

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1998



Thèse n°

504,
1

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 2 mars 1998

par

Sabine LE GALLIARD

née le 11 juillet 1973 à Désertines (Allier)

LA PRODUCTION MÉTACERCARIENNE DE *Fasciola hepatica* Linné.
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE D'UNE POPULATION DE *Lymnaea*
truncatula Müller À FAIBLE DEGRÉ D'AMPHIBIOSE.



EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Madame BOSGIRAUD, Professeur Président
Madame VAREILLE-MOREL, Maître de Conférences Juge
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences Juge
Monsieur VIGNOLES, Maître de Conférences Juge
Monsieur VINCENT, Maître de Conférences Juge
Monsieur DUPRE, Maître de Stage Membre Invité

A notre Président de Thèse

Madame le Professeur C. BOSGIRAUD,
Service de Bactériologie-Virologie-
Parasitologie,

*Nous sommes très sensible à l'honneur
que vous nous avez fait en acceptant
de présider ce Jury de soutenance.*

*Nous vous exprimons notre gratitude
respectueuse pour les connaissances que
vous nous avez apportées tout au long
de notre cursus universitaire.*

*Veillez accepter l'expression
de notre profond respect.*

A notre Directeur de Thèse

Monsieur le Docteur G. DREYFUSS,
Maître de Conférences,
Service de Bactériologie-Virologie-
Parasitologie,

*Vous nous avez fait l'honneur
de diriger ce travail.*

*Nous vous remercions pour l'intérêt
que vous y avez porté.*

*Nous vous exprimons ici
notre gratitude respectueuse.*

A nos Juges

Madame le Dr. C. VAREILLE-MOREL,
Maître de Conférences

Service de Biologie Animale,
Faculté des Sciences de Limoges,

Monsieur le Dr. Ph. VIGNOLES,
Maître de Conférences,

Service de Biophysique-Informatique,
Faculté de Pharmacie de Limoges.

Monsieur le Dr. M. VINCENT,
Maître de conférences,

Service de Biologie Animale,
Faculté des Sciences de Limoges,

Chargé de Cours auprès de la
Faculté de Pharmacie de Limoges.

*Nous vous sommes très reconnaissante
d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Nous vous exprimons nos
sincères remerciements.*

A notre Maître de Stage,

Monsieur le Dr. J.J. DUPRE,
Pharmacien,

Guéret, Creuse.

*Nous avons été sensible à votre gentillesse
et à votre aide au cours de nos stages
dans votre officine.*

*Nous sommes honorée de votre participation
à ce Jury de soutenance.*

Nous vous en sommes très reconnaissante.

Nous adressons nos remerciements les plus vifs:

- à Mme le Dr. Ch. BAYSSADE-DUFOUR, du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris,

pour son aide dans la détermination des formes larvaires d'un Trématode,

- à M. le Dr. D. RONDELAUD, Laboratoire d'Histopathologie Parasitaire, Faculté de Médecine de Limoges,

pour son encadrement et son aide lors de la réalisation pratique du mémoire.

- à Melle M. ABROUS, Facultés de Pharmacie et de Médecine de Limoges,

- à M. D. AUGOT, Facultés de Pharmacie et de Médecine de Limoges,

- à M. L. ROUMIEUX, Faculté des Sciences de Limoges,

pour leur aide dans la partie expérimentale de ce travail.

Nous avons été sensible à votre disponibilité et à votre gentillesse tout au long de ces recherches. Nous vous sommes très redevable.

A ma famille,

*pour le soutien qu'elle a su
m'apporter tout au long de mes études.*

A mes amis.

A Michaël,

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE PREMIER: <i>Fasciola hepatica</i> et son cycle	4
I. - <i>Fasciola hepatica</i>	4
A. Présentation du parasite	4
B. Cycle évolutif	8
C. Les hôtes définitifs	10
D. Les hôtes intermédiaires	12
II. - La Limnée tronquée et sa biologie	14
A. Présentation du mollusque	14
B. Sa biologie	16
1. Les générations annuelles du mollusque	16
2. L'amphibiose du mollusque	18
C. Ses relations avec <i>F. hepatica</i>	20
1. Problèmes de terminologie	20
2. Les formes larvaires de <i>F. hepatica</i>	22
3. Productivité parasitaire	24
4. Variabilité interpopulationnelle	26
a). Les populations de <i>L. truncatula</i>	26

b). Les lignées de <i>F. hepatica</i>	28
III. - La production métacercarienne	30
A. Les techniques d'élevage pour <i>L. truncatula</i>	30
1. Les systèmes de maintenance	30
2. L'alimentation des mollusques	33
B. L'exposition aux miracidiums	35
C. Le recueil des métacercaires	35
IV. - Commentaires	36
CHAPITRE DEUXIÈME: La technique utilisée pour la production métacercarienne .	38
I. - La population de Limnées tronquées	38
A. Description du gîte	38
B. Problèmes d'identification	44
C. Caractéristiques des prélèvements dans cette station	45
II. - Les oeufs de <i>F. hepatica</i>	46
III. - Protocole expérimental	48
IV. - Autres données sur la méthodologie	49
A. La laitue	49
B. La contamination du milieu d'élevage par les animaux morts	50
C. L'isolement des survivants au 30 ^e jour	50
D. L'entretien du matériel d'élevage et d'exposition	52
V. - Paramètres étudiés	52
CHAPITRE TROISIÈME: Résultats	54
I. - Taux de survie et d'infestation	54
II. - Croissance des mollusques au cours de l'expérience	56
III. - Durées du développement larvaire	59
IV. - Les métacercaires de <i>F. hepatica</i>	61
A. Nombre total de parasites	61
B. Répartition des limnées infestées en fonction du nombre des métacercaires	64

- C. Répartition des métacercaires par rapport à la durée de la période d'émission 64
- CHAPITRE QUATRIÈME: Commentaires 66
- I. - Synthèse 66
- II. - Discussion 68
 - A. Les caractéristiques de l'infestation fasciolienne chez *L. truncatula* 68
 - 1. La survie du mollusque au 30^e jour d'expérience 68
 - 2. La prévalence de l'infestation parasitaire 69
 - 3. La production métacercarienne 71
 - B. La population de Courcelles peut-elle être retenue pour la production métacercarienne de *F. hepatica* ? 73
- RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES 74
- BIBLIOGRAPHIE 76

-oOo-

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La distomatose à *Fasciola hepatica* Linné, 1758, encore appelée fasciolose, affecte de nombreuses espèces de Mammifères, y compris l'homme (EUZEBY, 1971). En plus de cet hôte définitif, le cycle évolutif du parasite comporte un hôte intermédiaire, à savoir un mollusque d'eau douce qui assure le développement des formes larvaires. Dans l'Europe de l'Ouest, ce dernier hôte est la Limnée tronquée, laquelle répond au nom scientifique de *Lymnaea truncatula* Müller, 1774.

Du mollusque infesté, s'échappent des cercaires (stade larvaire mobile) qui nagent pendant quelques minutes et s'enkystent sur un support pour se transformer en métacercaires. Si ces dernières sont ingérées expérimentalement ou naturellement par un hôte définitif, le cycle parasitaire se poursuit. C'est la raison pour laquelle de nombreux auteurs pratiquent des infestations de Mammifères afin d'étudier l'effet d'anthelminthiques comme le triclabendazole, par exemple.

Ces infestations expérimentales nécessitent de nombreuses métacercaires. Aussi, de nombreux auteurs se sont-ils penchés sur ce problème pour trouver le procédé idéal pour élever les Limnées tronquées infestées et obtenir les parasites enkystés. Plusieurs systèmes de maintenance ont déjà été proposés par les auteurs pour élever *L. truncatula* afin d'obtenir une production maximale de métacercaires à partir des mollusques infestés. Parmi ceux-ci, citons les procédés décrits par SCHUMACHER (1938), KENDALL (1953), BORAY (1969),

SEVO (1973), PÉCHEUR (1974), OSBORN *et al.* (1982), HOURDIN *et al.* (1993), LEE *et al.* (1994). La multiplicité de ces systèmes s'explique par les deux points suivants:

- A l'inverse des autres espèces qui sont aquatiques, la Limnée tronquée est amphibie et vit le plus souvent à l'interface terre-eau, tout au moins lorsque les conditions sont favorables.

- Le mollusque est classiquement connu pour se nourrir d'algues unicellulaires qui poussent dans son habitat naturel.

Les difficultés liées à l'emploi de ces procédés sont de plusieurs ordres. La première est la nécessité d'un technicien pour assurer le suivi de ces systèmes de maintenance, ce qui alourdit les frais pour obtenir une production métacercarienne. La seconde repose sur les cultures d'algues qui servent à l'alimentation des limnées dans la plupart de ces procédés. Leur utilisation ne permet la croissance que d'un nombre limité de mollusques, à moins de disposer d'une installation de culture à grande échelle. Enfin, la production cercarienne importante rapportée par certains auteurs ne concerne qu'un nombre réduit de limnées.

Dans ces conditions, on peut se demander si les métacercaires de *F. hepatica* ne peuvent pas être obtenues à un moindre coût en utilisant la technique développée partiellement par RONDELAUD (1978) dans sa thèse. Même si la production cercarienne de chaque mollusque est largement inférieure aux chiffres rapportés par KENDALL (1949) ou encore par LEE *et al.* (1994), elle peut être compensée par le nombre de mollusques émettant des cercaires.

Cette question est à l'origine des expériences que nous avons réalisées dans ce mémoire de thèse. La problématique à l'origine de ce travail est la suivante:

- Peut-on élever la Limnée tronquée à l'aide d'un système simple de maintenance afin de minimiser les coûts relatifs à la maintenance du mollusque au laboratoire ?

- Peut-on trouver une population de *L. truncatula* possédant un faible degré d'amphibiose afin de limiter les sorties du mollusque hors de l'eau et, par suite, les pertes liées au dessèchement des animaux sur les zones émergées ?

- Quelle est la meilleure méthode pour obtenir une production maximale de métacercaires à l'aide du système simple de maintenance cité dans la première question ?

Afin de répondre à cette problématique, nous avons réalisé des expériences en soumettant diverses populations de *L. truncatula* aux miracidiums de *F. hepatica* et en étudiant les émissions cercariennes.

Le plan utilisé dans ce mémoire est le suivant:

- Le premier chapitre présente des rappels généraux sur le cycle du parasite, son hôte intermédiaire et les méthodes qui permettent d'élever ce dernier dans les conditions du laboratoire.

- Le deuxième chapitre détaille les caractéristiques des diverses stations d'où proviennent les Limnées tronquées. Il expose également le protocole des expériences, la méthodologie utilisée, les paramètres et les tests statistiques dont nous nous sommes servi au cours de cette étude.

- Le chapitre troisième regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenus au travers de ces essais.

- Enfin le chapitre quatrième compare nos données par rapport à celles de la littérature.

***Fasciola hepatica* ET SON CYCLE**

Le but de ce chapitre est de rappeler un certain nombre de termes techniques sur la fasciolose et son mollusque hôte.

Les deux premiers paragraphes sont consacrés à la présentation du Trématode et à celle de *L. truncatula*. Les deux derniers traitent des méthodes d'élevage pour cette limnée et de quelques commentaires personnels sur le sujet.

I. - *Fasciola hepatica*.

A. PRÉSENTATION DU PARASITE.

Les données présentées dans ce paragraphe proviennent des documents suivants: BRUMPT, 1936, 1949; EUZEBY, 1971; SOULSBY, 1982; SZMIDT-ADJIDÉ *et al.* (1996).

Ce parasite est classé dans les taxons suivants:

- Embranchement des Plathelmintha,
- Classe des Trematoda,
- Ordre des Echinostomida,
- Famille des Fasciolidae,
- Genre *Fasciola*,
- Espèce *hepatica* Linné, 1758.

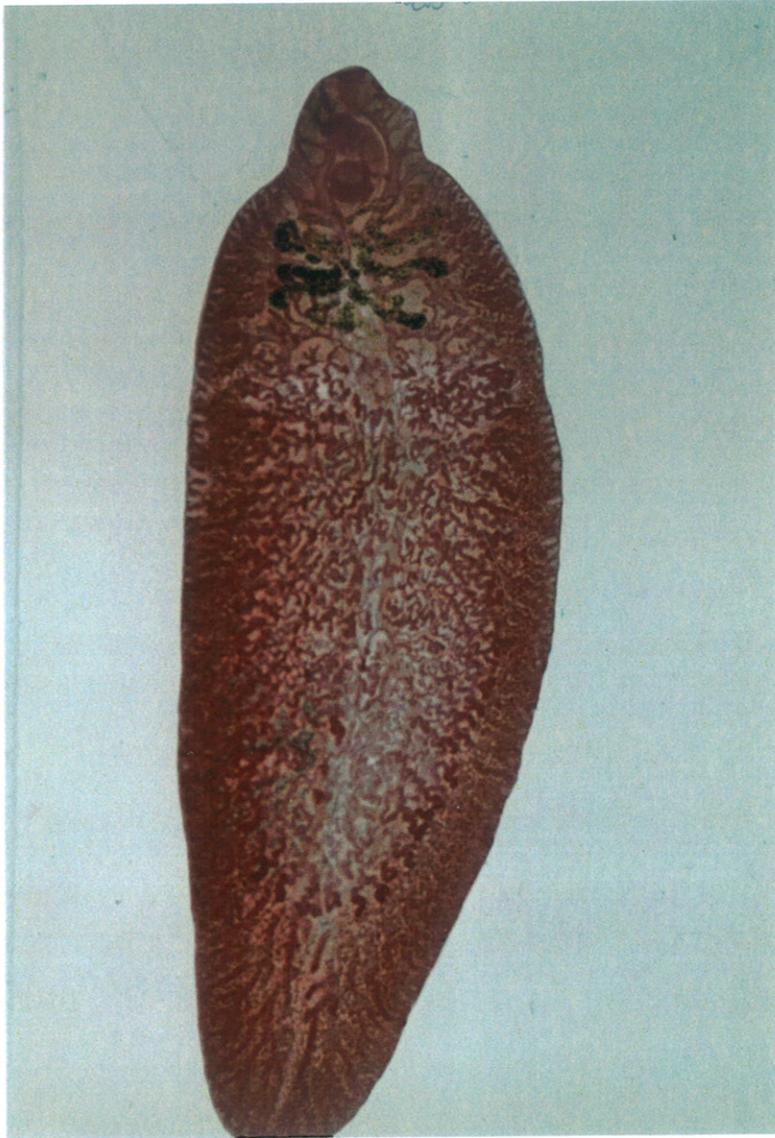


Planche A.
Fasciola hepatica adulte.
Crédit photo: M. DREYFUSS, Faculté
de Pharmacie, Université de Limoges.

La planche A montre une douve adulte colorée au carmin aluné. Sur ce spécimen, nous pouvons remarquer les éléments suivants:

- Mesurant 2 à 3 cm de hauteur sur 8 à 12 mm de largeur, le corps de l'adulte a une forme ovoïde et foliacée. Il possède deux élargissements scapulaires caractéristiques de l'espèce (flèche) et un cône céphalique triangulaire, long de quelques millimètres.

- Deux ventouses permettent à l'animal de se fixer aux parois des canaux biliaires chez l'hôte définitif. La plus antérieure est la ventouse orale, percée par la bouche en son centre. La seconde est la ventouse ventrale (ou postérieure) qui se situe à 3-5 millimètres de la première.

- Le système digestif n'est pas visible sur cette photographie. On distingue un pharynx court, se prolongeant par un oesophage et deux caecums aveugles qui vont jusqu'à l'extrémité postérieure de l'animal. Ces derniers présentent de nombreuses ramifications.

- Quant à l'appareil génital, il est connu pour avoir un ovaire unique situé sous la ventouse ventrale. Les deux testicules sont, par contre, situés l'un derrière l'autre. Ils sont ramifiés et se terminent chacun par un canal déférent, lequel s'ouvre dans le canal éjaculateur. Les glandes vitellogènes (colorées en brun sur la planche A) apportent les éléments nutritifs indispensables aux oeufs et se terminent par deux canaux qui rejoignent l'atrium génital.

- L'animal possède aussi un système excréteur avec des protonéphridies reliées à un canal excréteur, ainsi qu'un ganglion cérébroïde d'où partent des nerfs. Il n'y a pas d'appareils circulatoire et respiratoire.

La maladie due au parasite s'étend dans le monde entier, à l'exception de certains pays comme le Canada, la Scandinavie, la Sibérie et l'Islande. C'est donc une affection qui touche essentiellement les zones tempérées.

Cette parasitose est très répandue dans les régions d'élevage à condition que le climat soit propice au développement des stades parasitaires libres. Une région comme celle du Limousin est donc adéquate pour cette helminthose. Mais elle n'est pas la seule et toutes les zones françaises, possédant un sol humide et une température clémente (Dombes, Pyrénées centrales, Vendée, Normandie ...) sont des "réservoirs à douve". La maladie est connue pour son endémicité, avec parfois des proliférations épidémiques.

