimentalement chez le têtard d'*Alytes obstetricans*. (Orig.).

FIG. 38. — *Plagiorchis brumpti* A. Buttner, 1950. A, âgée de 15 jours, face ventrale ; B, âgée de 30 jours ; C, forme naine ; D, œufs. (Orig.)

un court prépharynx, un pharynx musculieux, un œsophage se terminant au tiers antérieur du corps ; les deux cæcums se terminent à la naissance des deux lobes supérieurs de la vessie en Y. Les testicules sont symétriques sur un plan horizontal passant au-dessus de la vésicule excrétrice. L'ovaire, vu par la face ventrale, est à gauche et légèrement au-dessus de l'acetabulum. La poche du cirre, les glandes vitellogènes n'apparaissent que sur des métacercaires plus âgées.

Une seconde autopsie est opérée le 28 août sur un têtard infesté depuis 15 jours ; le moignon caudal présente deux grandes métacercaires ayant déjà des œufs (100 à 200) dans l'utérus, ainsi que de nombreux kystes encore immatures ; dans les pattes : une vingtaine de métacercaires de plus ou moins grandes dimensions, dont quelques-unes ont déjà des œufs ; dans la cavité générale : quatre métacercaires encore immatures ; dans les viscères : une métacercaire de grande taille, parfaitement développée, présentant des œufs et des glandes génitales bien visibles (fig. 38, A). Les œufs sont déjà embryonnés. La paroi abdominale porte quatre métacercaires avec plus ou moins d'œufs.

Un troisième têtard fut autopsié le 31 août ; il avait été infesté le 13 et surinfesté le 19 et présentait donc des métacercaires de 12 et de 18 jours. Le moignon caudal montrait deux métacercaires progénétiques avec quelques œufs, et environ 25 jeunes, enkystées ; dans les viscères, 5 métacercaires enkystées portaient déjà de nombreux œufs ; dans la tête, 3 métacercaires immatures et 2 dans les pattes portent le total des distomes retrouvés à 37, alors que le nombre de cercaires auxquelles le têtard avait été exposé était évalué à 35-40, soit un pourcentage d'enkystement de 100.

Les deux derniers têtards ont été sacrifiés au bout de 20 à 30 jours : toutes les métacercaires étaient progénétiques, mais de tailles différentes, certaines d'entre elles restant naines (fig. 40), bien que progénétiques ; leurs œufs, quand ils sont mûrs, ont une taille normale, mais d'autres sont atrophiés et ne possèdent qu'une coque chitineuse. L'existence de ces organismes, interrompus dans leur croissance, mais sexuellement mûrs, se justifie mal, car leur évolution s'est poursuivie dans des conditions identiques à celle des métacercaires les plus évoluées.

La morphologie de la métacercaire de 30 jours est identique à celle de 15 jours. Toutefois, les testicules en sont dégénérés et le nombre des œufs dans l'utérus est encore accru (plus d'un millier), mais ils ne sont jamais évacués dans le kyste (fig. 38, B, et 39).

FIG. 39. — *Paralepoderma brumpti* : métacercaires progénétiques expérimentales de 30 jours. (Orig.)

FIG. 40. — *Paralepoderma brumpti* : métacercaires progénétiques obtenues expérimentalement chez le têtard d'*Alytes obstetricans* et restées naines après 36 jours. (Orig.).

Description de la métacercaire progénétique de *P. brumpti*.

Discussion

Voici la diagnose de la métacercaire de 15 jours (fig. 38, A) :

Taille de la métacercaire sortie du kyste : 1.500 μ -1.700 μ de long sur 900 μ -1.000 μ de large.

Cuticule très finement spinulée.

Deux ventouses sub-égales ($225\text{ }\mu$ - $250\text{ }\mu$ de diamètre).

Pharynx : $50\text{ }\mu \times 50\text{ }\mu$.

Oesophage plus ou moins contracté (moyenne : $150\text{ }\mu$ de long).

Deux cæcums minces se terminent au niveau des deux cornes supérieures de la vessie.

Ovaire volumineux ($225\text{ }\mu$ dans son plus grand diamètre sur $175\text{ }\mu$).

Poche du cirre juste au-dessus de l'acetabulum.

Testicules symétriques sur un plan horizontal entre la vessie et l'acetabulum (1).

Utérus rempli d'œufs formant de nombreuses circonvolutions.

Vessie dessinant un Y très allongé.

Follicules vitellins s'étendant sur $800\text{ }\mu$ - $900\text{ }\mu$ dans la partie moyenne de l'animal.

Œufs : $40\text{ }\mu$ de long sur 20 - $23\text{ }\mu$ de large, possèdent un opercule et un petit mucron au pôle inférieur ; présence d'un miracidium vivant à l'intérieur de la coque (fig. 38, D).

Nous avons examiné ce que devenaient ces métacercaires chez leur hôte au bout de plusieurs mois.

Nous avons ainsi retrouvé, chez un têtard d'*Alytes obstetricans*, sacrifié 10 mois après son infestation par 20-30 cercaires de *Paralepoderma brumpti* (exp. 588/A.B.-I), 22 métacercaires parfaitement vivantes, à des stades plus ou moins avancés d'évolution :

— 6 d'entre elles étaient restées naines et ne portaient que 6 à 20 œufs ; elles se trouvaient dans l'appendice caudal et le tissu conjonctif abdominal ;

— 6 autres, observées dans l'abdomen, étaient demeurées au stade de la métacercaire de 15 jours quant au nombre des œufs produits, mais elles présentaient une dégénérescence partielle des testicules et de l'ovaire, ainsi qu'une disparition complète des glandes vitellines.

