Le tégument d'*Euzetrema knoeffleri*,
Monogène parasite d'Amphibien :
Ultrastructure et évolution au cours du cycle biologique

par Annie FOURNIER

Département de Biologie animale, Centre Universitaire, F 66025 Perpignan.

Résumé.

Euzetrema knoeffleri est un Monogène endoparasite de la vessie des Amphibiens.

L'étude ultrastructurale du tégument est réalisée lors des trois étapes essentielles du cycle biologique : oncomiracidium, post-larve rénale et adulte vésical.

La signification des structures tégumentaires est discutée au cours de l'évolution de la larve en adulte et comparée à celle d'autres Monogènes.

D'un point de vue écologique, le passage d'un milieu d'eau douce à un milieu urinaire coïncide avec le développement des plis de la membrane cytoplasmique interne. Cette adaptation traduit un transfert de substances à travers le tégument nécessaire au continuuel réajustement osmotique du parasite : on démontre que le tégument intègre des adaptations ultrastructurales au milieu indépendantes de la phylogénie.

Summary.

The tegument of *Euzetrema knoeffleri*, endoparasitic Monogenean of an Amphibian : ultrastructure and evolution during the life cycle.

Euzetrema knoeffleri is an endoparasitic monogenean from the bladder of an Amphibian. Ultrastructural studies of the integument are made during the three stages of the life cycle : oncomiracidium, renal post-larva and adult.

The meaning of the structures is discussed during the larval evolution to the adult and is compared with that of other monogeneans.

The transition from fresh water to an urinary environment is in relation with the folding of the internal cytoplasmic membrane. This adaptation is specialized in water and ion tranport through the integument, necessary for the osmotic reajustement of the parasite : It has been noted that the tegument integrates ultrastructural adaptations to the biotope, independant of the phylogeny.

I. - Introduction

La même structure syncytiale du tégument se retrouve chez la plupart des Plathelminthes, à l'état adulte comme à l'état larvaire. Depuis une dizaine d'années, les études ultrastructurales et biochimiques ont permis de préciser le rôle que joue cette interface hôte-parasite dans le passage de substances soit vers l'hôte, soit vers le parasite. Ainsi la signification fonctionnelle du tégument est variable selon les groupes et même selon les espèces à l'intérieur d'un même groupe.

Nous avons étudié le tégument du Monogène *Euzetrema knoeppfleri* qui présente la particularité d'être le seul *Monopisthocotylea* endoparasite de l'appareil urinaire d'un Amphibien : aussitôt après l'infestation, les larves gagnent le rein de l'hôte, y séjournent environ 2 mois et achèvent leur maturité dans la vessie (Combes, Jourdane & Knoepffler, 1974). L'hôte de *E. knoeppfleri* est *Euproctus montanus*, Amphibien Urodèle, endémique de Corse.

L'étude du tégument d'*E. knoeppfleri* a été faite au cours des 3 phases essentielles de son cycle : larve libre nageante (ou oncomiracidium), post-larve rénale, adulte vésical.

II. - Techniques

La larve libre est fixée 30 mn dans du Glutaraldéhyde à 2 % dans le tampon Phosphate 0,1 M pH 7,2. Après un rinçage rapide (30 mn) dans le tampon Phosphate, elle est post-fixée par du Tétroxyde d'Osmium à 1 % dans le tampon Phosphate 0,1 M.

Les post-larves sont prélevées à des stades différents (24 h ; 48 h ; 10 jours ; 48 jours ; 60 jours d'infestation) : le fragment de lobule rénal contenant la larve est fixé 2 heures dans du Glutaraldéhyde à 2 % tamponné à pH 7,4 par du Cacodylate 0,1 M. Après un rinçage dans le tampon Cacodylate additionné de Saccharose, il est post-fixé par le Tétroxyde d'Osmium à 1 %, tamponné à pH 7,4, par du Cacodylate 0,1 M auquel on ajoute du Saccharose..

Les adultes font l'objet d'un traitement voisin du précédent, les temps de fixation étant légèrement allongés.

Après déshydratation par une série d'alcools et par l'oxyde de Propylène, les objets sont inclus dans de l'Epon. Les coupes récupérées sur grille 300 μ sont contrastées par l'acétate d'Uranyle et le Citrate de Plomb, selon les techniques habituelles.