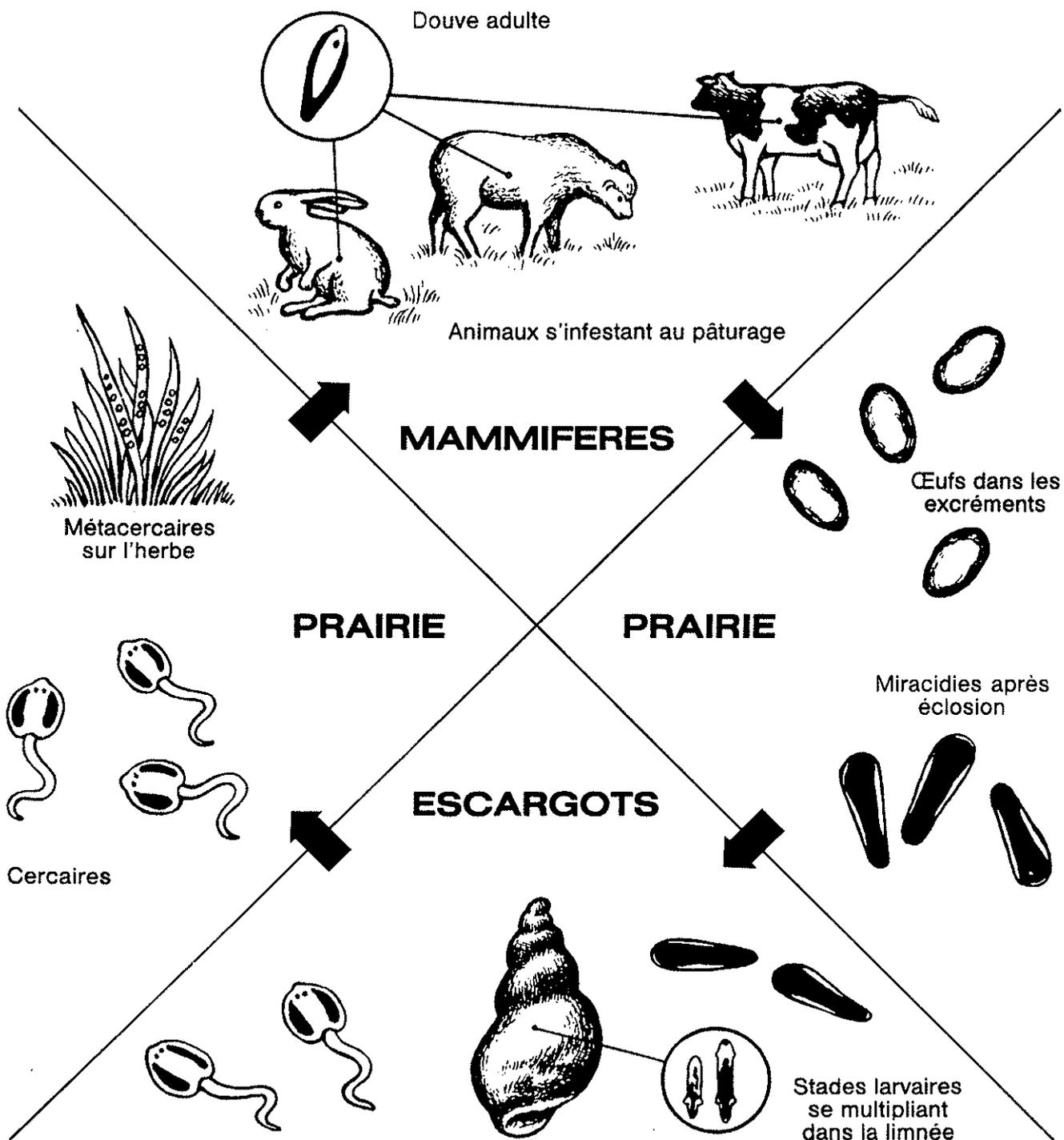


Figure 1.
 Le cycle évolutif de *F. hepatica*
 (d'après un document à diffusion scientifique,
 édité par le Centre de Recherches Agronomiques
 de Gembloux, Belgique).

B. CYCLE ÉVOLUTIF.

Il est représenté sur la figure 1.

Le cycle comprend deux hôtes, l'un définitif, l'autre intermédiaire. Le premier est un Mammifère qui héberge le parasite sous sa forme adulte. Le second assure le développement des formes larvaires. C'est un mollusque Gastéropode du genre *Lymnaea* qui assure ce rôle (NOZAIS, 1996).

Comme le soulignent les manuels et les thèses parus sur ce sujet, le cycle peut se diviser en quatre phases:

- 1) L'infestation de l'hôte définitif. Il se contamine en ingérant les parasites fixés sur l'herbe (métacercaires). Ces dernières effectuent une migration de six semaines dans le parenchyme hépatique avant de gagner les canaux biliaires du Mammifère où elles deviennent adultes et pondent des oeufs. Ceux-ci sont véhiculés par la bile dans l'intestin et gagnent l'extérieur avec les fèces de l'hôte.

- 2) Le développement du miracidium dans le milieu extérieur. Lorsque l'oeuf est déposé sur le sol, il subit une période d'incubation et éclôt en libérant une larve ciliée, le miracidium. Celui-ci nage dans l'eau à la rencontre d'un hôte intermédiaire. Si la rencontre n'a pas lieu, la larve meurt au bout de quelques heures.

- 3) Le développement chez le mollusque hôte. Trois stades larvaires successifs, à savoir le sporocyste, les rédies et les cercaires, se forment chez cet hôte intermédiaire. Ces dernières sortent dans le milieu extérieur lors de la phase d'émission mais elles ne sont pas infestantes à ce stade.

- 4) La formation de la métacercare. Après avoir nagé quelques minutes, la cercare adhère à un substrat, perd sa queue et forme un kyste à deux couches (stade métacercare). Ce dernier est la forme de résistance du parasite et peut survivre plus de six mois dans notre région. Si un Mammifère consomme l'herbe avec cette larve, le cycle se poursuit.

La fixation de la cercare sur un substrat n'est pas obligatoire. Il existe, en effet, des kystes flottants car les cercaires s'enkystent à la surface de l'eau. Les métacercaires de ce type peuvent flotter en eau stagnante pendant plusieurs semaines mais elles tombent rapidement sur le fond lors d'un transport par une eau courante.

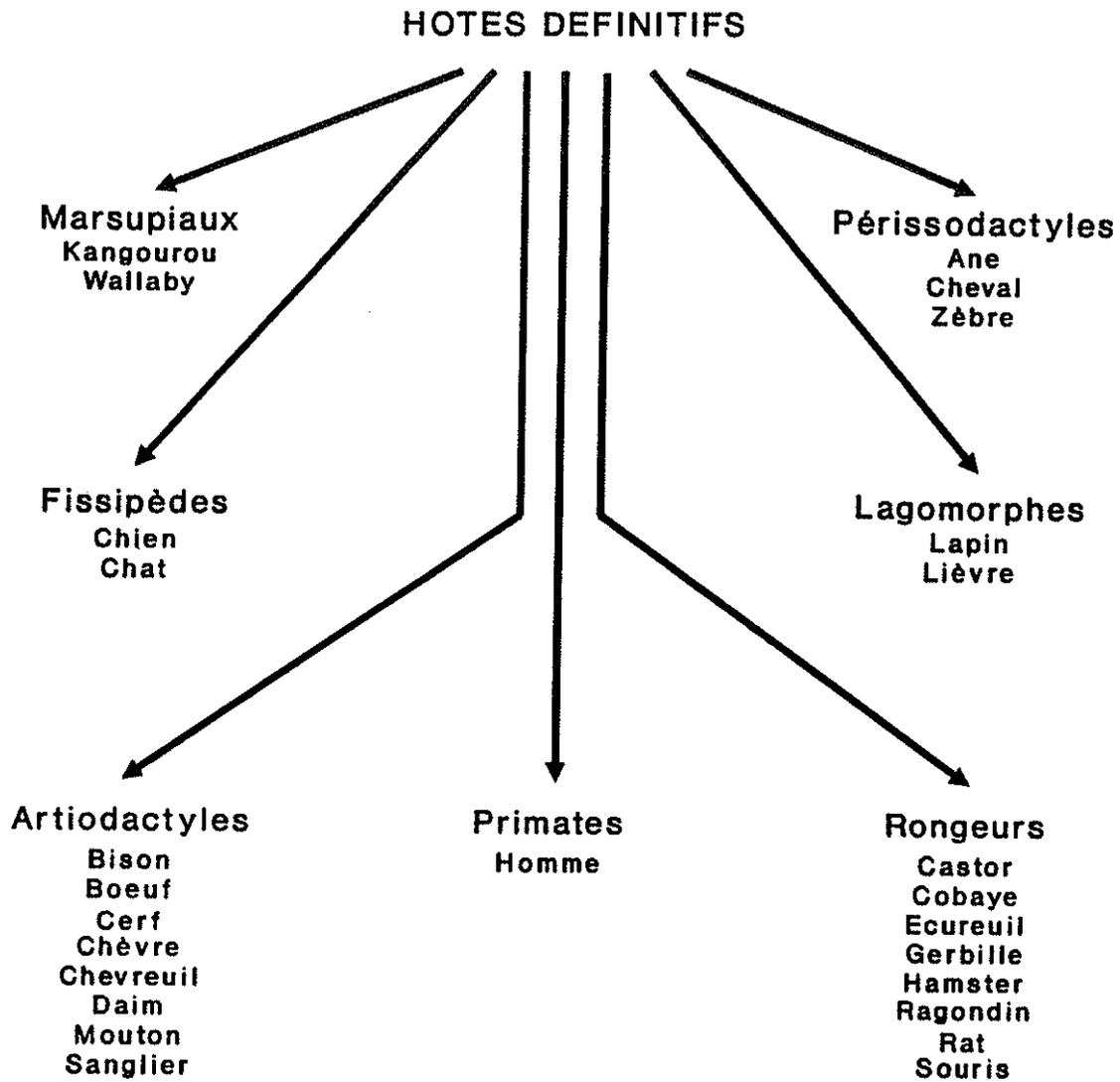


Figure 2.
Les Mammifères qui interviennent comme hôtes
définitifs dans le cycle évolutif de *F. hepatica*
(d'après BORAY, 1969 et MOUKRIM, 1991,
modifié par TAPIE, 1996).

C. LES HÔTES DÉFINITIFS.

La figure 2 énumère de nombreux Mammifères qui sont reconnus par les auteurs comme des hôtes définitifs potentiels du parasite. Sept groupes peuvent être individualisés sur cette illustration. Nos commentaires porteront sur les plus importants d'entre eux:

- Les Ruminants regroupent la plupart des espèces susceptibles d'être des hôtes. Parmi ceux-ci, citons l'ensemble des bovins et des ovins. En dehors des espèces domestiques qui vivent au contact de l'homme, il faut signaler aussi les Mammifères sauvages. C'est ainsi que les cerfs (de différentes espèces), les chevreuils, les daims, ... peuvent assurer le développement du parasite sous sa forme adulte.

- La plupart des Rongeurs peuvent être touchés par la parasitose. C'est le cas du castor mais aussi du ragondin, des rats et des souris. Si l'infestation naturelle de certaines espèces a été fréquemment rapportée par les auteurs (revue d'EUZEBY, 1971), les informations concernant le reste des Rongeurs proviennent d'infestations expérimentales (rats et souris, par exemple) et il serait intéressant de vérifier si le parasitisme existe dans les conditions naturelles.

- Le groupe des Lagomorphes (lapin, lièvre, ...) est aussi concerné par la maladie mais les données sur leur infestation naturelle sont relativement peu nombreuses. SIMINTZIS (1951), BAILENGER *et al.* (1965) signalent que de nombreux lapins examinés dans les Dombes ou en Bretagne hébergent des douves adultes. Ce fait se retrouve aussi dans d'autres régions comme celle du Limousin (RONDELAUD, *communication personnelle*).

- L'homme ne fait pas exception à la règle. GAILLET (1983), par exemple, collige 8.898 cas de distomatose humaine survenus en France depuis 1950 et ce chiffre est probablement sous-évalué. L'Organisation Mondiale de la Santé (1993) signale que plus de 300.000 cas cliniques ont été rapportés depuis 1970 dans plus de 61 pays d'Europe, des Amériques, d'Asie, d'Afrique et du Pacifique occidental.

L'infestation de l'hôte définitif par la métacercarie de *F. hepatica* s'effectue en deux phases. La première est une phase d'invasion qui est le plus souvent muette, d'où le terme fréquent de phase latente. La seconde est une phase d'état où le parasite devient adulte et pond des oeufs qui sont rejetés à l'extérieur. Ces deux périodes sont aussi appelées phases prépatente et patente par les cliniciens.

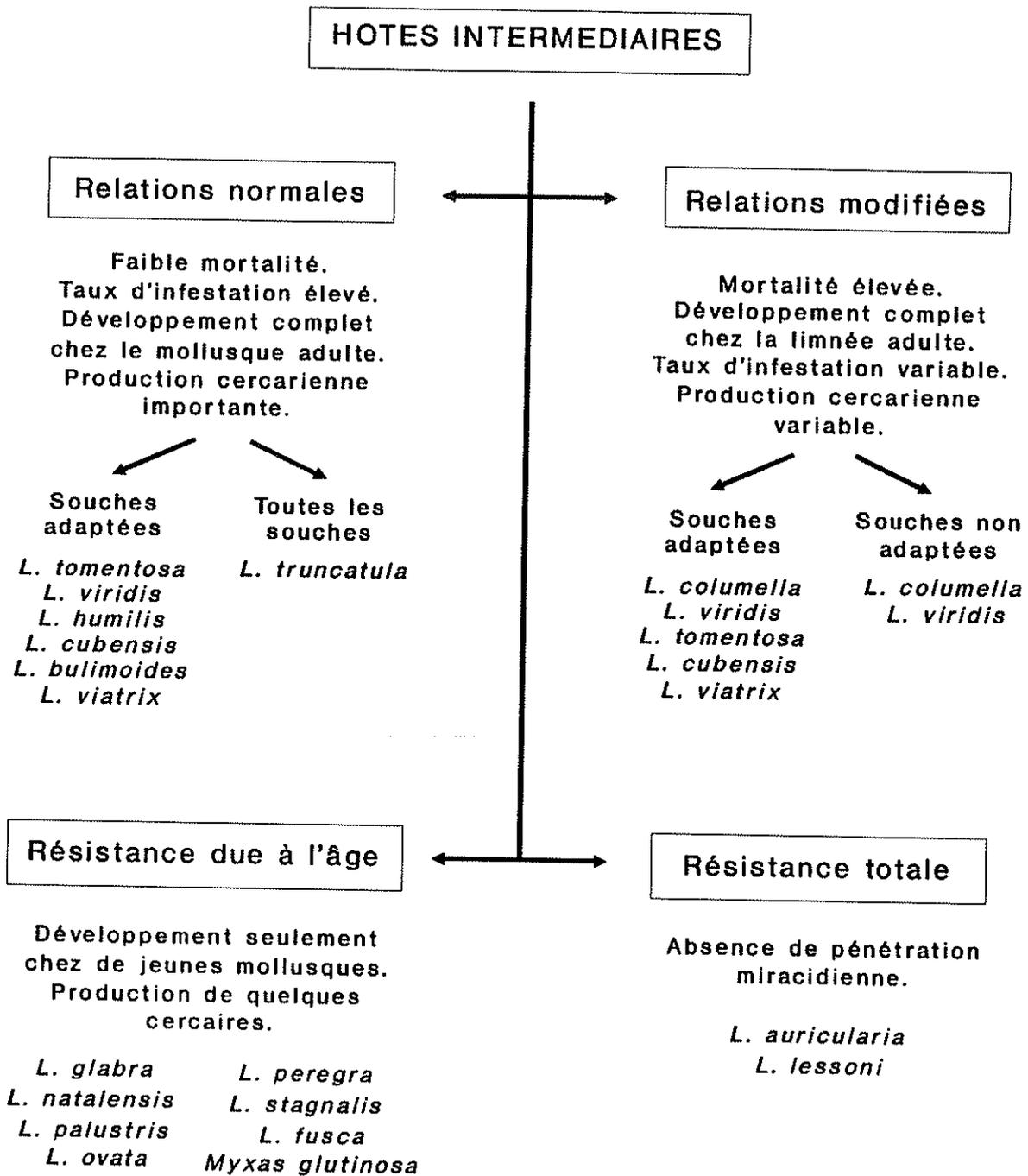


Figure 3.
Les principales espèces de mollusques hôtes
dans le cycle évolutif de *F. hepatica*
(d'après BORAY, 1978, modifié par BEAUDUFE, 1997).

D. LES HÔTES INTERMÉDIAIRES.

1. Données classiques.

D'après BORAY (1978, 1981, 1982), les membres de la famille des *Lymnaei-dae* ont divers types de relation avec *F. hepatica*. La figure 3 schématise les quatre groupes de mollusques. La lecture de cet organigramme permet les commentaires suivants:

- Les espèces du premier groupe ont des relations "normales" avec le parasite. Parmi les caractéristiques, signalons une faible mortalité du mollusque parasité, une prévalence de l'infestation importante, etc. A ce lot, appartiennent toutes les souches de *L. truncatula* et d'autres espèces comme *L. cubensis*, par exemple, tout au moins lorsque les souches sont adaptées au Trématode.

- Des relations disparates entre les deux partenaires sont la caractéristique du deuxième groupe. Le taux d'infestation peut être ainsi élevé ou faible, tout comme la production cercarienne qui peut être importante ou très réduite. Parmi ces espèces, citons *L. columella* (limnée originaire des U.S.A.), que la souche soit adaptée ou non au parasite.

- Les deux derniers groupes d'espèces présentent une résistance partielle à l'infestation parasitaire lorsque leur taille dépasse 2-3 mm de hauteur, ou bien ne sont pas des hôtes intermédiaires de ce Trématode. Si l'on se limite au premier lot, il faut reconnaître que la plupart des limnées françaises y figurent.

2. Données récentes.

Des travaux démontrent que certains mollusques sont capables d'assurer le développement larvaire de *F. hepatica* lorsqu'ils sont co-infestés par ce Trématode et un autre parasite de bovins, à savoir *Paramphistomum daubneyi*. Si les miracidiums de ces deux Helminthes pénètrent chez le même mollusque, l'évolution de l'une des espèces est facilitée par l'autre et vice versa. Ce fait a été constaté chez *L. truncatula* (AUGOT *et al.*, 1996) mais on le retrouve chez *Lymnaea glabra* qui peut alors s'infester jusqu'à 10 mm de hauteur (ABROUS *et al.*, 1996) ou encore chez une espèce inhabituelle: *Planorbis leucostoma* (ABROUS *et al.*, 1997). Les travaux se poursuivent encore pour déterminer si d'autres espèces de Mollusques Pulmonés peuvent assurer le développement larvaire de *F. hepatica* lorsqu'elles sont co-parasitées par *P. daubneyi*.

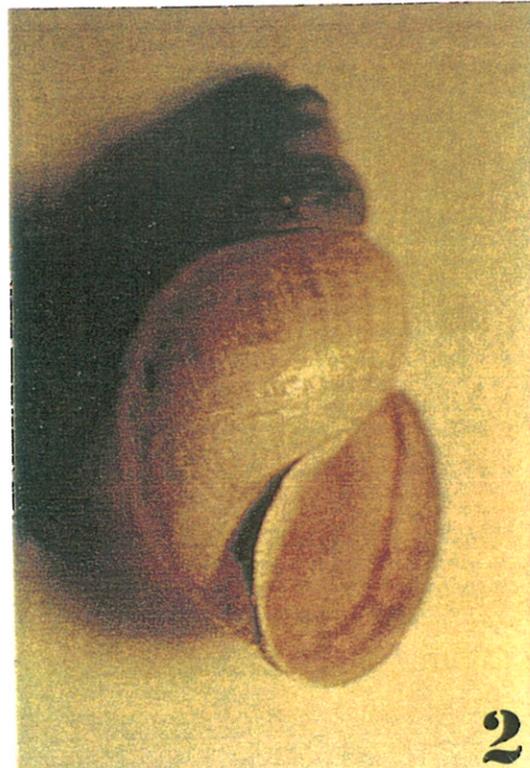


Planche B.

La coquille de *L. truncatula* adulte:

- Face supérieure montrant la spire avec des tours étagés (spire "en marches d'escalier"): n° 1.
- Face inférieure montrant l'ouverture: n° 2.

Individu mesurant 8 mm de hauteur.

(d'après VAREILLE, 1996).

II. - LA LIMNÉE TRONQUÉE ET SA BIOLOGIE.

A. PRÉSENTATION DU MOLLUSQUE.

Cette espèce occupe une place dans la systématique animale. Elle fait partie des taxons suivants:

- Embranchement des Mollusca.
- Classe des Gastropoda,
- Sous-classe des Pulmonata,
- Ordre des Basommatophora,
- Famille des Lymnaeidae.
- Genre *Lymnaea*.
- Espèce *truncatula* Müller, 1774.