Néanmoins, de très nombreux spermatozoïdes se distinguaient dans la poche du cirre et dans les deux canaux déférents qui se réunissaient à une faible distance de la poche du cirre en un canal commun.

Dans l'une de ces métacercaires, mentionnons, à la base du tronc médian de la vésicule excrétrice, 5 gros calculs vésicaux ;

— 10 métacercaires, enkystées dans les muscles de la tête et du thorax, étaient semblables à la métacercaire de 30 jours, mais avec une dégénérescence totale des glandes génitales (y compris l'ovaire) et des follicules vitellins. Quelques cellules isolées, chromophiles, au niveau de ces glandes, étaient sans doute les derniers vestiges de leur existence.

(1) Les deux caractères (testicules symétriques, vessie en Y se bifurquant en arrière des testicules), constants chez certains *Plagiorchiidæ*, ont incité R.-Ph. DOLLEUS à créer pour eux le genre *Paralepoderma* que nous avons adopté pour le distome étudié ici.

Signalons, dans les métacercaires les plus évoluées, que certaines anses utérines étaient remplies de granulations de substance coquillère, parmi lesquelles quelques très rares œufs normaux se voyaient encore.

FIG. 41. — *Paralepoderma cloacicola*. Exemple vivant trouvé dans le cloaque de *Tropidonotus natrix*. (Orig.)
Chaque division de l'échelle des œufs = 10 μ .

Dans un travail récent sur les variations anatomiques de *Distoma cloacicola* Max Lühe 1909, parasite du cloaque de la couleuvre à collier, R.-Ph. Dollfus (1950) a jugé identiques ce distome et la métacercaire progénétique que nous avons observée chez les têtards de batraciens. Nous ne partageons pas cette opinion. Nous avons eu

l'occasion d'examiner des exemplaires vivants de l'une et l'autre espèces. *Paralepoderma cloacicola* a normalement des cæcums digestifs très longs, qui atteignent la base de la vessie excrétrice; d'autre part, ces cæcums sont beaucoup plus gros que ceux de *P. brumpti*. La ventouse orale est plus grande (moyenne de $310\ \mu$ au lieu de $240\ \mu$); le système excréteur, rempli de guanine, est bien marqué — nous l'avons observé sur 11 exemplaires de *P. cloacicola* avec autant de netteté que sur la figure 41 — alors qu'il est à peine décelable chez *P. brumpti*; la vessie excrétrice est difficilement visible chez *P. cloacicola*, alors que chez *P. brumpti*, nous l'avons vue chez près d'une centaine d'exemplaires progénétiques, dessinant extrêmement nettement un Y très allongé. L'ovaire est beaucoup moins volumineux chez *P. cloacicola* et il est habituellement placé au-dessous

de l'acetabulum; chez *P. brumpti*, il dépasse, en général, légèrement l'acetabulum et son volume est presque double de celui du distome de la couleuvre (voir les deux figures comparatives 41 et 42).

FIG. 42. — *Paralepoderma brumpti* (A. Buttner, 1950), exemplaire vivant d'une métacercarie progénétique trouvée chez un têtard d'*Alytes obstetricans* Laur. (Orig.). Au lieu de $200\ \mu$, lire $300\ \mu$.

Essai d'évolution chez un hôte définitif possible (Colubridæ)

Enfin, l'activité génitale de *P. brumpti* en fait l'homologue d'un adulte. Nous avons essayé, à différentes reprises, de faire évoluer chez des couleuvres des métacercaires de *P. brumpti*, afin de vérifier l'hypothèse, émise par Dollfus, sur l'identité de cette espèce avec *P. cloacicola* : une cinquantaine de métacercaires de *P. brumpti*, de tous âges, provenant de deux têtards infestés expérimentalement, ont été administrées successivement à deux couleuvres, *Tropidonotus viperinus* et *Tropidonotus natrix*.

La première, *Tropidonotus viperinus* (561/A.B.-I), ingère, le 3 septembre, une trentaine de métacercaires à tous les stades, progénétiques ou non, d'un têtard infesté 15 jours plus tôt avec des cercaires, et réinfesté à différentes reprises. Cette couleuvre est sacrifiée quatre jours plus tard ; autopsiée, elle ne présente aucun distome dans le cloaque ; l'intestin postérieur, à 4 cm. du cloaque, renferme trois vers, en tous points semblables aux grandes métacercaires progénétiques ingérées, mais libérées de leur kyste (fig. 43, A, B). Le reste de la moitié inférieure de l'intestin ne renfermait aucun trématode, à l'exception d'un kyste ovoïde, de grande taille, dégénéré (fig. 43, C). La moitié antérieure intestinale était également dépourvue de distomes, sauf un second kyste ovoïde en dégénérescence. Aucun autre trématode n'a été décelé dans les différents organes. Cette absence de parasitisme est peut-être due au jeûne prolongé (trois mois) auquel l'animal avait été soumis, ou encore à sa faible réceptivité individuelle.

