L'INFESTATION DE LA LIMACE *DEROCERAS RETICULATUM* PAR LE PROTOSTRONGLE *MUELLERIUS CAPILLARIS* : ASPECT DE LA RÉACTION PRÉCOCE

J. CABARET*, H. WEBER**

Collaboration technique de Mme R. GIRARD

RÉSUMÉ. Quarante juvéniles de *D. reticulatum* ont été infestés par *M. capillaris*. Les taux moyens de pénétration des larves du premier stade (L₁) ont été mesurés ; l'infestation des limaces a été appréciée au moyen de coupes histologiques ou de digestion pepsique. Les 100 premières heures de l'infestation ont été étudiées ; les lots ont été primo-infestés et d'autres ré-infestés.

Dans les primo-infestations, la réaction cellulaire apparaît très précocement. Un granulome est observé dans la majorité des cas (17/19) et ne semble pas avoir d'influence sur la larve. Les ré-infestations sont inefficaces ; la régulation de l'infestation dans ce cas dépend d'une régulation externe, antérieure à la pénétration de la larve L₁.

Mots-clés : Protostrongle. Nématode. Mollusque. Biologie.

The infection of the slug *Deroceras reticulatum* by the Protostrongylid nematode, *Muellerius capillaris*: aspects of early reactions.

SUMMARY. Forty juveniles of *D. reticulatum* were infected by *M. capillaris*. The average rate of penetration of the first-stage larvae was measured; the actual infection of slugs was estimated either by the examination of histological sections or by pepsic digestion. The first 100 h post infection were considered; primarily or re-infected groups were investigated.

In prime infection the cellular reaction occurred very early. A granuloma was observed in most cases (17/19) and did not seem to exert any influence on the larvae. The re-infection were ineffective; the regulation of infection in that case depended on external regulation, prior to penetration.

Key-words : Protostrongylid. Nematoda. Mollusk. Biology.

Introduction

Les Protostrongles sont des Nématodes parasites des petits Ruminants domestiques et du Chamois. Le cycle comprend un gastéropode terrestre comme hôte intermédiaire. Ce dernier s'infeste par contact avec des larves du premier stade (L₁)

* I. N. R. A., Station de Pathologie aviaire et de Parasitologie, Unité d'Écologie Parasitaire, F 37380 Monnaie.

** U. F. R., Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Animale, Université d'Orléans, B. P. 6759, F 45067 Orléans Cedex.

Accepté le 3 juin 1986.

émises dans les fèces des hôtes définitifs. Après pénétration des L_1 dans la sole pédieuse, celles-ci vont subir deux mues et aboutir au stade L_3 infestant pour l'hôte définitif Vertébré.

La régulation de l'infestation par les Mollusques peut s'exercer soit au moment de la pénétration des L_1 (ou juste avant celle-ci), soit au cours de l'évolution postérieure à cette pénétration (Cabaret et Dakkak, 1979 ; Cabaret, 1979 ; Urban, 1980 ; Cabaret, 1982). Nous qualifions le premier type de régulation externe et le second de régulation interne. La première modalité semble être quantitativement très importante (Cabaret, 1982). La régulation au sein du Mollusque n'est cependant pas négligeable : 20 à 50 % des larves meurent au cours de l'évolution du stade L_1 au stade L_3 (Cabaret, 1979). Cette partie de la régulation de l'infestation a été très peu étudiée par l'histologie classique : sur un fond bibliographique de plus de 600 références (de 1889 à 1980), concernant les Protostrongles, seulement quatre traitent de la réaction du Mollusque.

La majorité des travaux sont relatifs aux primo-infestations. Il a été montré que les ré-infestations effectuées à intervalle court (de l'ordre de quelques jours) sont d'efficacité réduite à nulle (Sauerländer, 1979 ; Cabaret, 1984) ; il s'agit du phénomène de limitation. Aucune information n'est disponible sur la réaction interne des gastéropodes en cours des ré-infestations.

L'objet du présent travail est d'apprécier pour un même niveau de régulation externe les réactions d'une limace, *Deroceras reticulatum*, à une primo-infestation ou à une ré-infestation au cours des premières heures, ceci au moyen de l'histologie classique.

