Le phénomène de la " formation de la calotte " chez la larve d'*Anisakis marina* (Linnaeus 1767) dans du sérum humain

par Pieter H. VAN THIEL

Straub a trouvé, en 1955, un ver au centre d'un phlegmon éosinophile, dans la partie réséquée de l'intestin grêle d'un malade de Rotterdam, par ailleurs bien portant, et qui avait présenté brusquement des symptômes aigus d'occlusion intestinale. Depuis lors, plusieurs cas avec le même syndrome consécutif à la présence d'un ver au niveau de l'inflammation intestinale se sont présentés. Van Thiel, Kuipers et Roskam (1960) ont réussi à démontrer que ce ver est un Nématode, la larve d'un genre de la famille des *Heterocheilidae*. Ce ver avait d'abord été identifié à un *Eustoma rotondata* ; puis plus tard, van Thiel (1962, 1967) l'a décrit comme étant la larve d'une espèce du genre *Anisakis*. La maladie doit donc être dénommée anisakiase. Avec l'aide du Professeur C. F. A. Bruijning, du Laboratoire de Parasitologie de Leyde, nous avons pu démontrer que la larve se trouve chez les harengs capturés en mer du Nord. Il est certain que l'homme s'est infesté aux Pays-Bas en mangeant du hareng insuffisamment salé, le « hareng vert ». L'habitude de consommer ce hareng s'est instituée environ vers 1955, de sorte qu'il est probable que l'anisakiase ne s'est pas manifestée auparavant.

On sait, à présent, que la maladie existe aussi au Japon (Yokogawa et Yoshimura, 1965, Asami et collaborateurs, 1964, 1965) et que l'infestation se produit alors par la consommation non seulement de harengs, mais de cabillauds, de maquereaux, de seiches et de viande de baleines où se trouvent cachées des larves d'*Anisakis*. Les recherches de Kuipers, Kampelmacher et Steenhoven (1963) sur des lapins ont montré qu'un phlegmon éosinophile ne survient que si une deuxième larve d'*Anisakis* pénètre dans l'intestin tout près, à environ un centimètre du lieu de pénétration de la première larve. Les travaux de Kuipers (1964) ont permis d'admettre que la pathogénèse de l'anisakiase chez l'homme est semblable à celle du lapin.

Van Thiel (1967) a démontré que le ver adulte se trouve chez des Mammifères marins, à savoir chez des dauphins, des marsouins, des phoques gris et chez des baleines odontocètes et à fanons. Quoique plusieurs espèces d'*Anisakis* aient été décrites, il avait admis avec Dollfus (1948) leur identification à une seule espèce d'*Anisakis*, désignée sous le nom d'*Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809). En 1967, toutefois, van

Thiel a proposé le nom d'*Anisakis marina* (Linnaeus 1767), sous-famille des *Anisakinae* Railliet et Henry (1912), pour cet helminthe de Mammifères marins.

Au début, on a réséqué la partie infestée de l'intestin chez tous les malades soupçonnés d'anisakiase. Le diagnostic pouvait être affirmé par la mise en évidence du ver. Daniels (1962) a observé que des malades atteints d'anisakiase, et qui n'avaient pas subi l'opération, guérissaient spontanément, probablement par suite de la transformation du phlegmon en abcès, et de l'évacuation du pus dans la lumière intestinale. Depuis lors, la résection de l'intestin n'est plus pratiquée et il suffit de la constatation d'une éosinophilie très élevée dans la membrane séreuse et dans le liquide d'ascite pour faire le diagnostic d'anisakiase. Il est évident que dans ces conditions ce diagnostic est plus aléatoire.

L'établissement du diagnostic a été tenté aussi sérologiquement. Selon Kampelmacher (Polak 1964), la réaction de fixation du complément est assez hautement spécifique. Sur 975 « sérums normaux » huit fois seulement un titre de 1 : 2 et de 1 : 8 a pu être constaté. Evidemment, le titre chez un malade atteint d'anisakiase, ne peut pas être élevé quand le ver est retiré par suite de la résection intestinale. Le malade guéri spontanément montre un titre plus haut. Malgré cela, les auteurs sus-nommés n'ont pu obtenir un titre supérieur à 1 : 32.

Nous avons recherché encore s'il était possible de faire le diagnostic d'anisakiase au moyen d'une réaction de précipitation. Une publication de Otto (1948) nous a inspiré. Il a décrit la formation d'un précipité granulaire ou vésiculeux à l'orifice oral, et parfois à l'orifice anal et au pore excréteur de la larve infestante d'*Ancylostoma caninum* dans du sérum hyperimmun provenant d'un chien infesté avec des doses croissantes de ces larves.

