

a 63674

WHO/Ma.1/423
23 décembre 1963

ORIGINAL : ANGLAIS

FORMATION DE LA MEMBRANE PERITROPHIQUE CHEZ CERTAINS CULICINES
ET PROCESSUS CYTOLOGIQUES QUI S'Y RAPPORTENT¹
(Communication préliminaire)

par

Thierry A. Freyvogel, Institut tropical suisse, et
Willy Stäubli, Laboratoires de Recherches, Division pharmaceutique
de CIBA* Limited et Laboratoires d'Electromicroscopie, Université de Bâle

INTRODUCTION

Les travaux dont il est rendu compte ci-après se sont fondés sur l'hypothèse de travail suivante : les espèces d'Anopheles pourvues d'une membrane péritrophique (MP) qui se solidifie rapidement ne seraient guère propres à transmettre les plasmodia mais, par contre, les variétés chez lesquelles la MP se solidifie lentement, si tant est qu'elle se solidifie, y seraient éminemment propres. A titre de première mesure destinée à vérifier cette hypothèse, nous nous sommes proposés de déterminer aussi exactement que possible quelle était la structure de la MP, le moment où elle se formait à la suite du repas de sang du moustique, et son mode de formation. En principe, on a eu recours à trois techniques - la dissection de l'intestin, la préparation de spécimens histologiques et l'examen sous microscope électronique - qui toutes ont été mises en oeuvre à divers intervalles après que les moustiques eussent ingéré un repas de sang.

¹ Cette étude bénéficie en partie de l'aide de l'Organisation mondiale de la Santé.

1. MATERIEL ET TECHNIQUES

Les travaux ont porté notamment sur Anopheles gambiae, A. stephensi, A. maculipennis atroparvus et, aux fins de comparaison, sur Aedes aegypti; tous ces anophèles avaient été élevés à l'Institut tropical suisse (température de 26°C et humidité relative de 85 %). On a nourri ces moustiques principalement sur des cobayes et des singes rhésus mais aussi, dans certains cas, sur des poulets et des êtres humains.

On a isolé en soluté physiologique ou en solution de Ringer la partie postérieure du segment de l'intestin moyen (estomac) après avoir tué rapidement le moustique par des vapeurs d'éther ou de chloroforme. La paroi intestinale et, le cas échéant, la MP ont été séparées du contenu sanguin à l'aide de petites pinces entomologiques et de fines aiguilles de verre, puis ont été examinées sous microscope à contraste de phase.

On a préparé des coupes transversales et longitudinales. Le matériel frais a été fixé dans le liquide de Carnoy en vue de la préparation d'inclusions paraffiniques et de la coloration à l'azan.

Microscope électronique

Une solution froide tamponnée de tétraoxyde d'osmium à 2 % a été injectée dans le thorax des moustiques tués au chloroforme. Après 15 minutes, l'intestin a été prélevé par dissection et fixé pendant une heure encore avec le même liquide fixateur, puis on l'a enrobé dans l'Araldite ou le Vestopal, les coupes minces étant opacifiées au permanganate de potassium ou à l'hydroxyde de plomb, et des clichés ont été pris avec un Elmicope I Siemens.

2. RESULTATS

Il y a lieu de mentionner dès maintenant deux points : premièrement, il semble que le repas de sang soit digéré de la même manière, quelle que soit l'espèce d'hôte sur laquelle le moustique s'est nourri. Deuxièmement, l'âge de la femelle ne semble exercer aucune influence sur le processus de digestion du sang. Une expérience a montré que chez Aedes aegypti, il s'agit du premier, du deuxième ou du troisième repas de sang; ces repas étaient suivis de la formation de membranes d'un type analogue dans le même laps de temps.

2.1 Observations macroscopiques

Aedes aegypti

On a pu faire des observations de deux ordres sur un certain nombre de groupes d'épreuve nourris sur des cobayes. Le premier ordre d'observations concordait avec la description de Stohler (1957) : de quatre à sept heures après le repas de sang, on a observé une couche de matériel adhérent et visqueux entre l'épithélium intestinal et le sang coagulé; après neuf heures on a pu détacher une MP de plus en plus consistante. Vers la fin du processus digestif (soit après 42-54 heures) la MP a perdu de nouveau sa consistance. Enfin le résidu de la MP a été excrété à l'état liquide par voie anale ainsi que le reste du repas de sang.