III. - Observations

A. — Tégument de l'oncomiracidium.

Le tégument de l'oncomiracidium de *E. knoepffleri* comporte des cellules ciliées et un syncytium tégumentaire (Pl. I, fig. 1).

1) Les cellules ciliées sont au nombre de 62, disposées selon 7 zones bien définies.

Elles sont toutes semblables. Chacune, haute de 2 μ , recouvre une surface tégumentaire d'environ 10 μ . Le noyau est central et lenticulaire. Très dense, il mesure 2,5 à 3 μ de diamètre.

La base de la cellule est occupée par des mitochondries subsphériques empilées sur plusieurs couches. Chaque mitochondrie volumineuse (0,5 μ de diamètre) a de nombreuses crêtes.

La région superficielle comprend la zone des racines ciliaires, puis celle des centrioles donnant naissance aux cils relativement longs (5 à 10 μ) ; la base de chacun de ceux-ci est située au centre d'une dépression. De très nombreux corps réniformes, opaques aux électrons, tapissent la zone superficielle de ce tégument (Pl. I, fig. 2).

Latéralement, la cellule ciliée est reliée au syncytium tégumentaire, par des desmosomes très nets ; en profondeur, il existe des jonctions de type desmosomial avec les fibres musculaires.

2) Entre les cellules ciliées et sous elles, se situe le tégument proprement dit, peu développé à ce stade. Comme chez tous les Plathelminthes, il comprend deux niveaux : le syncytium superficiel et les corps cellulaires profonds.

a) Le syncytium est plus épais (1 à 2 μ) au niveau des zones antérieure et haptoriale que dans la zone médiane du corps ; au-dessous des cellules ciliées, il devient extrêmement mince. Il est caractérisé par (Pl. I, fig. 3) :

- de nombreuses mitochondries à longues crêtes, de 0,5 μ de diamètre,
- des ribosomes libres situés contre la membrane cytoplasmique interne,
- des inclusions très denses en forme de bâtonnets (0,5 μ), sphériques (0,2 μ) ou beaucoup plus fines (0,05 sur 0,2 μ), toutes entourées d'une membrane.

La membrane cytoplasmique externe forme quelques ondulations et émet fréquemment des prolongements.

La membrane cytoplasmique interne repose sur une très fine membrane basale ; au-dessous sont situées les couches musculaires caractéristiques.

Il semble que le phénomène de pinocytose existe au niveau du tégument, de très fines vésicules entourées d'une membrane étant souvent observées dans le cytoplasme (Pl. I, fig. 4).

b) Le corps cellulaire sous-jacent est très volumineux (10 à 20 μ) si l'on tient compte de la faible importance du syncytium tégumentaire superficiel. Il contient 1, 2 ou même 3 noyaux (4-5 μ de diamètre). La chromatine nucléaire régulièrement dispersée sur toute la surface du noyau est cependant légèrement plus abondante en périphérie.

Le cytoplasme clair contient peu d'éléments :

- quelques mitochondries de 0,5 à 0,8 μ de diamètre à contenu dense,
- des empilements de saccules golgiens,
- de nombreux ribosomes rarement associés à des membranes ergastoplasmiques,
- des tubules.

Cet aspect « vide » de la cellule avec de nombreux ribosomes libres la rapproche d'une cellule peu différenciée. Au niveau du col cellulaire très étroit (0,1 μ) la densité des éléments cytoplasmiques augmente (fig. 3). Ils y sont tout à fait semblables à ceux du cytoplasme syncytial.

B. — Tégument de la post-larve rénale.

Les cellules ciliées ont disparu. Le syncytium tégumentaire a conservé une épaisseur semblable à celui de l'oncomiracidium (*Pl. II, fig. 5*).

Les organites cytoplasmiques sont rares, mises à part des mitochondries petites et denses.

Les inclusions entourées d'une membrane sont variées : longues et fluxueuses, opaques aux électrons, ou bien moins grandes, à contenu d'aspect poudreux. Ces dernières peuvent devenir volumineuses et s'ouvrir à l'extérieur, prenant alors la forme d'un calice.

Les espaces vacuolaires sont très abondants.

