

ETUDE EXPERIMENTALE D'UNE SOUCHE MALGACHE DE *Schistosoma haematobium*: COMPATIBILITE AVEC DIFFERENTS BULINS, HOTES INTERMEDIAIRES POTENTIELS

— RAVAOALIMALALA V.A. —

RESUME

Une approche expérimentale consistant à comparer les dynamiques d'infection de mollusques du genre *Bulinus* a été réalisée au laboratoire avec une souche malgache de référence de *Schistosoma haematobium*. Les résultats de cette investigation confirme le rôle de *Bulinus obtusispira* comme hôte intermédiaire à Madagascar, mais n'exclue pas la possibilité d'une intervention d'autres espèces de bulins dans certains foyers de bilharziose urinaire.

Mots-clés : Schistosomiase urinaire- *Schistosoma haematobium*- *Bulinus obtusispira*- Madagascar.

SUMMARY

Experimental investigation on a malagasy strain of *S. haematobium*: compatibility with different *Bulinus* snails, potential intermediate hosts. A comparative experimental study of the infectivity of different *Bulinus* snails by a reference *S. haematobium* strain was made under laboratory conditions. The results support the role of *Bulinus obtusispira* as an intermediate host in Madagascar but some other *Bulinus* species could exist and play a role in the fields far away from the experimental criteria here described.

Key-words : Urinary schistosomiasis- *Schistosoma haematobium*- *Bulinus obtusispira*- Madagascar.

INTRODUCTION

L'hématurie liée à la bilharziose urinaire est connue depuis le XVII^{ème} siècle à Madagascar, où elle était décrite comme «pissement de sang» par les médecins de l'époque. Mais ce n'est qu'à partir de 1935 que l'on a réellement commencé à étudier la maladie liée à *Schistosoma* (*S.*) *haematobium* sur la côte Ouest (13). Les mollusques hôtes intermédiaires probables sont alors identifiés comme deux espèces voisines: *Bulinus* (*B.*) *forskalii* et *B. liratus*. Il faut attendre 1965 et les travaux de BRYGOO à l'Institut Pasteur pour aboutir à une identification spécifique plus précise (2, 3).

Si *B. forskalii* s. s., déjà identifié dans différents territoires africains, est bien un hôte intermédiaire reconnu au laboratoire pour *S. haematobium*, d'autres espèces et notamment *B. liratus* s. l. sont suspectées de jouer le même rôle dans la nature (2). En 1965, les critères de la radula permettent de distinguer morphologiquement *B. liratus* s. s., espèce commune sur les hauts plateaux, et *B. obtusispira*, hôte intermédiaire reconnu de *S. haematobium* dans le foyer de Mahajanga. Cette dernière espèce est considérée par certains comme le seul hôte intermédiaire de *S. haematobium* à Madagascar, mais d'autres espèces pourraient jouer

le même rôle dans certains foyers. Le présent travail, réalisé en partie lors d'un stage scientifique réalisé en 1988 à la Faculté de Médecine Broussais (Paris, Directeur: H. PICOT), nous a permis de mieux connaître les relations entre notre souche de référence (souche de *S. haematobium* isolée à partir d'un malade de Mahajanga et entretenue au laboratoire) et plusieurs espèces de bulins dont le statut d'hôte intermédiaire a été démontré dans différents foyers africains. Dans notre expérimentation, seul *B. obtusispira* a émis des cercaires de *S. haematobium*, dont l'identification a pu être vérifiée par chétotaxie et étude ultrastructurale du tégument (13). Cette approche expérimentale préliminaire n'exclut cependant pas que d'autres espèces de mollusques, notamment *B. globosus*, *B. forskalii* et enfin *B. truncatus*, interviennent localement dans la transmission de l'agent de la bilharziose urinaire.

MATERIEL ET METHODES

La souche de parasite

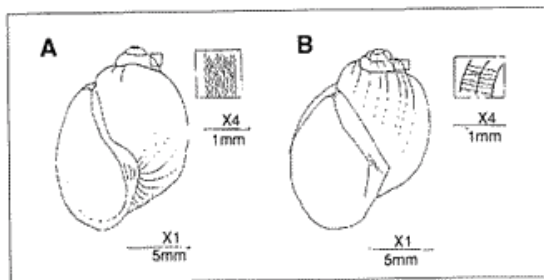
Elle provient d'un malade de 18 ans infesté à Soalala, dans la province de Mahajanga. A partir des oeufs émis dans les urines, onze bulins furent infestés à l'Institut Pasteur de Madagascar en 1987 et envoyés à Paris, où seulement trois émirent des cercaires.