On a pu faire en diverses occasions des constatations du second ordre et, dans chaque cas, le phénomène observé s'est produit simultanément chez tous les moustiques utilisés. Cinq heures seulement après le repas de sang, il a été possible de détacher la MP sous la forme d'une pellicule mince, transparente, incolore et quelque peu adhérente. Après neuf heures, cette pellicule a revêtu une teinte brunâtre et est devenue moins adhérente tandis qu'après douze heures, devenue flexible, elle présentait une résistance relative à la déchirure. Après 24 heures, on ne pouvait observer que des résidus de la MP sur le coagulum sanguin, bien que la digestion se poursuivît pendant environ 48 heures.

A cet égard, il importe de signaler que les cobayes utilisés ont également servi, le même jour, à nourrir les moustiques anophèles qui n'ont présenté aucune anomalie dans la digestion de leur repas sanguin, Il apparait dès lors que, chez A. aegypti, la formation et la dégradation de la MP peuvent demander plus ou moins de temps.

La MP d'Aedes aegypti peut être conservée intacte en soluté physiologique pendant quelques jours quel que soit l'âge du moustique.

Anopheles gambiae

C'est 12 heures, au plus tôt, après le repas de sang que la MP a pu être détachée. Il semble que cette membrane ait épaissi vers la fin du processus digestif (soit après 46 à 70 heures). Elle a persisté plusieurs heures de plus que le sang.

Cependant, elle a perdu quelque peu de sa consistance alors qu'elle était encore dans l'"estomac" et il semble qu'elle s'y soit décomposée aussi après digestion du sang. Toutefois, la MP d'Anopheles gambiae a toujours été plus mince que celle d'Aedes aegypti. En outre, elle se dissolvait invariablement, dans les deux ou trois heures, en solution physiologique.

Anopheles stephensi

La MP n'est apparue que 32 heures après le repas de sang. Après 48 heures, le segment postérieur paraissait toujours mince et ouvert à l'extrémité caudale. La MP a atteint sa plus grande consistance vers la fin du processus digestif après 56 à 60 heures, mais a été alors digérée aussi en même temps que les derniers restes de sang. De même que la MP d'Anopheles gambiae, elle se dissolvait, après un bref laps de temps, dans une solution aqueuse.

Anopheles maculipennis atroparvus

Bien que des quantités visibles à l'oeil nu, d'un liquide jaunâtre, transparent, légèrement visqueux se soient ajoutées dans le rostre au sang agglutiné, durant les toutes premières minutes qui suivaient le repas de sang, aucune MP ne s'est formée pendant toute la durée du processus digestif. Le microscope à contraste de phase a fait apparaître parfois des bandes d'un matériel rappelant celui qui avait été observé dans la MP des deux autres espèces d'anophèles étudiées. Toutefois, on n'a jamais observé de membrane entourant l'ensemble ou une forte proportion du sang ingéré. Cette observation contraste avec celle de Yagujinskaia (1940) qui, toutefois, a opéré sur A. maculipennis messeana.

2.2 Observations microscopiques et sous-microscopiques

Moustiques affamés

Par moustiques affamés nous entendons des moustiques femelles qui n'ont pas ingéré de repas de sang pendant plus de trois jours. Dans la plupart des cas, ces femelles avaient ingéré antérieurement au moins un repas de sang. Leurs intestins étaient vides autant qu'on ait pu en juger; à tout le moins, ils ne contenaient pas de résidus d'un repas de sang antérieur ou d'une MP formée pendant la digestion de ce repas.