La deuxième couleuvre, *Tropidonotus natrix* (579/A.B.), ingère, le 20 septembre, quatre métacercaires progénétiques mûres portant des milliers d'œufs dans l'utérus et une vingtaine de jeunes kystes, plus ou moins immatures, de la même espèce, mais renfermant des œufs. Sacrifiée six jours plus tard, cette couleuvre présente dans le cloaque les quatre grandes métacercaires, libres et nullement modifiées ; les cæcums digestifs étaient toujours grêles et, en aucun cas, le système excréteur ne renfermait de guanine, comme nous l'avions observé chez les onze exemplaires vivants de *Lepodermis cloacicola*, recueillis par nous dans le cloaque d'une couleuvre à collier, en Indre-et-Loire. Il semble donc bien que le séjour dans le milieu intestinal de la couleuvre ne modifie pas le métabolisme des distomes progénétiques de *Paralepoderma brumpti*. Aucune trace des autres métacercaires n'est relevée dans tout le tube digestif, ni dans aucun autre organe. Dans le poumon, seul un grand exemplaire de *Macrodera longicollis* est trouvé.

Que faut-il conclure de ces infestations ? La couleuvre ne paraît pas être un hôte définitif favorable. Les métacercaires jeunes n'y achèvent pas leur maturation ; les métacercaires mûres n'y poursuivent pas leur évolution.

Notons que des *Plagiorchiidæ* adultes ont été trouvés chez les animaux suivants : poissons, batraciens, reptiles, oiseaux et mammi-

FIG. 43. — Cycle évolutif de *Paralepoderma brumpti* : essai d'évolution chez *Natrix viperinus* et *Natrix natrix*. A, B, exemplaires trouvés dans l'intestin postérieur six jours après ingestion ; C, deux jeunes métacercaires en dégénérescence dans l'intestin moyen et antérieur. (Orig.).

ères. Cependant, la morphologie de ces distomes ne ressemble en rien à l'espèce que nous avons étudiée. C'est pourquoi, nous n'avons retenu comme hôte définitif éventuel que celui hébergeant *P. cloacicola*, trématode dont la disposition anatomique présentait quelques analogies avec l'espèce que nous avons trouvée.

Paralepoderma brumpti ne paraît pas davantage assimilable à la métacercaire progénétique de *Planorbis planorbis*, décrite par Dollfus en 1932 et observée par P. Paris le 18 avril 1932. En effet, les centaines de *Planorbis planorbis* que nous avons examinés à Riche-lieu, au cours de ces dernières années, n'ont jamais présenté de

telles métacercaires dans leur corps. D'autre part, les 150 exemplaires, parmi lesquels nous avons trouvé le seul mollusque parasité par la cercaire de *P. brumpti*, étaient tous exempts de métacercaires, progénétiques ou non. Or, la réunion de ces 150 planorbes dans un même bocal aurait dû les exposer particulièrement à ce parasitisme, et il est certain que, s'il y avait identité de distomes entre celui décrit par Dollfus et le nôtre, quelques *Planorbis planorbis* au moins auraient eu des métacercaires. Signalons encore que les planorbes que nous avons infestés expérimentalement et qui ont émis des cercaires de *Paralepoderma brumpti* étaient, à la dissection, indemnes de toutes métacercaires. Enfin, une dernière preuve biologique de cette non-identité spécifique nous paraît être dans le fait que des *Planorbis planorbis*, récoltés en mai 1950, aux environs de Saint-Jean-de-Losne (Côte d'Or), gîte originel des mollusques infestés par la métacercaire progénétique décrite par R.-Ph. Dollfus, avaient des métacercaires libres, encore immatures, et présentant de grandes analogies avec le distome progénétique étudié par Dollfus.

Les *Planorbis planorbis* qui nous ont été envoyés de Saint-Jean-de-Losne (1) ont été isolés au cours du mois de juin, afin d'étudier leur infestation éventuelle. Ils n'ont pas émis de cercaires que nous ayons pu observer. Après autopsie (juillet), deux d'entre eux sur 35 examinés ont présenté un hépatopancréas bourré de sporocystes allongés, transparents, contenant des germes multiples à différents degrés d'évolution. De nombreuses cercaires armées, très mobiles dans le sporocyste ou sorties par effraction, semblaient proches de la maturité ; mais les deux planorbes parasités par elles ne montrèrent dans leur corps aucun kyste, progénétique ou non.

Première démonstration expérimentale d'un cycle abrégé

La métacercaire progénétique de *Paralepoderma brumpti*, produisant très rapidement des milliers d'œufs et n'acquérant chez un hôte vertébré expérimental, tel que la couleuvre, aucune différenciation supplémentaire, paraissait présenter les conditions les plus favorables pour la réalisation d'un cycle abrégé, sans participation d'un hôte définitif.

Le 20 août, nous avons isolé deux métacercaires progénétiques provenant d'un têtard d'*Alytes obstetricans* spontanément infesté.

(1) C'est grâce au Professeur DENIS, Directeur de la Station expérimentale de Grimaldi, et à son élève M. BIRSCH, que nous avons pu étudier ces mollusques et nous les en remercions très vivement.

