Infestation expérimentale de *Cochlicella ventricosa* (Draparnaud, 1801) par des larves L₁ de Protostrongylides

par J. CABARET et A. DAKKAK

Institut agronomique et vétérinaire Hassan II,
Département de Parasitologie, B.P. 704, Rabat-Agdal, Maroc.

Résumé.

De jeunes *Cochlicella ventricosa* ont été infestés par mélange plurigénérique de larves du premier stade de Protostrongylidés. Ce mollusque terrestre est un hôte favorable pour *Cystocaulus* et *Neostrongylus*. Lors d'une première infestation, une seule larve est capable d'effectuer son évolution. Au cours d'une seconde infestation, une deuxième larve suivra le même processus. Cette régulation de l'infestation du mollusque s'apparente au phénomène de limitation. Les hypothèses relatives à son mécanisme sont discutées.

Summary.

Experimental infestation of *Cochlicella ventricosa* with L1 larvae of Protostrongylids.

Young land-snails (*Cochlicella ventricosa*) were infested with a plurigeneric mixture of first-stage larvae of Protostrongylids. *Cochlicella ventricosa* is good host for *Cystocaulus* and *Neostrongylus*. Only one larva is able to ensure its complete evolution at a first infestation. A second larva follows the same process, at a second infestation. Such a regulation of the infestation recalls the limitation phenomenon. Hypotheses concerning this regulation process are discussed.

Les protostrongylidoses des ovins constituent un problème pathologique majeur au Maroc : Joyeux et Gaud 1946, Alahkam 1977. Les espèces de nématodes qui en sont la cause varient avec les régions. Trois genres principaux sont recensés : *Müllerius*,

Accepté le 7 décembre 1978.

Neostromylus, *Cystocaulus* : Alahkam, 1977, Bahaïda, 1978. Parmi les hôtes intermédiaires fréquents rencontrés au Maroc tout au long de l'année on peut citer : *Euparypha*, *Cepaea*, *Helicella*, *Cochlicella* : Bahaïda, 1978.

Ce dernier genre de mollusque est représenté essentiellement au Maroc par *C. acuta* et *C. ventricosa*. Kassai, 1957, a montré que la première espèce est un hôte intermédiaire pour *Müllerius*, *Cystocaulus*, *Protostrongylus*. Aucune information n'est disponible pour *C. ventricosa*. Il nous a donc paru intéressant de suivre l'évolution des larves du premier stade de divers genres de Protostrongylidés chez *C. ventricosa*, ainsi que leur répercussion sur la survie de ce mollusque.

I. - Matériel et méthodes

1. Larves du premier stade de Protostrongylidés.

Le matériel infestant est un mélange plurigénérique obtenu à partir de fèces d'ovins dont la composition est : *Müllerius capillaris* (73,3 p. cent), *Cystocaulus* sp. (17,2 p. cent), *Neostromylus linearis* (8,4 p. cent), *Protostrongylus* sp. (1,1 p. cent). Ces pourcentages ont été établis sur l'examen de 90 larves. Les critères de détermination sont ceux de Ramirez-Fernandez, 1967, pour *N. linearis* et ceux de Boev, 1975, pour les autres genres.

2. Mollusques hôtes intermédiaires : *Cochlicella ventricosa*.

Ils sont âgés de 1 à 2 mois et proviennent d'une parcelle qui n'a jamais été fréquentée par des ovins. Des digestions peptiques de ces mollusques ont montré qu'ils n'hébergeaient pas de larves de protostrongylidés.

3. Modalités d'infestation.

La solution mère utilisée contient 82-103 L₁ (P = 0,05) dans 3 µl.

Des quantités croissantes de cette solution sont prélevées à la pipette automatique afin de réaliser les divers degrés d'infestation. Pour chaque lot, la quantité de liquide requise est déposée sur le fond d'une boîte de Petri. Les mollusques sont placés sur le film liquide ; le séjour dure une heure. Ils sont déposés ensuite dans d'autres boîtes de Petri où ils séjourneront pendant toute la durée de l'expérience. Ces boîtes de Petri sont aménagées de la façon suivante : le fond est garni de terre fine, qui est recouverte d'un papier filtre humide et le dessus de la boîte est percé d'orifices afin d'assurer une certaine aération du milieu.