*Laboratoire Central Bilharziose-Cysticerose, DLMT (Ministère de la Santé) Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274, Antananarivo 101

Les espèces de mollusques

Les *B. obtusispira* ont été récoltés à Ambilobe et entretenus au laboratoire, à l'Institut Pasteur. L'identification précise a été réalisée par l'examen des microsculptures de la coquille, fines et ondulées, qui distinguent cette espèce du *B. liratus* voisin (Figure 1). Nous avons également recueilli des mollusques des espèces *B. forskalii* (du groupe taxonomique «*B. forskalii*»), *B. truncatus rohlsi* et *B. guerni* (du groupe «*B. truncatus/tropicus*») et enfin *B. globosus* (du groupe «*B. africanus*»).

Figure 1 : Coquille de *Bulinus obtusispira* (A) et de *Bulinus liratus* (B)



Elevage des mollusques et technique d'infestation au laboratoire

Les mollusques de l'espèce *B. obtusispira* furent installés en aquarium, à raison de 150 ml d'eau de source par animal, dans une étuve (25°-30°C) éclairée. La conductivité de l'eau, de 440 à 500 µohms (5), est quotidiennement surveillée. La nourriture est constituée de feuille de laitue séchée. Trois cohortes d'une quinzaine de mollusques furent utilisées pour étudier les tables de survie.

Pour les autres espèces de bulins, les conditions d'élevage étaient légèrement différentes : température ambiante, conductivité à 300 µohms, nourriture à base de laitue crue ou cuite (13). Les oeufs contenant les miracidiums proviennent des foies d'animaux infestés au laboratoire. Après un fin broyage et plusieurs lavages en eau physiologique, le liquide est placé sur une plaque chauffante (+ 30°C) éclairée par une lampe (60 W). L'éclosion des oeufs intervient en une heure environ. Les miracidiums sont récoltés et placés en présence des mollusques, à raison de 2 à 4 par bulin, pendant 16 heures.

Technique d'émission des cercaires

Elle s'effectue dans les mêmes conditions que l'éclosion des oeufs (+ 30°C sous lampe 60 W) et demande de 30 à 60 minutes. Les cercaires émises servent à leur tour à infester, par balnéation, les animaux de laboratoire.

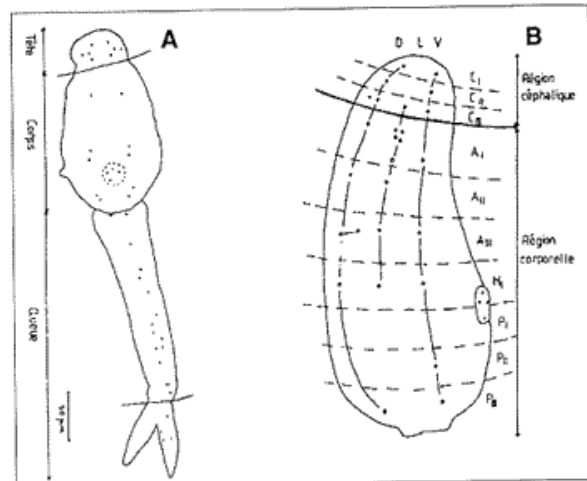
Etude chétotaxique des cercaires

Les cercaires vivantes sont plongées dans une solution de nitrate d'argent à 2% puis exposées aux UV avant lavage en eau bidistillée et montage en gomme au chloral (4). Différents indices chétotaxiques peuvent être calculés à partir des

distances entre certains types de papilles sensorielles, fortement colorées par l'imprégnation argentique (Figure 2). L'indice AD notamment a une haute valeur spécifique (1).

Figure 2 : Les papilles sensorielles d'une cercaire de *S. haematobium*. Face ventrale (A) et vue latérale (B) : papilles D = dorsales, L = latérales et V = ventrales.

$$\text{Indice AD} = \frac{\text{distance interpapilles } A_{II}D - A_{III}D}{\text{distance interpapilles } A_{II}D - A_{III}D}$$



Etude ultrastructurale des téguments parasites, après infestation de rongeurs de laboratoire

Différents rongeurs de laboratoire furent infestés par balnéation, pour être sacrifiés après 90 à 130 jours. Les vers adultes sont recueillis par perfusion hépatique, le foie ayant généralement un aspect granulomateux caractéristique. L'aspect des téguments des vers mâles adultes fut ensuite observé en microscopie électronique. Furent étudiés le hamster, *Mesocricetus auratus*, la souris de laboratoire, *Mus musculus*, le mériion du désert, *Meriones shawi*, et un petit rongeur forestier amazonien, *Holochilus braziliensis*. Rappelons que ce dernier est un hôte définitif naturel de *S. mansoni* au Brésil (10, 15).