La planche B permet de montrer les caractères conchyologiques de cette limnée. Le plus important est sa forme ovoïde, subconique, à ouverture ovale et dextre. On y remarque également une spire convexe constituée de tours étagés les uns par rapport aux autres, d'où l'aspect "en marches d'escaliers" que plusieurs auteurs (comme EUZEBY, 1971) citent pour décrire cette espèce. Les sutures (sillons séparant deux tours de spire) sont profondes. La coquille présente de fines stries transversales.

La hauteur maximale de *L. truncatula* et la largeur du dernier tour de spire n'excèdent pas 12 et 5 mm par ordre respectif. La couleur de la coquille varie du fauve au gris.

L'espèce vit dans la plupart des pays européens. Elle a été également signalée:

- en Asie où HUBENDICK (1951) rapporte sa présence dans la zone centrale de ce continent jusqu'aux limites Est de la Chine.
- en Afrique où la limnée colonise le Maghreb, le Cameroun, l'Ethiopie, le Kenya, le Zaïre et l'Afrique du Sud (BROWN, 1980).
- sur la Côte Est de l'Alaska jusqu'au Canada (BURCH *et al.*, 1989).

Des travaux récents (JABBOUR-ZAHAB *et al.*, 1997) basés sur l'étude des allozymes établissent qu'il y aurait une parenté étroite entre *L. truncatula* et d'autres limnées américaines (*Lymnaea cubensis*, *L. viatrix*) et, peut-être, une origine commune.

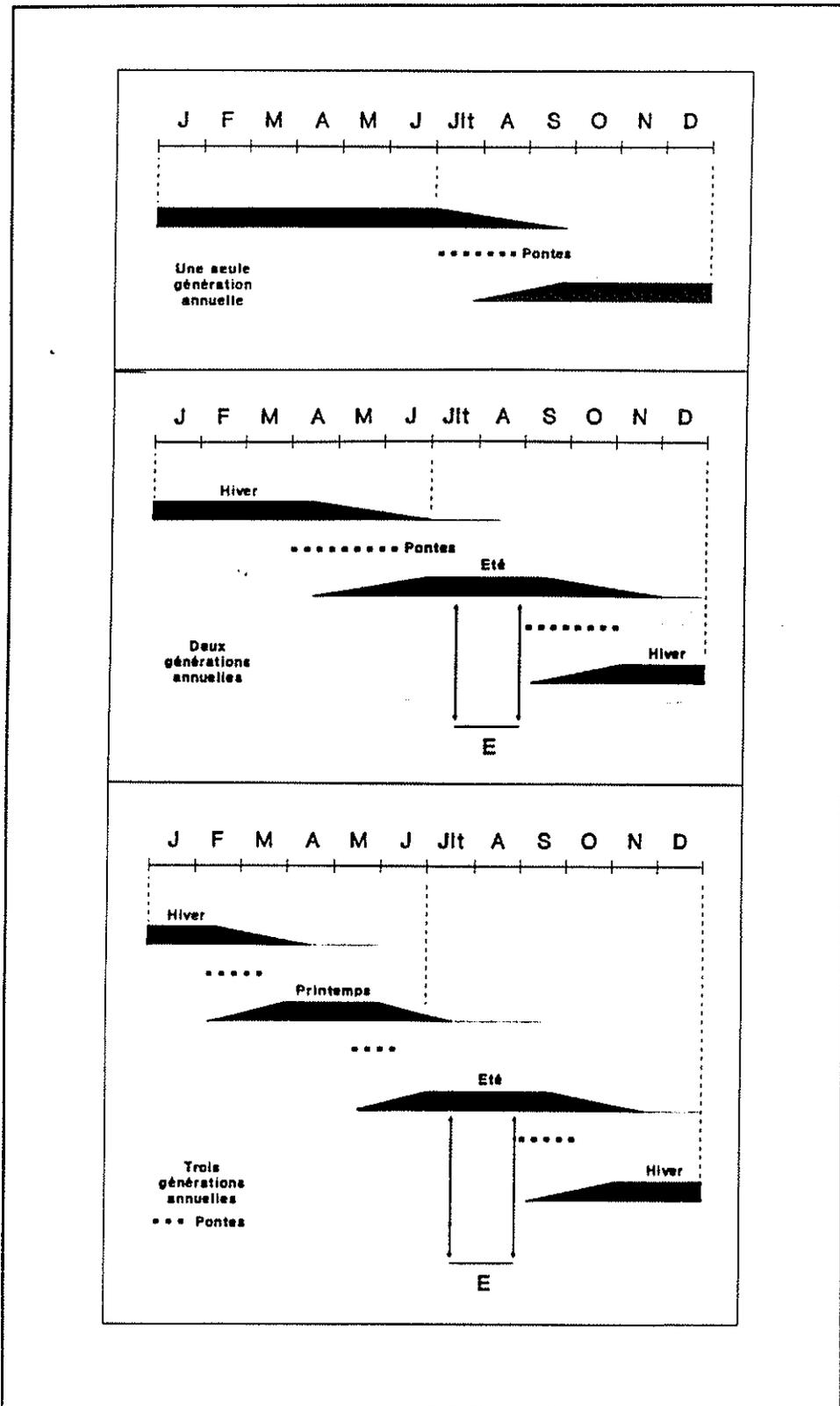


Figure 4.
 Les générations annuelles de *L. truncatula*
 (d'après RONDELAUD et MAGE, 1988, 1992,
 modifié par SZMIDT-ADJIDÉ, 1996).
 Abréviation: E (estivation).

B. SA BIOLOGIE.

Les informations contenues dans ce paragraphe proviennent de l'analyse des documents suivants: MOUKRIM, 1991; SZMIDT-ADJIDÉ, 1996; TAPIE, 1996; VAREILLE, 1996. Elles se rapportent aux deux points suivants:

1. Les générations annuelles du mollusque.

Elles sont illustrées sur la figure 4.

La plus simple est une seule génération annuelle. Les pontes sont déposées en juillet-août. Il en sort des descendants qui passent l'hiver et fournissent les adultes de l'année suivante. Ce type existe en altitude et il n'y a généralement pas de dessèchement du milieu au coeur de l'été (de MASSIAS *et al.*, 1996).

Le schéma à deux générations annuelles est le plus fréquent dans les pays de l'Europe de l'Ouest (TAYLOR, 1965). La première est constituée par les adultes transhivernants qui pondent en avril-mai. La seconde est composée par les descendants qui naissent à partir de ces pontes. Ces individus subissent l'estivation et déposent leurs pontes en septembre-octobre lors de la remise des habitats en eau.

La Limnée tronquée peut présenter trois générations au cours de certaines années très humides ("années à douve"). Au lieu de pondre en avril-mai, les adultes transhivernants déposent leurs oeufs en février, d'où l'existence d'une génération supplémentaire qui s'intercale entre celles d'hiver et d'été.

A l'inverse du premier type de génération, de description récente, les deux autres sont déjà connus depuis le début du siècle. Parmi les auteurs, citons WALTON et JONES (1922), ROBERTS (1950), HEPPELSTON (1972), MOREL-VAREILLE (1973), SMITH (1981).

Lorsque la génération est unique, la densité maximale du mollusque se situe de la mi-juillet à la mi-août (de MASSIAS *et al.*, 1996). Par contre, dans les deux autres types, le nombre le plus élevé s'observe à la fin juin ou au début de juillet juste avant l'estivation de l'habitat.

Selon HUNTER (1964), ce sont les conditions climatiques qui déterminent le nombre de générations annuelles pour ce mollusque.

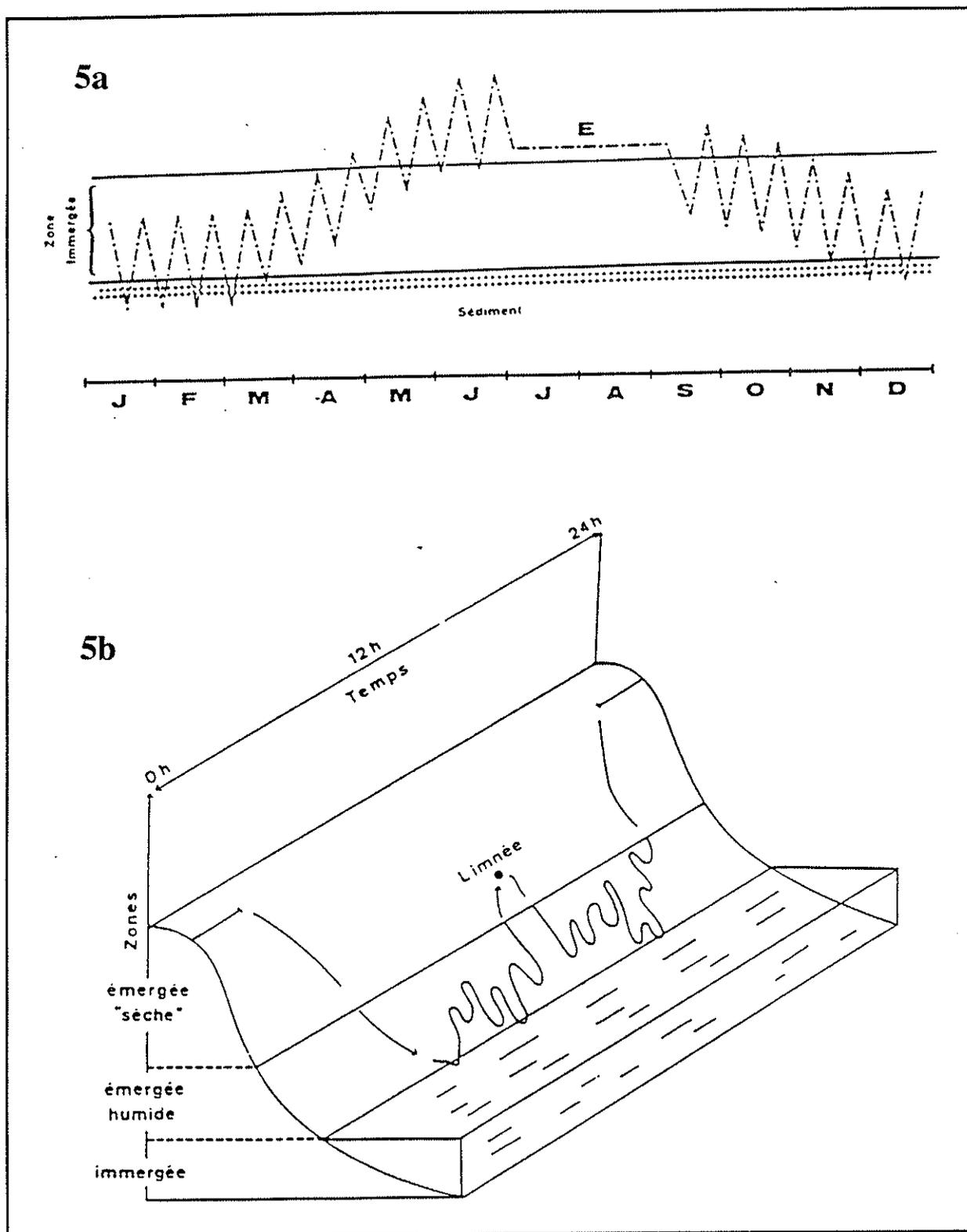


Figure 5.
 Schémas classiques admis pour l'amphibiose de *L. truncatula*
 dans les prairies marécageuses en France centrale:
 - Amphibiose saisonnière: 5a.
 - Amphibiose journalière lors d'une période de vie
 active au printemps: 5b.
 (d'après RONDELAUD et MAGE, 1988, modifié par MOUKRIM, 1991).

2. L'amphibiose du mollusque.

C'est la capacité pour l'animal de vivre, soit à l'air libre, soit dans l'eau. Cette particularité de l'espèce est connue depuis longtemps (THOMAS, 1883). Mais, en réalité, toutes les espèces des Lymnaeidae possèdent un certain degré d'amphibiose et la Limnée tronquée est celle qui a le plus fort degré.

Cette aptitude biologique a surtout été étudiée dans le cas des populations qui vivent dans les prairies marécageuses et la figure 5 montre les deux types de comportement que l'espèce présente au cours de sa vie. On distingue en particulier:

- 1) une amphibiose saisonnière (Fig. 5a). De novembre à mars, la limnée est immergée et s'enfouit en partie aux heures les plus froides de la nuit. Lorsque le printemps arrive, la limnée fréquente de plus en plus l'interface air-eau au cours de la journée et s'émerge totalement à la mi-juin. Lors du dessèchement estival, le mollusque est fixé sur un support avec le corps rétracté dans sa coquille. Lors de la remise en eau post-estivale, la limnée s'immerge de plus en plus.

- 2) un comportement journalier caractéristique, surtout en période de vie active (au printemps et au début de l'été). La limnée est émergée et se déplace le jour dans la bande humide qui longe la nappe d'eau. Le soir, elle effectue son repos nocturne à 4 ou 5 cm de hauteur par rapport à l'eau (Fig. 5b).

Mais cette amphibiose n'est pas aussi "standardisée" que celle décrite par les auteurs dans les prairies marécageuses. En effet, sur les berges de rivière, le mollusque reste plus de neuf mois immergé sous l'eau courante et s'émerge seulement lors de l'étiage du cours d'eau (LACOURARIE, 1996). La même particularité existe en zone d'altitude et l'animal peut rester plus de six mois sous une couverture de neige (de MASSIAS, 1996).

Toutes les populations de *L. truncatula* n'ont pas le même degré d'amphibiose comme nous l'avons nous-même constaté au cours de nos investigations. Si la plupart des colonies obéissent à la description définie ci-dessus, d'autres, situées en altitude, sont beaucoup plus aquatiques. C'est le cas de notre population d'étude, située à Courcelles (Creuse) qui est grégaire, ne sort pratiquement pas de l'eau et supporte mal un dessèchement prolongé.

D'après TAYLOR (1965), cette amphibiose du mollusque est favorable pour l'infestation de ce dernier par *F. hepatica*.

Termes techniques	Description	Observations
Période prépatente.	Correspond à l'intervalle de temps entre l'exposition et la première émission cercarienne.	Ces termes sont surtout utilisés chez l'hôte définitif lorsqu'il est parasité.
Période patente.	Période des émissions	
Génération (rédiennne).	Ensemble des rédies qui sortent du sporocyste ou d'un groupe déterminé de rédies.	Trois générations rédiennes se développent chez le mollusque hôte.
Rédies ou cercaires dépendantes.	Situées à l'intérieur du sporocyste ou d'une rédie.	Encore appelées rédies ou cercaires intra-sporocystaires ou intra-rédiennes.
Rédies ou cercaires indépendantes.	Larves libres dans la cavité générale du mollusque.	-
Rédies immatures.	Elles contiennent des morulas, des embryons rédiens ou des embryons procercaires.	-
Rédies matures.	Elles contiennent des procercaires et/ou des cercaires.	Encore appelées rédies à cercaires.
Cercaires émises.	Cercaires sorties dans le milieu extérieur.	Nagent quelques minutes pour s'enkyster (stade métacercaire).
Vague d'émission.	Période de 1 à quelques jours au cours de laquelle les cercaires sont émises.	Chaque vague est séparée de la suivante par un repos de 24 heures au moins.
Productivité.	Ensemble des embryons contenus dans les rédies.	On réserve parfois ce terme de productivité aux cercaires.

Tableau I.
 Quelques termes techniques utilisés par les auteurs pour définir le développement larvaire de *F. hepatica* chez le mollusque (d'après AUGOT, 1994; DREYFUSS, 1994).

C. SES RELATIONS AVEC *F. hepatica*.

1. Problèmes de terminologie.

Le tableau I indique un certain nombre de termes techniques que nous utiliserons tout au long de ce mémoire.

Deux phases se succèdent chez un mollusque hôte lorsqu'il est parasité par un Trématode. La première est la période prépatente et se définit comme le temps nécessaire pour la multiplication asexuée du sporocyste. On la fait terminer habituellement à la première émission cercarienne. Au-delà de celle-ci, commence la deuxième phase, à savoir la période patente (ou période des émissions).

Les différents types de formes larvaires, qui se succèdent chez l'hôte intermédiaire, seront détaillés dans le paragraphe suivant. Nous limiterons notre propos à quelques termes généraux qui s'appliquent aussi bien aux rédies qu'aux cercaires:

- Le premier d'entre eux se rapporte à la situation de la larve fille par rapport au sporocyste ou à la rédie parentale. Cette larve fille est considérée comme dépendante lorsqu'elle est encore contenue dans ces derniers. A l'inverse, elle est dite indépendante (ou libre) lorsqu'elle est présente dans la cavité générale du mollusque.

- La deuxième expression porte sur l'évolution du contenu (pour les rédies). Est considérée comme immature une rédie ne possédant que des embryons très jeunes (morulas, embryons procercariens). Au contraire, une rédie mature¹ contient des procercariens ou des cercaires.

- La productivité parasitaire prête à confusion car on peut confondre ce mot avec production. Dans le premier cas, il s'agit de l'ensemble des embryons contenus dans les rédies, cercaires comprises. Dans la deuxième cas, la production se limite au stade larvaire final qui sort du mollusque, à savoir la cercaire ou la métacercaire.

Comme la métacercaire résulte de la transformation d'une cercaire, nous utiliserons indifféremment, soit l'un des termes, soit l'autre, dans la suite de cet exposé.

¹ - La maturité des rédies est contestée par certains auteurs (comme BORAY, 1969) car ils considèrent qu'une larve ne peut aboutir à la maturité.

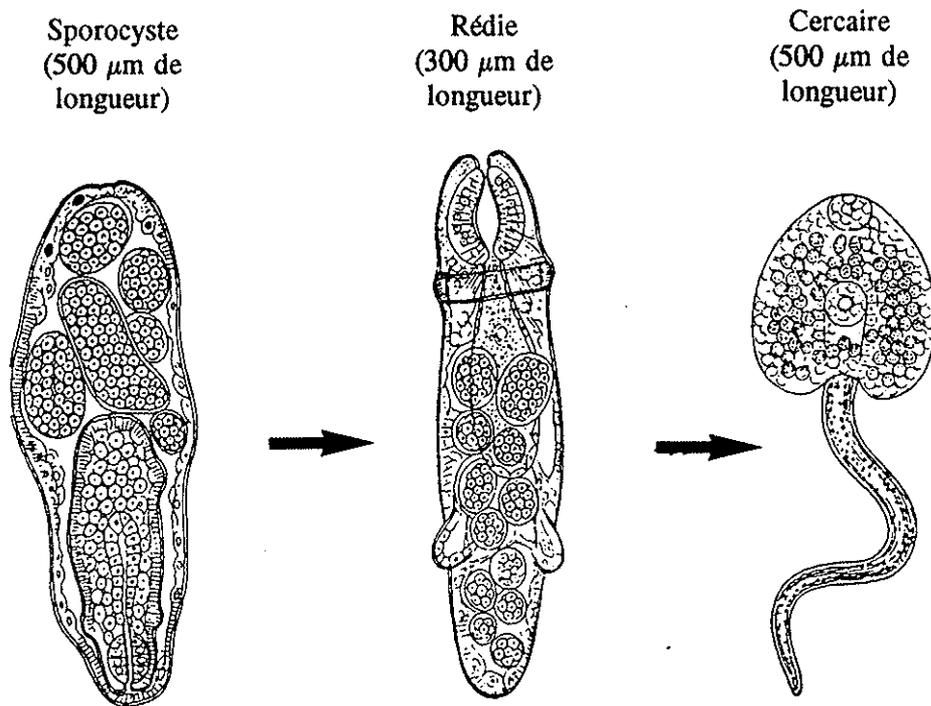


Figure 6.
Les formes larvaires de *F. hepatica* chez le mollusque hôte:
sporocyste (A), rédie (B) et cercaire (C) d'après SOULSBY (1982).