Avant d'examiner si le sérum de malades atteints d'anisakiase permet l'apparition d'une réaction de précipitation, nous avons étudié le phénomène dans du sérum humain normal.

Chaque larve est placée dans 0,3 cc de sérum stérile dans une cuvette en verre stérile, fermée par une lame de verre et mise à l'étuve à 37° C. La larve est examinée successivement après 24, 48 et 72 heures. Une « calotte » de précipité apparaissait souvent au niveau de la tête de la larve. Afin de pouvoir juger de la fréquence de la formation de ce précipité, le professeur H. R. van der Vaart, autrefois chargé des statistiques à l'Université de Leyde, nous a conseillé d'examiner tout d'abord 15 sérums normaux, à raison de 20 larves par sérum. Des sérums frais ont été étudiés provenant de recrues originaires de diverses parties des Pays-Bas, à l'exception de Rotterdam, du fait que, au début, tout au moins, presque tous les cas d'anisakiase se sont présentés dans cette ville.

Les larves d'*Anisakis* utilisées dans cette expérience étaient prélevées chez des harengs par le Dr R. Th. Roskam à Ymuiden et expédiées dans un peu d'eau de mer à Leyde, où elles étaient soit immédiatement mises en expérience, soit conservées à la glacière à 4° C. Les larves utilisées au début de chaque épreuve présentaient toujours une grande mobilité.

Résultats

a) RÉACTION AVEC DES SÉRUMS NORMAUX.

Les sérums normaux étaient essentiellement équivalents, parce qu'ils étaient originaires de personnes n'ayant très probablement pas souffert d'anisakiase. La probabilité d'existence dans ces sérums d'anticorps anti-*Anisakis* était donc extrêmement faible. D'après l'expérience de Kampelmacher, mentionnée plus haut, la réaction de fixation du complément dans les sérums de semblables personnes est négative. Le résultat se trouve dans le tableau I. Le Professeur van der Vaart, nommé plus haut, a recherché si la probabilité pour les larves d'*Anisakis*, mises dans du sérum normal, de développer une calotte était la même pour chaque larve quelle que soit la durée d'incubation (24, 48 et 72 heures) ; en d'autres termes si la répartition binomiale pouvait être appliquée. A cet effet, il a composé une table de « deux fois 15 » pour la présence ou l'absence d'une calotte. Pour cette table, le χ^2 se montait à T 44.1. Ceci veut dire que chaque larve n'a pas la même chance de former une calotte et que la formation de ladite calotte ne peut pas être utilisée pour le diagnostic de l'anisakiase.

b) RÉACTION AVEC DES SÉRUMS DE MALADES ATTEINTS D'ANISAKIASE PAR COMPARAISON AVEC CELLE EFFECTUÉE AVEC DU SÉRUM NORMAL.

Avant que le résultat de l'examen fait par le P^r van der Vaart, décrit en « a », fût connu, une épreuve identique a été faite avec les sérums de trois malades, fortement suspects d'anisakiase, mais chez qui une résection intestinale n'avait pas été pratiquée ; le sérum a été prélevé pendant leur séjour à l'hôpital et environ deux mois après leur départ de cet établissement.

La calotte se formait ici aussi très fréquemment, mais il n'y avait pas de différence dans la fréquence ou dans l'intensité de la formation de la calotte en égard à celle observée dans du sérum normal après 24, 48 et 72 heures d'incubation. Malheureusement la réaction de fixation du complément n'a pas donné un résultat positif. Peut-être ceci a-t-il été causé par le fait que la réaction a été exécutée par le D^r Kampelmacher (1967) au commencement de son étude sur le sujet. Le diagnostic d'anisakiase reste donc douteux.

c) LA NATURE DE LA CALOTTE.

A l'aide de la méthode d'acroléine-Schiff, le professeur d'histochimie à l'Université de Leyde, P. van Duyn, a établi que la calotte est composée d'albumen. Dans le sérum, filtré sur un filtre de Seitz, dilué à 1 : 12 et marqué à la fluorescéine, le D^r C. van den Berg, du Laboratoire de Pathologie de l'Université de Leyde, a pu observer que la calotte montrait une fluorescence, de sorte qu'elle est formée de matériaux provenant du sérum. Dans la calotte fluorescente les bandes, décrites en « f » ne pouvaient être observées.

d) LA PLUS GRANDE ÉPAISSEUR DE LA CALOTTE.