Ces métacercaires avaient leur utérus bourré d'œufs embryonnés (ce qui est normal chez un *Plagiorchiidæ* adulte) (1). Pour libérer les œufs, l'animal ne présentant pas d'orifice de ponte et étant enveloppé dans un kyste fragile, nous avons légèrement écrasé les deux métacercaires entre lame et lamelle, dans l'eau physiologique. Examinant ensuite au microscope cette préparation, nous avons pu vérifier que les œufs étaient bien sortis de l'utérus et disséminés sous la lamelle, mais néanmoins entiers et non lésés : l'opercule était bien visible ; à l'intérieur de la coque du plus grand nombre d'entre eux, un miracidium vivant, sans yeux, avec un petit rostre strié en avant, était parfaitement perceptible ; on le voyait se mouvoir légèrement, d'avant en arrière.

Quinze jeunes *Planorbis planorbis*, indemnes d'infestation vermineuse, sont mis aussitôt en contact avec ces œufs, dans 20 cc. d'eau, à 25° (expérience 540/A.B.-I) ; 24 heures plus tard, un prélèvement sur les déjections est examiné entre lame et lamelle, afin de contrôler si les œufs ingérés et évacués avec les déjections ont éclos dans l'intestin. Nous avons pu observer d'innombrables œufs présents dans les déjections ; cinq-six œufs seulement sont désoperculés, témoignage de leur éclosion dans le tube digestif ; plusieurs sont en division ; un grand nombre est encore intact et possède toujours un miracidium mobile. Quelques œufs sont éclatés, la coque est vide, mais on ne peut savoir si l'œuf était immature ou si le miracidium qu'il contenait était présent dans l'intestin du mollusque.

Le 21 août, douze autres jeunes *Planorbis planorbis* neufs sont placés dans un cristalliseur de 10-15 cm. de diamètre, avec les œufs de quatre métacercaires progénétiques spontanées, à des stades différents, incluses dans les tissus d'un têtard d'*Alytes obstetricans* (expérience 540'/A.B.-I). Les fragments de tissus ont été broyés dans un mortier avec du noir animal, afin de mettre les œufs en liberté. Le produit de hachage, agité dans l'eau physiologique, est rejeté avec cette eau dans le cristalliseur où les mollusques sont maintenus dans une faible épaisseur d'eau (1-2 cm.), pendant 24 heures.

(1) On sait que les œufs des familles de trématodes suivantes : *Dicrocoelidæ*, *Plagiorchiidæ*, *Opisthorchidæ*, *Heterophyidæ*, *Azygiidæ* sont toujours embryonnés à la ponte et dans les dernières anses de l'utérus. Pour pouvoir poursuivre leur évolution, ces œufs doivent être absorbés par le mollusque, premier hôte intermédiaire ; ils éclosent dans l'intestin : le miracidium actif traverse l'intestin et se fixe en un point d'élection, généralement déjà sur le tube digestif, pour se transformer en sporocyste primitif. Il colonise ensuite l'intestin, le long duquel on trouve souvent les sporocystes, et gagne de là l'hépatopancréas. La coque vide de l'œuf est rejetée avec les selles. Il y a donc ingestion passive et non attraction miracidienne, comme dans la plupart des autres groupes.

L'examen des déjections, le lendemain (22 août), donne les mêmes résultats que pour le premier lot : très nombreux œufs ingérés, rares œufs éclos (1 p. 100 environ).

Les deux lots sont réunis avec les sédiments de tissus hachés et les déjections contenant encore de nombreux œufs mûrs, mais non éclos lors de la première ingestion.

Une nouvelle tentative d'infestation de mollusques est effectuée le 29 août (expérience 558/A.B.-I) ; 20 *Planorbis planorbis*, mis en observation depuis plusieurs mois, n'ayant jamais émis de cercaires, ni infesté de têtards-pièges (1), sont mis en présence de milliers d'œufs renfermant des miracidiums très actifs ; ces œufs provenaient de quatre métacercaires progénétiques prélevées sur des têtards d'*Alytes* infestés spontanément ; 12 *Planorbis glabratus* et 12 *Bullinus contortus* sont joints à ce lot pour étudier la plus ou moins grande spécificité du premier hôte intermédiaire.

L'examen des déjections, 24 heures plus tard, fait ressortir le même pourcentage d'éclosion que dans les expériences précédentes.

Un troisième essai d'infestation est pratiqué le 19 septembre, à partir d'un têtard d'*Alytes* infesté expérimentalement 30-35 jours plus tôt (expérience 578/A.B.-I). L'autopsie de cet animal révéla la présence de très nombreuses métacercaires mûres de grande et de petite taille. Elles étaient toutes progénétiques. Le moignon de la queue portait 10 grandes métacercaires et 5-6 petites ; dans la cavité générale, 12 grands kystes progénétiques sphériques étaient présents. Dans la tête, 36 grandes métacercaires et 2 petites, toujours avec de nombreux œufs. Enfin, le tronc contenait 20 kystes progénétiques, dont 6 nains, soit un total de 72 grandes métacercaires et 14 petites, représentant certainement du 100 p. 100 d'enkystement.

