Evolution *in vitro* d'explants de membrane prolifère d'*Echinococcus granulosus*

Etude de la formation de vésicules secondaires

par J. BENEX

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

Résumé

La culture organotypique d'explants de membrane prolifère d'*E. granulosus* débarrassée de scolex a démontré que la formation d'hydatides secondaires était uniquement sous la dépendance des cellules germinatives de la membrane.

Les formations ainsi obtenues *in vitro* présentent une plus grande analogie de structure avec les formations rencontrées *in vivo*, que celles obtenues à partir de scolex seuls.

Cependant, les deux types évolutifs dérivant d'explants de membrane correspondaient à des formes dégénératives chez l'homme.

Summary

In vitro cultures of explanted pieces of germinal membrane established that formation of exogenous secondary cysts only depends on cells from the germinal membrane itself, without scolex being conserved in.

The cyst forms obtained *in vitro* look like secondary cysts observed *in vivo*, more than vesicular forms obtained from a single scolex do. Therefore, the two aspects reached *in vitro* from germinal membrane are alike degenerated cysts observed in man.

Dans un précédent travail (1), nous avons étudié l'évolution *in vitro* des scolex d'*E. granulosus* totalement débarrassés de la membrane proligère.

Poursuivant notre étude sur les rôles respectifs des scolex et de la membrane proligère dans la formation des vésicules filles exogènes, nous avons étudié, en contrepartie, dans ce travail, l'évolution *in vitro* de fragments de membranes dépourvus de tout scolex.

Matériel et Méthode.

Les explants maintenus en culture organotypique en milieu liquide, nous furent fournis par des fragments de membrane proligère prélevés stérilement sur des kystes fertiles provenant de foies ou de poumons de cheval.

Les kystes sont ponctionnés dès l'abattage des animaux, puis ouverts et des lambeaux de membrane proligère prélevés stérilement. Ces lambeaux sont ensuite lavés soigneusement en solution saline stérile et débarrassés de tout scolex par un très léger brossage. L'absence de scolex est vérifiée sous une loupe binoculaire ; de nouveaux lavages permettent d'éliminer la totalité des scolex formés. Par contre, il nous a été pratiquement impossible de séparer la membrane proligère de la membrane cuticulaire à laquelle elle est demeurée accolée. Les lambeaux sont alors découpés en très petits fragments (fig. 5, pl. I) et mis en survie dans le milieu nutritif déjà utilisé pour la culture de scolex (199 + sérum de poulain ou liquide amniotique + antibiotiques) (1).

Les fragments de membrane proligère ont été, de préférence, prélevés sur des kystes multiloculaires, tels que les montrent les fig. 1, 2, et 3 de la planche I. Le foie de l'animal infesté était bosselé par un nombre considérable de kystes plus ou moins volumineux (fig. 1) tous fertiles et contenant des liquides de composition voisine (0,4 mg de protéines et 6,5 mg de carbohydrates par ml). Certains de ces kystes présentaient un canal de communication bien visible, mais d'autres étaient parfaitement isolés et séparés par une épaisse portion de tissu hépatique (fig. 4, pl. I).

La survie se poursuit à 37° ; le changement de milieu a lieu tous les deux ou trois jours selon les variations du pH. A chaque changement de milieu, des fragments sont prélevés, examinés au microscope, fixés, coupés et colorés.

Résultats Expérimentaux

A) Etude morphologique de l'évolution des explants.

De très nombreux fragments n'évoluent pas ou très peu au cours de la survie. Une autre partie subit un début de processus évolutif. On voit apparaître quelques ébauches de scolex sur les fragments, mais ils se détachent très vite de leur support, tombent au fond du récipient de culture où ils se vésiculisent et meurent rapidement. Les fragments de membrane restants subissent alors un processus de dédifférenciation tissulaire ; ils s'enroulent sur eux-mêmes, s'organisant en petites masses qui survivent une quinzaine de jours puis la dédifférenciation s'accroît, les structures dégèrent et l'explant meurt. Dans certains cas, cependant, il se produit un phénomène évolutif.

PLANCHE I

FIG. 1. — Vue externe de kystes hydatiques multiloculaires sur un foie de cheval

FIG. 2. — Vue interne des kystes de la figure 1

FIG. 3. — Vues topographiques d'un foie creusé de nombreux kystes hydatiques

FIG. 4. — Aspects des communications entre plusieurs kystes

FIG. 5. — Exemple de fragments de membrane prolifère explantés

FIG. 6. — Début de formation d'un kyste secondaire à partir d'un explant de membrane

1^{re} Type évolutif.