Aedes aegypti

On a constaté que l'épithélium intestinal consistait en des cellules typiques, en forme de colonnes, qui mesuraient 44-50 μ de hauteur et environ 10 μ de largeur. Les noyaux se discernaient nettement et leur diamètre allait jusqu'à 7-8 μ . Le cytoplasme apical contenait des granules qui ont pris une couleur légèrement orangée. Sur l'image du microscope électronique la cellule épithéliale d'appui était caractérisée par la présence de grands complexes de reticulum endoplasmique granuleux (RE) plus ou moins régulièrement disposés, qui correspondaient probablement aux granules orangés qu'on avait vus sous microscope optique. Ces complexes présentaient fréquemment un arrangement concentrique de cercles de RE et rappelaient l'aspect d'empreintes digitales. La membrane inférieure de la cellule, dont les invaginations faisaient fortement saillie dans le cytoplasme, formait, à proprement parler, un labyrinthe basal.

Anopheles gambiae, A. stephensi, et A. maculipennis atroparvus

Les légères différences observées dans l'épithélium intestinal de ces trois espèces d'Anopheles présentent, semble-t-il, peu d'importance dans le travail qui nous occupe. Nous avons donc groupé ces trois espèces sous une seule et même rubrique et nous les avons comparées avec Aedes aegypti. Les cellules épithéliales mesuraient 20-30 μ de hauteur et environ 7 μ de largeur. Les noyaux avaient à peu près les mêmes dimensions que chez Aedes aegypti. Les microvillosités formaient une couche régulière de 2 à 4 μ et recouvraient toutes les cellules épithéliales. Aux deux extrémités, apicale et proximale, le protoplasme semblait être disposé en "fils" longitudinaux très fins. Dans l'intervalle de ces "fils" et au-dessous, on observait de petites "vacuoles", c'est-à-dire des taches rondes incolores qui, chez Anopheles maculipennis atroparvus, atteignaient approximativement les mêmes dimensions que le noyau, présentaient des contours relativement accusés et contenaient, comme l'a montré l'examen sous microscope électronique, du glycogène en particules. La R E était d'une étendue notablement inférieure chez toutes les variétés d'Anopheles. Il est rare qu'on ait pu mettre en évidence des

"empreintes digitales" et, même lorsqu'on en a observé, elles consistaient simplement en quelques cercles granuleux disposés concentriquement. Chez les Anopheles, contrairement à Aedes aegypti, de nombreux granules mesurant 220-430 μ de diamètre ont été observés dans la partie apicale des cellules. En raison de leurs similitudes morphologiques avec les granules de sécrétion du pancréas, on les a considérés comme des granules de zymogène. Nous supposons que les diastases de la digestion, ou leurs précurseurs, sont emmagasinées dans ces corps. Chez les Anopheles également, on a trouvé un labyrinthe basal et latéral auquel il fallait apparemment attribuer la structure "filiforme" observée sous microscope optique.

Moustiques récemment alimentés

L'ingestion de sang a entraîné des changements marqués dans la paroi intestinale qui s'est considérablement distendue. La hauteur des cellules, mesurée dans les portions médianes de l'"estomac", s'est réduite à environ 4 μ chez Aedes aegypti et à environ 2 μ chez les diverses espèces d'Anopheles. Il a été difficile de déterminer la largeur des cellules car leurs limites étaient devenues à peine visibles, mais il semble qu'elle ait avoisiné 20 μ . Le noyau s'était adapté à la modification de forme de la cellule et se présentait comme un corps ovale aplati.

Dans le cas d'Aedes aegypti on n'a plus observé de granules orangés peu après que le sang eût pénétré dans l'intestin. Cette observation concorde avec les résultats obtenus sous microscope électronique. Sept minutes seulement au maximum après le repas de sang, les complexes hautement organisés de la R E avaient fait place à de nombreuses vésicules. En outre une bordure de couleur bleue est apparue entre la paroi intestinale et le coagulum sanguin, cette couleur étant particulièrement marquée vers les bords. Corrélativement à la destruction des empreintes digitales, un matériel granuleux, qui correspond probablement à la "bordure bleue" vue sous microscope électronique, est apparu entre les microvillosités de la bordure "en brosse". Nous estimons que cette bordure bleue est entièrement ou en partie un produit de sécrétion des cellules épithéliales.

