Considérations expérimentales nouvelles sur l'évolution *in vitro* en milieu liquide des larves d'*Echinococcus granulosus*

par J. BENEX

(Institut Pasteur, 25, rue du D^r-Roux - 75 - Paris-15^e)

Résumé

La culture *in vitro* de scolex d'*E. granulosus* a conduit à l'obtention de formations différentes selon la nature des explants.

a) La présence de fragments de membrane prolifère est indispensable à l'obtention de kystes secondaires ;

b) Les scolex nus tendent à former un proglottis, mais dans des conditions défavorables, évoluent vers des formes abortives.

Summary

In vitro cultivation of scolex from *E. granulosus* showed two different aspects according to the explanted material :

a) to obtain true miniature hydatid cysts with laminated envelope, some fragments of germinal membrane must remain.

b) scolex without any germinal membrane try to develop in strobilar stage — if suitable conditions are provided — or became abnormal and develop posterior bladders.

L'intérêt de la culture *in vitro* de larves des ténia du genre *Echinococcus* est apparu très tôt, presque parallèlement à la connaissance du cycle évolutif de ce parasite. C'est donc dès 1900 avec les travaux de Dévé (3) complétés dans les années suivantes par ceux de son élève Coutelen (2) que nous trouvons les premiers résultats expérimentaux positifs. Dévé et Coutelen obtiennent des survies de 33 jours en milieu liquide, avec évolution de la larve par « hydropisie » et formation d'une cuticule très mince qui paraît être à structure lamellaire.

Mais, paradoxalement malgré les très beaux résultats de ces auteurs la scoliculture ne donne lieu à aucune recherche jusque vers les années 60. A ce moment un regain d'intérêt se manifeste et une nouvelle série de travaux est publiée [Rauch et Jentoft (7), Webster et Cameron (12), Gurri (4), Lukasenko (5), Pauluzzi et Serra (6), Yamashita et coll. (11)]. Ces auteurs utilisent des milieux beaucoup plus complexes que ceux employés par Dévé et Coutelen, en particulier tous les milieux utilisés en culture de tissus classiques : Hanks, 199, Parker, Eagle, cultures cellulaires, etc... avec adjonction de nombreux facteurs nutritifs complexes et d'antibiotiques, mais leurs résultats diffèrent peu. L'évolution des scolex est plus ou moins rapide selon la composition du milieu de survie, mais les processus en sont analogues.

Certains auteurs considèrent cinq types évolutifs différents (Smyth), d'autres trois ou quatre (auteurs japonais). Nous les résumerons à deux aspects que l'on retrouve d'une manière constante avec quelques variantes non significatives.

a) gonflement et vésiculation totale du scolex isolé ;

b) formation vésiculeuse à une extrémité du scolex qui se gonfle, grossit et donne en fin d'évolution une vésicule entourée d'une membrane lamellaire et contenant quelques corpuscules calcaires.

Nous avons pour notre part, repris ces expérimentations à la lumière des résultats déjà obtenus dans nos essais de culture organo-typique appliquée aux parasites.

Matériel et Méthodes.

Les explants nous ont été fournis par des scolex d'*Echinococcus granulosus* prélevés à partir de kystes hydatiques de cheval.

Après désinfection et ponction presque totale du kyste, le sable hydatique qui contient de nombreux scolex est prélevé ; Au besoin un grattage léger des parois de la membrane prolifère permet de recueillir de très nombreux scolex.

PLANCHE I

FIG. 1. — Début d'une vésiculation totale d'un scolex. Trois jours de survie x 150

FIG. 2. — Autre aspect de la vésiculation totale d'un scolex. Quatre jours de survie x 150

FIG. 3. — Début de la formation d'une vésicule caudale après digestion enzymatique. Deux jours de survie x 300

FIG. 4. — Détail de la figure 3

FIG. 5. — Vésicule caudale plus âgée. Six jours de survie x 300

FIG. 6. — Détail de la figure 5

Ceux-ci sont isolés et lavés en eau physiologique par centrifugations différentielles répétées à très faible vitesse.

Les scolex ainsi recueillis ont entraîné avec eux des fragments de membrane proligère auxquels ils restent fixés. Pour éliminer ceux-ci nous avons utilisé une digestion enzymatique préconisée par Smyth en 1962. Mais pour notre part nous nous sommes contentés d'une simple digestion trypsique (trypsine à 0,02 %, 30' à 37°). Ce traitement nous permet l'obtention de scolex vivants séparés de tout fragment de membrane germinative.