A partir du fragment initial (fig. 5, pl. I), on voit se détacher de petites masses de cellules germinatives qui évoluent en trois semaines en petits kystes miniatures (fig. 6, pl. I). Ceux-ci grossissent au cours des jours et s'entourent d'une paroi à structure lamellaire épaisse dont les fig. 7, 9 et 10 de la planche II montrent l'aspect.

Ces petits kystes se remplissent de grains de pigments et de très petits cristaux (fig. 9, pl. II), mais l'organisation cellulaire intérieure demeure très frustre. De telles formations survivent un mois puis dégénèrent et meurent.

Dans ce type évolutif, à aucun moment on ne voit apparaître l'étape « scolex ».

Si nous comparons ce processus d'évolution avec celui d'un scolex *in vitro*, ce processus réactionnel de l'explant ne semble pas être de même nature.

Les images obtenues à l'optimum de l'évolution sont morphologiquement très différentes. La fig. 8, pl. II, rappelle les formations obtenues lors de la mise en survie du scolex débarrassé de tous fragments de membrane prolifère. Mais la constitution de la paroi et le contenu des kystes et de la vésicule ne présentent pas des aspects superposables. La structure lamellaire de la paroi du kyste apparaît nettement (fig. 10, pl. II) tandis que dans la vésicule issue du scolex (fig. 8, pl. II), elle demeure douteuse.

Les deux formations kystiques obtenues *in vitro* à partir de la membrane (fig. 7) font bien plutôt penser aux kystes pédonculaires libres décrits déjà par Dévé dans sa thèse en 1901 et signalés par quelques chirurgiens (cf. Pérez-Fontana) comme signes de complication d'une hydatidose. Ces kystes chez l'homme sont généralement considérés de peu d'intérêt clinique, car ils sont une forme dégénérative et régressent d'eux-mêmes par calcification ou fibrination.

2^e Type évolutif.

Outre la naissance de ces nouveaux petits kystes à paroi épaisse et lamellaire, à partir d'un explant de membrane prolifère, nous avons pu obtenir un autre type d'évolution. C'est la formation de « chitinome ou cuticulome » tels que les a appelés Dévé (4).

Ces formes sont habituellement attribuées à une malformation de la vésicule hydatique. Elles ne sont pas, en général, décrites dans les traités classiques. Dubreuilh en donne une première description en 1887 (5), puis Cabanié et Lamy (2) rapportent en 1960 l'ablation chirurgicale et l'étude parasitologique d'une tumeur hydatique de cette nature chez un homme de trente-cinq ans.

Cette évolution est signalée par les auteurs comme une malformation caractérisée par le développement de la membrane germinative en « grosses végétations mamelonées, de bourgeons en chou-fleur serrés les uns contre les autres ». La fig. 11, pl. II, montre l'aspect de la masse hydatique issue de la membrane germinative de l'opéré de Cabanié et Lamy. Comparativement, la fig. 12, pl. II, montre la formation obtenue en culture organotypique d'explants de membrane prolifère ; l'aspect morphologique en est tout à fait comparable.

Ici, également, on n'a pas décelé un passage par la forme scolex lors de la culture *in vitro*. Le nouveau kyste se forme directement à partir de la membrane prolifère.

PLANCHE II

FIG. 7. — Deux petits kystes pédicellaires obtenus en culture *in vitro*, à partir d'un explant de membrane prolifère

FIG. 8. — Vésicule apicale formée à partir d'un scolex en survie *in vitro*

FIG. 9. — Détails du pédicelle et du contenu d'un kyste secondaire de la figure 7

FIG. 10. — Détail de la paroi d'un kyste secondaire obtenu *in vitro*

FIG. 11. — Fragment d'un cuticulome observé par Cabanié et Lamy chez l'homme

FIG. 12. — Aspect d'une formation obtenue *in vitro* à partir d'un explant de membrane prolifère

PLANCHE III

FIG. 13. — Vue d'ensemble des éléments constituant la membrane prolifère

FIG. 14. — Substance fondamentale

FIG. 15. — Cellules constituant la couche active

FIG. 16. — Mêmes cellules qu'en 15, à un stade évolutif plus avancé (inclusions graisseuses)

FIG. 17. — Formation de la membrane cuticulaire (structure lamellaire)

FIG. 18. — Formation d'une vésicule fille exogène

PLANCHE IV

FIG. 19. — Début de formation d'une vésicule fille exogène

FIG. 20. — Stade plus avancé de la formation d'une vésicule fille exogène

FIG. 21. — Mode d'isolement de la vésicule fille exogène

FIG. 22. — Vue topographique d'un kyste ayant donné naissance à deux formations exogènes

FIG. 23. — Début de formation d'une vésicule fille exogène *in vitro*

FIG. 24. — Scolex ayant pris naissance dans une vésicule exogène

B) Etude histologique des explants.