Chez les moustiques Anopheles, les "vacuoles" que nous tenons pour identiques aux granules de zymogène ont disparu peu après le repas de sang. Sur l'image du microscope électronique, il n'a plus été possible d'observer de granules de zymogène dans la partie apicale du cytoplasme 90 minutes, au maximum, après que le sang ingéré eut pénétré dans l'intestin.

Résultats obtenus avec les divers types de moustiques au moment où la membrane péritrophique a atteint son plein développement

Aedes aegypti (24 heures après le repas de sang)

Sur la coupe intestinale, les cellules épithéliales semblaient présenter une forme cubique. Des vacuoles étaient visibles dans le protoplasme à la base du noyau.

La "bordure bleue" pouvait déjà être observée à une certaine distance de la bordure "en brosse". Elle paraissait nettement séparée des cellules épithéliales; d'autre part, il y avait, semble-t-il, une phase liquide de transition entre la "bordure bleue" et les érythrocytes avoisinants, à demi digérés. A ce stade de la digestion du sang, il est hors de doute que la "bordure bleue" représentait la membrane péritrophique. Elle se présentait sous forme d'une structure longitudinale dans certaines parties et n'avait pas plus de 10 μ . d'épaisseur. Parfois, elle contenait des corps d'inclusion qu'il a été impossible de définir d'une manière plus précise.

Anopheles gambiae (24 à 48 heures après le repas de sang)

Comme chez Aedes aegypti, la paroi intestinale était un peu moins tendue. Les cellules épithéliales étaient entièrement couvertes d'une bordure verticale "en brosse". Contrairement à ce que l'on a observé chez Aedes aegypti, il n'y avait pas de solution de continuité entre le centre du coagulum sanguin, contenant des érythrocytes à peine digérés, et l'extérieur de la bordure "en brosse"; à proximité des érythrocytes au centre, on a observé des érythrocytes qui étaient à demi dégradés et qui se sont résolus en une zone de membranes vides; cette zone contenait également, dans une certaine mesure, du matériel provenant de la bordure bleue.

Il faut présumer que, dans ce cas aussi, la bordure bleue représentait la M P Du matériel bleu granuleux, de forme et d'épaisseur très irrégulières, entourait le sang ingéré; sur certains points, il était directement relié à la bordure "en brosse" tandis que, sur d'autres, il était nettement séparé de cette bordure; certaines portions de sa périphérie étaient plus épaisses que d'autres, ce qui donnait l'impression d'une structure longitudinale, tandis que, ailleurs, le matériel se présentait comme un conglomérat flou et détaché.

Anopheles stephensi

Les conclusions relatives à A. stephensi ont été analogues, à cette exception près, bien entendu, que - comme il a été indiqué - la membrane péritrophique n'est apparue que plus tard et que l'aspect de cette membrane était plus clairement identifiable sur les coupes préparées 48 heures après le repas de sang. Bien qu'il soit apparu également sous forme granuleuse, le matériel de la "bordure bleue" s'est condensé autour du sang ingéré, de sorte que, sur la coupe, il constituait une bande clairement délimitée. On a observé, sur certains points, une sorte de structure longitudinale. La membrane s'est amincie vers son extrémité caudale et s'est dissoute dans le contenu amorphe de l'intestin.

Anopheles maculipennis atroparvus

La sécrétion du matériel de couleur bleue - en particulier vers les bords et aussi, dans une mesure un peu moindre, en direction caudale - a, semble-t-il, diminué après avoir atteint son maximum quelques minutes seulement après le repas de sang. Une demi-heure après, il ne semble pas que de nouvelles sécrétions se soient produites. Après une heure seulement, la sécrétion initiale ne recouvrait plus entièrement le contenu permanent de la portion médiane de l'"estomac". D'autre part, après deux heures, une couche d'un rouge très vif est apparue sous la "bordure bleue" qui la recouvrait; il n'est pas possible de donner présentement d'autres détails sur cette couche rouge. A tous autres égards, le processus digestif semblait s'être déroulé comme chez A. gambiae et A. stephensi.

Ces observations cadrent avec celles qui ont été enregistrées sur du matériel frais. A. maculipennis atroparvus ne présente pas de M P (même après ingestion d'un repas de sang).