RESULTATS

Table de survie (*Bulinus obtusispira*):

Les différents paramètres de survie furent facilement obtenus pour l'espèce *B. obtusispira*, avec une croissance assez régulière (environ 0,5 mm/sem) jusqu'à 12 semaines (Figure 3) qui se stabilise ensuite, et un maximum de pontes entre 8 et 14 semaines (Figure 4). Le meilleur résultat a été obtenu avec la cohorte B, dont la durée moyenne de survie a été de 225 jours. Nous avons rencontré une forte mortalité dans l'élevage des autres espè-

ces de bulins, à l'exception de *B. guernei* (Tableau I), ce qui nous a empêché de compléter nos données pour ces espèces.

Figure 3 : Croissance de *Bulinus obtusispira*

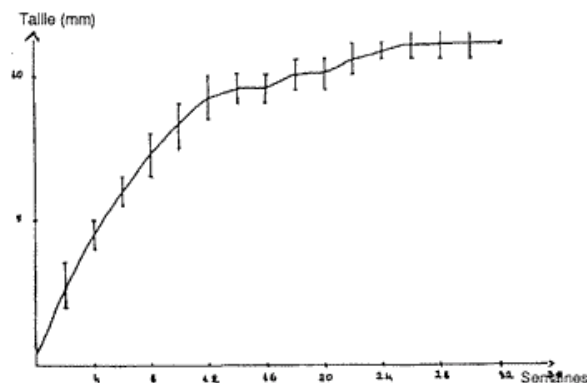
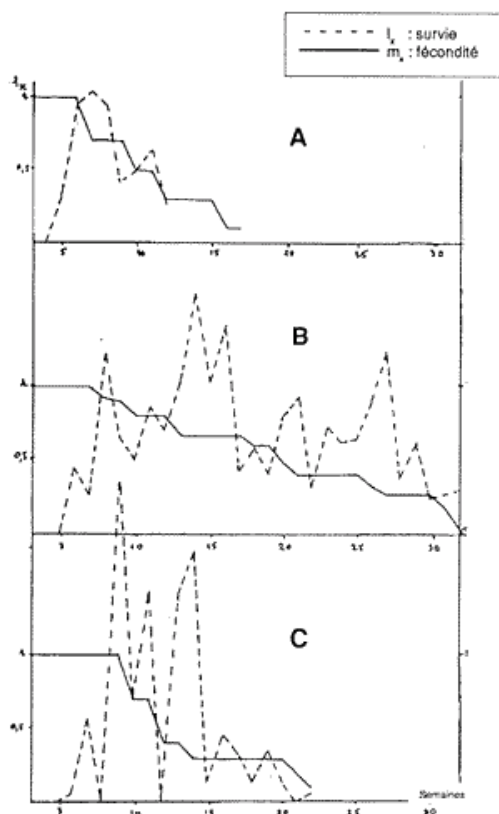


Figure 4 : Tables de survie des trois cohortes à 25-30°C (A) et 28-30°C (B et C)



Taux d'infestation des mollusques

Malgré une forte mortalité le premier mois d'infestation (TABLEAU I), le taux d'infection des *B. obtusispira* a été satisfaisant: 40,7 % de mollusques positifs à J30, 42,4 % de J45 à J75 (13). Les autres espèces de bulins n'ont émis aucun cercaire lors de notre expérimentation.

TABLEAU I : Taux de mortalité des mollusques étudiés

Mollusques	Taux de mortalité (%)			
	J30	J45	J60	J75
<i>B. obtusispira</i>	28,05	41,46	70,73	89,03
<i>B. forskalii</i>	83,33	96,67	100	100
<i>B. truncatus rohlfsi</i>	85	90	100	100
<i>B. guernei</i>	5	15	30	50
<i>B. globosus</i>	20	30	50	50

Données chétotaxiques

88 cercaires furent traitées par imprégnation argentique et dessinées au microscope à chambre claire. Leurs indices chétotaxiques (données non présentées) permirent d'identifier sans doute *S. haematobium* (13).