Milieu de culture.

Désirant obtenir une évolution nous avons choisi un milieu de survie d'une teneur en éléments supérieure à celle que l'on peut observer dans le liquide hydatique [Benex 1968 (1)]. Le milieu formé à l'intérieur du kyste pouvant être considéré comme un milieu de quiescence. La rupture du kyste entraînant les scolex dans le milieu interne de l'organisme de l'hôte où il poursuit son évolution, il est légitime d'utiliser pour notre expérimentation un milieu favorable au développement des cellules de Mammifères.

Considérant ces résultats, nous avons donc utilisé le milieu de Parker (199) modifié selon la technique de l'Institut Pasteur auquel sont ajoutés uniquement comme facteurs nutritifs du sérum de poulain si le kyste provient du cheval, ou du liquide amniotique si le liquide est extrait d'un kyste bovin. L'adjonction de facteurs nutritifs supplémentaires (liquide ascite, extrait embryonnaire, extraits d'organes, etc...) ne s'étant pas révélé indispensable.

Résultats expérimentaux.

Dans un tel milieu nous obtenons très vite (trois jours) le début des deux processus évolutifs signalés.

A) EVOLUTION PAR VÉSICULATION TOTALE (Pl. I, fig. 1 et 2).

Un scolex isolé se gonfle, prend un aspect globuleux. Le parenchyme devient lacunaire. L'évolution se poursuit par l'apparition d'une structure réticulaire lâche au sein de laquelle les cellules deviennent astéroïdes. La paroi du scolex s'épaissit et l'évolution finale est une petite sphère à structure très lacunaire délimitée par une paroi plus épaisse, dans laquelle on retrouve des corpuscules calcaires et des débris de crochets.

PLANCHE II

FIG. 7. — Vésiculation caudale d'un scolex, après douze jours de survie x 222

FIG. 8. — Détail de la figure 7 montrant le glissement des cristaux du scolex vers la vésicule

FIG. 9. — Détail du passage d'un cristal de l'intérieur du scolex dans la vésicule

FIG. 10. — Détail du contour d'une vésicule à dix jours de survie

FIG. 11. — Jeune vésicule caudale de trois jours de survie associée à une vésiculation totale d'un scolex x 300

FIG. 12. — Détails de la figure 11. — Noter l'épaississement déjà notable de la paroi et la densité du contour vésiculaire

Ce processus se déroule en totalité en une trentaine de jours. Puis la petite sphère survit encore longtemps (un mois), dégénère et meurt (Pl. IV, fig. 24).

Cette transformation qui a déjà été signalée par Coutelen est considérée par les auteurs modernes comme un processus évolutif conduisant à la néoformation d'une nouvelle hydatide de constitution identique à celle du kyste hydatique primaire [Yamashita (11), Pauluzzi (6), Schwabe (8)].

Pour notre part, il nous paraît bien plutôt être un phénomène de dégénérescence présentant toutes les caractéristiques de la dédifférenciation tissulaire telle qu'elle a été observée et décrite dans la majorité des cultures organotypiques en milieu liquide [Thomas, Tuzet, Benex (10)], dégénérescence des fibres musculaires, apparition de structure lacunaire, organisation en sphère, etc...

Cette dédifférenciation est très bien décrite par Coutelen dès 1927. Celui-ci écrivait : « En même temps que cette vésiculation, la cuticule s'amincit, les ventouses s'estompent, la couronne de crochets agrandit sa circonférence et le contenu du scolex s'éclaircit. Le tissu qui constitue la partie interne du scolex devient un réseau trabéculaire où évolue une masse plasmodiale mince qui vient doubler intérieurement la cuticule. »

Tous ces phénomènes sont parfaitement observables sur la majeure partie des photos publiées et dans notre propre expérimentation.

D'autre part, cette vésiculation n'apparaît dans nos survies que parallèlement à un haut degré de mortalité, et avec très peu d'évolution du deuxième type. Nous l'avons surtout observée lors de variations de pH ou de température, ou lorsque les facteurs nutritifs additionnés étaient particulièrement riches (hypertonie).