Chez aucune des espèces étudiées, quelle que fût la variété observée, les images du microscope électronique n'ont révélé l'existence d'une membrane constituant une couche clairement délimitée entre la bordure "en brosse" et le coagulum sanguin. C'est seulement dans certains cas que nous avons observé un amas de matériel hautement concentré, semblable à celui qu'ont décrit Bertram & Bird (1961) comme étant une M P. En outre, les érythrocytes, dans le processus de dégradation, ont fréquemment avancé jusqu'à la bordure "en brosse" ou sont même parvenus à reposer directement sur les microvillosités. Ces deux observations semblent indiquer qu'il n'y a pas de M P continue, entourant le coagulum sanguin.

3. RESUME ET CONCLUSIONS PROVISOIRES

a) Il existe des différences fondamentales entre les cellules épithéliales du moyen intestin d'Aedes aegypti, d'une part, et celles des variétés d'Anopheles étudiées, d'autre part. Une différence essentielle est observée dans l'élaboration intracellulaire des diastases de la digestion. Chez Aedes aegypti, on observe des complexes de reticulum endoplasmique hautement développés, disposés concentriquement. Chez les Anopheles, ces complexes ne présentent guère d'importance mais, d'autre part, on observe des granules de zymogène.

- b) i) De même que chez Aedes aegypti, on observe également à l'oeil nu, après chaque repas de sang, une "membrane péritrophique" dans le moyen intestin d'Anopheles gambiae et d'A. stephensi.
- ii) On ne trouve pas de M P chez Anopheles maculipennis atroparvus.
- iii) La formation, la consolidation et la dégradation de la M P peuvent, chez Aedes aegypti, présenter des variations d'ordre chronologique.

iv) La M P d'Aedes aegypti est insoluble dans l'eau tandis que celles d'Anopheles gambiae et d'A. stephensi sont solubles, ce qui semble indiquer que les structures chimiques de ces membranes sont différentes.

c) Sous microscope, la M P n'apparaît pas habituellement comme clairement délimitée et, à cet égard, elle ne correspond pas nécessairement à ce que l'on entend généralement par le terme "membrane". Cette observation s'applique encore davantage aux images obtenues avec le microscope électronique, dans lesquelles il est souvent impossible de mettre en évidence une M P. La question se pose donc de savoir quelle est la nature réelle de la M P chez les diverses espèces de culicidés. A ce propos, il importe de tenir compte de deux ordres de contingences : l'intervention possible d'un artefact de manipulation - par exemple la polymérisation au cours de la dissection - ou une imperfection méthodologique, qui se reliait à la nature même du processus électronique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bertram, L. S. & Bird, R. G. (1961) Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 55, 404

Stohler, H. (1957) Acta trop. (Basel), 14, 302

Yagujinskaia, L. W. (1940) Med. Parazit. (Mosk.), 9, 601 et communication personnelle.

Le but des documents de la série WHO/Mal est le suivant :

- a) mettre le personnel de l'OMS, les instituts nationaux, les chercheurs et les travailleurs de la santé publique au courant de l'évolution des recherches sur le paludisme et des progrès de l'éradication du paludisme au moyen d'exposés succincts relatifs à quelques problèmes en cause;
- b) distribuer, aux catégories de lecteurs indiquées ci-dessus, les rapports d'opérations et autres communications qui présentent un intérêt particulier, mais qui ne sont pas normalement imprimés dans les publications de l'OMS;
- c) communiquer aux intéressés différents articles qui sont destinés à la publication mais qui, en raison de leur actualité, méritent d'être rapidement connus.

La parution d'un article dans cette série ne constitue donc pas une publication officielle et un tel article peut donc, avec l'accord de l'auteur et de l'OMS, être publié dans un périodique de l'OMS ou ailleurs.

Les articles signés n'engagent que leurs auteurs. La mention des manufactures et des produits commerciaux n'implique pas que ces maisons ou leurs produits soient recommandés ou approuvés par l'Organisation mondiale de la Santé de préférence à d'autres.