Les boîtes de Petri ayant servi à réaliser les infestations ainsi que les mollusques eux-mêmes sont lavés ; les larves présentes dans le liquide de lavage sont comptées.

4. Protocole expérimental.

Les caractéristiques des divers lots sont exprimées dans le *tableau I*.

Tableau I. *Doses infestantes moyennes administrées et effectifs des divers lots.*

N° du lot	Nombre moyen de L ₁ /mollusque	Effectifs
I	2,9	100
II	28,1	100
III	306	100
IV	598	50
V	1 240	25
Témoin	0	100

Pendant les deux premières semaines (J + 7, J + 14) le nombre de mollusques survivants dans les différents lots est noté et des digestions pepsiques individuelles de 5 mollusques par lot sont réalisées toutes les semaines de J + 7 à J + 28. Aucune digestion pepsique n'a été effectuée sur les lots IV et V en J + 7.

II. - Résultats

Aucune mortalité n'est observée dans aucun lot de J₀ à J + 14. Le développement de champignons entre J + 14 et J + 21 dans les divers lots a provoqué une légère mortalité dans tous les lots et aucune mesure de survie n'a été faite après J + 14.

Il est difficile, en règle générale, de différencier les larves de stade 3 de *Neostrogylus* et de *Cystocaulus*. Le premier est caractérisé par une extrémité caudale allongée et présente la morphologie habituelle de la larve du premier stade. La larve de troisième stade de *Cystocaulus* présente une extrémité caudale trapue, articulée, avec un rétrécissement brusque et une striation cuticulaire transversale très nette. Les premières larves du stade 2 de *N. linearis* sont mises en évidence en J + 7 et sont encore présentes en J + 14 ; le stade 3 apparaît en J + 14. Le stade 2 de *Cystocaulus* apparaît en J + 14 et le stade 3 en J + 21. Une larve de stade 1 de *M. capillaris* a été isolée en J + 14. Trois semaines après la date de l'infestation des mollusques toutes les larves de *Cystocaulus* et *N. linearis* sont infestantes pour l'hôte définitif.

Les pourcentages de pénétration des larves L₁ et les degrés d'infestation moyens des mollusques sur toute la durée d'observation sont présentés dans le *tableau II*. Le pourcentage de pénétration est défini comme le rapport des larves ayant disparu dans le liquide d'infestation, après le séjour des mollusques dans ce liquide, sur la quantité de larves initialement présente. Le degré d'infestation moyen des mollusques est établi sur l'ensemble des résultats des digestions peptiques dans chaque lot, de J + 7 à J + 28.

Il n'y a jamais plus d'une larve dans un mollusque infesté, quel que soit le lot.

Tableau II. *Pourcentages de pénétration des L_1 et degrés d'infestation moyen des mollusques.*

N° du lot	Pénétration des L_1 p. cent	Degré d'infestation moyen	Nombre de mollusques examinés
I	92,9	0	25
II	90,7	0,04 (0,20) *	25
III	98,8	0,24 (0,43)	25
IV	96,3	0,30 (0,47)	25
V	95,2	0,25 (0,44)	20

* Les chiffres entre parenthèses représentent l'écart-type.

III. - Discussion

I. Infestation et survie des mollusques.

L'infestation du mollusque, même par des doses élevées ne semble pas affecter sa survie, ce qui est en accord avec les opinions émises par Gerichter, 1948 et Rojo-Vazquez, 1973. Le fait qu'une seule larve au maximum poursuive son évolution à l'intérieur de l'hôte intermédiaire paraît en être la cause principale. Enfin la réaction du mollusque vis-à-vis des larves installées est faible et semble indiquer que les larves sont bien supportées par l'hôte : cf. Hobmaier A. et Hobmaier B., 1934, Beresford-Jones, 1966.

Taux de pénétration des larves L_1 selon la dose infestante et la densité des mollusques.