La membrane cytoplasmique externe émet des villosités nombreuses et courtes ; quelques rares vésicules de micropinocytose ont pu être observées. Des zones de rapprochement existent entre la larve et le rein de l'Euprocte (*Pl. II, fig. 6*) : le contact semble se faire au niveau des inclusions caliciformes. La membrane plasmique interne est nette : elle repose sur une basale plus épaisse que chez l'oncomiracidium ; des

PLANCHE I. — Micrographies de l'oncomiracidium de *E. knoepffleri*. FIG. 1. — Section du tégument passant par une cellule ciliée, chez laquelle on peut observer le noyau, l'empilement de mitochondries et la couche superficielle de cils. Des jonctions de type desmosomial (j.d) existent avec le syncytium tégumentaire latéralement et les couches musculaires sous-jacentes. FIG. 2. — Coupe tangentielle de la cellule ciliée au niveau de la zone des racines ciliaires. FIG. 3. — Col cellulaire reliant le syncytium tégumentaire superficiel au corps tégumentaire profond à travers les couches musculaires. FIG. 4. — Invagination de micropinocytose (i) au niveau du syncytium tégumentaire superficiel.

invaginations s'en détachent, formant des tubules allongés dans le cytoplasme basal de ce syncytium.

Le corps cellulaire tégumentaire est peu profond. Le ou les noyaux ont une chromatine répartie en paquets importants au centre et à la périphérie. Le cytoplasme

PLANCHE II. — Micrographies de la post-larve rénale de *E. knoeffleri*. FIG. 5. — Syncytium tégumentaire de la post-larve : on peut noter sa faible épaisseur, la présence d'inclusions rares et de vacuoles nombreuses. La membrane cytoplasmique interne émet quelques digitations. FIG. 6. — Zone dans laquelle le syncytium tégumentaire de la post-larve est très proche de l'épithélium rénal. L'inclusion qui s'ouvre à l'extérieur est de type 2 (voir Pl. III).

périnucléaire contient des mitochondries, des ribosomes libres, quelques corps de Golgi et de très nombreux corpuscules denses, semblables aux inclusions du syncytium. Les cols cellulaires ont été rarement observés.

Nous avons noté que les couches musculaires sont moins développées que chez la larve libre.

C. — Tégument de l'adulte vésical.

Le tégument de *E. knoepffleri* adulte est épais (2 à 3 μ) (Pl. III, fig. 7).

Les mitochondries, abondantes, sont situées à la base du syncytium tégumentaire.

La densité des inclusions de la zone superficielle tégumentaire est grande ; on y trouve :

- de nombreuses inclusions réniformes (0,15 μ de diamètre),
- des inclusions sphériques (0,3 μ) à aspect poudreux, également très nombreuses,
- des corps multivésiculaires (autolysosomes) contenant des empilements de membranes ou de corps résiduels et des petites vésicules,
- des corps contenant des feuillettes membranaires.

La membrane plasmique externe émet de nombreuses digitations fines ou microvillosités. Elle est recouverte par un cell-coat filamenteux important.

De la membrane plasmique interne, plissée, partent des digitations tubulaires, profondes. Une membrane basale sépare le syncytium d'une couche fibreuse de 0,7 μ d'épaisseur.

Les couches musculaires sont moins régulières que chez les stades larvaires. La couche de fibres musculaires circulaires est notamment très fine.

Le corps cellulaire, très important, est situé profondément dans le parenchyme (Pl. III, fig. 8) : un seul noyau volumineux de 6 μ de diamètre occupe une position centrale. La chromatine est ramassée en un gros nucléole : le cytoplasme périnucléaire est riche en mitochondries, en ribosomes libres et en empilements de saccules golgiens (Pl. III, fig. 9). Dans la zone cytoplasmique plus distale, on retrouve les corps multivésiculaires et les inclusions syncytiales typiques. Les cols cellulaires sont étroits.

IV. - Signification de l'évolution des ultrastructures

1. — Les cellules ciliées.

Elles n'existent que chez l'oncomiracidium dont elles constituent l'essentiel du revêtement. Ne reposant pas sur une membrane basale, elles sont dépourvues de toute activité sécrétrice ou absorbante, donc de toute possibilité de transit. Les racines ciliaires très longues, striées, sont un témoignage de leur activité motrice énorme ; en effet, durant 24 h, le mouvement des cils est incessant : la larve, dont le comportement photonégatif semble être prédominant, est à la recherche de son hôte.