Ces constatations sont renforcées par les résultats de Smyth en 1966 (9) qui signale que cette vésiculation (qu'il considère comme un processus évolutif) ne se produit que lorsque les scolex se trouvent dans des conditions d'environnement habituellement anormales (haute tension en O₂, baisse de pH, anaérobiose forte, concentration biliaire élevée), toutes conditions dans lesquelles les larves doivent souffrir.

Yamashita (11) signale lui aussi que le nombre des scolex globuleux augmente avec l'adjonction d'extraits de bile ou de foie, ainsi également que le nombre de scolex dégénérés.

Smyth (9) considère que le processus de vésiculation peut être reconnu comme une fonction protectrice si on considère le cycle du parasite. Sans doute, l'auteur pense aux protozoaires qui s'enkystent lorsqu'ils se trouvent dans des conditions évolutives

PLANCHE III

FIG. 13. — Aspect de la paroi et contenu d'une vésicule au douzième jour de survie du scolex

FIG. 14. — Aspect de la paroi et contenu d'une vésicule au 5^e jour de survie

FIG. 15. — Vésicule apicale d'un scolex au vingtième jour de survie x 150

FIG. 16. — Détail de la figure 15 montrant des formations cellulaires le long de la paroi

FIG. 17. — Vésicule apicale d'un scolex après seize jours de survie

FIG. 18. — Détail de la figure 17. L'intérieur de la vésicule reste clair, mais certaines formations apparaissent le long de la paroi

défavorables. Nous pensons qu'il s'agit bien d'un processus réactionnel de défense, mais plutôt dégénératif qu'évolutif. La formation d'une membrane lamellaire guide l'interprétation des auteurs, mais aucune étude histologique comparative n'a fait apparaître l'identité de structure entre les formations observées par coloration *in toto* et les lamelles de la cuticule d'un kyste. La réaction apparaissant dans les petites vésicules *in vitro*, si elle a bien pour origine les cellules d'une néo-membrane germinative, ne serait peut-être qu'une dernière tentative avortée d'évolution du potentiel germinatif.

B) EVOLUTION PAR VÉSICULATION CAUDALE OU APICALE.

Nous avons obtenu au cours de notre expérimentation des scolex présentant des aspects évolutifs tout à fait comparables à ceux décrits par Yamashita et Pauluzzi. Les figures des planches I, II et III donnent un aperçu de ce développement.

La vésicule apparaît dans la très grande majorité des cas au pôle caudal du scolex, à la racine du pédoncule, au niveau où doit se développer le premier proglottis. Notre traitement par la Trypsine ayant fait disparaître toute trace de membrane prolifère, il est évident que le développement se fait uniquement à partir du contenu du scolex lui-même.

Une petite vésicule se dessine dès le deuxième jour (Pl. II, fig. 11 et 12), et grossit peu à peu. Il semble se former une structure interne et une organisation cellulaire, lacunaire et anarchique cependant. Parallèlement, la paroi se dessine par glissement d'une masse plasmoïdiale qui vient épaissir la mince pellicule du début. Au fur et à mesure de cette évolution le scolex se vide de son contenu, les crochets se détachent et peuvent même tomber à l'intérieur de la vésicule, la dégénérescence s'accroît au même rythme que la croissance vésiculaire. En fin d'évolution il ne reste du scolex aucune structure organisée, il en demeure seulement une sorte d'amas cellulaire encore visible en un point de la surface de la sphère (Pl. IV, fig. 24).

L'intérieur de cette dernière est composé de cellules réparties dans un réseau réticulé. Dans quelques cas, le long de la paroi épaissie, on peut voir des îlots de cellules paraissant avoir la structure de cellules germinatives (Pl. III, fig. 16-18). L'explication de tels phénomènes est donnée par tous les auteurs comme la formation d'une hydatide secondaire, à partir d'un scolex, telle qu'elle se produit *in vivo* à la suite de la rupture d'un kyste fertile.

PLANCHE IV

FIG. 19. — Terme de l'évolution d'un scolex en survie (30 jours) x 87

FIG. 20. — Détails de la figure 19

FIG. 21. — Scolex dévaginé pourvu d'une vésicule apicale x 87

FIG. 22. — Même scolex que celui de la figure 21, montrant les mouvements musculaires x 87

FIG. 23. — Détails de la figure 22. Noter l'abondance du contenu de la vésicule, surtout au niveau de l'attache du scolex

FIG. 24. — Dégénérescence d'une vésicule au 31^e jour de survie. On aperçoit en bas la trace du scolex x 87

Discussion.