La calotte est généralement orientée obliquement tout contre l'extrémité céphalique de la larve (fig. 1 à 6). La plus grande épaisseur ne se trouve donc pas dans l'axe longitudinal de la larve.

Dans la mesure du possible, la plus grande épaisseur de la calotte a été déterminée. Dans la rubrique à droite du tableau I, elle est indiquée en unités de $4,2 \mu$. L'épaisseur de la calotte, qui s'était formée après une incubation des larves pendant 72 heures, n'était pas différente de celle observée après une incubation de 24 à 48 heures successivement.

Il n'existait pas non plus de différence entre l'épaisseur de la calotte chez des larves après incubation dans du sérum normal et dans celui des malades fortement suspects d'anisakiase (en « b »).

e) INFLUENCE DE LA MOBILITÉ DE LA LARVE SUR LA FORMATION DE LA CALOTTE.

La plupart des larves était encore bien vivantes et fortement mobiles, même après une incubation de 72 heures. Il n'existait pas de rapport entre la formation de la calotte et la mobilité de la larve.

Dans les expériences d'Otto, signalées plus haut, les larves d'*Ancylostoma caninum* étaient hyperactives après une incubation de 5 heures ; elles avaient l'air de vouloir se débarrasser du précipité. Puis, la quantité de précipité augmentait, tandis que la mobilité des larves diminuait au bout de 24 heures. Peu avant 48 heures, les larves étaient presque immobiles ou moribondes. Quelques-unes étaient mortes après deux à cinq ou six jours. Un tel précipité ne se formait pas dans du sérum normal, dans lequel les larves restaient actives pendant près de deux semaines.

Ceci indique aussi que le phénomène observé par Otto est différent de celui observé par nous.

f) LA STRUCTURE DE LA CALOTTE.

Le précipité nommé ici « calotte » n'est pas composé d'une matière granuleuse uniforme ; sa structure est assez complexe.

1. La boulette d'excrétion.

Une boulette finement granuleuse de matière d'excrétion se trouve au centré tout près et à l'extérieur du pore excréteur (fig. 1 et 2). Elle peut être entourée par une bande, parallèle à la périphérie de cette boulette, qui est plus finement granuleuse et de teinte plus foncée (fig. 2) ou aussi claire (fig. 4). La boulette se gonfle dans les autres bandes, décrites en « 2 », « 3 » et « 4 ».

Dans la figure 6, il semble exister dans la calotte deux centres indiqués par deux boules (en « g »).

FIG. 1-6. — Têtes de la larve d'*Anisakis marina* munies de quelques types de « calotte » dans du sérum humain normal

FIG. 1. — Le contenu du tube d'excrétion se déverse dans le centre de la calotte. La boulette d'excrétion (en f1) est entourée par la bande striée (en f2) et ensuite par la bande granuleuse différenciée (en f4).
Grossissement : 120 fois

FIG. 2. — Le tube d'excrétion aboutit au centre de la calotte. La boulette d'excrétion est entourée par une bande parallèle (en f1). Dorsalement par rapport à la boulette se trouve la bande striée (en f2). La bande granuleuse est déchirée à la périphérie (en f4).
Grossissement : 188 fois

2. La bande striée.

Une bande contournée, distincte, est caractérisée par des stries perpendiculaires à la surface de la larve (fig. 1, 2 et 3). Cette bande se trouve tout près du corps de la larve, autour de la boulette de matière d'excrétion, décrite en « 1 ». Elle est, en général,

FIG. 3. — La boulette d'excrétion (en *f* 1) au centre et la bande striée (en *f* 2) sont fortement développées. La bande granuleuse est composée de trois bandes de composition différente (en *f* 4).
Grossissement : 170 fois

FIG. 4. — Le contenu du tube d'excrétion se déverse dans le centre de la calotte. La matière d'excrétion très fine semble se gonfler dans la cavité (en *f* 3). La bande striée (en *f* 2) est développée faiblement et seulement au milieu de la matière d'excrétion. La bande granuleuse (en *f* 4) est composée de deux bandes de composition différente, la plus centrale étant striée faiblement. Grossissement : 200 fois

FIG. 5. — La bande striée (en *f2*) est très épaisse, entourée par la bande granuleuse déchirée (en *f4*). Grossissement : 174 fois