2. — Le syncytium et les corps cellulaires.

CHEZ LA LARVE NAGEANTE :

Le syncytium tégumentaire, discret entre et sous les cellules ciliées, est très pauvre en inclusions. Bien qu'on y observe quelques vésicules de micropinocytose, il n'est le siège d'aucune absorption importante. Les corps cellulaires, d'un volume qui semble démesuré par rapport à la fine pellicule syncytiale, sont également peu différenciés.

CHEZ LA POST-LARVE :

Syncytium et corps cellulaire ont une structure donc une fonction qui paraissent nettement plus proches de celles de l'adulte que de celles de la larve.

CHEZ L'ADULTE :

Se manifestent deux modifications essentielles :

— l'une consiste en la transformation des corps cellulaires en cellules sécrétrices ; d'elles découlent les modifications du syncytium : en effet, la production de tous les éléments superficiels s'effectue dans les zones cytoplasmiques profondes. Les inclusions très denses peuvent être comparées à celles que l'on rencontre dans le tégument d'autres Helminthes et qui sont d'origine golgienne (Bogitsch, 1968, 1972). Sécrétées dans les cellules tégumentaires, elles seraient responsables de la formation du cell-coat (celui-ci n'est pas apparent chez l'oncomiracidium où la densité des inclusions est réduite) ;

— l'autre se situe au niveau de la membrane cytoplasmique interne qui acquiert des invaginations (déjà présentes au stade rénal). Ces dernières auxquelles seraient associées les mitochondries sont une preuve du rôle important de cette zone dans les transports d'eau et d'ions.

En dehors de ces aspects dominants de l'évolution du tégument, on note la présence d'autolysosomes et d'inclusions de type lamellaire ; les autolysosomes témoignent d'une activité d'épuration et sont en liaison avec la présence de bactéries (Four-

PLANCHE III. — Micrographies de l'adulte de *E. knoeppfleri*. FIG. 7. — Syncytium tégumentaire superficiel de l'adulte ; on peut remarquer le plissement de la membrane cytoplasmique interne, la densité des inclusions de deux types : 1) très denses ; 2) d'aspect poudreux, les mitochondries. La section passe au niveau d'un énorme corps multilamellaire et de nombreux autolysosomes. On peut noter l'importance de la zone fibreuse sous le syncytium tégumentaire. FIG. 8. — Syncytium tégumentaire superficiel et corps cellulaire profond chez *E. knoeppfleri* adulte. La couche musculaire est réduite, notamment les fibres musculaires longitudinales. Sur cette micrographie, le cytoplasme du corps cellulaire profond est très riche en bactéries et autolysosomes. FIG. 9. — A un plus fort grossissement, le cytoplasme d'une cellule tégumentaire profonde montre des empilements de saccules golgiens, en relation avec les inclusions 1 que l'on retrouve dans le syncytium superficiel.

nier, Vago et Combes, 1975). Les inclusions lamellaires sont identiques à celles signalées chez d'autres Monogènes, *Gyrodactylus* (Lyons, 1970), *Entobdella* (Lyons, 1968) : ce sont des feuillettes de phospholipides qui participent à la formation et au maintien de la membrane plasmique, et constituent un stock de réserve de membranes pour la formation des vésicules.

V. - Discussion

1. — Tégument et systématique.

Les connaissances sur les cellules ciliées des larves de Monogènes sont actuellement réduites aux données de Lyons (1972), relatives à l'oncomiracidium d'*Entobdella soleae*. Par rapport à ces données, il faut noter que les cellules ciliées d'*Euzetrema knoeppfleri* sont toujours pourvues d'un noyau volumineux et allongé, alors que chez *Entobdella soleae*, nucléées chez l'embryon, elles perdent leur noyau à l'éclosion.

Nous notons aussi que chez *Euzetrema knoeppfleri*, les cils sont implantés dans des dépressions étroites dont les parois contiennent des inclusions denses. Ceci n'existe pas chez *Entobdella soleae* et est donc signalé pour la première fois chez les Monogènes. L'intérêt de cette précision est qu'elle rappelle de près ce qu'on connaît chez les Planaires (Dorey, 1965).

