La reconstitution de l'épithélium digestif chez *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller après infestation par les formes larvaires de *Fasciola hepatica* L.

par D. RONDELAUD et D. BARTHE

Laboratoire d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique (P^r D. BARTHE),
Faculté de Médecine, F 87032 Limoges Cedex.

Laboratoire de Biologie animale (P^r R. SOURIE),
Faculté des Sciences, F 87060 Limoges Cedex.

Résumé

Chez la Limnée tronquée en fin d'évolution parasitaire, la reconstitution de la glande digestive s'opère sous forme de tubules périphériques à diamètre étroit. L'épithélium tubulaire — de même que ceux de l'estomac et de l'intestin — présente une hyperplasie cellulaire avec anisocaryose. L'activité cellulaire, d'abord normale, croît ensuite en fonction de la durée d'infestation.

Summary

The reconstitution of the digestive epithelium in *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller infested by larval forms of *Fasciola hepatica* L.

In *L. truncatula* at the end of parasitic cycle, the reconstitution of the digestive gland consists in development of peripheral tubules with strait diameters. The tubular epithelium — like stomach and intestine epithelia — show cellular hyperplasia with anisocaryosis. The cellular activity — normal at first — increases then along the infestation period.

Accepté le 28 novembre 1977.

Les troubles consécutifs à la présence de formes larvaires de Trématodes dans les Mollusques Gastéropodes ont été décrits en de nombreuses notes (revues de Cheng et Snyder, 1962 ; de Wright, 1966 et de Moore et Halton, 1973).

Les auteurs se sont principalement intéressés aux nécroses tissulaires pendant la « phase d'agression ». Mais une phase de reconstitution peut suivre ; elle n'a, à notre connaissance, fait l'objet d'aucune étude approfondie.

Le travail présent répond à ce but et porte sur la reconstitution de l'épithélium et de l'intestin chez les Limnées tronquées infestées par *Fasciola hepatica*.

Matériel et techniques

Des Limnées de 4 mm de hauteur sont infestées chacune par un miracidium et élevées selon les conditions standard du laboratoire (Rondelaud, 1974 b). La survie de ces Mollusques infestés atteint 10-12 semaines à une température de 20 °C maintenue constante. Tous les 7 jours, cinq individus infestés sont sacrifiés sauf en fin d'expérience où les deux derniers sacrifices n'ont concerné chacun que 3 animaux.

Les Mollusques sont fixés au Bouin, débités en coupes sériées de 5 µm d'épaisseur et colorés à l'hématoxyline de Harris — trichome de Gabe.

Notre étude porte sur des Limnés présentant une infestation parasitaire, depuis le début jusqu'à la 12^e semaine (20 °C). Les résultats recueillis sont comparés :

— avec ceux provenant de Mollusques infestés, mais élevés à des températures différentes, soit constantes (25 °C et 16 °C), soit avec des fluctuations journalières de 4° à 18 °C (Rondelaud et Barthe, 1978) ;

— avec ceux provenant de Limnées témoins.

Résultats

1. — La glande digestive de *Lymnaea truncatula*.

Chez une Limnée saine, l'épithélium de la glande comprend 3 types cellulaires reconnaissables en microscopie optique. Il s'agit, selon Southgate (1969), de cellules digestives, de cellules sécrétrices et de cellules à calcium ; par contre Moore et Halton, en 1973, dénomment les deux derniers types cellulaires, respectivement cellules à mucus et cellules basophiles. Nous avons appelé « cellules à cytoplasme dense » ces cellules à calcium ou basophiles : elles se situent de préférence à l'extrémité de chaque tubule.

Le microscope électronique (Southgate, 1969) révèle de plus l'existence de cellules indifférenciées (« thin cells ») et de cellules excrétrices (« excretory cells »).

A partir de la 4^e semaine d'infestation, l'impact du parasitisme se traduit par les effets suivants : vacuolisation apicale, migration nucléaire selon certains auteurs

et rejet d'une partie du matériel cytoplasmique comme les paquets granulaires issus des cellules digestives. Mais les zones basales de ces cellules, avec les noyaux, persistent.