Le pourcentage de L_1 pénétrant dans le mollusque est relativement homogène indépendamment du niveau d'infestation. La relation entre le probit du pourcentage de pénétration et le logarithme de la dose administrée n'est pas significative ($P > 0,005$) ; il en est de même pour la transformation logit. Cependant, l'utilisation d'une pondération $1/\sqrt{n}$ associée avec la transformation logit, permet d'établir la relation significative ($P = 0,02$) suivante :

$$\log. P/Q = 0,0907 \sqrt{n} + 0,2800 \log. x$$

avec : P = p. cent de L_1 ayant pénétré dans les mollusques ; Q = p. cent de L_1 n'ayant pas pénétré dans les mollusques ; n = effectifs des mollusques utilisés ; x = nombre moyen de L_1 mises à la disposition de chaque mollusque.

Le pourcentage de pénétration augmente donc fortement en fonction du nombre de mollusque présents (densité) et faiblement avec la quantité moyenne de larves dis-

ponibles par individu (dose infestante/mollusque). Le fait que la transformation logit soit plus satisfaisante que la transformation probit semble indiquer l'absence d'une sensibilité individuelle particulière : cf. Lazar, 1975. Le taux de pénétration varie dans le même sens que la densité des mollusques car chacun d'entre eux a une probabilité plus grande de rencontrer une larve L_1 . Afin de vérifier l'importance de la densité des hôtes intermédiaires sur le taux de pénétration l'expérimentation complémentaire suivante a été réalisée : 3 lots de 2 individus sont mis en contact avec une solution permettant une infestation moyenne de 300 larves par mollusque. Le taux de pénétration est de 66,8 % en moyenne, avec une faible variabilité entre les lots ; il est très inférieur à celui obtenu pour la même dose individuelle dans un lot de 100 individus : 98,8 % (cf. tableau II).

2. Taux et degrés d'infestation.

Le pourcentage de pénétration des larves L_1 est élevé, pourtant le taux ainsi que le degré d'infestation restent faibles : aucun mollusque n'héberge plus d'une larve et seulement 4-30 % d'entre eux sont infestés. Dans le but de vérifier ces résultats, des digestions peptiques complémentaires ont été pratiquées sur les lots 3, 4, 5 (d'effectifs respectifs : 22, 8, 5). Aucun des individus n'héberge plus d'une larve et les taux d'infestation sont respectivement de 24,1 p. cent, 40,5 p. cent et 35,7 p. cent. Ces valeurs sont assez proches de celle obtenue sur des *Cochlicella* sp. récoltés sur les pâturages dans la région de Rabat par Bahaïda, 1978 : 28,8 p. cent. Les conditions expérimentales sont très favorables à une infestation massive comparées à celles régnant à l'extérieur ; la faible différence observée semble indiquer que les mollusques disposent d'un moyen de régulation de l'infestation. Cette régulation est mise en évidence sur l'ensemble des mollusques soumis à l'infestation. Il existe une bonne relation entre le nombre moyen de larves L_1 qui ont pénétré et le nombre moyen de larves L_3 obtenues. Elle est du type :

$$L_1 = 0,924 \exp. 0,0519 L_3 \quad (P < 0,05)$$

Le nombre de larves infestantes (L_3) varie peu pour des infestations de 300 à 1 200 larves L_1 par mollusque.

L'existence d'un phénomène de régulation est mieux perceptible lorsque l'on considère les degrés d'infestation individuels. Il existe deux possibilités : aucune larve, présence d'une seule larve. Les variations observées au sein de l'ensemble des populations infestées s'explique par la fréquence plus ou moins grande des valeurs nulles.

3. Phénomène de limitation.

L'ensemble de ces résultats fait penser à un phénomène du même ordre que celui de la limitation, mis en évidence par Bain et Chabaud 1975. On pourrait donc avancer, à l'image de ce qui a été énoncé par Mougey et Bain 1976, pour les microfilaires pénétrant dans leur vecteur, deux possibilités :

- existence de sites : il existe un certain nombre de sites de passage et lorsque ceux-ci sont occupés, la pénétration n'est plus possible,
- libération d'une substance immobilisatrice par l'escargot.