Par rapport aux miracidiums de Digènes, le tégument de l'oncomiracidium des Monogènes nous semble permettre une comparaison intéressante. Les recherches récentes conduisent en effet à distinguer 2 types de miracidiums (Basch et Diconza, 1974 ; Southgate, 1970) :

- le type *Schistosoma* chez lequel les cellules ciliées superficielles, riches en structures lysosomales, anucléées, sont reliées à des corps cellulaires nucléés situés sous les couches musculaires,
- le type *Fasciola* chez lequel les cellules ciliées nucléées ne sont pas reliées à des corps cellulaires profonds.

Ces différences sont d'après Wright (1971, in Hockley, 1971), Basch et Diconza (1974), en relation avec la suite du développement : le miracidium de *F. hepatica* rejette ses cellules ciliées dans l'eau durant la pénétration tandis que le miracidium de *S. mansoni* les « transporte » dans les tissus du Mollusque avant de s'en débarrasser au bout de quelques heures.

On remarque que l'oncomiracidium des Monogènes se rapproche du miracidium de *Fasciola*, puisque à la fin de la vie libre, les cellules ciliées rompent leurs ponts desmosomiaux et sont éliminées dans le milieu extérieur.

En ce qui concerne la structure générale du tégument, l'étude de *E. knoeppfleri* confirme aussi bien chez la larve libre ou la post-larve que chez l'adulte la structure binaire typique du tégument des Plathelminthes : un syncytium superficiel communiqué avec des corps cellulaires tégumentaires profonds par l'intermédiaire de cols cellulaires étroits.

Elle confirme également le caractère qui distingue d'après Lyons (1973), le tégument des Monogènes de celui des Digènes, à savoir la présence de microvillosités.

Dans la classe des Monogènes, Lyons (1972) établit une distinction ultrastructurale entre *Monopisthocotylea* et *Polyopisthocotylea* de Poissons, d'après la présence d'une zone dense fibreuse située sous la membrane plasmique externe du tégument chez les *Polyopisthocotylea*. Cette formation décrite notamment chez *Rajonchotyle* participe au maintien de la paroi tégumentaire et à une meilleure contractibilité qui facilite les échanges tégumentaires. L'absence de cette structure chez *Euzetrema* est en accord avec la position de cette espèce parmi les *Monopisthocotylea*.

2. — Tégument et écologie.

Les monogènes, dans leur quasi-totalité, vivent dans un environnement liquide, que ce soit à l'état larvaire ou à l'état adulte. Cet environnement liquide est constitué soit par l'eau douce ou l'eau de mer, soit par l'urine ou le plasma de leur hôte.

Les Monogènes parasites de Tétrapodes sont les seuls que leur cycle confronte avec deux milieux d'osmolarité très différente, successivement l'eau douce et l'urine. D'un point de vue ultrastructural, nous avons montré que ce passage coïncide avec le développement de nombreux plis de la membrane cytoplasmique interne, associés avec les mitochondries. Cette structure a une signification fonctionnelle bien établie : elle participe à des transferts de substances de faible poids moléculaire (rappelons qu'elle est présente dans les cellules rénales des Vertébrés) ; on peut donc l'interpréter ici comme nécessaire au continu réajustement osmotique du parasite dans son milieu vésical.

Il nous semble remarquable que cette adaptation ultrastructurale soit également présente (Bresciani, 1973) chez le *Polyopisthocotylea Polystoma integerrimum* et (Burton, 1966) chez le Digène *Gorgodera amplicava*. Il s'agit là de parasites phylétiquement éloignés de *Euzetrema* mais qui occupent un microbiotope identique à l'état adulte, après avoir mené comme lui une vie larvaire en eau douce.

Chez les Monogènes qui n'ont pas à affronter des changements d'osmolarité au cours de leur cycle, qu'ils soient marins ou d'eau douce, les invaginations de la basale sont peu développées ou nulles, en l'état actuel des rares connaissances ; l'acquisition de ces invaginations serait donc caractéristique non d'un milieu d'osmolarité donnée mais d'un changement d'osmolarité en cours de cycle.