2. Les formes larvaires de *F. hepatica*.

Les trois types de formes larvaires sont présentés sur la figure 6. Le commentaire correspondant provient en grande partie des livres suivants: SOULSBY, 1982; NOZAIS, 1996.

Le sporocyste (A) résulte de la transformation du miracidium. Après sa pénétration dans le mollusque, cette dernière larve perd sa ciliature et sa papille antérieure pour former un sac informe, le sporocyste qui migre dans les espaces hémolympatiques de l'hôte intermédiaire pendant 3 à 5 jours. Après sa fixation dans un site préférentiel (généralement la région réno-péricardique de la limnée), le sporocyste s'accroît en taille pour atteindre 500 à 700 μm de longueur. Les cellules germinales internes se multiplient pour former des morulas, lesquelles se différencient à leur tour pour former des rédies appartenant à la première génération. La première d'entre elles devient indépendante à partir du 7^e jour et la sortie des suivantes se fait progressivement jusqu'au 49^e jour (à 20° C).

La rédie (B) a une forme allongée, avec un collier antérieur et deux appendices postérieurs. Un pharynx s'ouvre dans un tube digestif aveugle. Elle contient également des cellules germinales qui formeront d'autres rédies filles ou des cercaires. La longueur de cette larve est généralement de 2 mm mais peut atteindre 4 à 5 mm (AUGOT *et al.*, 1997). Il n'y a pas une seule génération de rédies, mais au contraire trois qui se succèdent chez le mollusque. Les rédies de première génération sont toutes issues du sporocyste et produisent des rédies de deuxième génération, lesquelles forment à leur tour des rédies de troisième génération. Le nombre de ces rédies se situe entre 30 et 40 chez une limnée lorsqu'elle est infestée par un seul miracidium. A l'exception de la rédie qui sort en premier du sporocyste, toutes les autres vont produire des cercaires (en plus des rédies filles), quelle que soit la génération concernée.

La forme de la cercaire (C) est caractéristique. Son corps est semi-circulaire et se prolonge par une queue mobile. La largeur moyenne du corps se situe entre 300 à 350 μm ; la longueur de la queue atteint 600 à 700 μm . La larve possède deux ventouses, l'une orale, l'autre ventrale. Elle contient tous les organes du parasite adulte (avec des ébauches pour les organes génitaux) et renferme, en plus, des cellules cystogènes. Les larves sortent du mollusque au niveau de la région péri-anale et nagent pendant quelques minutes avant de se fixer sur un support.

Classes de temps (jours)	Embryons intra-rédiens		Cercaires dépendantes		Métacercaires	Totaux
	Normaux	Dégénérés	Normales	Dégénérées		
75/ 89	264,3	14,7	15,4	5,2	197,6	497,2
90/ 104	271,8	17,8	13,8	10,1	163,4	476,9
105/ 119	264,7	26,2	21,2	8	181,5	501,6
120/ 134	190,1	36,2	32,4	10,7	247,8	517,2
135/ 149	140,2	41,7	36	23	288,7	529,6
150/ 164	92,3	58,8	38,1	29,7	368,4	587,3

Tableau II.
 La productivité parasitaire chez des *L. truncatula*
 mortes après une émission cercarienne de *F. hepatica*
 (d'après DREYFUSS, 1994).

3. Productivité parasitaire.

Le tableau II regroupe les chiffres moyens en rapport avec les nombres d'embryons intra-rédiens, de cercaires dépendantes et de métacercaires pour des *L. truncatula* mortes après une émission. Ces valeurs sont présentées en fonction de la durée de vie des limnées (exprimées sous forme de classes de 14 jours chacune).

Notre commentaire s'appuie sur celui fourni par DREYFUSS dans sa thèse (1994):

- Le nombre moyen des embryons normaux passe par un maximum dans la classe 90/104 jours et diminue par la suite jusqu'à 92 masses germinatives par limnée dans la classe 150/164 jours. Quant aux embryons dégénérés, leur effectif s'accroît dans le temps, avec une élévation plus marquée à partir de 120/134 jours.

- Les cercaires dépendantes augmentent en nombre avec la durée de l'expérience, qu'elles soient normales ou dégénérées. Cet accroissement est plus précoce chez les parasites normaux que chez les autres.

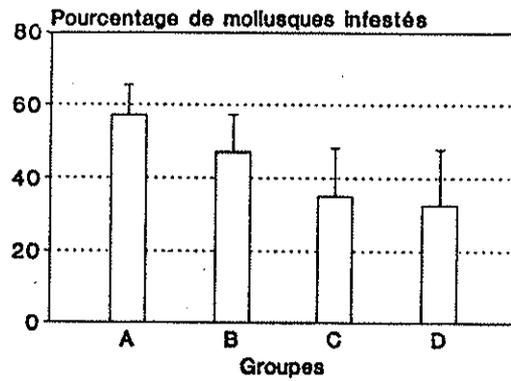
- Le même phénomène se retrouve pour les métacercaires. Leur nombre augmente plus rapidement à partir de la classe 120/134 jours.

- Si l'on effectue le total de ces différentes masses germinatives pour une limnée, on constate une diminution numérique pour la classe 90/104 jours, suivie d'un accroissement progressif au fur et à mesure que la durée de vie de la limnée s'allonge.

Il existe également des mollusques infestés qui meurent sans produire de cercaires. Si l'on considère ces individus, on note des valeurs nettement plus faibles que celles enregistrées chez les limnées avec émission (331 masses germinatives, métacercaires comprises dans la classe 150/164 jours chez les premiers au lieu de 587 chez les seconds). Ces chiffres peuvent s'interpréter de plusieurs façons. L'hypothèse la plus valide serait que l'existence des émissions cercariennes stimulerait la productivité parasitaire.

D'après DREYFUSS (1994), les métacercaires de *F. hepatica* obtenues à partir des Limnées tronquées sont nettement plus nombreuses que celles appartenant à un Trématode de la même famille, *F. gigantica* (368 en moyenne par limnée dans la classe 150/164 jours au lieu de 298). Ceci peut être rapporté à la nature même du Trématode d'une part, à la sensibilité du mollusque hôte d'autre part.

7a



7b

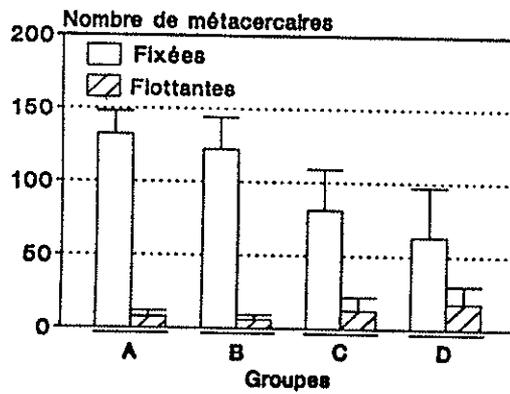


Figure 7.

La variabilité de l'infestation en fonction de l'origine des populations de *L. truncatula* (d'après RONDELAUD, 1993):

- La prévalence de l'infestation fasciolienne: 7a.
- Le nombre de métacercaires par limnée parasitée: 7b.

Symboles: A (rencontre naturelle fréquente entre le mollusque et son parasite). B (contact assez fréquent) C (rencontre rare). D (contact exceptionnel).

4. Variabilité interpopulationnelle.

Ce phénomène touche aussi bien les colonies de Limnées tronquées que les lignées de parasites. Nous examinerons les différences l'une après l'autre.

a). *Les populations de L. truncatula.*

Notre propos est basé sur les données que RONDELAUD (1997), RONDELAUD et DREYFUSS (1997) ont fournies pour les mollusques infestés de diverses populations différant par leur localisation géographique ou leur position par rapport aux réseaux hydrographiques.

La figure 7 présente les résultats que cet auteur a obtenus avec deux paramètres en considérant la fréquence de rencontre entre le mollusque et son parasite sur le terrain, ou au contraire sa rareté. Des deux graphes, nous pouvons dégager les éléments suivants:

- La prévalence de l'infestation (Fig. 7a) diminue lorsque le contact entre les deux partenaires devient de plus en plus rare.
- Comme pour la variable précédente, le nombre de métacercaires obtenues pour chaque limnée (Fig. 7 b) présente une décroissance progressive lorsque la rencontre sur le terrain est de plus en plus rare.

Ces données montrent qu'il existe une variabilité dans l'infestation fasciolienne en fonction de l'origine des limnées (*L. truncatula* dans ce cas). D'après RONDELAUD (1993), ces différences doivent être rapportées à la fréquence de rencontre entre le mollusque et son parasite dans le milieu naturel.

D'autres paramètres se modifient également en fonction de la fréquence de contact entre le parasite et son hôte intermédiaire. Une rencontre rare se traduit par un accroissement de la mortalité chez les mollusques infestés et par une augmentation de la durée du développement larvaire.

Il ressort de ces données que le plus important, ce n'est pas l'origine géographique de la population de *L. truncatula*, mais c'est la capacité de cette espèce à rencontrer le parasite dans son milieu naturel. D'après l'auteur précité, ce fait a une influence directe sur la sensibilité d'une population de limnées à l'infestation parasitaire.

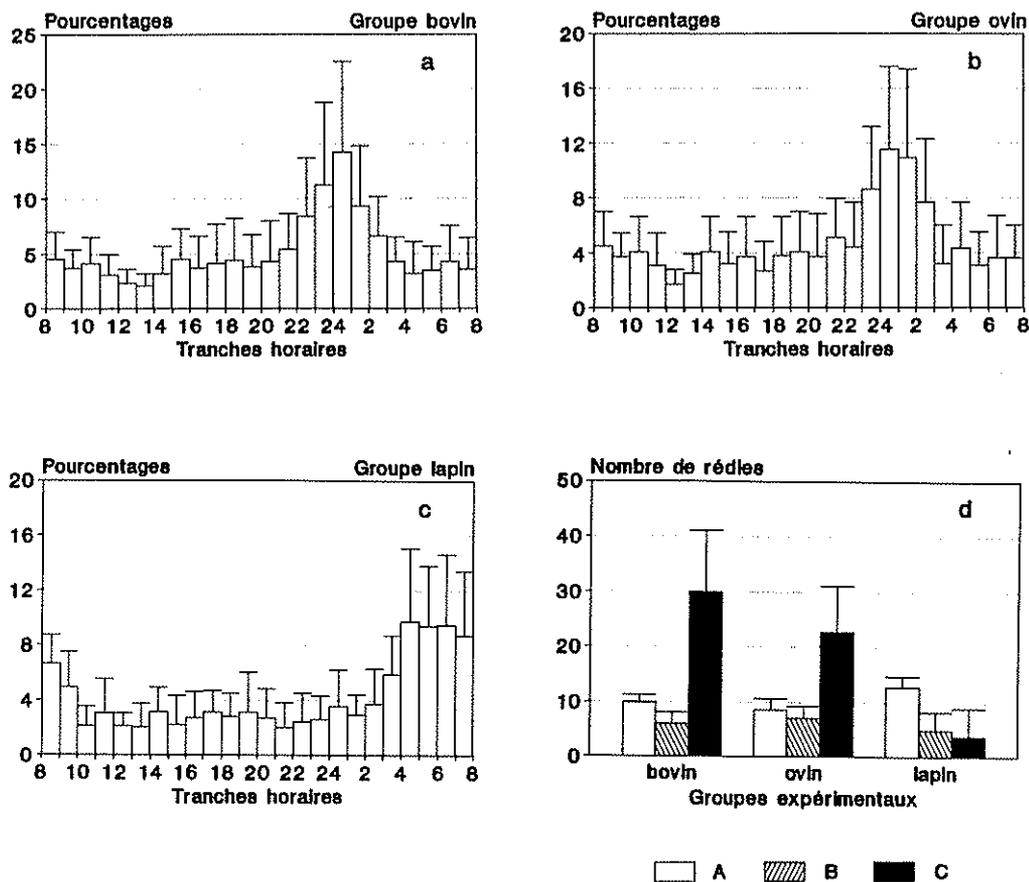


Figure 8.

Le développement larvaire de *F. hepatica* par rapport à la nature de l'hôte définitif d'où sont issus les oeufs:

- La distribution numérique des métacercaires en fonction des tranches horaires. Origine bovin: 8a. Origine ovine: 8b. Origine lapin: 8c.
- Le nombre de rédies par mollusque: 8d. Abréviations: A (rédies indépendantes et dégénérées). B (rédies intra-rédiennes). C (rédies indépendantes et en vie).

(d'après RONDELAUD et DREYFUSS, 1995).

Les moyennes sont indiquées avec leurs écarts-types.

b). *Les lignées de F. hepatica.*

Il s'agit de l'hôte définitif chez lequel le parasite est devenu adulte. Les données relatives à cette expérience proviennent des observations que RONDELAUD et DREYFUSS (1995) ont réalisées en infestant des mollusques appartenant à la même population de *L. truncatula* par des miracidiums provenant d'oeufs récoltés chez trois catégories d'hôtes définitifs (bovins, ovins, lapins) issus de la même région.

La prévalence de l'infestation est respectivement de 86 %, de 66 % et de 35 % lorsque l'on considère les résultats obtenus dans les groupes bovin, ovin et lapin.

- Des cercaires sont émises par les mollusques des trois groupes mais leur nombre total est plus faible dans le groupe lapin que dans les deux autres (54,5 en moyenne par mollusque au lieu de 157,8 et de 216,4, respectivement). Mais il existe une différence dans le rythme circadien selon le groupe étudié comme le montre la figure 8. Le nombre de cercaires émises est maximal entre minuit et 1 heure dans le groupe bovin (Fig. 8a), entre minuit et deux heures dans le lot ovin (Fig. 8b). Par contre, dans la série lapin (Fig. 8c), on constate que la plupart des cercaires sortent entre 4 et 8 heures du matin.

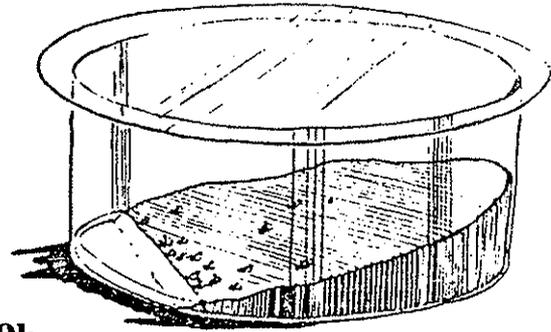
Les auteurs ont aussi décompté le nombre de rédies chez des limnées disséquées au 30^e jour post-exposition. Une différence existe entre les chiffres relevés pour la charge rédienne globale: 43,7 rédies en moyenne chez les limnées du groupe bovin, 38,4 chez celles du lot ovin et seulement 21,3 chez celles du groupe lapin. Si l'on procède au décompte de ces rédies en fonction de leur état physiologique (Fig. 8d), on observe un accroissement numérique net des rédies dégénérées dans le groupe lapin (12,7 par limnée au lieu de 8,6 et 9,9 dans les deux autres lots) alors que l'effectif des rédies indépendantes et en vie y est très faible (3,7 par mollusque au lieu de 22,7 et 29,7 dans les deux autres lots).

A la lumière des résultats fournis par cette expérimentation, les auteurs concluent en indiquant que l'espèce de l'hôte définitif peut jouer un rôle dans le développement de l'infestation parasitaire chez le mollusque en limitant le nombre des rédies et la production cercarienne. Les oeufs de *F. hepatica* récoltés chez les bovins ou les ovins seraient plus efficaces pour la transmission de la maladie que ceux provenant de lapins.

Ces données démontrent que tous les facteurs influençant le développement larvaire du parasite ne sont pas encore tous connus.



9a



9b

9c

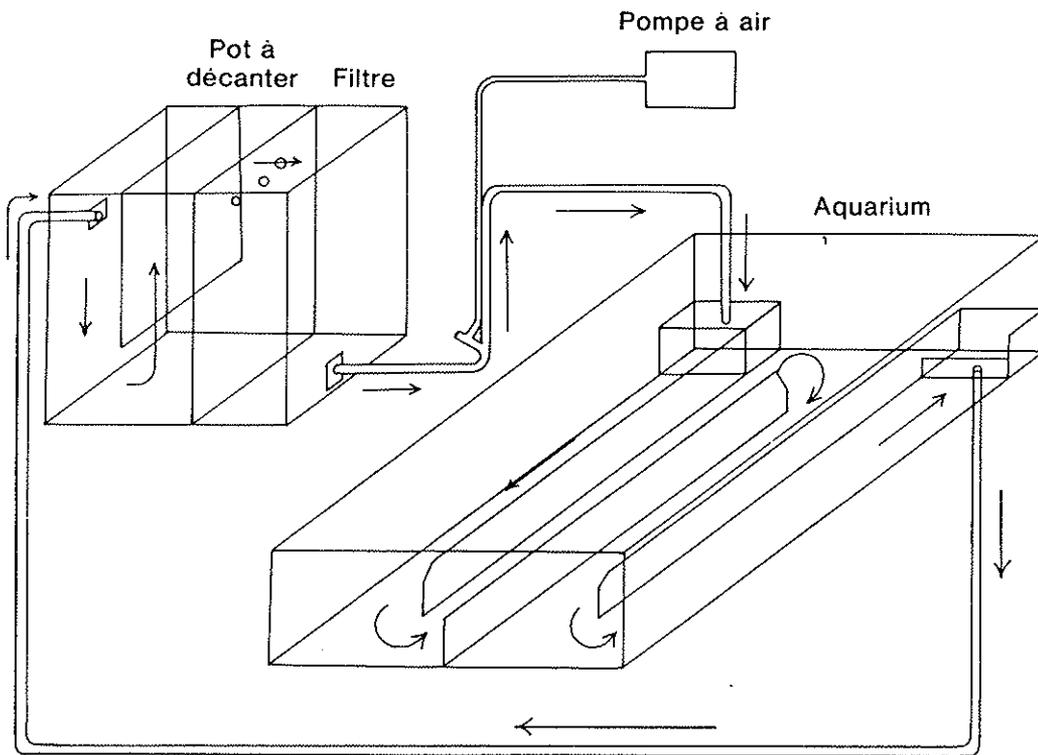


Figure 9.