La glande digestive en reconstitution présente les caractéristiques suivantes :

a) *Mise en place.* La figure 1 A montre :

— que le début de cette reconstitution épithéliale est fonction de la température d'élevage ;

— qu'il n'existe pas de synchronisme entre cette reconstitution et la phase parasitaire E 1 (Rondelaud, 1974 a), c'est-à-dire la sortie des premières cercaires à partir du corps des rédies dans les Mollusques.

b) *Configuration anatomo-microscopique.* Nous avons comparé :

— les nombres de *tubules périphériques* de la glande digestive chez des Limnées saines ou infestées de même taille. Pour cela nous avons compté le nombre d'amas de cellules à cytoplasme dense terminant ces tubules. Les résultats obtenus ne correspondent donc pas à la totalité des tubules pour chaque glande digestive.

Pour les Limnées saines ou infestées, les nombres obtenus lors de l'examen de 3 individus par série et par semaine sont ramenés à une valeur moyenne et transcrits sur la figure 1 B ;

— les diamètres les plus grands de tous les tubules digestifs chez les Limnées présentant une infestation de 4,9 et 11 semaines (20 °C) par rapport à des témoins sacrifiés au début et à la fin de l'expérimentation (fig. 1 C et D).

De ces observations nous pouvons déduire les remarques suivantes :

— chez les témoins, le nombre et le diamètre des tubules périphériques augmentent progressivement au cours de la croissance des individus jusqu'à une valeur maximale ;

— l'évolution des parasites durant les premières semaines s'accompagne d'un arrêt du développement des tubules ;

— lors de la reconstitution digestive, nous assistons à une augmentation assez brusque des nombres de tubules périphériques. Par contre, les diamètres sont nettement inférieurs à ceux des témoins de départ.

c) *Structure cytologique.* La figure 2 regroupe des données concernant :

— les nombres de cellules comptées sur une longueur d'épithélium égale à 0,1 mm. Chaque Mollusque examiné fait l'objet de 20 mesures. Celles-ci portent sur des plages cellulaires formées par des cellules à cytoplasme dense ou par les deux autres types cellulaires.

Chez les Limnées en reconstitution digestive, nous effectuons un comptage séparé des cellules intercalées entre les cellules à cytoplasme dense (fig. 2 A) ;

— la hauteur de l'épithélium tubulaire selon le même protocole (fig. 2 B).

Dans les deux cas, les diverses valeurs recueillies sont ramenées à une moyenne avec indication des extrêmes (sauf pour les cellules à cytoplasme dense) ;

FIG. 1. — La reconstitution de la glande digestive chez des Limnées parasitées par *Fasciola hepatica*.

— Les débuts de cette reconstitution en fonction de la durée d'infestation, de la température d'élevage et de la présence des premières cercaires libres (↓) dans le Mollusque : phase E 1 (1 A).

— Les nombres moyens de tubules périphériques comptés chez les Limnées témoins (trait continu) ou infestées (pointillés) (1 B).

— Les diamètres des tubules :

• chez un témoin sain au départ de l'expérience (3,8 mm de hauteur : tracé I) par rapport à une Limnée présentant une infestation de 4 semaines (tracé II) (1 C) ;

• chez des Limnées présentant une infestation de 8 semaines (tracé III) ou de 10 semaines (tracé IV) par rapport à un témoin de même taille (tracé V) (1 D).

FIG. 2. — Structure histologique de l'épithélium tubulaire de la glande digestive chez des Limnées parasitées par *Fasciola hepatica*.

— Les nombres de cellules comptées par une longueur d'épithélium égale à 0,1 mm (CC: cellules à cytoplasme dense; CD: cellules digestives et sécrétoires; Cd: cellules intercalées entre les cellules à cytoplasme dense) (2 A).

— La largeur de l'épithélium tubulaire (2 B).

— La caryométrie des cellules à cytoplasme dense chez une Limnée infestée en reconstitution (11^e semaine d'infestation: pointillés) par rapport à un témoin (traits continus) (2 C).

— la caryométrie de 500 cellules à cytoplasme dense chez une Limnée en reconstitution digestive (11^e semaine d'infestation) par rapport à un témoin de même taille (fig. 2 C).