Nous discuterons quelques aspects du développement de cette vésicule qui nous amèneront à poser certains problèmes d'ordre évolutif.

Les figures 3 et 4 de la planche I montrent à différents grossissements le début de la formation d'une vésicule polaire à partir d'un scolex isolé (trois jours de survie). On voit nettement l'origine de la vésicule à l'intérieur du scolex. Les figures 5 et 6 montrent le même phénomène à un stade plus avancé (8 jours de survie). Les faisceaux de fibres (musculaires ?) partent de l'intérieur du scolex et vont former l'infrastructure de la vésicule fille.

Il semble y avoir ensuite un glissement de tout le contenu du scolex à l'intérieur de la vésicule fille. Les enclaves lipidiques, les cristaux de cholestérol et même les crochets coulent littéralement du scolex vers la vésicule fille (Pl. II, fig. 7, 8, 9 et 10).

Il n'est pas rare, de ce fait, de voir des vésicules jeunes plus riches en constituants internes que des vésicules plus âgées et plus grosses. La formation de la membrane cuticulaire externe apparaît aussi très tôt et peut être très épaisse à quelques jours de l'évolution. Les figures 11, 12, 15, 16 de la planche III illustrent ce phénomène. La figure 11 montre un scolex un peu gonflé qui produit une vésicule polaire. Celle-ci contient déjà un matériel cellulaire important et est délimitée par une paroi épaisse.

La figure 15 montre une vésicule beaucoup plus grosse, donc plus âgée. La paroi est encore mince et son contenu très lacunaire (fig. 16). L'observation quotidienne d'un même scolex isolé en survie nous a révélé que les cristaux trouvés à l'intérieur de la vésicule ne grossissaient pas au cours du temps mais se trouvaient dès le premier jour de survie identique en taille à ceux trouvés à l'intérieur du scolex. Le nombre en augmentait du reste dans la vésicule tandis qu'il diminuait dans le scolex. Les figures 13 et 16, fort grossissement de la paroi et de l'intérieur des vésicules âgées de dix jours, montrent de très grosses inclusions à l'intérieur d'une paroi encore très mince (fig. 13) ou peu épaisse et en tout cas non lamellaire (fig. 16). Ces considérations nous ont amenés à penser que le deuxième processus décrit comme évolutif n'était peut-être lui aussi qu'un phénomène dégénératif et de dédifférenciation du scolex.

La voie normale d'évolution d'un scolex d'*Echinococcus granulosus* est de donner naissance à un ténia adulte par formation de proglottis. Cette évolution a du reste été réalisée *in vitro* par Smyth (9) dans une très belle expérimentation. Il nous paraît que la formation de vésicules apicales est le résultat d'un essai infructueux du scolex en vue de former un proglottis. Nous adopterons les conclusions de Smyth qui démontre que les conditions nécessaires au développement du scolex en ténia adulte ne sont pas réalisées dans les cultures en milieu liquide.

Mais tandis que cet auteur considère la vésiculation comme un processus évolutif vers l'hydatide secondaire — voie de rechange en quelque sorte pour l'évolution du scolex —, pour notre part nous considérerons que le scolex tente alors de former un proglottis mais que les conditions nécessaires n'étant pas remplies, ce premier anneau dégénère en prenant cet aspect vésiculeux.

Les figures 19, 20, 24 de la planche IV illustrent le terme final de l'évolution des

scolex. Elles montrent tous les signes de la dédifférenciation d'explants maintenus en culture organotypique en milieu liquide.

Il reste néanmoins que dans certains cas la vésicule fille demeure relativement claire et que des formations semblent naître à partir de la membrane interne du petit kyste (Pl. III, fig. 15, 16, 17, 18). Des expérimentations complémentaires devront aider à éclaircir le problème de savoir si les formations observées sont réellement un produit d'une couche de cellules germinatives tapissant le petit kyste ou bien le résultat du glissement d'une couche plasmodiale.

D'après les travaux récents, la seule certitude est que c'est un matériel PAS positif issu de l'intérieur du scolex qui se condense pour former la paroi de la vésicule. Mais ce matériel est-il germinatif ? La preuve pourra en être donnée si l'on obtient une infestation expérimentale positive chez des animaux contaminés par l'injection ou l'ingestion de vésicules ayant été maintenues en survie jusqu'à ce stade. Cette expérimentation est actuellement en cours.