Pour la première éventualité le maximum de larves observées dans l'hôte intermédiaire est de 1 ; chaque mollusque constituerait un site. On montre que la variance maximale du degré d'infestation est égale au quart de la moyenne de ce degré d'infestation, ce qui n'est pas le cas ici. Dans la seconde éventualité, le processus est poissonnien et la moyenne est égale à la variance. Les comparaisons entre les variances calculées (moyenne des degrés d'infestation) et les variances observées (variance des degrés d'infestation) [Cf. *tableau II*] sont présentées dans le *tableau III*.

Tableau III. Comparaison des variances calculées et observées du degré d'infestation des mollusques des lots II, III, IV, V.

N° du lot	Variance calculée	Variance observée	X ²	d.d.l.
II	0,04	0,04	24	22
III	0,24	0,18	17	22
IV	0,30	0,22	14	17
V	0,25	0,19	15	17

Aucune différence n'est significative et il est possible de conclure que le processus est poissonnien ; la seconde éventualité est donc la plus vraisemblable. Cette hypothèse est en accord avec le fait que, lors de limitation par l'émission d'une substance immobilisatrice, le degré d'infestation moyen diminue pour les doses élevées (cf. lot 5, *tableau II*).

Le terme de substance immobilisatrice est peu adéquat, car la majorité des larves qui ont pénétré dans le mollusque ne se retrouvent ni dans le liquide d'infestation ni dans le digestat peptique de mollusque. La destruction des larves de premier stade à l'intérieur du mollusque est très rapide. Une infestation de 300 larves par individu a été réalisée sur 3 lots de 2 animaux. Des digestions peptiques sont effectuées aux temps post-infestation + 5 mn, + 15 mn, + 30 mn. Une seule larve a été retrouvée dans un seul mollusque au temps P.I. + 15 mn. Il semble donc y avoir intervention d'une substance lysante à action rapide.

Etant donné l'existence d'un phénomène de limitation très particulier lors de primo-infestation, on peut se demander comment les larves vont se répartir au cours d'une infestation de rappel. Vont-elles préférentiellement vers les mollusques infestés ou indemnes ? Pour répondre à cette question 5 animaux du lot III et 5 animaux du lot IV (codés III' et IV') ont été réinfestés par une dose de 320 larves L₁/mollusque.

L'examen des digestions pepsiques réalisées 2 semaines après la réinfestation donne les résultats suivants :

- lot III' : degré d'infestation moyen : 1,0 (0,71) ;
- lot IV' : degré d'infestation moyen : 0,6 (0,89).

83 p. cent des larves du troisième stade appartiennent au genre *Cystocaulus* et le reste au genre *Neostromylus*. Trois possibilités sont enregistrées quant au degré d'intestation individuel : 0 larve L_3 (3 mollusques), 1 L_3 (4 mollusques), 2 L_3 (2 mollusques). Lors d'une réinfestation les larves se distribuent au hasard suivant un processus poissonien ; il n'y a pas, apparemment, intervention d'un phénomène de prémunition, ce qui est en accord avec l'opinion de Gerichter, 1948. Le phénomène de limitation, caractérisé par le développement complet possible d'une seule larve dans chaque mollusque, se produit donc de façon identique lors d'une deuxième infestation.

4. Nature spécifique de l'infestation.

Des trois espèces principales fournies aux mollusques, seules deux d'entre elles (*Neostromylus* et *Cystocaulus*) accomplissent leur évolution complète. *Cochlicella ventricosa* est donc un nouvel hôte favorable pour *Neostromylus linearis*. Contrairement à *Cochlicella acuta* (cf. Kassai 1957), il n'est pas un hôte favorable pour *Müllerius capillaris*.

5. Chronologie évolutive de l'infestation.

La durée de l'évolution de la larve du premier stade en larve du troisième stade correspond à celles obtenues par divers auteurs : pour *Cystocaulus* de 18 à 55 jours à 20-22° C (cf. Davtian, 1940 ; Gerichter, 1951 ; Ramirez-Fernandez, 1967) et pour *Neostromylus* de 10 à 21 jours à 18-20° C (cf. Rojo-Vazquez, 1973). Elle semble toutefois plus proche des valeurs minimales, car toutes les larves sont au stade 3 au bout de 3 semaines.