Une étude histologique a été menée parallèlement à l'étude morphologique des explants. Mais, seule l'étude histologique du premier type évolutif a pu être menée à bien. L'inclusion et la coupe du cuticulome n'ont pu être réalisées, l'évolution de celui-ci, *in vitro*, ayant été poursuivie trop tardivement et les tissus ayant de ce fait dégénéré.

La fixation était faite au Bouin, la coloration à l'hémalum-éosine. Les images obtenues ont été comparées à celles fournies par des coupes de parois de kystes hydatiques prélevées *in vivo*. Les figures de la planche III font apparaître les diverses structures de la membrane prolifère (3). La fig. 13 montre la succession de couches cellulaires constituant cette membrane : *a*) une substance fondamentale finement granuleuse, peu chromophile (fig. 14) ; *b*) de nombreuses cellules nucléées d'abord jeunes et indifférenciées qui, en vieillissant, se différencient et dont certaines se chargent de glycogène et de graisse (fig. 15 et 16) ; *c*) un réseau de fibrilles d'autant plus abondant que l'hydatide est plus âgée ; *d*) l'apparition de la membrane cuticulaire à structure lamellaire tirant son origine de sécrétions de la membrane prolifère (fig. 17).

Les modes de formation des vésicules filles exogènes apparaissent également bien dans nos coupes histologiques. Des îlots de membrane prolifère peuvent se trouver isolés entre les lames de la membrane cuticulaire et donner lieu à la formation de vésicules filles qui, à la longue, vont se trouver isolées à l'extérieur du kyste primitif. Ce sont les vésicules filles exogènes classiques (fig. 18, pl. IV).

Parallèlement, un autre mode de formation de vésicules exogènes a pu être mis en évidence. Le kyste initial développe des appendices qui s'étirent en doigts de gant. La paroi du kyste se referme alors à la naissance du doigt et une ou plusieurs petites vésicules se trouvent accolées à la vésicule mère. La formation de travées de cuticules à partir des cellules des membranes prolifères des différents kystes arrive, à la longue, à séparer ceux-ci et on voit apparaître de nouvelles vésicules filles exogènes. Les figures de la planche IV illustrent ce phénomène. La fig. 19 montre le début de la formation d'une vésicule fille par bourgeonnement de la vésicule mère. La fig. 20 précise l'évolution de ce phénomène. A la fin de ce processus, les parois de la membrane germinative se rejoignent et isolent un nouveau petit kyste (fig. 21). La fig. 22 offre une vue topographique de kystes secondaires ainsi formés et la fig. 23 montre le développement d'un tel processus sur un kyste *in vitro*.

Dans aucun cas, nous n'avons pu observer le passage de scolex à travers les membranes cuticulaires pour aller donner naissance à d'autres vésicules filles. Par contre, la membrane germinative des vésicules isolées par bourgeonnement donnent presque toujours naissance à de nombreux scolex qui tombent dans la cavité kystique (fig. 24).

Discussion.

Les processus évolutifs *in vitro* d'explants de membrane germinative d'*E. granulosus* semblent être relativement différents de ceux observés au cours de la survie de scolex nus. L'aspect morphologique des formations obtenues au cours de la culture

des membranes, tout autant que leur aspect histologique, paraît beaucoup plus proche de ceux rencontrés *in vivo* chez l'hôte intermédiaire. Mais les deux types rencontrés, kyste pédicellaire et chitinome, sont deux processus qui, chez l'homme, sont considérés comme des aboutissements anormaux de kystes hydatiques. Le deuxième processus évolutif, le type chou-fleur, et d'autre part à rapprocher de l'évolution d'*E. multilocularis*. La croissance est désordonnée et exubérante avec formation de petites boursofflures non franchement délimitées.

Cette évolution paraît répondre également à la description du cycle dénommé « collatéral » par Pérez-Fontana (6) ; mais il est vrai que cet auteur est un des tenants de l'unicité des espèces d'Echinocoque.