FIG. 6. — Il y a deux boules dans la calotte (en *f1* et *g*) ; la genèse de la plus petite est obscure. Elles sont enveloppées par une bande granuleuse qui est nettement différenciée en plusieurs bandes (en *f4*). Grossissement : 160 fois

plus développée dans la direction ventro-caudale (fig. 2 et 3), et se rétrécit vers son extrémité distale (fig. 1 et 3) ; quelquefois ce bout est élargi (fig. 2). Dans la figure 4 cette bande striée semble manquer, mais pourtant elle est de très faible épaisseur et

située probablement entre les deux parties de la boulette de matière d'excrétion, décrite en « 1 ». Dans la figure 5, la bande striée est extrêmement épaisse.

3. Une cavité petite, probablement artificielle, se présente comme une bande claire, entourant la bande striée décrite en « 2 ». La boulette de matière d'excrétion peut se gonfler dans cette cavité (fig. 4).

4. La bande granuleuse.

Une bande claire, bien tranchée, finement granuleuse et plus large, dans laquelle parfois une striation très fine, perpendiculaire à la surface du corps de la larve, peut être observée (fig. 4). Cette bande embrasse la tête de la larve, principalement à la partie ventrale et détermine l'étendue de la calotte, parce qu'elle se développe caudalement par rapport aux bandes décrites en « 2 » et « 3 ». Dans cette dernière bande, on voit souvent des lignes bien marquées, plus ou moins parallèles à la surface de la tête de la larve, qui indiquent que cette bande peut être composée de plusieurs parties, probablement de consistance différente, la partie la plus finement granuleuse siégeant à la périphérie (fig. 1, 3 et 4). L'une semble parfois couvrir seulement une partie de l'autre (fig. 3). La bande peut être localement extrêmement mince à la périphérie de la bande décrite en « 2 » (fig. 6). Quand elle n'a pas de contour net (fig. 2 et 5), il est probable qu'elle a été déchirée ; c'est ce qui se passe lorsqu'une larve est collée avec sa calotte contre le verre de la cuvette remplie de sérum, puis s'en est détachée.

g) LA GENÈSE DE LA CALOTTE.

Il existe une relation entre la genèse de la calotte et la formation des matériaux d'excrétion, même quand celle-ci n'est pas évidente. La localisation centrale de cette matière est surtout distincte dans les figures 1 et 2. Dans la figure 6, la grande boule, mesurant 84 μ , située tout près du pore excréteur, peut être expliquée ainsi, mais une seconde boule plus petite, qui a été trouvée rarement, demeure inexplicable.

Les bandes se forment sans doute par le contact entre la substance excrétrice et le sérum. Dans ce rapport il est bien remarquable que la bande granuleuse décrite en « f4 » s'étende dans la figure 6, au-dessus des deux boules, que nous venons de signaler, la partie couvrant la grande boule étant extrêmement mince.

La striation de la bande décrite en « f2 » semble naître aussitôt que les excréments viennent au contact du sérum. Une explication de ce phénomène ne peut être donnée, même après consultation du professeur de biochimie de l'Université de Leyde, H. Veldstra. Les produits d'excrétion peuvent diffuser à travers la bande striée vers l'extérieur (figs 1, 2, 3 et 4).

La structure de la calotte permet de présumer que les bandes naissent par poussées, peut-être sous l'influence d'excréments périodiques et de la mobilité des larves.

Quand une calotte vient d'être constituée et que son épaisseur maximale ne dépasse pas 20 à 29 μ , la bande striée est déjà formée, et se situe ventralement par rapport à la dent larvaire, à côté de la goutte excrétrice ; elle mesure 7,5 μ d'épaisseur. Elle est aussitôt entourée par une bande granuleuse non-différenciée, qui s'étend surtout caudalement à la face ventrale.

TABEAU I. — Formation d'une « calotte » autour de la tête de la larve d'*Anisakis marina* dans du sérum humain normal ; 20 larves par sérum séparées après incubation à 37°C.