Le taux de pénétration des larves du premier stade de Protostrongylidés dans un mollusque hôte intermédiaire, *Cochlicella ventricosa*, est élevé (supérieur à 90 %). Le nombre de larves mis en évidence dans le mollusque n'est au contraire jamais supérieur à un, lors de primo-infestation ; il n'est pas supérieur à deux lors d'une seconde infestation. Il semblerait donc que pour chaque infestation une seule larve pénètre sans être détruite et puisse accomplir son évolution normale. Ce phénomène de limitation pourrait expliquer l'absence de mortalité chez les *Cochlicella ventricosa* au cours d'infestations massives.

Cochlicella ventricosa est un hôte favorable pour *Cystocaulus* et *Neostromylus linearis*. Pour ce dernier Protostrongylidé, il peut être considéré comme un nouvel hôte intermédiaire.

Bibliographie

- Alahkam (L.), 1977 : Contribution à l'étude parasitologique, épidémiologique et lésionnelle des broncho-pneumonies vermineuses du mouton dans la région de Tadla. *Th. Doct. Vet. Rabat*, 99 p. ronéotypées.
- Bahaïda (B.), 1978 : Contribution à l'étude des Protostrongylidoses du mouton. Production de larves L₁ et leur devenir chez les mollusques terrestres hôtes intermédiaires. *Th. Doc. Vet. Rabat*, 128 p. ronéotypées.
- Bain (O.), et Chabaud (A.G.), 1975 : Le mécanisme assurant la régulation de la traversée de la paroi stomacale du vecteur par les microfilaires. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 281, Ser. D, 1199-1202.
- Beresford-Jones (W.P.), 1966 : Observations on *Muellerius capillaris*. I. The bionomics and development in *Trichia hispida* of larvae obtained from Sheep Grazed en Permanent Pasture. *Res. Vet. Sci.* 7, 61-66.
- Boev (S.N.), 1975 : Principles of nematology (Osnovy nematologii) 25 - Protostrongilidii. Ed. by K.M. Ryzhikov. *Isdatel'stvo « Nauka »* ; Moscow.
- Davtian (E.A.), 1940 : Development cycle of *Cystocaulus nigrescens*. *Tr. Arm. Nauchn - Issled - Vet. Inst.* 3, 5-31.
- Gerichter (Ch.B.), 1948 : Observations on the life history of lung nematodes using snails as intermediate hosts. *Am. J. Vet. Res.* 9, 109-112.
- Hobmaier (A.) and Hobmaier (B.), 1934 : The route of infestation and the site of localization of lung worms in mollusks. *Science*, 80, 229.
- Joyeux (C.) et Gaud (J.), 1946 : Recherches helminthologiques marocaines (suite). Etudes sur la pneumonie vermineuse. *Arch. Inst. Pasteur, Maroc.* 3, 383-461.
- Kassai (T.), 1957 : Schnecken als Zwischenwirte der Protostrongyliden. *Z. f. Parasitenkunde*, 18, 5-19.
- Lazar (P.), 1975 : Les essais biologiques. *Document polycopié Univ. Paris 6 (C.E.S.A.M.)* 176 p.
- Mougey (Y.) et Bain (O.), 1976 : Passage des microfilaires dans l'hémocèle du vecteur : modèles stochastiques appropriés à diverses hypothèses sur les mécanismes de la limitation. *Ann. Parasitol. Hum. et Comp.* 51, 95-110.
- Ramirez-Fernandez (A.P.), 1967 : Epizootologia de las bronco-neumonias verminosas ovinas en León. *Ann. Fac. León*, 13, 135-210.
- Rojo-Vazquez (F.A.), 1973 : Bronconeumonias verminosas en León, con especial atención al ciclo biológico de *Neostongylus linearis*. *Ann. Fac. Vet. León*, 19, 147-197.