Matériel et méthodes

L'infestation des limaces

Les exemplaires de *D. reticulatum* sont récoltés à l'état juvénile, en Mai, sur un jardin indemne de toute contamination. Les larves de *Muellerius capillaris* sont extraites des fèces d'une chèvre infestée expérimentalement et maintenues 8 jours à $+ 4^\circ \text{C}$ après leur extraction. La dose infestante est de 120 L_1 /Mollusque ; les infestations sont réalisées par groupe de cinq hôtes intermédiaires. Les conditions d'infestation et l'entretien des Mollusques ont été décrits par ailleurs (Cabaret et Dakkak, 1979).

Protocole expérimental

Les modalités sont présentées dans le *tableau I* ; chaque lot concerne cinq individus.

Les digestions pepsiques sont réalisées plus tardivement ($J + 15$) afin d'obtenir une bonne estimation du parasitisme par cette méthode. Pour chaque lot, le taux de pénétration apparente des L_1 est calculé comme suit : (nombre initial — nombre restant après infestation)/nombre initial.

TABLEAU I. — Protocole expérimental.

Lots	Primo-infestation	Durée d'évolution	Ré-infestation	Durée d'évolution	Traitements
I	+	3 h	0	0	H*
II	+	16 h	0	0	H
III	+	100 h	0	0	H
IV	+	16 h	+	16 h	H
V	+	100 h	+	16 h	H
VI	0	0	0	0	H
VII	0	0	0	0	D**
VIII	+	15 j	0	0	D
IX	+	16 h	+	15 j	D
X	+	100 h	+	15 j	D

* H : histologie.
 ** D : digestion pepsique.

Techniques histologiques

Les Mollusques sont fixés au Bouin Hollande à 20° C pendant 6 h puis à 4° C pendant 4 jours. Les pièces fixées sont ensuite déshydratées, incluses en paraffine, coupées à 5 ou 6 μ m d'épaisseur. Les coupes sériées d'au moins la moitié de chaque individu sont colorées à l'éosine-bleu de toluidine.

Des mensurations à la chambre claire et des microphotographies ont permis de compléter les observations.

Résultats

Taux de pénétration apparente (tableau II)

Ils varient peu, qu'il s'agisse de primo- ou de ré-infestations (93 ± 2 % contre 95 ± 1 %).

Estimation des infestations

Aucune larve n'est retrouvée dans les lots témoins, examinés histologiquement ou après digestion pepsique. Avec cette dernière technique, les infestations moyennes sont respectivement de $0,4 \pm 0,4$; $0,4 \pm 0,2$ et $0,2 \pm 0,2$ larve pour les lots VIII, IX, X. Le nombre maximal de larves chez un individu est de deux. L'infestation déterminée à partir des coupes histologiques est de 0,8 ; 0,6 ; 1,0 ; 0,8 ; 0,6 larve en moyenne pour les lots I, II, III, IV, V. Le nombre maximal de larves est de 3 (lot primo-infesté).

TABLEAU II. — Taux de pénétration apparente.

Lots	Primo-infestations	Ré-infestations
I	93	—
II	87	—
III	90	—
IV	92	97
V	95	95
VIII	93	94
IX	87	94
X	94	95

Localisation du parasite et mensurations du granulome

Le parasite pénètre parfois très peu profondément (*fig. 1*) mais en règle générale la membrane basale est très largement franchie (*fig. 2*). Aucune larve n'a été rencontrée dans l'intestin, le rein, le cœur, l'appareil génital ou le système nerveux.

Les mesures concernant la profondeur de pénétration, le diamètre du parasite et la taille du granulome selon les lots, sont présentées dans le *tableau III*. Il n'y a pas de différences significatives entre les lots pour les deux premiers paramètres. Le granulome est significativement plus gros dans le lot I et plus réduit dans le groupe 2. Dans deux cas sur 19, il n'y a pas formation de granulome (*fig. 3*).

FIG. 1. — Granulome en position superficielle (3 h post-primo-infestation).