Cinquante-cinq *Planorbis planorbis*, de tous âges, indemnes d'infestation (expérience 578), sont placés dans un cristalliseur de 10-15 cm. de diamètre et une faible hauteur d'eau (1-2 cm.), avec le broyat de tissus parasités du têtard, pilés dans un mortier, afin de libérer plus sûrement les œufs des kystes fortement protégés par les tissus ; 64 grandes métacercaires et quelques petites, isolées et écrasées comme précédemment entre lame et lamelle, sont agitées dans l'eau pour y disséminer les œufs.

L'examen des déjections, 24 heures plus tard, a fait ressortir, outre la quantité considérable d'œufs ingérés, un pourcentage d'éclosion de

(1) Les têtards pièges sont des têtards neufs placés avec les mollusques suspects dont les cercaires ont une grande affinité pour les batraciens. Dans ces conditions, même si les cercaires sont rares et passent inaperçues, elles s'enkystent certainement chez le têtard piège et pourront être ainsi décelées.

10 à 15 p. 100. Les œufs désoperculés provenaient certainement de l'éclosion et non d'un écrasement produit lors de la compression entre lame et lamelle, car aucun éclatement des œufs n'a été ainsi obtenu mécaniquement ; d'autre part, ces œufs sans opercule se trouvaient normalement dans les boudins de déjections évacués par le mollusque.

Les déjections replacées dans le cristalliseur avec les mollusques contenaient encore de très nombreux œufs mûrs, non éclos. Ils ont été certainement en grande partie réingérés et un certain nombre d'entre eux ont dû éclore dans l'intestin, élevant à nouveau le pourcentage d'infestation.

Ce n'est qu'au bout de 60 jours (21 octobre 1949) que nous avons vu apparaître, dans notre premier lot, les premières cercaires de *Paralepoderma brumpti*. Nous les avons aisément reconnues à leur géotropisme fortement positif et leur façon particulière de s'élever de temps en temps dans le bocal, puis de se laisser retomber passivement, enroulées sur elles-mêmes. Les mollusques ont été aussitôt isolés ; en l'espace de huit jours, sur les 20 survivants de cette première infestation, 8 *Planorbis planorbis* émettaient des cercaires, soit un pourcentage de 40 p. 100.

Le nombre des cercaires émises a suivi des variations sensiblement semblables à celles des émissions de notre planorbe originel « 527 ». La longévité des planorbes parasités est faible : trois semaines au maximum. Pour ne pas risquer de perdre la souche, nous avons aussitôt infesté un têtard d'*Alytes obstetricans* (Laurenti) que nous possédions encore, puis trois jeunes têtards d'*Amblystoma mexicanum* (Shaw) et un animal néoténique de grande taille de cette même espèce, tous quatre de la variété blanche, deux jeunes *Xenopus laevis* (Daudin) (1), enfin un jeune *Triton palmatus* (Schneid.).

Tous ces animaux ont bien supporté l'infestation, et nous avons pu constater, comme précédemment, en plaçant ces animaux la tête en haut dans une éprouvette de 10 cc., la pénétration de toutes les cercaires, que leur géotropisme positif maintenait au fond, le plus souvent par l'appendice caudal.

Les têtards d'Axolotl, entièrement transparents, permettent de suivre la migration des cercaires de la queue vers la cavité générale et toutes les parties du corps.

Un mois plus tard, tous ces batraciens présentaient des métacercaires progénétiques, à partir desquelles nous avons réinfesté des

(1) *Amblystoma* et *Xenopus* proviennent des élevages entretenus à Lagny par M. Parisy, qui a bien voulu nous en céder quelques spécimens pour nos expériences.

Planorbis planorbis (L.), en vue de préparer une deuxième génération de cercaires (exp. 648/A.B.-I).

Les deux autres lots parasités (n° 558 et 578) avaient été soumis à une infestation trop intense ; la plupart des mollusques sont morts prématurément avec l'hépatopancréas bourré de sporocystes contenant des cercaires encore immatures, mais néanmoins déjà reconnaissables. Des coupes ont été pratiquées, qui nous ont permis d'observer les altérations histologiques des tubes glandulaires de l'hépatopancréas et leur destruction au contact des sporocystes. Signalons toutefois que tous les mollusques autres que *Planorbis planorbis* (L.) ne se sont pas infestés. Une expérience récente, effectuée avec *Planorbis carinatus* (n° 647/A.B.-I), nous a donné également un résultat négatif.

L'hépatopancréas d'un des planorbes « 558 » a été fixé et coloré *in toto* au carmin chlorhydrique ; il montre bien l'envahissement total de la glande hépatique par les sporocystes et sa destruction entraînant finalement la mort du mollusque.

La deuxième génération de cercaires, obtenues expérimentalement à partir du lot de *Planorbis planorbis* 648/A.B.-I, est apparue le 11 juillet. Elle a permis d'infester quatre jeunes têtards de *Rana temporaria* (684/A.B.-I), provenant de pontes récoltées dans les ruisseaux du Bois de Boulogne, et conservées à l'abri des mollusques dans une cuve du laboratoire.

Trois de ces têtards sont morts accidentellement, 4, 5 et 6 jours après leur infestation. Ils présentaient chacun 6 à 10 métacercaires de grande taille, mais encore immatures.