D'autre part, les résultats obtenus au cours de cette expérimentation semblent au premier abord en contradiction avec ceux rapportés par Sweatman et coll. en 1963 (7), qui, eux, n'ont pas obtenu d'Echinococcose secondaire par l'innoculation de fragments de membrane prolifère dépourvus de scolex à des animaux de laboratoire. Mais ces auteurs opèrent dans des conditions totalement différentes de celles réalisées pour ce travail.

1° Leur expérimentation est conduite *in vivo* chez l'animal par inoculation et les réactions de l'hôte doivent jouer là un rôle restrictif qui n'a pas lieu *in vitro*.

2° Les scolex injectés — au dire même des auteurs — ne sont pas débarrassés totalement de la membrane germinative ; des fragments de celle-ci demeurent attachés à l'apex du scolex et participent à l'évolution de celui-ci.

3° De nombreux fragments de membrane prolifère dépourvus de scolex étaient prélevés par ces auteurs sur des kystes non fertiles. Il n'est donc pas étonnant que de tels lambeaux explantés *in vivo* n'aient donné naissance qu'à des granulomes.

4° Enfin, tous les scolex injectés ne produisent pas de kystes et tous les kystes secondaires formés sont stériles.

Nous serons cependant de l'avis de Sweatman et coll. lorsque ces auteurs écrivent : « Dans le kyste primitif, c'est la membrane germinative indifférenciée riche en éléments nucléés qui produit les capsules filles et les scolex. Cela semble incongru qu'un scolex pleinement différencié soit capable de se réorganiser en kyste secondaire tandis que les fragments de la membrane prolifère ne le font pas. » Ces auteurs néo-zélandais émettent comme hypothèse explicative que la nutrition de la membrane germinative nécessite la présence continue de liquide hydatique pour évoluer. Tout en admettant avec eux ce postulat, nous pensons pour notre part que le scolex « nu » est incapable de redonner un kyste secondaire ; pour cela, il est nécessaire qu'il emporte avec lui un fragment de membrane prolifère.

D'après les résultats de nos expérimentations *in vitro*, c'est la membrane qui fait le scolex et non pas le scolex qui fait la membrane. Le scolex tente d'évoluer vers la forme adulte par formation de proglottis. Si les conditions nécessaires ne sont pas rencontrées, il dégénère en vésiculant et meurt.

Au contraire, un fragment de membrane prolifère — sans scolex — s'il contient un massif de cellules germinatives, peut redonner un kyste secondaire, à condition de lui fournir les éléments nutritifs nécessaires et suffisants.

Conclusion.

Des expérimentations conduites *in vitro* par des cultures organotypiques d'explants de membrane prolifère d'*E. granulosus* ont permis de préciser que la formation de vésicules filles et d'hydatides secondaires exogènes étaient sous l'unique dépendance des cellules germinatives de la membrane prolifère. Cette dernière, débarrassée de tout scolex, est capable *in vitro* de redonner des hydatides secondaires morphologiquement et histologiquement comparables à celles rencontrées *in vivo*.

Toutefois, les formations observées s'apparentent à des formes considérées chez l'homme comme dégénératives.

Il en découle que toutes les conditions nécessaires à une pleine et entière évolution en kyste secondaire ne sont pas encore réalisées dans les techniques de culture *in vitro* bien qu'elles en soient très proches.

Bibliographie

1. BÉNEX (J.), 1968. — Considérations expérimentales nouvelles sur l'évolution *in vitro* en milieu liquide des larves d'*Echinococcus granulosus*. *Ann. Parasito. hum. comp.*, 43.
 2. CABANIÉ (G.) et LAMY (L.), 1960. — Malformation de la vésicule hydatique dans un volumineux kyste du foie. *Bull. Soc. Path. exot.*, 53, 41.
 3. COUTELEN (F.), 1938. — Sur la structure de la membrane prolifère des hydatides échinococciques. *C.R. Soc. Biol.*, 128, 946.
 4. DÈVE, 1916. — La forme multivésiculaire du kyste hydatique, sa condition pathogénique, ses relations pathologiques. *C.R. Soc. Biol.*, 79, 391.
 5. DUBREUILH, 1887. — *Bull. Soc. Anat. et Physiol.*, Bordeaux, 168.
 6. PÉREZ-FONTANA. — *Archivos internacionales de la Hidatidosis*, 1965, vol. XXIII, fasc. I y II.
 7. SWEATMAN (G. K.), ROBINSON (R. G.) et MANKTELOW (B. W.), 1963. — Comparative observations on the scolex and germinal membrane of *E. granulosus* as a source of secondary hydatid cysts. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 12, 199.
-