Morphologie ultrastructurale des téguments parasitaires

Nous n'avons pas observé, comme avec *S. mansoni* et *S. bovis*, de différences très marquées au niveau ultrastructural entre les téguments des schistosomes adultes, en fonction de l'hôte définitif. Il semblerait que chez les hôtes permissifs, souris et hamster, les téguments ont des tubercules épineux complets alors que chez les hôtes considérés comme non-permissifs, rats domestiques ou sauvages, la maturation des téguments soit incomplète (13).

Infestation des animaux

Parmi les animaux infestés, c'est le rongeur sud-américain *Holochilus braziliensis* qui a donné le plus de vers adultes (53,3 % de cercaires évoluant complètement), cette espèce étant de loin la plus permissive à *S. haematobium* avec une émission d'oeufs dans les selles et les urines dès le 107ème jour d'infestation (13). Viennent ensuite le hamster (37,5 % de réussite), la souris blanche (17,5 %) et le méridien (17,1 %).

DISCUSSION

Dans leurs biotopes naturels, les bulins subissent d'importantes fluctuations saisonnières (5) car ils sont plus sensibles aux variations physico-chimiques du milieu que *Biomphalaria pfeifferi*, hôte intermédiaire de *S. mansoni* à Madagascar (12), et *Biomphalaria glabrata*. Dans son étude des rizières du Mangoky, Degrémont a bien mis en évidence l'effet des fortes pluies de début d'année (5). En abaissant la conductivité de l'eau, elles permettent une forte densité de *B. obtusispira* dans les rizières. Au contraire, lorsque les pluies diminuent, le niveau d'eau s'abaisse et la conductivité augmente empêchant une bonne reproduction pour cette espèce. Celle-ci finit par disparaître et être remplacée par *B. liratus*. L'importance écologique de ce phénomène

de variation de la conductivité de l'eau, déjà présentée par BRYGOO dans ses études sur la période de transmission de la maladie (3), se confirme au laboratoire où la ponte et l'éclosion s'interrompent lorsque la conductivité de l'eau descend en-dessous de 200 μohms (13). Les taux de reproduction et d'accroissement de la population notés ici pour *B. obtusispira* sont nettement inférieurs à ceux observés pour *Biomphalaria glabrata* (11) et *Biomphalaria pfeifferi*. Par contre, sa survie est supérieure. Seul *B. obtusispira* a pu être correctement étudié, montrant un fort taux d'infection dans nos conditions expérimentales, car la mortalité observée avec les autres espèces était trop élevée. Ceci est d'autant plus regrettable que *B. forskalii* en particulier a été soupçonné à plusieurs reprises de transmettre l'agent de la bilharziose urinaire à Madagascar (2). Nous avons par contre eu la surprise de mettre en évidence une réceptivité insoupçonnée du rongeur sauvage *Holochilus braziliensis*, alors que jusqu'à présent seule l'espèce *Saccostomus campestris* permettait l'entretien de *S. haematobium* au laboratoire (1). Ce «nouveau» modèle expérimental pour *S. haematobium*, facile d'élevage au laboratoire, est d'autant plus surprenant qu'il est en conditions naturelles un hôte définitif de *S. mansoni* (10, 15).

CONCLUSION

Cette approche expérimentale, encore préliminaire, nous a permis de définir les conditions d'élevage au laboratoire de *Bulinus obtusispira* et de son infection par une souche sympatrique de *S. haematobium*, identifiée par ailleurs à l'aide des indices chétotaxiques et de la morphologie ultrastructurale des téguments. Moins fécond mais vivant plus longtemps que les *Biomphalaria*, *B. obtusispira* se maintient aisément au laboratoire ce qui permet d'envisager de fructueux développements dans des projets de recherche complémentaires. Le rôle des autres bulins malgaches reste encore à préciser sur le terrain (dynamique de populations *in natura* (7, 14), périodicité et durée de transmission?) et au laboratoire (compatibilité avec la souche de référence, rythme d'émission des cercaires (8, 9), marqueurs de diversité génétique (6)).