L'observation de cette figure conduit aux observations suivantes :

— jusqu'à la 7^e semaine d'infestation, les nombres de cellules épithéliales restent sensiblement constants. Leur hauteur croît à partir de la 3^e semaine et atteint un maximum vers la 5^e semaine ;

— après la 7^e semaine, l'épithélium en reconstitution présente une diminution brusque de sa hauteur, suivie d'une nouvelle croissance. Ce phénomène s'accompagne d'une hyperplasie cellulaire avec anisocaryose. Ainsi dans le cas des cellules à cytoplasme dense (fig. 2 C), de nombreux noyaux sont atypiques avec des invaginations de la membrane nucléaire. Ces dernières cellules sont également plus nombreuses dans les tubules périphériques que les autres types cellulaires.

FIG. 3. — La reconstitution du système digestif chez des Limnées parasitées par *Fasciola hepatica*.

— Les nombres de granules (G) et de paquets granulaires (PG): N1 dans la glande digestive au cours de l'infestation (3 A).

— Les effectifs Limnées parasitées présentant plus de deux paquets granulaires: N2 en fonction des phases parasitaires (R: reconstitution épithéliale) (3 B).

— Les nombres de cellules: N3 comptées pour une longueur d'épithélium stomacal égale à 0,1 mm au cours de l'infestation (3 C).

d) *Produits de l'activité cellulaire.* Nous nous sommes intéressés :

— aux granules colorés en jaune par le trichome. Ils sont généralement ronds avec un diamètre de 5-6 μ m, mais sont parfois composés de sous-unités. La plupart d'entre eux sont rejetés par les cellules à cytoplasme dense : les variations de leurs nombres traduisent principalement l'activité de ces cellules ;

— aux paquets granulaires rejetés dans la lumière à partir des deux autres types cellulaires.

Dans les deux cas, nous avons effectué nos comptages toutes les 20 coupes. Les résultats sont transcrits sur la *figure 3 A* et permettent les remarques suivantes :

— jusqu'à la 4^e semaine d'infestation, nous retrouvons des granules en nombre élevé ainsi que la libération de quelques paquets granulaires dans la lumière. Ce dernier fait est visible aussi chez les témoins ;

— par la suite, la maturation des futures cercaires s'accompagne d'une baisse sensible des nombres de granules et d'une libération massive des paquets granulaires ;

— lors de la reconstitution digestive, les granules redeviennent assez nombreux. De même il y a augmentation progressive des paquets granulaires en fonction de la durée d'infestation, ce qui implique que l'épithélium présente à nouveau une hyperactivité cellulaire.

Le rejet de ces paquets granulaires ne touche au début que certains tubules proches des parasites, puis ce phénomène s'étend à tous les tubules au fur et à mesure du développement des formes larvaires. L'évolution plus ou moins synchrone du parasitisme chez les Limnées nous a conduit à compter les individus présentant plus de 20 paquets granulaires en fonction de leur phase parasitaire (*fig. 3 B*). Le rejet est maximal à la fin de la phase C et au début de la phase D (Rondelaud, 1974 a), c'est-à-dire lors de la formation des cercaires pour les 2 premières générations rédiennes (Rondelaud et Barthe, 1978).

Nous notons des mitoses éparses entre les 7^e et 9^e semaines d'infestation.

2. — L'estomac et l'intestin de *Lymnaea truncatula*.

La *figure 3 C* indique le nombre de cellules comptées pour une longueur d'épithélium stomacal égale à 0,1 mm en fonction de la durée d'infestation. Chaque Limnée a fait l'objet de 20 mesures au niveau de cet épithélium unistratifié et les valeurs recueillies sont ramenées à une moyenne avec indication des résultats extrêmes.

L'épithélium du complexe stomacal présente une hyperplasie cellulaire nette à partir de la 7^e semaine d'infestation. On note aussi une légère anisocaryose. Nous n'avons pas constaté de modification structurale au niveau de la tunique musculaire.

L'épithélium intestinal présente lui aussi une hyperplasie cellulaire à la fin de l'évolution parasitaire (résultats non représentés). La nécrose cellulaire est plus forte que chez les témoins, surtout au niveau des cellules glandulaires.

Discussion

Les résultats recueillis lors de l'examen de Limnées en début d'infestation (jusqu'à la 7^e semaine) sont conformes à ceux fournis par les auteurs cités antérieurement. Notons cependant que l'impact du parasitisme se traduit par un arrêt du développement des tubules digestifs; ceci permet d'émettre l'hypothèse que le développement des formes parasitaires bloque celui de la glande digestive du Mollusque.