Le quatrième (d'un poids de 0,35 gr.), sacrifié 50 jours après son infestation, alors qu'il possédait déjà ses quatre pattes et que l'appendice caudal régressé n'était plus qu'un moignon, montra à l'autopsie :

11 métacercaires progénétiques, dont une seule grande et 10 naines, dans le corps et la queue, et 14 métacercaires progénétiques, dont 8 grandes et 6 petites, dans la tête. Les grands kystes possédaient de 500 à 1.000 œufs dans l'utérus, mais aucun dans le kyste, et d'assez nombreuses granulations de substance coquillière étaient disséminées parmi les œufs.

Un nouveau lot de 80 *Planorbis planorbis* jeunes, provenant de nos élevages, fut infesté à partir de ces œufs, préparant une troisième génération de cercaires (695/A.B.-I). Ces infestations successives semblent donc bien prouver que l'espèce *Paralepoderma brumpti* est parfaitement adaptée à un processus abrégé d'évolution.

Nous donnons ci-dessous (p. 100) un tableau généalogique des différents passages effectués à partir du planorbe originel « 527 »,

FIG. 44. — *Paralepoderma brumpti*; métacercaires progénétiques fixées sur des branchies de têtard d'*Amblystoma mexicanum*. Localisation superficielle, tombent à la maturité. (Orig.).

spontanément infesté, pour aboutir à la troisième génération de cercaires obtenues expérimentalement par des cycles à deux hôtes.

Comment les mollusques s'infestent-ils dans la nature ? Il semble rare que les kystes tombent spontanément, comme chez les dis-

Paralepoderma brumpti (A. BUTTNER, 1950)

Origine de la souche :
Station expérimentale de Richelieu (Indre-et-Loire)

Évolution abrégée (1)

(1) Les chiffres tels que (1), (5), etc., indiquent le nombre d'animaux étudiés.

coglosses infestés par *Ratzia joyeuxi* (E. Brumpt 1922) ; cependant, nous avons obtenu, chez un têtard d'*Axolotl*, l'enkystement de deux métacercaires sur les branchies (fig. 44). Ces métacercaires n'y étaient fixées que très superficiellement, et les branchies à peine sectionnées, les kystes n'ont pas tardé à se détacher et à rouler sur la lame où nous venions de les dessiner en place sur les diverticules branchiaux.

Il se peut que la mort des têtards mette en liberté, lors de la décomposition des tissus, les œufs qui sont alors ingérés par les mollusques. Ceux-ci consomment, en effet, volontiers des fragments de têtards hachés ; nous avons pu nous en apercevoir, lors de nos infestations expérimentales, avec des tissus de têtards infestés, plus ou moins dilacérés et broyés. Il se peut aussi que le têtard soit mangé par un animal prédateur vertébré, et que les kystes digérés laissent en liberté les œufs qui traversent passivement le tube digestif et sont ainsi évacués dans l'eau sans être altérés. Cette difficulté pour libérer les œufs pourrait expliquer l'extrême rareté de cette infestation dans la nature. Nous sommes retournée au printemps 1950 au gîte originel de ces planorbes ; sur 250 planorbes examinés, aucun jusqu'à ce jour n'a présenté cette infestation.

Comment est-elle née dans la cuve où nous l'avons découverte ? C'est ce qu'il nous paraît impossible d'élucider. Peut-être le mollusque était-il déjà infesté lors de sa récolte dans les canaux de drainage. Ces canaux hébergent une faune assez variée et ils peuvent être fréquentés au printemps par des batraciens, des reptiles, des oiseaux sauvages et de petits mammifères susceptibles de jouer ce rôle de libérateur passif des œufs au cours du passage des kystes dans leur tube digestif.

Etude de la reproduction : autofécondation

En dépit de leur abondance dans l'utérus, il n'y a jamais d'œufs dans le kyste. L'examen à frais semble montrer que l'orifice femelle n'est pas fonctionnel. En effet, les œufs projetés au moment des contractions utérines vers l'orifice génital ne parviennent jamais à sortir. Dans ces conditions, l'autofécondation normale paraissait difficilement explicable, à moins que l'on admette une perméabilité précoce du pore utérin. Des coupes sérieées, pratiquées dans un certain nombre de métacercaires progénétiques, nous ont permis d'élucider en partie le processus de fécondation : il ne s'agit point de parthénogénèse ; les deux testicules, parfaitement développés dans les métacercaires, sont en pleine activité fonctionnelle (métacercaires de 15 à 60 jours). Ils dégénèrent par la suite, lorsque l'utérus, gonflé d'œufs, ne peut plus les évacuer en raison de la particularité

anatomique que nous signalons ci-dessus. La spermatogénèse est aisément suivie et l'on distingue tous les stades de développement du spermatozoïde, depuis la zone de multiplication jusqu'aux stades de différenciation du spermatocyte de deuxième ordre en spermatide, puis en spermatozoïde. Ce dernier est de grande taille ; il mesure 15 à 18 μ .

L'ovogénèse est beaucoup moins facile à observer et il ne nous a pas été possible de distinguer, sur les coupes colorées, la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule pendant ou après la méiose. Toutefois, celle-ci ne saurait faire de doute, car de nombreux spermatozoïdes étaient présents dans les anses utérines. Observons que si, chez les métacercaires âgées, les testicules dégénèrent complètement, en revanche, l'ovaire demeure volumineux (fig. 45) et ne donne aucun signe de dégénérescence. Au bout de 8 à 10 mois cependant, nous avons vu que cette dégénérescence s'effectue et que l'ovaire disparaît à son tour.