- Quelques systèmes de maintenance utilisés pour l'élevage de *L. truncatula* au laboratoire:
- Technique de SCHUMACHER, in TAYLOR (1965): 9a.
 - Technique de KENDALL, 1953, in TAYLOR (1965): 9b.
 - Technique de PÉCHEUR (1974): 9c.

III. - LA PRODUCTION MÉTACERCARIENNE.

Il existe une relation directe entre la quantité de nourriture que le mollusque hôte peut absorber et le nombre de cercaires qui sortent de ce dernier (KENDALL, 1949; KENDALL et OLLERENSHAW, 1963, par exemple). Pour obtenir de nombreux parasites, il est donc nécessaire que le mollusque ait une croissance optimale au cours de son infestation. La méthode d'élevage est donc d'une importance primordiale pour les Limnées tronquées lorsqu'elles sont maintenues dans les conditions du laboratoire.

A. LES TECHNIQUES D'ÉLEVAGE POUR *L. truncatula*.

1. Les systèmes de maintenance.

La figure 9 présente trois de ces dispositifs.

Deux de ces systèmes sont basés sur le même principe, c'est-à-dire reconstituer, au laboratoire, le biotope naturel où vivent les limnées. Le dispositif de SCHUMACHER (1938) permettait de placer les mollusques dans des bacs contenant de la boue continuellement irriguée (Fig. 9a) mais cet auteur ne réussit pas à conserver les mollusques. Celui de KENDALL (1953) s'inspire de la méthode mise au point par TAYLOR et MOZLEY (1948). La figure 9b montre une illustration de ce dispositif. Les limnées sont placées dans des bacs de verre contenant de la boue disposée en plan incliné plongeant dans un peu d'eau. Une souche d'algues microscopiques est placée dans le récipient pour nourrir les mollusques. Ce dernier système est encore largement utilisé à l'heure actuelle (SEVO, 1973; OSBORN *et al.*, 1982; LEE *et al.*, 1994).

La figure 9c montre l'aquaterrarium proposé par PÉCHEUR (1974). Le système comporte de l'eau circulant en circuit fermé sur un lit de gros graviers. Cette dernière est constamment réoxygénée et épurée grâce à un bac à décantation. Des algues sont incorporées dans ce milieu.

D'autres dispositifs comme l'élevage en aquarium en circuit fermé (HOURDIN *et al.*, 1993) ont également été proposés.

Quel que soit le système utilisé, les limnées sont soumises à un éclairage artificiel de 12 heures généralement à l'aide de tubes fluorescents. La température peut être celle de la pièce mais les dispositifs sont généralement maintenus à 20° C.

Référence	Algues utilisées.	Observations
TAYLOR et MOZLEY, 1948.	Chlorophycées.	Espèces non identifiées.
KENDALL, 1953.	Chlorophycées. Diatomées.	<i>Cosmarium</i> sp.
EUZEBY, 1971.	Cyanophycées et Chlorophycées diverses.	Espèces non identifiées.
SEVO, 1973.	Chlorophycées.	<i>Palmella</i> sp.
PÉCHEUR, 1974.	Chlorophycées.	<i>Chlorella</i> sp.
OSBORN <i>et al.</i> , 1982.	Cyanophycées.	<i>Oscillatoria</i> sp.
LEE <i>et al.</i> , 192, 1994.	Cyanophycées et Chlorophycées (7 espèces).	<i>Gloeocystis ampla</i> prédominante.

Tableau III.
Les algues utilisées par différents auteurs
pour la nourriture de *L. truncatula* et *L. viridis*.

2. L'alimentation des mollusques.

Le tableau III répertorie les algues que les auteurs ont utilisées pour nourrir les limnées lors de leur élevage dans les conditions du laboratoire.

Il s'agit d'algues bleues et vertes microscopiques, provenant souvent des sites où vivent les limnées. Les espèces sont variées et ne sont pas identifiées dans certains cas. Les auteurs ne font pas mention d'espèces filamenteuses. Cependant, cette nourriture n'est pas la seule car la limnée est capable de consommer de la salade dégradée après un séjour de 5 jours dans l'eau et de laisser seulement les nervures (HOURDIN *et al.*, 1993, par exemple).

Ces algues sont cultivées selon plusieurs méthodes. La technique la plus répandue est celle de TAYLOR et MOZLEY (1948). Nous nous sommes servi des détails fournis par OSBORN *et al.* (1982) pour construire l'organigramme de la figure 10. Celui-ci montre les trois étapes suivantes:

- De la boue à consistance fluide est préparée à partir de sédiment naturel stérilisé à la chaleur sèche. De l'agar et de la nourriture (Bioplant) y sont incorporés et le tout est autoclavé avant utilisation.

- Des algues microscopiques y sont ensuiteensemencées et placées dans des conditions favorables jusqu'à ce qu'elles poussent.

- Les limnées y sont enfin placées pour se nourrir. La densité y est importante (50-60 mollusques sur 1,9 dm²). Cette dernière étape ne dure que 2 à 3 jours si bien que les mollusques doivent être replacés sur un nouveau substrat couvert d'algues.

Avant leur ensemencement sur la boue, la culture des algues s'effectue sur des milieux minéraux constitués par différents sels dont la nature varie selon les auteurs.

D'autres milieux ont été proposés par les auteurs pour nourrir les mollusques. Parmi ces derniers, citons celui utilisé par BORAY (1969) pour nourrir *Lymnaea tomentosa* au laboratoire. Il comprend de la laitue desséchée (25 %), des feuilles de luzerne desséchées (25 %) et des germes de blé (50 %) auxquels on ajoute 3 % de sulfate de calcium. Celui de PÉCHEUR (1974) est une solution aqueuse renfermant un complexe vitaminé Bemax (1 %), du lait condensé (5 %), de la salade séchée et moulue (1 %), de l'alginate de sodium (1 %) et du chlorure de calcium (2 %).

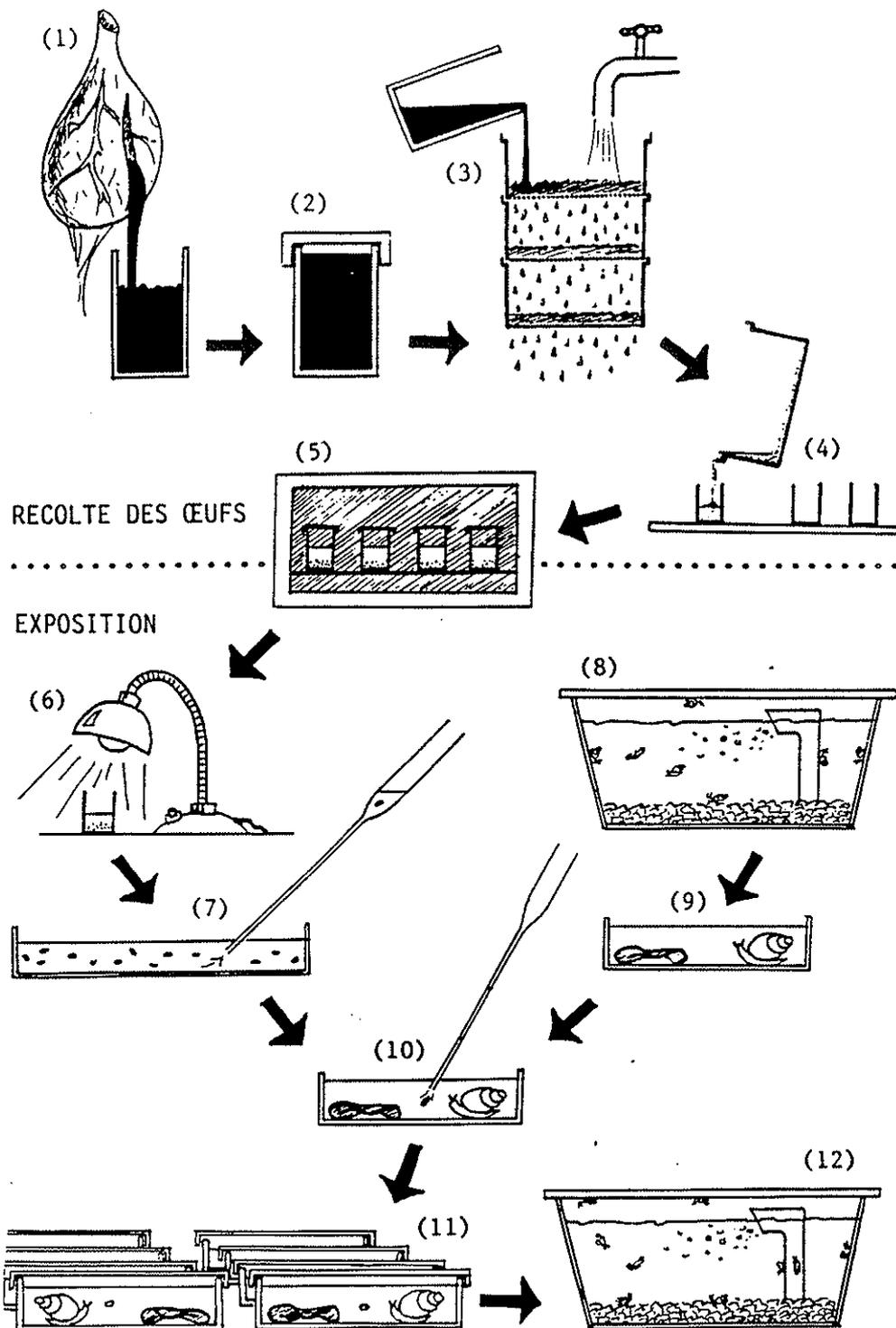


Figure 11.
 La technique d'exposition des Limnées tronquées
 aux miracidiums de *F. hepatica* (d'après RUELLAN, 1997).

- (1) Récolte de la bile par incision de la vésicule biliaire.
- (2) Transport de la bile au laboratoire.
- (3) Filtration du liquide.
- (4) Récolte des oeufs.
- (5) Stockage de ceux-ci à 20° C.
- (6) Ecllosion des oeufs à la lumière.
- (7) Prélèvement des miracidiums à l'aide d'une pipette.
- (8) Limnées en élevage.
- (9) Isolement des limnées dans de petits récipients, avec un fragment de salade.
- (10) Introduction de deux miracidiums dans chaque récipient.
- (11) Exposition des mollusques au parasite pendant 4 heures.
- (12) Remise en élevage des limnées.

B. L'EXPOSITION AUX MIRACIDIUMS.

Les limnées sont soumises aux miracidiums de *F. hepatica* lors d'une exposition. Les modalités de cette technique varient selon les auteurs. Généralement, les mollusques ont une hauteur de 4 mm lors de cette opération car leur sensibilité à l'infestation fasciolienne est alors la plus élevée (GOLD, 1980). Le nombre de larves mises en présence du mollusque est très variable: une seule (LEE *et al.*, 1994), deux (HOURDIN *et al.*, 1993), trois (LEE *et al.*, 1994), 4 ou 5 (PÉCHEUR, 1974; OSBORN *et al.*, 1982), 4 à 6 (SEVO, 1973), 20 (BORAY, 1969). D'après ROUMIEUX (1997), le nombre de deux miracidiums pour chaque mollusque représente le meilleur compromis pour obtenir une prévalence maximale de l'infestation et un taux de mortalité raisonnable (inférieur à 50 %).

Nous avons fourni, sur la figure 11, l'une des techniques utilisées pour préparer les oeufs de *F. hepatica* et mettre les miracidiums, qui en éclosent, en contact avec les mollusques. On peut remarquer les points suivants:

- Les oeufs sont séparés de la bile par tamisage et lavage à l'eau du robinet. Ils sont stockés à l'obscurité totale pendant 20 jours pour l'incubation si la température est de 20° C (OLLERENSHAW, 1971) mais ce délai est plus court (15 jours seulement) s'il fait plus chaud (25° C par exemple).

- Le (ou les) miracidium(s) est (ou sont) prélevé(s) à l'aide d'une pipette et mis au contact de chaque mollusque dans un petit récipient (ici, boîte de Pétri de 35 mm de diamètre). D'autres dispositifs peuvent être utilisés (tubes à hémolyse par exemple). Le contact entre le mollusque et les larves dure 4 heures.

- Après l'exposition, les limnées sont replacées dans leurs bacs d'élevage (ici des aquariums) pendant 30 jours avant d'être isolées pour le suivi des émissions cercariennes.

Des variantes existent selon les auteurs. Le temps de contact entre le mollusque et les parasites est ainsi de 8 heures pour PÉCHEUR (1974). Les mollusques sont nourris ou non durant leur séjour dans les tubes.

C. LE RECUEIL DES MÉTACERCAIRES.

A l'inverse de la technique précédente, cette dernière méthode est variable et nous nous limiterons à deux exemples pour illustrer notre texte.

Au bout de 23 à 25 jours (à 25° C), SEVO (1973) transfère les limnées dans une boîte de Pétri dont le fond est garni d'une feuille de matière plastique. Le récipient contient de l'eau et des algues. Comme les cercaires se fixent sur la feuille de matière plastique, il suffit de la retirer 24 heures plus tard et de la laver. On dispose alors d'un nombre défini de métacercaires d'âge connu, fixées sur un support aisément maniable.

PÉCHEUR (1974) dissèque les limnées infestées au bout de 7 semaines (à 20° C) dans une boîte de Pétri contenant de l'eau. Les cercaires se mettent alors à nager et vont se fixer sur les parois. Les récipients sont rincés 24 heures plus tard, remplis d'eau et conservés à la température du laboratoire. L'auteur n'indique pas le mode utilisé pour enlever les métacercaires des parois sur lesquelles elles sont fixées.

OSBORN *et al.* (1982) stimulent les émissions cercariennes en soumettant les limnées à l'action d'une eau fraîche, accompagnée d'une chute de température. Les mollusques sont placés dans un récipient contenant une feuille de cellophane et de l'eau distillée. Ce dernier est mis dans une eau à 8°-10° C pendant 35 minutes avant d'être laissé pendant quelque temps à 20° C. Les cercaires sortent du mollusque 30 minutes à 1 heure plus tard et s'enkystent sur la feuille de cellophane. Celle-ci est lavée et stockée pendant 12 semaines au maximum à + 4° C.

IV. - COMMENTAIRES.

Les rappels, que nous avons présentés dans les paragraphes précédents, peuvent se résumer de la manière suivante:

- Le cycle évolutif du Trématode *F. hepatica* s'effectue par l'intermédiaire de deux hôtes, l'un définitif qui assure le développement du parasite sous sa forme adulte, l'autre intermédiaire qui assure la multiplication des formes larvaires.

- Ce dernier hôte est un mollusque d'eau douce. Le plus fréquemment cité dans l'Europe de l'Ouest est la Limnée tronquée, connue pour son amphibiologie.

- Les techniques utilisées pour élever ce mollusque dans les conditions du laboratoire afin d'obtenir des métacercaires respectent le comportement amphibie de cette limnée et sont basées sur la culture des algues dont elles se nourrissent. Des variantes dans ces méthodes existent selon les auteurs.

La revue de ces techniques montre que plusieurs points sont difficiles à maîtriser lorsque l'on veut développer ces méthodes dans de nouveaux laboratoires. En particulier, la consistance boueuse du substrat sur lequel se développent les algues est fortement dépendante de la couche d'eau le recouvrant d'une part, de l'évaporation du sédiment d'autre part. Le recueil des métacercaires diffère largement selon les auteurs.

C'est pourquoi nous nous sommes proposé de réaliser une technique plus simple pour obtenir ces métacercaires de *F. hepatica*. Pour mettre au point cette méthode, nous avons recherché:

- une population de *L. truncatula* qui soit fortement liée au milieu aquatique et possède donc un faible degré d'amphibiose. En effet, cette capacité varie fortement lorsque la limnée vit en plaine, en altitude (MASSIAS *et al.*, 1996) ou sur le bord des cours d'eau (DREYFUSS *et al.*, 1997).

- une nourriture basée sur la dégradation naturelle de feuilles (salade par exemple) lors de leur séjour dans l'eau.

Les résultats de cette expérimentation sont fournis dans le chapitre troisième de ce mémoire.

LA TECHNIQUE UTILISÉE POUR LA PRODUCTION MÉTACERCARIENNE

Le but de ce chapitre est de regrouper toutes les informations qui sont nécessaires pour comprendre la méthode dont nous nous sommes servi pour produire des métacercaires de *F. hepatica*.

Le plan utilisé est classique. Après avoir détaillé le matériel biologique et le protocole de l'expérience, nous formulerons des commentaires sur la méthodologie et présenterons les paramètres que nous avons utilisés au cours de cette étude.

I. - LA POPULATION DE LIMNÉES TRONQUÉES.

A. DESCRIPTION DU GÎTE.

La population de *L. truncatula* vit au hameau du Masvaudier, commune de Courcelles, département de la Creuse. Il s'agit d'un fossé de route (celle allant vers Lascaud) et le gîte s'étend à droite, sur une centaine de mètres environ à partir du hameau.

La morphologie de ce gîte est particulière. La pente du fossé suit celle de la route à cet endroit, avec une dénivellation de 3 % environ. Ceci retentit sur la morphologie de l'habitat, avec a) des zones resserrées là où le socle (micaschistes) est à nu et b) de petites cuvettes profondes de 10 cm au maximum, emplies de nombreux graviers et des restes de feuilles d'arbres ou d'autres macrophytes qui s'y accumulent à l'entrée de l'hiver.



Planche C.

- Le site du Masvaudier, commune de Courcelles (Creuse):
- Vue générale du fossé: n° 1.
 - Vue des passages resserrés et des cuvettes: n° 2.
- Crédit photos: G. DREYFUSS, Université de Limoges.