Cette hypothèse doit être confirmée par des recherches ultérieures, notamment par une comparaison entre le néoténique branchial et l'adulte vésical des Polystomes.

Les études réalisées en Microscopie électronique sur les Monogènes de Poissons marins montrent une grande uniformité de la structure fine du tégument qui pourrait laisser croire à de faibles capacités évolutives du phylum. Cette uniformité est probablement liée à celle de l'environnement puisque les résultats obtenus chez les parasites vivant dans un milieu original montrent que l'ultrastructure du tégument intègre des adaptations au milieu indépendantes de la phylogénie.

EXPLICATION DES ABRÉVIATIONS DES FIGURES :

a : autolysosomes,	i : invagination de micropinocytose,
b : membrane basale,	ib : plissement de la membrane basale,
c : cils,	jd : jonction de type desmosomial,
cc : corps cellulaire,	M : muscles,
cl : corps multilamellaire,	m : mitochondries,
ct : cellule tégumentaire,	mv : microvillosités,
d : dépression ciliaire,	N : noyau,
f : couche fibreuse,	R : rein,
g : golgi,	st : syncytium tégumentaire,
	v : vacuoles.

L'échelle donnée sur les figures correspond à 1 μ .

Bibliographie

- BASCH (P. F.) et DICONZA (J. J.), 1974. — The miracidium sporocyst transition in *Schistosoma mansoni* surface changes *in vitro* with ultrastructural correlation. *J. Parasit.*, 60, 935-41.
- BOGITSH (B. J.), 1968. — Cytochemical and ultrastructural observations on the tegument of the trematode *Megalodiscus temperatus*. *Trans. Amer. microsc. Soc.*, 87, 477-86.
- , 1972. — Additional cytochemical and morphological observations on the tegument of *Haematoloechus medioplexus*. *Trans. Amer. microsc. Soc.*, 91, 47-55.
- BRESCIANI (J.), 1973. — The ultrastructure of the integument of the Monogenean *Polystoma integerrimum* (Frolich, 1791). *Kgl. Veterinaer-og Landbohojsk. Arsskr.*, 14-27.
- BURTON (P. R.), 1966. — The ultrastructure of the integument of the frog bladder fluke, *Gorgoderina* sp. *J. Parasit.*, 52, 926-34.
- COMBES (C.), JOURDANE (J.) et KNOEFFFLER (L.-Ph.), 1974. — Le cycle biologique de *Euzetrema knoeffleri* Combes, 1965 (Monogenea, Monopisthocotylea), parasite de l'Euprocte de Corse. *Bull. Soc. Zool. France*, 99, 219-36.
- DOREY (A. E.), 1965. — The organisation and replacement of the epidermis in acelous turbellarians. *Q. Jl microsc. Sci.*, 106, 147-172.
- FOURNIER (A.), VAGO (C.) et COMBES (C.), 1975. — Mise en évidence de Bactéries endocellulaires pathogènes chez le Monogène *Euzetrema knoeffleri*. *C.R. Acad. Sci.* (à paraître).
- HOCKLEY (D. J.), 1973. — Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma*. *Advances in parasitology*, 11, 233-305.
- LYONS (K. M.), 1968. — A comparison of the adult epidermis in some Monogeneans: the development of the outer layer of *Entobdella soleae*. *Parasitology*, 58, 140-150.
- LYONS (K. M.), 1970. — Fine structure of the outer epidermis of the viviparous Monogenean *Gyrodactylus* sp. from the skin of *Gasterosteus aculeatus*. *J. Parasit.*, 56, 1110-1117.
- LYONS (K. M.), 1972. — Ultrastructural observations on the epidermis of the Polyopisthocotylea monogeneans, *Rajonchotyle emarginata* and *Plectanocotyle gunardi*. *Z. Parasitenk.*, 40, 87-100.
- LYONS (K. M.), 1973. — The epidermis and sense organs of the Monogenea and some related groups. *Advances in parasitology*, 11, 193-232.
- SOUTHGATE (V. R.), 1970. — Observations on the epidermis of the miracidium and on the formation of the sporocyst of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 61, 177-190.
- WRIGHT (C. A.), 1971. — Flukes and Snails. *George Allen and Unwin, Ltd. Publ.*, London, 168 p.