L'autofécondation nous semble, dans ce cas, absolument certaine ; sans faire, croyons-nous, preuve de finalisme, remarquons qu'il serait sans doute sans exemple qu'un organe puisse conserver une activité fonctionnelle aussi intense que celle des glandes génitales mâles de ce distome, si cette activité devait demeurer sans objet. L'histoire du développement embryologique des êtres vivants a toujours démontré, au contraire, qu'un organe devenu inutile ne persiste chez l'adulte qu'à l'état rudimentaire. Nous retrouverons ce problème à propos de la fécondation des œufs de *Ratzia joyeuxi*, chez lequel la structure testiculaire est nettement anormale et où la présence de spermatozoïdes n'a pu être décelée. Néanmoins, le tractus génital mâle est entièrement développé ; la vésicule séminale, sorte de manchon sacciforme à double renflement, est même exceptionnellement volumineuse. Le *receptaculum seminis* est également présent et souvent assez gros.

Par quelle voie se fait la fécondation chez *Paralepoderma brumpti* ? Nous n'avons pu mettre en évidence avec certitude, sur nos préparations *in toto*, le canal de Laurer. Les préparations les plus démonstratives étaient celles des métacercaires de 15 jours, sexuellement mûres, et où le nombre des œufs n'était pas trop élevé, permettant de distinguer l'ovaire et ses dépendances ; un canal transparent, assez large, semble remonter à une certaine distance de l'ovaire vers l'acetabulum. Les coupes frontales nous ont parfois montré, derrière la ventouse ventrale, non loin de la poche du cirre, un canal large rempli de spermatozoïdes, et deux autres plus petits contenant également de très nombreux spermatozoïdes. Le premier pourrait vraisemblablement correspondre au canal de Laurer, seule voie de fécondation possible, semble-t-il, dans ce cas particulier.

R.-Ph. Dollfus (1950), étudiant les différents distomes qu'il assimile à *P. cloacicola*, parmi lesquels il comprend *Paralepoderma brumpti*, admet, sans être tout à fait affirmatif, qu'ils possèdent un canal de Laurer (p. 148).

FIG. 45. — Métacercaire progénétique âgée de *Plagiorchis brumpti* avec xénokyste réactionnel. Remarquer l'ovaire encore assez volumineux. (Orig.)

Les deux autres canaux sectionnés que l'on voit sur le même plan dans de nombreuses coupes transversales successives, entre le sommet des testicules et l'acetabulum, seraient les canaux déférents,

peut-être réunis en un seul vers la partie médiane, ce canal unique dessinant alors quelques sinuosités. Une dizaine de métacercaires de 15 et 36 jours, diversement orientées, ont été ainsi examinées par nous sur des coupes sériées. Sur chacune de ces coupes, nous avons pu constater l'activité sexuelle intense et l'extrême fécondité de ce distome. De nombreux spermatozoïdes étaient toujours présents dans l'utérus, les canaux déférents, la poche du cirre et le canal de Laurer, si le large conduit situé non loin de l'aceta-bulum lui est assimilable. Ces observations ont été complétées par l'étude d'une trentaine de métacercaires progénétiques de 15 à 36 jours, montées *in toto* et colorées à l'hémalun ou au carmin chlorhydrique, qui nous ont permis de mieux interpréter les coupes et de les localiser dans l'espace.

Nous concluons donc à une autofécondation, processus dont l'efficacité se révèle aussi grande que celle de la fécondation croisée chez des distomes adultes. Elle fait de la métacercaire progénétique de *P. brumpti* un adulte véritable. L'ouverture précoce du pore utérin, suivie de sa fermeture, reste très improbable, puisqu'en 15 jours déjà, de nombreux œufs sont formés, et qu'en dépit des contractions régulières de l'utérus, aucun œuf n'est évacué dans le kyste. D'autre part, le fait que la spermatogénèse se manifeste pendant toute l'évolution sexuelle de l'animal et que le nombre des œufs s'accroît sans cesse et dans des proportions considérables, rend plus vraisemblable l'accomplissement de la fécondation par le canal de Laurer. Cette fécondation se poursuit pendant toute la période d'activité génitale de la métacercaire. Au bout de deux mois, les testicules dégénèrent, mais la métacercaire chargée d'œufs, prêts pour la dissémination, peut persister fort longtemps dans les tissus de son hôte.

Longévité et rôle pathogène

Cette métacercaire présente en effet une grande longévité ; elle peut vivre plusieurs mois en état de vie ralentie ; sa croissance étant achevée et son activité sexuelle éteinte, les exigences de son métabolisme deviennent très discrètes. Un jeune têtard d'*Alytes obstetricans* (Laur.), pesant environ 1 gramme, déjà infesté par 50-60 cercaires d'*Opisthioglyphe ranæ* et de *Leptophallus nigrovenosus*, a été exposé, le 21 octobre 1949 et les jours suivants, à 20-30 cercaires de *Paralepoderma brumpti*, faciles à distinguer des premières en raison de la taille et du caractère progénétique de leurs métacercaires (exp. 588/A.B.-I).

Ce têtard, bien que maintenu en état constant de sous-alimentation pour empêcher sa métamorphose, était encore en parfaite santé

quand il fut sacrifié le 28 août 1950, soit environ 310 jours après son infestation par les cercaires de *P. brumpti*.