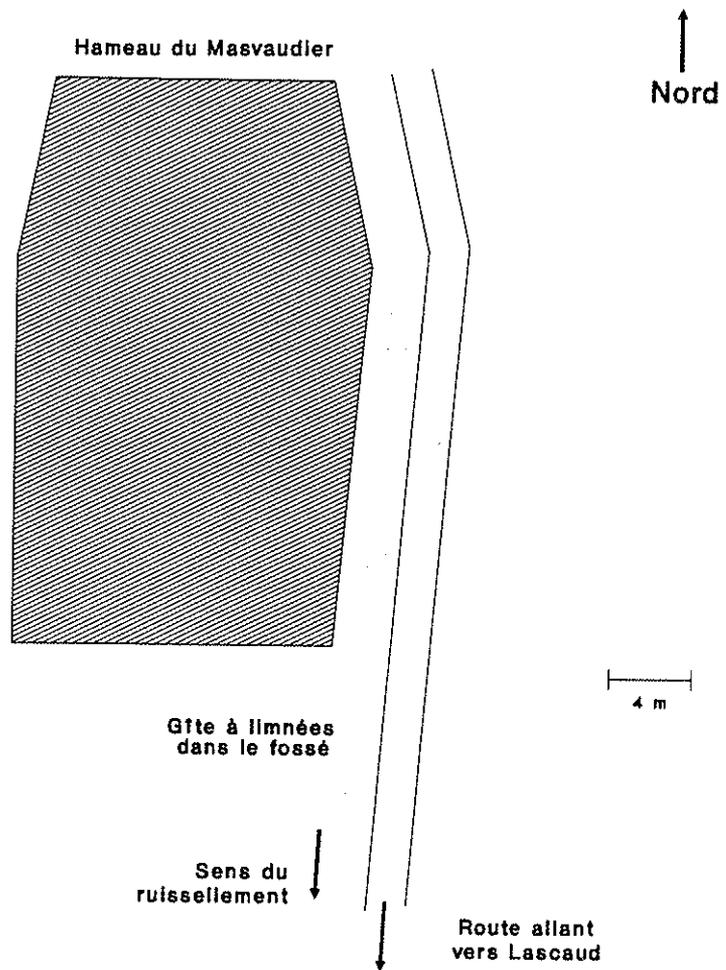


Figure 12.
 Plan détaillé de la station où les *L. truncatula*
 ont été récoltées. Les flèches indiquent les zones
 où les prélèvements ont été effectués.

La planche C présente deux illustrations du site. La première photographie montre la pente de la route et la couverture formée par les arbres au-dessus du fossé si bien que les limnées ne reçoivent la lumière du soleil que pendant deux heures (7-9 heures) au cours des mois d'été. Sur l'autre cliché (n° 2), on constate nettement la succession des zones défilées et des cuvettes avec des graviers.

Un plan sommaire de la station est fourni sur la figure 12.

Le régime hydrologique est lié à la pluviométrie importante qui sévit dans cette région: entre 1.300 et 1.400 mm par année (VILKS, 1991) si bien que le fossé peut être complètement occupé par l'eau de ruissellement dans les heures ou les jours qui suivent une précipitation. Par contre, entre deux périodes pluvieuses, le site s'assèche progressivement avec une évaporation limitée par la couverture des arbres et la température moyenne annuelle, relativement faible (7,5° C: VILKS, 1991) dans cette zone de la région Limousin.

Le dessèchement de la station n'est cependant jamais complet car les deux fermes situées au-dessus de la station évacuent, par l'intermédiaire du fossé, chaque jour, des eaux de rejet. Nous avons toujours constaté au moins la présence d'eau stagnante lors de nos différentes prospections en 1996 et 1997. A notre avis, ce site représente un gîte réservoir (TAYLOR, 1965) avec de l'eau en quasi-permanence, permettant à l'espèce de survivre dans des conditions optimales lors des mois d'été.

L'eau circulant dans ce fossé se jette dans une prairie de 1 ha environ, située en contrebas. Une zone marécageuse de 10 m² se situe dans la partie haute de cette pâture, prolongée par un début de rigole par lequel circule irrégulièrement l'eau issue des précipitations atmosphériques. Nous n'avons pas constaté la présence de Limnées tronquées dans cette parcelle, malgré des investigations répétées.

La question de la nourriture dans le fossé se pose. La présence de feuilles d'arbres et, éventuellement, d'autres plantes y est fréquente et il n'est pas rare de voir en été un groupe de 20 à 50 mollusques en train de "broûter" des éléments nutritifs sur ces feuilles. Les algues filamenteuses sont rares dans ce site. Par contre, une fine couverture d'algues vertes, particulièrement visible si l'on éclaire avec une lampe électrique, se situe sur les blocs rocheux et les plus gros cailloux, avec souvent des mollusques isolés ou des groupes de 2 ou 3 individus, fixés dans la zone supérieure du substrat.

Planche D.

La population de *L. truncatula* de Courcelles (Creuse).

- La coquille d'un mollusque parasité atteignant 9 mm de hauteur:
n° 1.
- Vue générale de deux mollusques dans une boîte de Pétri
(diamètre, 35 mm): n° 2.

Crédit photos: M. DREYFUSS, Faculté de Pharmacie,
Université de Limoges.



1



2

B. PROBLÈMES D'IDENTIFICATION.

La planche D montre des illustrations sur quelques exemplaires de *L. truncatula*. L'espèce atteint normalement une hauteur de 8 mm à l'état adulte. Si l'animal est parasité (deux exemplaires² sur plus de 4.000 mollusques récoltés en 1997), cette taille peut être de 11 mm.

Plusieurs points nous ont posé problème pour identifier cette population:

- 1) L'absence d'étagement pour les tours de la spire. Ce fait est très net sur le cliché n° 1, planche D. Des variétés de *L. truncatula* en fonction de leur origine géographique ont déjà été citées par GERMAIN (1930/1931) dans sa revue sur les mollusques français et, plus récemment, par LEIMBACHER *et al.* (1972), dans une note de vulgarisation. Mais la dissection des *genitalia*³ permet de rattacher cette colonie à l'espèce *L. truncatula* en s'appuyant sur les travaux de ROZKOWSKI (1922) et de LARAMBERGUE (1928).

- 2) Le grégarisme de cette population. Des densités de 100 à 180 individus au mètre carré ont été relevées en 1997 ou en 1997 dans cette station, avec souvent une concentration autour des zones où se trouve de la nourriture. Même si les descendants sont compris dans ces décomptes, les chiffres sont largement supérieurs à ceux qu'ont rapportés d'autres auteurs pour *L. truncatula*: en moyenne moins de 20 mollusques par m² sur sol siliceux (VAREILLE, 1996; GUICHARD, 1997).

- 3) Le faible degré d'amphibiose que possède cette population. Les individus ont toujours été observés immergés ou à l'interface terre-eau. Lorsque l'eau se retire par suite de l'assèchement, les mollusques suivent son retrait. Même aux plus fortes chaleurs de l'été, les limnées sont dépendantes de l'eau et ne se réfugient pas sur le sédiment émergé humide. Ceci contraste avec les observations que d'autres auteurs ont faites sur des populations de *L. truncatula* vivant dans des prairies marécageuses (RONDELAUD, 1974; RONDELAUD et MAGE, 1988, par exemple).

² - Les cercaires issues de ces deux exemplaires sont des xyphidiocercaires (cercaires à stylet). Nous remercions M. D. AUGOT pour le montage des cercaires sur lames histologiques et Mme C. BAYSSADE-DUFOUR, du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, pour l'identification de ce Trématode.

³ - Cette dissection a été réalisée par M. RONDELAUD.

- 4) Le comportement particulier de ces mollusques car ils sont souvent en déplacement à la surface supérieure des cailloux qui parsèment l'habitat. Cette attitude ne correspond pas à un réflexe de sauvegarde lorsqu'un torrent d'eau pluviale survient inopinément (RONDELAUD, *communication personnelle*). Il est également difficile de rattacher ce fait à un déplacement pour la nourriture car les concentrations de mollusques autour des feuilles d'arbres en décomposition se produisent aussi bien dans les cuvettes que sur les cailloux si tel est le cas. Dans le cadre de notre expérience, nous n'avons pas pu expliquer ce type de comportement.

C. CARACTÉRISTIQUES DES PRÉLÈVEMENTS DANS CETTE STATION.

Des récoltes portant sur 200 à 300 mollusques ont été régulièrement réalisées tous les 15 jours dans ce site depuis le 15 avril 1997 jusqu'au 15 juin suivant. Le nombre total des animaux prélevés est de 1.308.

Des individus hauts de 4 mm ($\pm 0,2$ mm) ont été prélevés à la pince souple et placés dans de petits pots à raison de 50 individus par dm³. Quelques feuilles d'arbre, dégradées et humides sont ajoutées dans chaque récipient mais il n'y a pas d'eau stagnante afin d'éviter un stress lors du transport. Les pots sont mis sous des conditions isothermes et transportés au laboratoire. A leur arrivée, les limnées sont placées pendant 48 heures au moins à la température de 20° C dans des aquaterrariums où elles subissent une période d'acclimatation avant d'être exposées aux miracidiums.

Les aquaterrariums sont constitués par différents récipients à fond plat, contenant une couche de graviers et des cailloux plus gros disposés autour d'une zone propre où est déposée la nourriture (salade en lyse). L'eau (Volvic⁴) recouvre les graviers mais est insuffisante en quantité pour que les blocs soient immergés. Légèrement incliné de manière à dégager un plan émergé mais humide, ce système permet aux mollusques (100/m²) de croître en taille à condition d'enlever l'eau souillée par les fèces et de la renouveler par de l'eau propre toutes les semaines.

⁴ - L'eau de Volvic (marque déposée) contient 9,9 mg d'ions calcium et 6,1 mg d'ions magnésium par litre. Nous avons utilisé cette eau minérale en raison de la teneur en ions calcium dissous proche de celle enregistrée dans le site (7,6 mg/L) et des facilités liées à sa diffusion commerciale.

II. - LES OEUFES DE *F. hepatica*.

Les foies de bovins, saisis à l'abattoir de Limoges pour distomatose sont à l'origine des oeufs que nous avons utilisés dans le cadre de notre expérimentation. La vésicule biliaire correspondante est percée et la bile est recueillie dans des pots en verre, de deux litres chacun. Ce liquide est transporté au laboratoire où il est traité aussitôt pour recueillir les oeufs avant que la bile ne se putréfie.

Les bovins proviennent d'élevages situés dans la région Limousin. C'est la raison pour laquelle nous avons récupéré cette bile seulement lors des abattages du vendredi. L'origine de ces exploitations est variable. La plupart d'entre elles, d'où proviennent les animaux, sont localisées dans le Sud-Ouest de la Haute-Vienne.

Comme les oeufs de *F. hepatica* sont plus lourds que le reste des éléments présents dans la bile, on procède au laboratoire à "l'épuisement" de la bile en versant dans l'évier la fraction supérieure de celle-ci et en remplissant le bocal avec de l'eau du robinet. Cette opération est répétée toutes les trois minutes environ jusqu'à l'obtention d'un sédiment propre, contenant les oeufs.

Ce dernier est ensuite filtré sur deux tamis de granulométrie, à grandeurs de mailles décroissantes (75 et 38 μm) sous l'eau du robinet. Les oeufs présents sur le deuxième tamis sont ensuite recueillis et lavés plusieurs fois.

Ils sont enfin répartis dans de petits pots en verre (40 cL). Chaque récipient reçoit 100 à 150 oeufs et de l'eau du robinet (teneur en ions calcium dissous: 30 mg/L) sur une épaisseur de 1 cm environ. Chaque pot est fermé par du Parafilm, puis enveloppé dans une feuille de papier aluminium, étiqueté et placé à la température constante de 20° C pendant 20 jours à l'obscurité totale selon les données d'OLLERENSHAW (1971). Nous n'avons pas employé de température supérieure à 20° C pour cette expérience car l'éclosabilité des oeufs de *F. hepatica* diminue lorsque la température s'élève (JIMENEZ-ALBARRAN et GUEVARA-POZO, 1977).

La préparation de ces oeufs a été effectuée toutes les trois semaines entre avril et juin. Au 21^e jour d'incubation, les oeufs sont prêts à éclore lorsqu'on les place pendant 1 heure sous une lumière électrique. Ils ont été utilisés au cours de la quatrième semaine après leur préparation. Au-delà du 27^e jour, les oeufs restants sont éliminés.

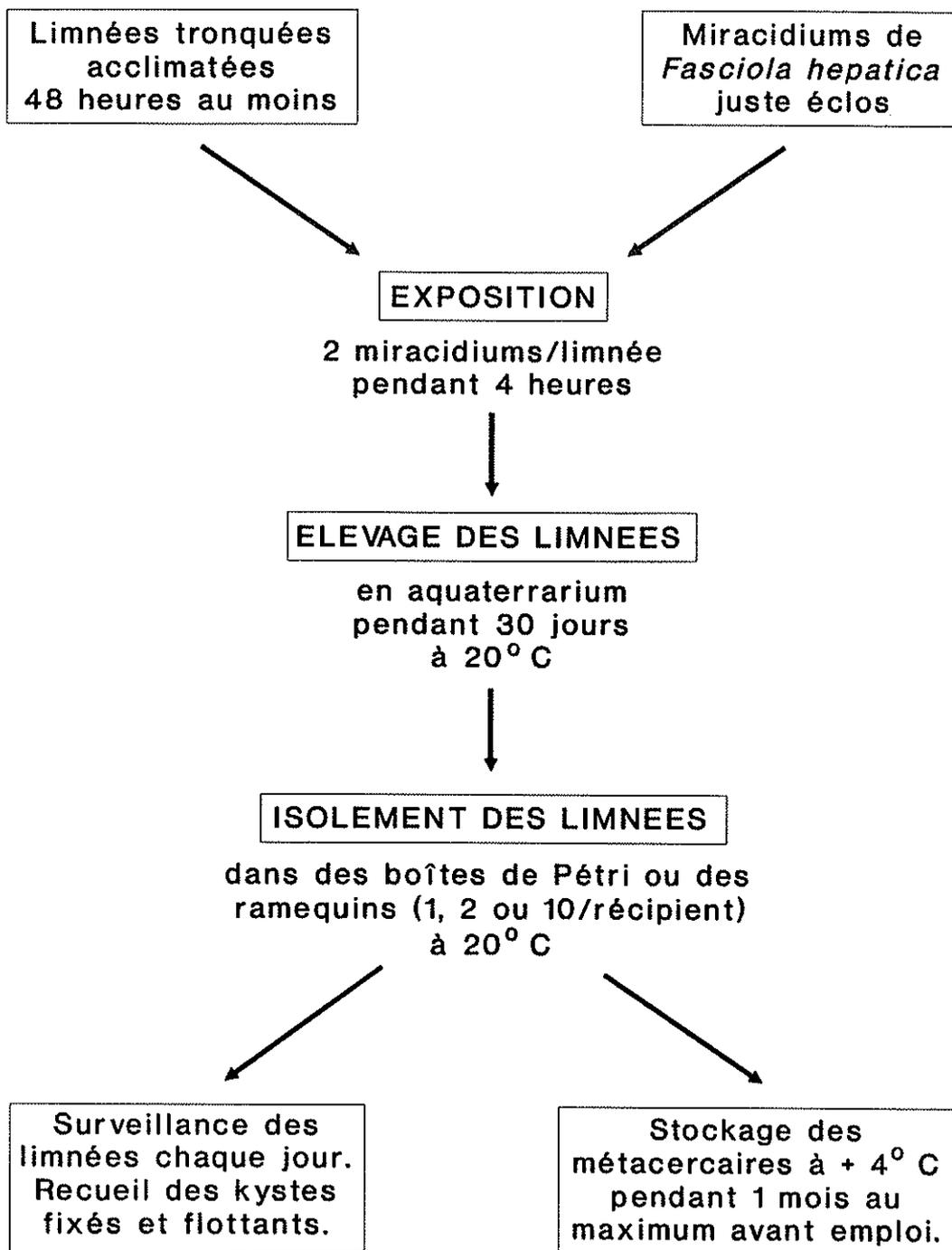


Figure 13.
Organigramme schématisant les différentes étapes
de la technique pour obtenir des métacercaires
de *F. hepatica* à partir de *L. truncatula*.
(d'après ROUMIEUX, 1997).

III. - PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.

La figure 13 résume les différentes étapes.

Les Limnées tronquées à infester sont isolées dans des tubes à hémolyse avec 6 à 8 mL d'eau de Volvic. Deux miracidiums prélevés parmi ceux qui "nagent en banc de poisson" sont aspirés à l'aide d'une pipette reliée à une poire, puis transférés dans le tube où ils sont expulsés délicatement. Les partenaires sont laissés en contact pendant 4 heures afin que les larves aient le temps de pénétrer dans leur hôte. La surveillance des limnées s'est révélée inutile dans le cas de cette population car 95 % d'entre elles restent dans l'eau et ne se réfugient pas sur les bords émergés.

Après cette exposition, les mollusques sont élevés pendant 30 jours à la température de 20° C dans des aquaterrariums selon les modalités qui ont déjà été précisées ci-dessus (page 45). Les limnées se déplacent parmi les graviers et sortent accessoirement sur les cailloux mais elles ne se fixent pas sur les parois des bacs, évitant ainsi des pertes inutiles. Deux facteurs se sont révélés indispensables: a) l'octroi de salade en lyse (après un séjour de 5 jours dans de l'eau de source) et son renouvellement une fois par semaine, et b) l'élimination hebdomadaire des fèces par un lâcher d'eau au sommet du plan incliné et son recueil à la base du conteneur d'élevage.

Au 30^e jour, les limnées survivantes sont placées dans différents récipients selon les caractéristiques des séries expérimentales suivantes:

Série	Récipient	Nombre de limnées	
		par récipient	dans la série
A	Boîte de Pétri, 35 mm de diamètre.	1	229
B	Idem.	2	488
C	Ramequin recouvert de cellophane.	10	250

Chaque boîte (ou ramequin) reçoit un fragment de salade (en lyse) pour la nourriture des limnées et de l'eau en quantité variable selon la contenance du récipient. Dans le cas d'une boîte de Pétri, le liquide est déversé jusqu'à ce qu'il touche les bords du couvercle

(lorsque le récipient est fermé) et une grosse bulle d'air stagne sous celui-ci. Dans le cas d'un ramequin, on déverse 30 mL d'eau. Cette quantité d'eau est nécessaire car les cercaires se fixent souvent juste sous la surface de l'eau et sont ingérées par la (ou les) limnée(s) si la quantité de liquide est trop faible dans le récipient.

Les boîtes et ramequins sont placés dans une salle climatisée à la température constante de 20° C. Une surveillance journalière est assurée pour enlever les métacercaires fixées et flottantes, changer l'eau et, si nécessaire, le fragment de salade. La récupération des métacercaires s'effectue en faisant glisser les kystes à l'aide d'une pince fine sur le couvercle humide et en les prélevant par capillarité.

Les métacercaires sont décomptées lors de leur récolte et placées dans des tubes Ependorff par groupes de 100, les deux types étant confondus. Elles sont stockées au réfrigérateur à la température de + 4° C.

IV. - AUTRES DONNÉES SUR LA MÉTHODOLOGIE.

La plupart des informations ont déjà été citées dans les paragraphes précédents. Nous rapportons ci-dessous quelques éléments qui nous ont semblé importants pour comprendre la technique que nous proposons:

A. LA LAITUE.

Le degré de dégradation pour la salade est essentiel pour que les limnées se nourrissent. Trop verte, les mollusques s'en désintéressent et recherchent des éléments nutritifs dans le reste du bac. Trop dégradée, elle n'est visitée que par quelques limnées. Un séjour de cinq jours dans de l'eau de source, renouvelée au 3^e jour est optimal pour avoir des fragments appétents pour *L. truncatula*.