Un dernier point reste à signaler. Contrairement à ce qu'a écrit Smyth (9), nous avons pu observer la formation d'une vésicule caudale chez un scolex dévaginé et actif (Pl. IV, fig. 21, 22), vésicule dans laquelle on observe nettement le passage des inclusions du scolex (Pl. IV, fig. 23). L'évolution de tels scolex dévaginés est tout à fait comparable à celle observée chez des scolex restant invaginés, et confirme notre hypothèse de tentative de formation de proglottis. La dévagination elle-même étant sous l'influence d'excitations externes variées [Smyth (9), Bénex (1)].

Conclusions.

In vivo, la rupture d'un kyste qui conduit à l'échinococcose secondaire projette à l'extérieur du kyste des scolex qui n'ont été soumis à aucune digestion enzymatique. Dans ce cas, des fragments de membrane proligère peuvent rester associés aux scolex et redonner de nouveaux kystes.

Dans le cas du cycle normal où il y a obligatoirement digestion enzymatique, le scolex forme des proglottis et donne naissance à un taenia. *In vitro*, s'il se produit cette digestion enzymatique qui détruit toute la membrane germinative, le scolex tente de former un proglottis, mais échoue et se vésiculise.

D'après les résultats obtenus jusqu'à ce jour en culture *in vitro*, il semble que l'on puisse considérer deux aspects de l'évolution des scolex d'*Echinococcus granulosus* : a) la formation de vrais kystes secondaires nécessitant la présence de fragments de membrane proligère ; b) les scolex nus ne pouvant prétendre qu'à la production de taenia adulte ou à des formes abortives. Un prochain travail sur le devenir évolutif des membranes d'un kyste hydatique doit préciser ce point de vue.

Bibliographie

1. BÉNEX (J.), 1968. — Influence des facteurs externes sur la vitalité des *scolex d'Echinococcus granulosus* maintenus en survie. Comparaison avec les conditions naturelles de vie. *Bull. Soc. Path. exot.*, 61, 66.
 2. COUTELEN (F.), 1927. — Sur l'évolution vésiculaire *in vitro* des scolex échinococciques. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 5, 239.
 3. DEVÉ (F.), 1901. — Sur la transformation des scolex en kystes échinococciques. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 53, 298. 1902, Sur l'évolution cystique du scolex échinococcique. *Arch. Paras.*, 6, 54.
 4. GURRI (J.), 1963. — Vitalidad y evaluacionidad de los escolices hidaticos *in vitro* y *in vivo*. *Ann. Fac. Med. Montev.*, 48, 372.
 5. LUKASHENKO (N.P.), 1964. — Studio dello sviluppo di *Alveococcus multilocularis* (Leuckart, 1863) *in vitro* (in russo). *Med. Parazit. I. Parazit. Bol.*, 33, 271.
 6. PAULUZZI (S.) et SERRA (P.), 1966. — Giornale di Malattie Infettive e Parassitarie. *Estratto del*, n° 2.
 7. RAUCHT (R. L.) et JENTOFF (V. L.), 1957. — Studies on the helminth fauna of Alaska. XXXI. Observations on the propagation of the larval *Echinococcus multilocularis*. Leuckart, 1863, *in vitro*. *J. Parasitol.*, 1, 43.
 8. SCHWABE (C. W.), HADIDIAN (L.) et KOUSSA (M.), 1963. — Host-parasite relationships on échinococcosis. IX. *In vitro* survival of hydatid scolices and the effects of drugs upon scolex respiration. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 12, 338.
 9. SMYTH (J. D.), 1967. — Studies on tapeworm physiology. XI. *In vitro* cultivation of *Echinococcus granulosus* from the protoscolex to the strobilate stage, *Parasit.*, 57, 111-133.
 10. THOMAS (J. A.), 1963. — Exposés annuels de Biologie cellulaire. *Survie et conservation biologique*, Masson, Edit.
 11. YAMASHITA (J.), OMBAYASHI (M.) et KITAMURA (Y.), 1958. — Studies on Echinococcosis. IX. Differences in development of the tapeworm stage between *E. granulosus* (Batch 1786) and *E. multilocularis* (Leuckart 1863). *Jap. J. Vet. Res.*, 6, 226-229.
 12. WEBSTER (G. A.) et CAMERON (T. W. M.), 1963. — Some preliminary observations on the development of *Echinococcus in vitro*. *Canad. J. Zool.*, 41, 185.
-