C : cellules ciliées
 cm : cellules muqueuses
 mb : membrane basale
 L₁ : larve L₁

} de l'épithélium

FIG. 2. — Granulome en position profonde (3 h post-primo-infestation).

G : granulome
 L₁ : larve L₁

FIG. 3. — Larve L₁ non incluse dans un granulome (16 h post-infestation).

cm : cellule muqueuse caliciforme
 fm : fibre musculaire
 L₁ : larve L₁

FIG. 4. — Granulome dense (lot ré-infesté 100 h).

a₁ : amœbocyte à noyau plus colorable
 a₂ : amœbocyte à petit noyau pâle
 f : cellules ressemblant à des fibroblastes
 fc : fibres collagène
 L₁ : larve L₁
 m : mucocyte

FIG. 1, 2, 3 et 4

TABLEAU III. — Localisation du parasite et mensurations du granulome réactionnel (μm).

Lots	Profondeur de pénétration	Diamètre maximal de la larve	Granulome*
I	180 (11-495)	14,5 (8-13)	64,3 (31-110)
II	123 (94-175)	11,6 (8-19)	5,3 (1-14)
III	364 (152-935)	12,5 (7-19)	18,3 (7-37)
IV	129 (54-243)	10,2 (8-13)	18,2 (8-32)
V	94	8,5 (5-10)	15,4 (11-20)

* Surface en 10^{-3} mm^2 .

Nature cellulaire du granulome

Trois types cellulaires sont rencontrés :

- des grosses cellules à noyau rond très important, contenant beaucoup de chromatine et de nombreux nucléoles petits,
- des cellules plus petites, dont le noyau est moins colorable et le cytoplasme très clair,
- des cellules ressemblant à des fibroblastes, à noyau allongé, et situées au bord du granulome.

Des fibres de collagène entourent l'ensemble en cercles concentriques. Le granulome est situé dans la majorité des cas à proximité de mucocytes. Les différents aspects de la structure sont représentés sur les *figures 4 et 5*.

Certaines tendances apparaissent selon les lots :

- en début de primo-infestation (3 h), les cellules sont nombreuses et homogènes,
- les cellules en fin de primo-infestation (100 h) ou en ré-infestation sont plus diversifiées (présence des trois types),
- la structure du granulome tend à se relâcher lors des ré-infestations (*fig. 6*).

Discussion

Trois points feront l'objet de la discussion : l'intensité respective de la régulation externe et interne, l'évolution de la réaction du mollusque au cours d'une primo-infestation et enfin l'efficacité des ré-infestations.

FIG. 5. — Larve L_1 au sein d'un granulome (primo-infestation 100 h).

ci : cellules intestinales
fm : fibre musculaire
œ : œsophage

FIG. 6. — Relâchement des structures du granulome lors de réinfestations.

L_1 : larve L_1
 a_1 : amœbocyte à noyau plus colorable
 a_2 : amœbocyte à petit noyau

Il existe une disparité très importante entre les taux apparents de pénétration et l'intensité de l'infestation mesurée par les deux techniques. Ainsi de 87 à 97 % des 120 larves initiales semblent pénétrer et pourtant seulement 3 larves au maximum s'installent chez les limaces. Des résultats similaires ont été obtenus par Morrondo-Pelayo *et al.* (1980), tant pour *M. capillaris* que pour *Neostromylus linearis* chez plusieurs espèces de *Cerutuella* (Helicidae). Le pouvoir lytique des sécrétions contenues dans le mucus rendent compte en partie de cette disparité (Cabaret, 1983) : pour un autre Hélicidé, *Theba pisana*, cette lyse peut concerner

jusqu'à 57 % des larves. Étant donné l'importance quantitative de la régulation externe, il serait intéressant d'en préciser les mécanismes.

L'évolution de la réaction de l'hôte au cours de primo-infestation a déjà été étudiée par Zmoray *et al.* (1969) ou Sauerländer (1979) pour *M. capillaris* chez deux espèces de *Cepaea* ou pour *N. linearis* chez deux *Cerņuella* (Marcos-Martinez, 1975). L'évolution est peu différente chez *D. reticulatum*. Elle se caractérise par sa rapidité :

- formation d'un granulome au cours des trois premières heures après l'infestation au lieu de 5 h chez *Cepaea* ;
- apparition de fibroblastes plus précoce.