Toutes les salades ne se dégradent pas à la même vitesse dans l'eau à 20° C. Une feuille de laitue Batavia mettra au moins huit jours dans de l'eau de Volvic avant d'entrer en lyse. Une laitue "à feuilles de chêne" aura un aspect dégradé à partir du 3^e jour. Lorsque les feuilles de salade sont à point, il faut les distribuer avec parcimonie (1 ou 2 feuilles de petite taille pour un aquaterrarium de 1 m²) afin d'éviter que les feuilles non consommées ne se putréfient à partir du 7^e jour après leur introduction dans les récipients d'élevage.

Le lieu de provenance de la salade est, lui aussi, important pour la réussite de l'expérience. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes servi de plants provenant de jardins privés, situés à l'écart de routes à grande circulation en raison des risques de pollution par le plomb. Nous avons délaissé les salades du commerce, même celles provenant de commerces agro-biologiques.

B. LA CONTAMINATION DU MILIEU D'ÉLEVAGE PAR LES ANIMAUX MORTS.

Quelques animaux meurent dans les heures ou dans les jours qui suivent leur infestation. Ils vont donc se décomposer et présenter un risque potentiel pour la survie des autres mollusques en raison des agents qu'ils peuvent véhiculer sur leur tégument externe (plusieurs espèces de champignons fréquentes, parfois des nématodes et d'autres parasites externes, ...).

La disposition en ligne de tous les mollusques après leur infestation sur la face inférieure d'un couvercle (boîte de Pétri de 16 ou 18 cm de diamètre, en polystyrène cristal) préalablement recouvert d'une pellicule d'eau est idéale pour différencier les survivants des individus morts ou mourants. Le couvercle est mis à flotter sur l'eau présente dans le récipient d'élevage. Les survivants se déplacent et quittent dans les 24 heures leur support tandis que les autres restent sur place. Ceci permet de retirer le couvercle avec les mollusques décédés et d'éviter ainsi une pollution du milieu.

C. L'ISOLEMENT DES SURVIVANTS AU 30^e JOUR.

Cette étape est la plus délicate. Il est nécessaire, en effet, de récolter tous les mollusques au 30^e jour après l'exposition aux miracidiums et de les examiner sous le stéréomicroscope afin de s'assurer qu'ils sont en vie. Le choix de cette date pour l'isolement a été retenu en fonction des résultats antérieurs (fournis par les infestations expérimentales de *L. truncatula* (AUDOUSSET *et al.*, 1989): certains individus parasités commencent à émettre des cercaires à partir du 33^e jour à 20° C.

Un mollusque vivant se reconnaît à son pied gris noirâtre, avec la sole affleurant généralement à l'ouverture de la coquille lorsque le mollusque est rétracté. Des ondulations minimales du pied se voient nettement lors de l'observation. L'effleurement de cet organe avec

Matériel	Technique	Observations.
Aquaterrarium, tubes à hémolyse, boîtes de Pétri, tuyauterie en téflon pour l'aération.	Les récipients sont vidés de leur contenu, grattés, lavés plusieurs fois à l'eau du robinet et placés à l'étuve à 40° C.	Eau de javel et agents détersifs proscrits.
Gravier et cailloux.	Lavage et stérilisation à la chaleur sèche (à 110° C pendant 1 heure).	Néant.
Pincés souples, pincés fines, pipettes Pasteur.	Stérilisation à la chaleur sèche comme ci-dessus.	Un grattage est parfois nécessaire pour les pincés souples avant stérilisation. Ethanol proscrit.
Autre matériel consommable.	Eliminé après emploi.	Néant.

Tableau IV.
 Les soins apportés au matériel d'élevage et d'infestation après usage. Ces informations proviennent du laboratoire d'accueil et correspondent à la technique utilisée en 1997.

une pince entraîne une rétraction partielle et rapide. Lorsque l'on touche le dessus de la coquille, une mince bulle d'air se forme sur le côté droit.

Une limnée morte ou mourante a un pied gris clair, en position variable. Parfois, il est étendu et on voit nettement la couleur orange du complexe radulaire sous l'épithélium grisâtre du mufle. Le plus souvent, il est rétracté de manière irrégulière dans la coquille. L'effleurement n'entraîne pas de réaction (à ne pas confondre avec un léger retrait qui provient de la lyse cadavérique) et la bulle d'air émise est souvent volumineuse.

D. L'ENTRETIEN DU MATÉRIEL D'ÉLEVAGE ET D'EXPOSITION.

Comme dans tout élevage, il est nécessaire que le matériel soit nettoyé afin d'éviter une contamination lors d'un essai ultérieur.

Le tableau IV présente les techniques qui sont utilisées par le laboratoire d'accueil en 1997.

V. - PARAMÈTRES ÉTUDIÉS.

Ils sont au nombre de sept:

- 1) le taux de survie au 30^e jour post-exposition. Le pourcentage est calculé par le rapport suivant: (nombre de mollusques vivants à cette date) / (effectif initial des limnées au départ de l'expérience). Ce taux est exprimé sous forme de pourcentage.

- 2) la prévalence de l'infestation parasitaire établie sur le nombre de mollusques émettant des cercaires. Le mode de calcul est le suivant: (nombre d'individus avec émission) / (effectif des survivants au 30^e jour). Elle est également exprimée en pourcentage.

- 3) la croissance du mollusque au cours de l'expérience. Elle correspond à la différence de taille qui existe entre la hauteur des animaux au départ de l'expérience (soit 4 mm) et celle mesurée à la mort des limnées.

- 4) la durée de vie du mollusque, depuis l'exposition aux miracidiums jusqu'à sa mort.

- 5) l'intervalle de temps entre l'exposition aux miracidiums et la première émission cercarienne. Cette phase correspond au début des formes larvaires immatures.

- 6) la durée de la période où s'effectuent les émissions (ou période patente).
- 7) le nombre total de métacercaires obtenues dans chaque série.

Deux analyses ont porté sur a) la répartition numérique des limnées en fonction du nombre des métacercaires (exprimée sous forme de classes de 25 parasites chacune) et b) la distribution des métacercaires produites en fonction de la durée de la période d'émission (exprimée sous forme de tranches de 4 jours chacune).

Le test de comparaison des fréquences expérimentales (pour deux paramètres) et l'analyse de variance à un seul facteur (pour les autres facteurs) ont été utilisés pour établir les niveaux de signification statistique (STAT-ITCF, 1988).

RÉSULTATS

Les données fournies par l'infestation expérimentale des limnées de Courcelles sont regroupées dans le présent chapitre⁵.

Après avoir présenté les chiffres se rapportant à la survie des mollusques et la prévalence de l'infestation fasciolienne, nous détaillerons les durées du développement larvaire chez les mollusques parasités et le nombre de métacercaires obtenues dans les trois séries.

I. - TAUX DE SURVIE ET D'INFESTATION.

Le tableau V (page suivante) indique les valeurs des deux paramètres pour les trois groupes de mollusques. La lecture de ce dernier permet les remarques suivantes:

- La survie des mollusques au 30^e jour d'expérience est voisine, avec des valeurs se situant entre 71 et 76,2 %. Il est vrai que les limnées proviennent de la même colonie et ont été infestées selon le même protocole.

⁵ - *Les études sur les mollusques isolés et les limnées par groupes de deux (par couples) ont été réalisées en collaboration avec un autre stagiaire (ROUMIEUX, 1997). Celle sur les mollusques par groupes de dix est personnelle.*

Paramètre	Limnées isolées.	Couples.	Groupes par 10.
Nombre d'individus au départ.	321	640	347
Nombre de survivants au 30 ^e jour.	229	488	257
Taux de survie.	71,3 %	76,2 %	74,1 %
Nombre de limnées avec émission.	190	312 (156 couples)	120 (12 groupes)
Prévalence de l'infestation.	82,9 %	63,9 %	46,6 %

Tableau V.

Le taux de survie et la prévalence de l'infestation fasciolienne dans les trois séries de limnées expérimentées. La prévalence de l'infestation a été établie sur le nombre de mollusques avec émission.

- A l'inverse du taux de survie, la prévalence de l'infestation montre des valeurs plus variables. Si le taux est de 82 % chez les mollusques isolés, il n'est plus que de 63 % chez les limnées maintenues par couples et de 46 % chez celles par groupes de dix.

Cette variabilité de la prévalence selon les séries doit, à notre avis, être rapportée à la mortalité des mollusques. En effet, le premier individu qui meurt dans un couple ou un groupe plus important entraîne souvent le décès de l'autre (ou des autres) membre(s) et ceci, malgré l'enlèvement du mort, le changement de l'eau, de la salade et, parfois, le changement de boîte (Pétri) ou de ramequin.

Les pourcentages obtenus dans le cadre de ces expériences ont été soumis au test de comparaison des fréquences expérimentales. Les résultats fournis par cette analyse sont regroupés dans le tableau ci-dessous:

	Modalités de la comparaison	Signification
Taux de survie	Isolés/Couples.	NS
	Couples/Groupes de 10.	NS
	Isolés/Groupes de 10.	NS
Prévalence	Isolés/Couples.	$P < 0,1 \%$
	Couples/Groupes par 10.	$P < 0,1 \%$
	Isolés/Groupes par 10.	$P < 0,1 \%$

Abréviations: NS (non significatif). P (probabilité).

La lecture de ces résultats montre que les différences entre les taux de survie au 30^e jour ne sont pas significatives. Par contre, celles entre les trois prévalences sont toutes significatives, quel que soit le mode de comparaison.

II. - CROISSANCE DES MOLLUSQUES AU COURS DE L'EXPÉRIENCE.

La figure 14 (page suivante) fournit les résultats obtenus dans les trois séries. Ces derniers se rapportent à la différence de taille entre la hauteur des animaux au départ de l'expérience (soit 4 mm) et celle qui a été mesurée à la mort des limnées.

Les valeurs sont voisines, avec des moyennes comprises entre 2,1 et 2,5 mm.

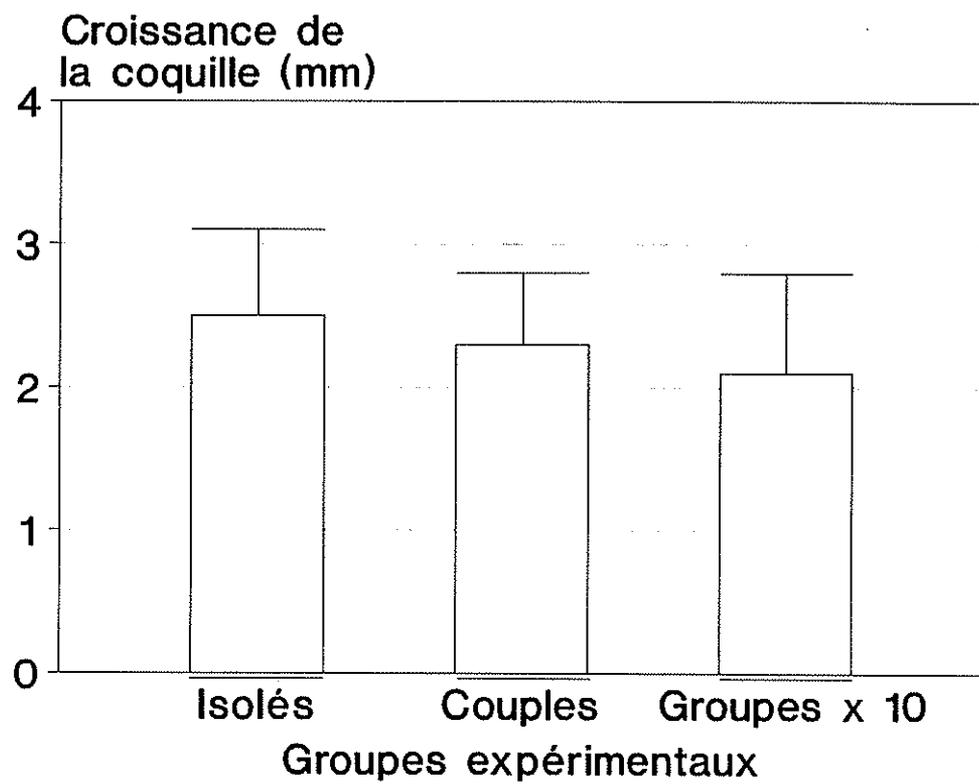


Figure 14.
La croissance des mollusques au cours de l'expérience
dans les trois séries de *L. truncatula*.
Les moyennes sont indiquées avec leurs écarts types.

Les moyennes ont été soumises à une analyse de variance. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-après:

Modalités de la comparaison	Degrés de liberté	Rapport F de Fisher	Signification
Les trois séries.	2/619	3,06	$P < 5 \%$
Isolés/Couples.	1/500	1,94	NS
Couples/Groupes par 10.	1/430	0,41	NS
Isolés/Groupes par 10.	1/308	1,12	NS

Abréviations: NS (non significatif). P (probabilité).

Il n'y a pas de différence significative entre les moyennes lorsque l'on compare les moyennes deux par deux.

III. - DURÉES DU DÉVELOPPEMENT LARVAIRE.

La figure 15 précise les moyennes et les écarts types pour deux paramètres. Le premier se rapporte à l'intervalle de temps entre l'exposition aux miracidiums et la première émission cercarienne. Le second concerne la durée de la période où les sorties de cercaires ont lieu.

L'intervalle de temps est voisin dans les trois séries: de 57 à 59 jours. Les différences entre les moyennes ne sont pas significatives ($F = 2,87$).

La période d'émission est plus longue chez les limnées isolées ou par couples que chez celles qui ont été maintenues par groupes de dix: 20,2 et 16,6 jours au lieu de 9,5. Le tableau suivant fournit les résultats de l'analyse de variance:

Modalités de la comparaison	Degrés de liberté	Rapport F de Fisher	Probabilité P
Les trois séries.	2/619	24,13	$P < 0,1 \%$
Isolés/Couples.	1/500	6,64	$P < 5 \%$
Couples/Groupes par 10.	1/430	14,78	$P < 0,1 \%$
Isolés/Groupes par 10.	1/308	18,17	$P < 0,1 \%$

Les différences entre les moyennes sont toutes significatives.

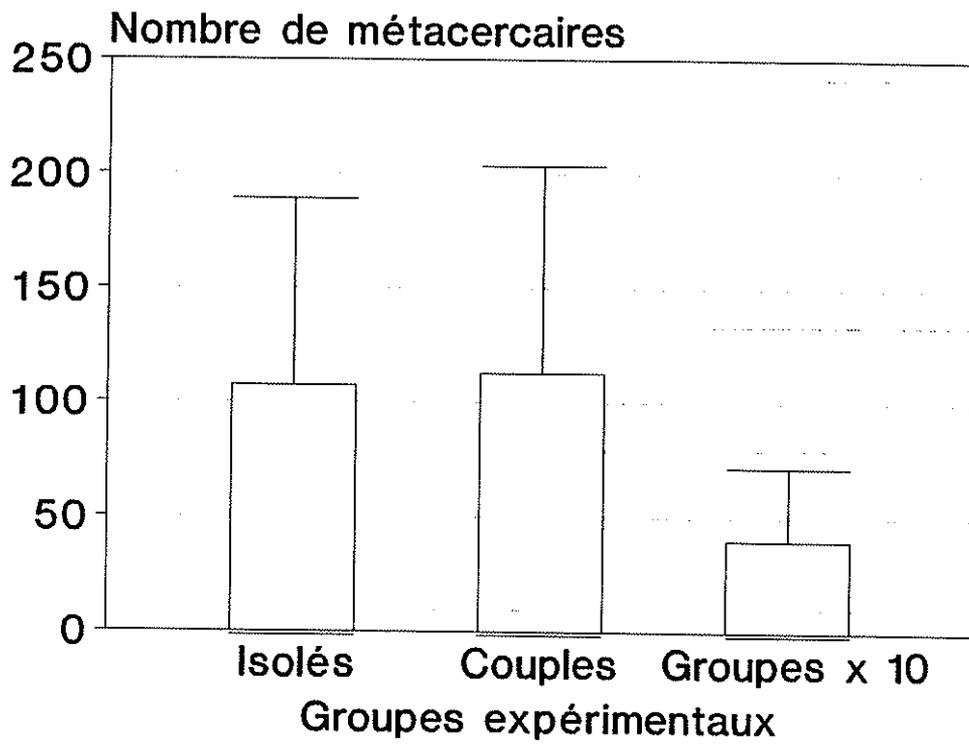


Figure 16.
 Le nombre total des métacercaires de *F. hepatica*
 dans les trois séries de *L. truncatula*.
 Les moyennes sont indiquées avec leurs écarts types.

IV. - LES MÉTACERCAIRES DE *F. hepatica*.

A. NOMBRE TOTAL DE PARASITES.

Les résultats sont fournis sur la figure 16.

Il est de 107 métacercaires chez les limnées isolées. Les chiffres sont plus difficiles à interpréter dans les deux autres séries:

- Chez les mollusques maintenus sous forme de couples, le chiffre est de 112,5 métacercaires pour deux limnées, ce qui correspond à 56,2 parasites pour chaque individu pris isolément.

- Chez les mollusques étudiés par dix, il y a seulement 40 métacercaires par groupe, ce qui correspond à 4 parasites par limnée.

Dans le cas des couples et des groupes, il est impossible d'attribuer la production métacercarienne à l'une ou à l'autre des limnées. Aussi la comparaison statistique a-t-elle été réalisée sur les moyennes obtenues pour les deux catégories. Les résultats sont fournis sur le tableau suivant:

Modalités de la comparaison	Degrés de liberté	Rapport F de Fisher	Signification
Les trois séries.	2/619	28,07	$P < 0,1 \%$
Isolés/Couples.	1/500	0,35	NS
Couples/Groupes par 10.	1/430	18,79	$P < 0,1 \%$
Isolés/Groupes par 10.	1/308	19,34	$P < 0,1 \%$

Abréviations: NS (non significatif). P (probabilité).

Deux différences entre la moyenne des limnées par groupes de dix et celles des deux autres lots sont significatives mais ce n'est pas le cas pour celle entre les limnées isolées et les couples.

Devant ces résultats, nous avons cherché à savoir si l'action du groupement (par 2 ou par 10) avait une influence éventuelle sur la répartition numérique des métacercaires. Nous avons donc comparé cette distribution à celle des limnées qui ont émis des parasites ou à la durée de la période d'émission.