La reconstitution de l'épithélium digestif a été signalée pour la première fois par Agersborg en 1924 comme un retour aux conditions normales. Les auteurs ultérieurs n'ont pas porté leur attention sur ce point; seul Pan, en 1965, signale une régénération de la glande digestive chez *Australorbis glabratus* avec réapparition de tubules périphériques et développement de petits bombements à partir des tubules principaux.

Nos résultats montrent :

— que la reconstitution de la glande digestive chez la Limnée infestée se traduit par le développement progressif de tubules périphériques à diamètre étroit (75 à 100 μ m) (Pl. I, fig. 1);

— que l'épithélium digestif présente alors une hyperplasie cellulaire avec anisocaryose (Pl. I, fig. 2, 3 et 4).

— que l'activité des cellules hyperplasiées reste normale jusqu'aux 9^e-10^e semaines puis croît par la suite.

Nous pouvons rappeler que la glande digestive d'une Limnée soumise à un sel métallique toxique est l'objet d'une nécrose cellulaire avec hyperplasie réactionnelle (Rondelaud, Chaisemartin et Barthe, 1976). Le parasitisme provoque à plus longue échéance les mêmes phénomènes mais ceux-ci sont limités par la mort des Mollusques. Nous nous proposons d'analyser la réaction de la glande digestive sous l'action de sels métalliques toxiques à long terme.

La question de savoir si l'hyperplasie digestive s'opère à partir des cellules déjà différenciées restées en place ou à partir des cellules indifférenciées n'est pas résolue. La compréhension de ce phénomène nécessite une étude des variations structurales de cette glande en microscopies optique et électronique.

Nous nous proposons d'approfondir ces points dans des travaux ultérieurs.

PLANCHE I

FIG. 1. — Vue générale d'un tubule de la glande digestive après sa reconstitution ($\times 680$).

FIG. 2 et 3. — Noyaux atypiques de cellules à cytoplasme dense ($\times 1200$).

FIG. 4. — Plaque de cellules à cytoplasme dense avec quelques noyaux de cellules intercalaires (Cd) ($\times 1200$).

Limnée sacrifiée durant la 11^e semaine d'infestation.

Bibliographie

- AGERSBORG (H. P. K.), 1924. — Studies on the effect of parasitism upon the tissues. I. With special references to certain gastropod mollusc. *Quart. Jour. Micr. Sci.*, 68, 361-401.
- CHENG (T. C.) et SNYDER (R. W.), 1962. — Studies on host-parasite relationships between larval trematodes and their hosts. I. A review. II. The utilization of host's glycogen by the intramolluscan larvae of *Glythelmins pennsylvaniensis* Cheng and associated phenomena. *Trans. Am. microsc. Soc.*, 81, 109-228.
- MOORE (M. N.) et HALTON (D. W.), 1973. — Histochemical changes in the digestive gland of *Lymnaea truncatula* infected with *Fasciola hepatica*. *Z. Parasitenk.*, 43, 1-16.
- PAN (C. T.), 1965. — Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14, 931-976.
- RONDELAUD (D.), 1974 a. — L'évolution des rédies de *Fasciola hepatica* L. chez *Galba truncatula* Müller en Limousin. *Rev. Med. vet.*, 125, 237-250.
- RONDELAUD (D.), 1974 b. — Recherches sur l'influence de quelques facteurs physiques sur les migrations quotidiennes de *Galba truncatula* Müller. *Ann. parasitol. hum. comp.*, 49, 417-425.
- RONDELAUD (D.) et BARTHE (D.), 1973. — Arguments et propositions pour une nouvelle interprétation de l'évolution de *Fasciola hepatica* L. chez *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller. *Ann. Parasitol. hum. comp.* (à paraître).
- RONDELAUD (D.), CHAISEMARTIN (C.) et BARTHE (D.), (1976). — Données histologiques et histochimiques sur le transfert de deux métaux (Fe⁺⁺⁺, Cu⁺⁺) chez *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller (Mollusques Gastéropodes Pulmonés). *Ann. Limnol.*, 12, 269-281.
- SOUTHGATE (V. R.), 1969. — Studies on the biology and host-parasite relationships of some larval Digenea. *Ph. Doct. Thesis*, Cambridge, Engl., 231 p.
- WRIGHT (C. R.), 1966. — The pathogenesis of Helminths in the Mollusca. *Helminth. Abstr.*, 35, 207-224.
-