Les dimensions de la larve L₁ sont en accord avec celles de *M. capillaris* chez *Trichia hispida* (Beresford-Jones, 1966) ou chez *Deroceras agreste* (Rose, 1957).

Les ré-infestations sont inefficaces. Ainsi, les examens histologiques ou ceux réalisés après digestion pepsique indiquent que le nombre de larves des lots infestés une seule ou deux fois est très semblable. Les valeurs des diamètres des larves montrent également qu'elles sont très peu différentes alors que dans les lots réinfestés, celles-ci auraient soit 16 h ou soit 116 h d'âge. Il en est de même en ce qui concerne les granulomes : aucune différence significative n'est enregistrée. Les larves mises en évidence dans les lots ré-infestés ne sont que les larves issues de la primo-infestation. Le phénomène de limitation lors d'infestations à intervalle court (Cabaret, 1984) existe également chez la limace *D. reticulatum* et semble donc être très général. Cette limitation pourrait s'exercer soit par voie externe, soit par voie interne. L'examen des coupes histologiques montre que la régulation ne se fait pas au niveau interne (absence de nouvelles larves) et l'augmentation légère du taux de pénétration apparente pourrait être liée à l'accroissement du pouvoir lytique des sécrétions des mollusques infestés.

BIBLIOGRAPHIE

- BERESFORD-JONES W. P. : Observations on *Muellerius capillaris*. I. The bionomics and development in *Trichia hispida* of larvae obtained from sheep grazed on permanent pasture. *Res. Vel. Sci.*, 1966, 7, 61-66.
- CABARET J. : Réceptivité expérimentale à l'infestation par les larves de Protostrongylidés de quelques Hélicidés fréquents au Maroc. Facteurs de variation. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1979, 54, 475-482.
- CABARET J. : Polymorphisme de *Euparypha pisana* et réceptivité à l'infestation par les Protostrongylidés. *Malacologia*, 1982, 22, 49-50.
- CABARET J. : The polymorphism of shell ornamentation of three helicids and susceptibility to Protostrongylid infection. *J. Moll. Stud.*, 1983, *Suppl. 12 A*, 6-9.
- CABARET J. : Les réinfestations des mollusques par les Protostrongles : Phénomènes de limitation et de facilitation. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1984, 59, 369-378.
- CABARET J., DAKKAK A. : Infestation expérimentale de *Cochlicella ventricosa* par des larves L₁ de Protostrongylidés. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1979, 54, 57-64.

- MARCOS-MARTINEZ R. : Histopatología de las relaciones *Neostrongylus linearis*-*Ceratomyxa cespitum* arizonensis y *C. virgata* en infestación experimental. *Ann. Fac. Vet. León*, 1975, 21, 103-174.
- MORRONGO-PELAYO P., CORDERO DEL CAMPILLO M., DIEZ-BANOS P., MANGA-GONZALEZ Y. : Infestación experimental de tres *Ceratomyxa* spp. con larvas de *Muellerius capillaris* y *Neostrongylus linearis*. *Ann. Fac. Vet. León*, 1980, 26, 107-123.
- ROSE J. H. : Observation on the larval stages of *Muellerius capillaris* within the intermediate hosts *Agriolimax agrestis* and *A. reticulatus*. *J. Helm.*, 1957, 31, 1-16.
- SAUERLANDER R. : *Cepaea nemoralis* als experimenteller Zwischenwirt für *Muellerius capillaris*. *Z. Parasitenkd.*, 1979, 59, 53-66.
- URBAN E. : Studies on lung nematodes in sheep of the Podhale region, Tatra Highlands. II. Intermediate hosts of Protostrongylids. *Acta Parasitol. Pol.*, 1980, 27, 63-74.
- ZMORAY I., SVARC R., LESTAN P. : Localisation der Larven von *Muellerius capillaris* in den Geweben des Zwischenwirts *Cepaea vindobonensis*. *Biologia, Bratislava*, 1969, 24, 113-128.
-