Sérum numéro	Nombre de larves ayant une calotte après incubation pendant			Epaisseur maximale moyenne et varia- bilité (entre parenthèses) de la calotte, indiquées par nombre d'unités à 4,2 μ		
	24 h (1)	48 h (1)	72 h	24 h (1)	48 h (1)	72 h
I	1	1	4	23	20	16 (10-25)
II	0	4	1	—	10 (6-16)	15
III	5	3	4	20 (12-25)	22 (20-25)	10 (5-20)
IV	4	2	3	23 (20-30)	28 (27-30)	17 (9-24)
V	1	0	2	14	—	18 (17-20)
VI	3	5	4	20 (17-22)	22 (17-25)	13 (8-20)
VII	1	4	1	15	23 (20-25)	35
VIII	1	5	2	7	16 (6-28)	20 (15-25)
IX	1	1	3	5	25	16 (10-25)
X	5	1	1	18 (10-30)	10	12
XI	4	4	8	21 (17-30)	17 (9-30)	14 (10-20)
XII	8	6	2	13 (10-17)	13 (10-30)	25 (20-30)
XIII	3	5	2	?	?	?
XIV	4	4	2	?	?	?
XV	2	2	2	11 (10-13)	15	14 (13-15)
	43	47	41			
Pourcen- tage de lots de 300 lar- ves	14	16	14			

(1) Une larve n'est plus incubée après que la formation d'une calotte ait été constatée.

Résumé

Quand les larves d'*Anisakis marina*, qui se trouvent chez les harengs, capturés en mer du Nord, sont incubées dans du sérum humain à 37° C, il se forme souvent sur la tête de la larve un précipité, nommé ici « calotte », qui n'est autre que le précipité qui se forme aux orifices oral et anal et au pore excréteur des larves d'*Ancylostoma caninum* quand celles-ci se trouvent dans du sérum hyperimmun. Le « phénomène de la formation de la calotte » est décrit en détail. Il naît probablement par le contact du produit d'excrétion de la larve avec le sérum et est composé d'albumen.

Le « phénomène de la formation de la calotte » ne peut être utilisé pour le diagnostic de l'anisakiase, la « maladie du hareng » chez l'homme.

Bibliographie

- ASAMI (K.), WATANUKI (T.), SAKAI (H.), IMANO (H.) et OKAMOTO (R.), 1964. — Eosinophilic granuloma in the stomach, probably caused by *Anisakis* infection. *Jap. J. Parasitol.*, 13, 325-329.
- , 1965. — Two cases of stomach granuloma caused by *Anisakis*-like larval Nematodes in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14, 119-123.
- DANIELS (J. J. H. M.), 1962. — De eosinofiele flegmone van het maagdarm-kanaal. *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.*, 106, 131-132.
- DOLLFUS (R. Ph.), 1948. — Nématode à œsophage sigmoïde de l'estomac d'une *Orca orca* (L. 1789) ♀ (Cétacé odontocète). Liste des *Anisakis* des Cétacés et des Pinnipèdes. *Ann. Parasit. Hum. et Comp.*, 23, 305-322.
- KAMPELMACHER (E. H.), 1967. — Verslagen en Mededelingen betreffende de Volksgezondheid. *Sous-presse*.
- KUIPERS (F. C.), 1964. — Pathogenese van de haringwormflegmone bij de mens. *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.*, 108, 304-305.
- , KAMPELMACHER (E. H.) et STEENBERGEN (F.), 1963. — Onderzoekingen over haringworm-ziekte bij konijnen. *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.*, 107, 990-995.
- LINNAEUS (C.), 1767. — *Systema naturae*. Ed. 12, 1, 533-1327.
- OTTO (G. F.), 1948. — Immunity against canine hookworm disease. *Veterin. Med.*, Chicago, 43, 5, 1-12.
- POLAK (M. F.), 1964. — Haringwormbesmetting bij de mens. *Rapport Rijksinstituut voor de Volksgezondheid*, Utrecht, 1-18.
- THIEL (P. H. VAN), 1962. — Anisakiasis. *Parasitol.*, 52, 16.
- , 1967. — The final hosts of the herringworm *Anisakis marina*. *Trop. and Geogr. Med.*, 18, 310-328.
- et HOUTEN (H. van), 1967. — The localization of the herringworm *Anisakis marina* in- and outside the human gastro-intestina wall and characteristics of its larval juvenile stages. *Trop. and Geogr. Med.*, 19, 56-62.
- , KUIPERS (F. C.) et ROSKAM (R. Th.), 1960. — A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. *Trop. and Geogr. Med.*, 12, 97-113.
- YOKOGAWA (M.) et YOSHIMURA (H.), 1965. — *Anisakis*-like larvae causing eosinophilic granulomata in the stomach of man. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14, 770-773.

(Travail du Laboratoire de Parasitologie de l'Université
et de l'Institut de Médecine Tropicale, Leyde, Pays-Bas)