REMERCIEMENTS

L'auteur tient à remercier le Docteur Ph. ESTERRE, Chef de Service de l'Unité de Parasitologie à l'Institut Pasteur de Madagascar, pour son aide à la rédaction de ce manuscrit et pour les intéressantes discussions lors des missions de

terrain. Nos remerciements également aux Docteurs Javid A. HASHMI et T.C. NCHINDA du programme spécial de formation PNUD-Banque Mondiale-OMS, grâce à qui nous avons pu réaliser ce stage dans les laboratoires du Docteur H. PICOT (Faculté de Médecine de Paris), et au professeur R. HOUIN, qui a bien voulu nous accueillir dans le cadre de maîtrise de Parasitologie (Faculté de Médecine de Créteil). Le présent travail a bénéficié d'une bourse OMS de formation à la Recherche.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ALBARET J.L., PICOTH., DIAWO T., BAYSSADE-DUFOUR C., VASSILIADES G., ADAMSON M., LUFFAU G., CHABAUD A. – Enquête sur les schistosomes de l'homme et du bétail au Sénégal, à l'aide des identifications spécifiques fournies par la chétotaxie des cercaires. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1985, **60** :417-434.
- 2- BRYGOO E.R., MOREAU J.P. – *Bulinus obtusispira*, hôte intermédiaire de la bilharziose à *Schistosoma haematobium* dans le Nord-Ouest de Madagascar. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1966, **59** :835-839.
- 3- BRYGOO E.R. – La température et la répartition des bilharzioses humaines à Madagascar. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1967, **60** :433-441.
- 4- COMBES C., BAYSSADE-DUFOUR C., CASSONE J. – Sur l'imprégnation et le montage des cercaires pour l'étude chétotaxique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1976, **51** :399-400.
- 5- DEGREMONT A.A. – Projet Mangoky de lutte contre les schistosomiasés dans le Bas-Mangoky (Madagascar). 1973, Institut Tropical Suisse, Bâle, 273 pp.
- 6- LANGAND J., BARRAL V., DELAY B., JOURDANE J. – Detection of genetic diversity within snail intermediate hosts of the genus *Bulinus* by using Random Amplified Polymorphic DNA markers (RAPDs). *Acta Tropica*, 1993, **55** :205-215.
- 7- MARTI H. – Field observations on the population dynamics of *Bulinus globosus*, the intermediate host of *Schistosoma haematobium* in the Ifakara area, Tanzania. *J Parasit.*, 1986, **72**:119-124.
- 8- MOUAHID A., MONE H., ARRU E., CHASSE J.L., THERON A., COMBES C. – Analyse comparative du rythme d'émission des cercaires de trois souches de *Schistosoma bovis*. *Parassitologia*, 1987, **29** :79-85.
- 9- PAGES J.R., THERON A. – Analysis and comparison of cercarial emergence rhythms of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum*, *S. bovis* and their hybrid progeny. *Internat. J. Parasitol.*, 1990, **20** :193-197.
- 10- PICOTH. – *Holochilus braziliensis* and *Nectomys squamipes* (Rodentia-Cricetidae), natural hosts of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1992, **87** :255-260.
- 11- POINTIER J.L. – Mollusque vecteur et schistosomiasé en Guadeloupe. Inventaire faunistique, études systématiques et écologiques des mollusques dulçaquicoles et du vecteur *Biomphalaria glabrata*. 1979, Thèse de Doctorat en Science, Paris, 1968 pp.

- 12- PFLUGER W. – Ecological studies in Madagascar of *Biomphalaria pfeifferi*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*.
1. Seasonal variations and epidemiological features in the endemic area of Ambositra. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 1976, **45**:79-114.
 2. Biology and dynamics in the non-endemic area of Antananarivo. *Arch. Inst. Pasteur de Madagascar*, 1977, **46**:241-269.
- 13- RAVAOALIMALALA V. – Contribution à l'étude expérimentale d'une souche malgache de *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1825): étude du parasite et de ses hôtes. Mémoire de Maîtrise de Parasitologie Générale, Faculté de Médecine, Paris 1988.
- 14- THERON A.– Cercariometry and the epidemiology of Schistosomiasis. *Parasitol. Today*, 1986, **2**: 61-63.
- 15- VEIGA-BORGEAUD T., LEMOS NETO R.C., PETER F., BASTOS O.C. – Constatações sobre a importância dos roedores silvestres (*Holochilus braziliensis*, Thomas 1897) na epidemiologia da esquistossomose mansônica propiamente dita da preamazônia, Maranhão, Brasil. *Cad. Pesqu. São Luís*, 1986, **2**: 86-99.
-