Nous avons retrouvé dans son corps, sans altération, la majeure partie de ses métacercaires. Les seules modifications observées dans les kystes de *P. brumpti* résidaient dans une disparition graduelle des glandes génitales et de l'appareil vitellin.

Les œufs semblaient en parfait état et leurs miracidiums, bien constitués, nous ont servi de point de départ pour une nouvelle infestation expérimentale de *Planorbis planorbis* d'élevage (exp. 690/A.B.-I).

Nous avons examiné les œufs situés près de l'extrémité utérine, représentant par conséquent ceux qui sont arrivés les premiers à maturité. Comme nous avons pu observer, au cours de nos expériences d'infestation de planorbes, que le miracidium des œufs des kystes progénétiques était déjà infectieux au bout de 15 jours (exp. 540/A.B.-I), et que, d'autre part, l'utérus étant obturé, ces œufs sont contraints de poursuivre leur évolution *in situ*, on peut affirmer que, chez le têtard d'*Alytes* « 588 », les métacercaires de *P. brumpti* présentaient dans les œufs utérins voisins du pore génital des miracidiums restés vivants pendant 9 mois et demi. Cette longévité, étant donné l'excellent état des œufs, doit vraisemblablement s'étendre à la durée de la vie de la métacercaire et peut-être au delà.

La longévité de la métacercaire est elle-même fonction de celle de l'hôte qui l'héberge : nous avons ainsi pu constater qu'en prolongeant artificiellement l'existence du têtard « 588 », l'adaptation parfaite de la métacercaire de *P. brumpti* au métabolisme ralenti de son hôte lui permet de participer à la prolongation d'existence de ce dernier, sans perdre pour autant son rôle actif dans la conservation de l'espèce.

Que deviennent les kystes au moment de la métamorphose ? C'est ce que nous n'avons pu savoir, n'ayant pu conserver en laboratoire des têtards métamorphosés.

Le rôle pathogène est ainsi presque nul. Il n'y a certainement pas production de toxines. Seuls, les effets mécaniques déterminent occasionnellement de petites hémorragies. Une métacercaire progénétique, logée dans l'angle interne de l'œil d'un têtard, à côté de deux kystes non progénétiques d'*Opisthioglyphe ranæ*, s'est développée normalement, sans causer à son hôte aucune perturbation mécanique ou toxique.

Conclusions

L'étude du cas de progénèse de *Paralepoderma brumpti* nous suggère les réflexions suivantes :

Le processus possède ici un caractère *impératif* : toutes les métacercaires de cette espèce deviennent progénétiques chez le têtard-hôte, alors que celles des autres espèces gyrenophiles y demeurent à l'état larvaire, quelle que soit la durée de leur habitat chez cet animal. Le développement rapide de la progénèse se déroule sans le concours apparent de facteurs extérieurs ; tout au plus, la température peut-elle accélérer légèrement le rythme de cette évolution. Le déterminisme reste probablement ici *sous l'entière dépendance de facteurs inscrits dans le patrimoine héréditaire*.

La progénèse fait de la métacercare de *P. brumpti* un adulte véritable : il en a la maturité sexuelle et la fécondité.

La progénèse abrège dans ce cas le cycle évolutif normal.

Pourquoi ce parasitisme, dont le développement n'exige plus que deux hôtes, ne se répand-il pas davantage dans la nature ? Depuis de longues années, en effet, des *Planorbis planorbis* ont été récoltés à Richelieu ; depuis longtemps également, les métacercaires de têtards de batraciens ont été étudiées par différents chercheurs ; c'est la première fois cependant que, l'an dernier, une métacercare progénétique a été observée par nous, en Indre-et-Loire, chez des batraciens larvaires. D'autre part, nous avons examiné à nouveau, cette année, plus de 250 *Planorbis planorbis* du même gîte, dont aucun, après isolement pendant plusieurs jours, n'a présenté la cercare de *Paralepoderma brumpti*.

Cette rareté peut être due au fait que le phénomène est d'apparition récente ; il se peut aussi que la spécificité très étroite du miracidium pour *Planorbis planorbis* (mollusque assez peu répandu dans la région et que son habitat hivernal, profondément enfoui dans la terre, met à l'abri en cette saison de toute contamination) diminue considérablement les chances d'infestation. Enfin, il ne faut pas oublier que la libération des œufs ne se produit qu'après la mort du têtard. Comment se réalise-telle dans la nature ? Nous n'en savons rien. Faut-il qu'un animal prédateur ingère le têtard et que les œufs, mis en liberté par les sucs digestifs, traversent passivement le tube digestif et soient éliminés avec les selles, pour que les mollusques puissent être infestés ? Nous ne savons pas davantage ce que deviennent les métacercaires chez le batracien après sa métamorphose. Ceux que nous avons conservés au laboratoire n'ont jamais vécu bien longtemps. Il est possible que la métacercare dégénère chez le batracien adulte et ne puisse ainsi jouer son rôle dans la conservation de l'espèce.

(à suivre).

Institut de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris
et Station expérimentale de Richelieu (Indre-et-Loire)
(Dir. : Prof. H. Galliard) (Dir. honor. : Prof. E. Brumpt)