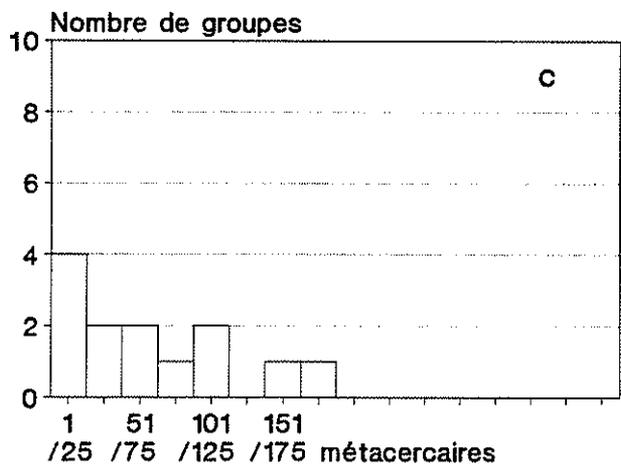
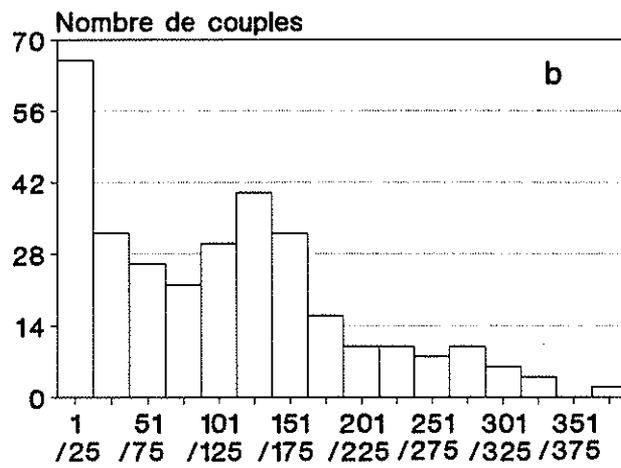
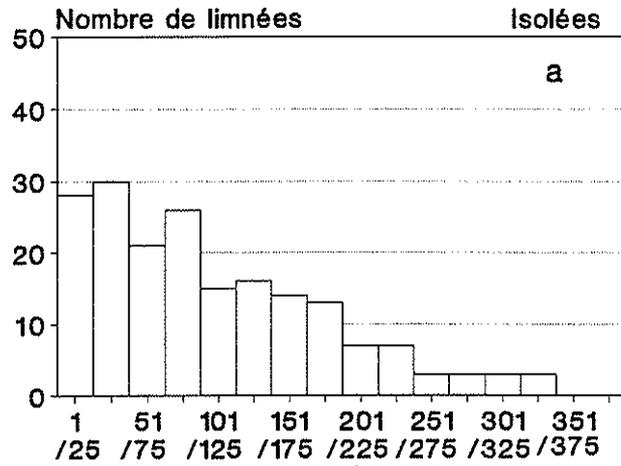


Figure 17.
La répartition des limnées parasitées en fonction du nombre des métacercaires (exprimé sous forme de classes de 25 parasites chacune).

B. RÉPARTITION DES LIMNÉES INFESTÉES EN FONCTION DU NOMBRE DES MÉTACERCAIRES.

Elle est précisée sur la figure 17. Le nombre total de métacercaires obtenu pour chaque mollusque y est exprimé sous forme de classes de 25 parasites chacune.

Le nombre des limnées isolées (Fig. 17a) diminue progressivement lorsque la charge parasitaire s'accroît. La même remarque peut être formulée pour les couples de limnées (Fig. 17b) malgré l'existence d'un léger ressaut pour les classes 126/175 métacercaires. Dans le cas des groupes de dix limnées (Fig. 17c), il n'y a rien de concluant.

C. RÉPARTITION DES MÉTACERCAIRES PAR RAPPORT À LA DURÉE DE LA PÉRIODE D'ÉMISSION.

Dans le cas des limnées isolées (Fig. 18a), les valeurs sont sensiblement constantes tout au long de la période. Dans le lot des couples (Fig. 18b), la production est optimale jusqu'au 8^e jour; par la suite, elle diminue et présente une certaine constance jusqu'à la fin de la période d'émission. Enfin, les moyennes sont relativement constantes dans le cas des groupes de dix limnées (Fig. 18c).

Les moyennes ont été comparées par l'analyse de variance. Les résultats sont indiqués sur le tableau ci-après:

Modalités de la comparaison		Degrés de liberté	Rapport F de Fisher	Signification
Limnées isolées.	Toutes les classes.	10/623	0,63	NS
Limnées par couples.	Toutes les classes.	10/462	2,35	$P < 5 \%$
	Toutes les classes (sauf 1-4 et 5-8 jours).	8/233	0,77	NS
	Classes 1-4/5-8 jours.	1/229	0,001	NS
Limnées par groupes de 10.	Toutes les classes.	3/172	1,34	NS
Classes de temps 1-4 jours:				
- Entre les trois séries.		2/378	12,39	$P < 0,1 \%$
- Limnées isolées/Couples.		1/342	8,28	$P < 1 \%$

Abréviations: NS (non significatif). *P* (probabilité).

Aucune variation significative n'a été enregistrée chez les mollusques isolés ou maintenus par groupes de dix. Par contre, chez les couples, la production parasitaire est significativement plus élevée pendant les huit premiers jours.

COMMENTAIRES

Le but de ce chapitre est de comparer les résultats de notre expérimentation par rapport aux données de la littérature parue sur ce sujet.

Une courte synthèse rappelant les principales données est présentée dans le premier paragraphe. Ces dernières seront discutées par rapport à la littérature dans la deuxième subdivision de cet exposé.

I. - SYNTHÈSE.

Des limnées provenant d'une population à faible degré d'amphibiose ont été exposées aux miracidiums de *F. hepatica* et élevées à 20° C pendant 30 jours avant d'être suivies jusqu'à leur mort sous forme isolée, en couples ou par groupes de dix individus chacun.

La survie des mollusques au 30^e jour d'expérience est voisine, avec des valeurs se situant entre 71 et 76,2 %. La prévalence de l'infestation montre des valeurs plus variables. Si le taux est de 82 % chez les mollusques isolés, il n'est plus que de 63 % chez les limnées maintenues par couples et de 46 % chez celles qui ont été suivies par groupes de dix.

L'intervalle de temps entre l'exposition et la première émission cercarienne dure 57 à 59 jours. La période d'émission est plus longue chez les limnées isolées ou par couples que chez celles qui sont maintenues par groupes de dix (20,2 et 16,6 jours au lieu de 9,5).

Références	Hauteur au départ de l'expérimentation. (nombre de colonies)	Nombre de miracidiums.	Température d'élevage.	Survie au 30 ^e jour (en %).
BUSSON, 1981; BUSSON <i>et al.</i> , 1982.	Nouveau-nés (deux).	3	23° C	62,0 86,0
RONDELAUD et BARTHE, 1982.	4 mm (une seule).	1 2 5 10 20	20° C	73,0 66,0 32,0 30,0 18,0
SINDOU, 1989; SINDOU <i>et al.</i> , 1991.	Nouveau-nés, 1 mm, 2 mm, 4 mm (une seule).	1	20° C	7,7 18,3 85,0 69,0
RONDELAUD, 1993.	4 mm (dix-sept) ^a .	1	20° C	25 à 60
DREYFUSS, 1994; DREYFUSS et RONDELAUD, 1994.	4 mm (une seule).	2	20° C	56,5
BARRET, 1996.	4 mm (Veyrac).	1 2 5 10 20	20° C	64,0 79,0 67,0 50,0 23,0
	4 mm, 5 mm, 6 mm, 8 mm (trois).	2	20° C	39 à 79 55 à 82 51 à 74 27,0
ROUMIEUX, 1997.	4 mm (une seule).	2	20° C	87,5
Nos résultats.	4 mm (une seule).	2	20° C	71 à 76 selon les séries.

^a. La survie des mollusques au 30^e jour ne dépasse pas 25 à 37 % lorsque le contact naturel de la colonie avec *F. hepatica* est rare ou exceptionnel.

Tableau VI.

Les taux de survie rapportés par différents auteurs chez des *L. truncatula* infestées par *F. hepatica* (tableau de BARRET, 1996, complété avec des données récentes).

Le nombre de métacercaires par limnée est de 107 chez les limnées isolées. Chez les mollusques maintenus sous forme de couples, le chiffre est de 112,5 métacercaires pour deux limnées, ce qui correspond à 56,2 parasites pour chaque individu pris isolément. Chez les mollusques étudiés par dix, il y a seulement 40 métacercaires par groupe, soit 4 parasites par limnée.

La répartition numérique des métacercaires a été étudiée par rapport à la durée de la période d'émission. Chez les limnées isolées, les valeurs sont sensiblement constantes tout au long de la période. Chez les couples, la production est optimale jusqu'au 8^e jour; par la suite, elle diminue et présente une certaine constance jusqu'à la fin. Enfin, les moyennes sont relativement homogènes dans le cas des groupes de dix limnées.

II. - DISCUSSION.

A. LES CARACTÉRISTIQUES DE L'INFESTATION FASCIOLIENNE CHEZ *L. truncatula*.

Elles dépendent des modalités expérimentales comme DREYFUSS (1994) ou BARRET (1996) l'ont montré dans leur thèse. Parmi celles-ci, il faut citer la taille de *L. truncatula* lors de l'exposition, le nombre de miracidiums utilisés pour chaque mollusque et la température de l'élevage. Aussi, avons-nous indiqué, sur les tableaux ci-dessous, les conditions des expériences réalisées par quelques auteurs en regard des chiffres que nous présentons pour les trois caractéristiques qui nous ont semblé les plus importantes pour analyser le comportement de notre population.

1. La survie du mollusque au 30^e jour d'expérience.

Le tableau VI détaille les valeurs de ce paramètre en fonction des données que plusieurs auteurs ont rapportées pour les limnées nourries avec de la salade dégradée par un séjour dans l'eau comme dans notre expérience.

Une grande variabilité existe au niveau des chiffres lorsque l'on considère des animaux de la même hauteur, soumis à une charge miracidienne identique. Les pourcentages vont ainsi de 25 à 87,5 %. Cette différence dans les taux doit être rapportée à la sensibilité plus ou moins grande des limnées au parasite. D'après RONDELAUD (1993), le facteur à

retenir pour expliquer cette variabilité dans la sensibilité serait la fréquence de rencontre entre le mollusque et le parasite dans le milieu naturel (voir chapitre premier, pages 25-26).

Les pourcentages au 30^e jour diminuent dans la même population de *L. truncatula* lorsque le nombre de miracidiums utilisés devient de plus en plus élevé. Ce fait a été constaté par RONDELAUD et BARTHE (1982) et par BARRET (1996). Cependant, ce fait ne s'applique pas à toutes les populations. C'est ainsi que dans la population de *L. truncatula* vivant à Berneuil (Haute-Vienne), BARRET observe une certaine constance dans les taux de survie (de 39 à 68 %), quelle que soit la charge miracidienne utilisée (résultats non représentés).

L'impact de la taille initiale du mollusque sur le taux de survie est difficile à mettre en évidence car la plupart des expériences ont été réalisées avec des populations différentes de limnées. D'après SINDOU (1989), le taux de survie des nouveau-nés et des juvéniles hauts de 1 mm est nettement plus faible que celui d'animaux plus âgés mais cette constatation n'a pas été retrouvée par BUSSON (1981) car cet auteur rapporte 62 et 86 % de survie chez des nouveau-nés de deux populations, exposés chacun à trois miracidiums et élevés à 23° C. BARRET (1996) ne constate pas de variation nette dans le taux de survie lorsque la taille lors de l'exposition aux miracidiums augmente. Seules, les animaux hauts de 8 mm ont une survie plus faible.

Dans ces conditions, les chiffres obtenus avec la population de Courcelles (71 à 76 % selon la série) s'inscrivent dans les valeurs supérieures de la gamme rapportée pour des animaux hauts de 4 mm pour différentes souches et nous autorisent à dire que cette colonie résiste assez bien à une infestation expérimentale par *F. hepatica*.

2. La prévalence de l'infestation parasitaire.

Dans le cadre de cette expérience, nous avons calculé ce paramètre en nous basant sur le nombre de mollusques produisant des cercaires. Or, d'après DREYFUSS (1994), il existe, dans chaque série expérimentale, des limnées infestées qui meurent sans produire de parasites et seule une étude *post-mortem* des cadavres par dissection permet de les reconnaître. Comme nous n'avons pas effectué ce type d'étude, nos données ont seulement été comparées avec celles de la littérature se rapportant aux mollusques avec émission.

Références	Nombre de populations étudiées	Nombre de miracidiums par limnée*	Taux d'infestation (%)
RONDELAUD, 1993.	17	1	32 à 57 (isolés)**
DREYFUSS, 1994; DREYFUSS et RONDELAUD, 1994.	1	2	61,8 (isolés)
BARRET, 1996.	3	2	17,9 à 42,1 (isolés)
ROUMIEUX, 1997.	1	2	45,1 (isolés)
Nos propres résultats.	1	2	82 (isolés), 63 (couples), 46 (groupes par 10).

* Autres conditions: hauteur initiale de 4 mm, 20° C.

** Selon le contact plus ou moins fréquent de la population avec le parasite dans le milieu naturel.

Tableau VII.
La prévalence de l'infestation fasciolienne
calculée sur le nombre de limnées avec émission.

Le tableau VII répertorie ces chiffres. La prévalence va de 17,9 à 61,8 % dans la littérature pour des limnées isolées alors qu'elle est de 82 % dans la population de Courcelles. Cette dernière souche est donc un bon matériel si l'on désire faire des infestations expérimentales afin de produire des métacercaires de *F. hepatica*.

La diminution de la prévalence constatée dans les limnées maintenues sous forme de couples ou de groupes par dix s'explique facilement par la mortalité du premier mollusque. Lorsque celui-ci meurt, son décès entraîne souvent celui de ses congénères. A l'heure actuelle, il est difficile de proposer une explication pour commenter cette observation.

Le groupement des limnées parasitées dans les boîtes de Pétri ou les ramequins a donc un effet néfaste sur la prévalence de l'infestation car de nombreuses limnées meurent sans produire de cercaires. Cette modalité dans la technique est donc à abandonner.

3. La production métacercarienne.

Les résultats présentés sur le tableau ci-dessous se rapportent à des mollusques hauts de 4 mm lors de l'exposition aux miracidiums:

Références	Conditions expérimentales	Moyennes
DREYFUSS, 1994.	Trois colonies. Conditions semi-naturelles. 2-3 miracidiums/limnée.	76,9 103,8 25,5
	Une colonie. 20° C. 2 miracidiums/limnée.	238,5
BARRET, 1996.	Trois colonies. 20° C. 2 miracidiums/limnée.	75,8 à 123,2 58,6 à 164,7 51,1 à 157,2
ROUMIEUX, 1997.	Une colonie. 20° C. 2 miracidiums/limnée.	56,5
Nos résultats.	Une colonie. 20° C. 2 miracidiums/limnée.	107 (isolés)

* Les mollusques sont tous isolés dans leurs boîtes de Pétri.

La production parasitaire provenant des limnées de Courcelles se situe donc en bonne position parmi les valeurs de la gamme présentée dans ce tableau.

Caractéristiques	Conséquences
Biologiques: - Faible degré d'amphibiose. - Grégarisme. - Habitude de brouter des feuilles d'arbre dans leur habitat.	- Les animaux ne sortent pas de leur milieu. - Densité importante en élevage: 100 sur 0,6 m ² . - Nourriture avec de la salade dégradée.
Parasitologiques (2 miracidiums): - Survie au 30 ^e jour d'expérience. - Fréquence des limnées avec émission. - Durée de la période d'émission. - Productivité parasitaire.	- De 71 à 76 %. - 83 %. - 20 jours en moyenne. - 107 métacercaires en moyenne par limnée.
Inconvénient.	Difficulté de maintenir les limnées par couples ou par groupes plus importants.

Tableau VIII.
 Les avantages de cette population sur les plans biologique et parasitologique.

Opération	Temps mis pour 100 limnées.
- Infestation des mollusques. - Maintien en élevage pendant 30 jours.	6 heures. 2 x 15 min par semaine (remise à niveau de l'eau).
- Isolement des survivants. - Suivi des émissions cercariennes.	2 heures. 3 heures par jour pendant 4 semaines (recueil des métacercaires).

Tableau IX.
 Les avantages de cette population sur le plan de la maintenance en élevage.

B. LA POPULATION DE COURCELLES PEUT-ELLE ÊTRE RETENUE POUR LA PRODUCTION MÉTACERCARIENNE DE *F. hepatica* ?

Pour répondre à cette question, il est utile de considérer tous les aspects de la technique.

Le tableau VIII présente les avantages et les inconvénients de cette population en fonction de ses caractéristiques. Plusieurs arguments biologiques plaident en faveur de cette colonie pour son emploi dans la production métacercarienne: a) son faible degré d'amphibiose, ce qui évite les pertes lorsque les mollusques se réfugient sur les zones humides des parois et se fixent en position rétractée dans leur coquille si cette humidité disparaît, b) son gréganisme, traduisant l'aptitude de ces limnées à vivre en population dense, et c) son habitude à brouter des feuilles d'arbre dans leur habitat naturel. Les données parasitologiques sont plus qu'honnêtes car 5,9 à 6,3 mollusques, sur un groupe de dix limnées exposées aux miracidiums, produisent plus de 100 cercaires par individu. Le seul inconvénient mais majeur concerne la difficulté de maintenir les limnées en couples ou en groupes plus importants.

Ces avantages sont confortés par le temps que l'expérimentateur passe pour produire ces métacercaires. A titre d'illustration, le tableau IX répertorie les durées moyennes pour 100 mollusques de Courcelles en fonction des diverses étapes de la technique. Un gain de temps certain est obtenu lors du suivi des mollusques en élevage: 30 minutes par semaine au lieu d'une heure par jour pour les autres colonies (RONDELAUD, *communication personnelle*). Les durées des autres étapes ne changent pas, quelle que soit l'origine de la population.

A notre avis, la population de Courcelles constitue un matériel "solide" pour réaliser des infestations expérimentales et produire des métacercaires de *F. hepatica*. Un apport certain doit être encore réalisé pour mettre au point une technique afin d'élever les nouveau-nés et les juvéniles qui éclosent à partir des pontes déposées dans les conditions du laboratoire.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Des Limnées tronquées provenant d'une population à faible degré d'amphibiose ont été exposées aux miracidiums de *F. hepatica* et élevées à 20° C pendant 30 jours avant d'être suivies jusqu'à leur mort selon l'une des modalités suivantes: mollusques isolés, par couples ou par groupes de dix individus chacun. La production métacercarienne a été étudiée dans ces trois groupes.

Nos résultats peuvent être regroupés sous deux rubriques:

1. Les caractéristiques générales de l'infestation fasciolienne.

La survie des mollusques au 30^e jour d'expérience est voisine, avec des valeurs se situant entre 71 et 76,2 %. La prévalence de l'infestation montre des valeurs plus variables. Si le taux est de 82 % chez les mollusques isolés, il n'est plus que de 63 % chez les limnées maintenues par couples et seulement de 46 % chez celles qui ont été suivies par groupes de dix individus.

L'intervalle de temps entre l'exposition et la première émission cercarienne dure 57 à 59 jours. La période d'émission est plus longue chez les limnées isolées ou par couples que chez celles qui sont maintenues par groupes de dix (20,2 et 16,6 jours au lieu de 9,5).

2. La production métacercarienne.

Le nombre de parasites par limnée est de 107 chez les limnées isolées. Chez les mollusques maintenus sous forme de couples, le chiffre est de 112,5 métacercaires pour deux limnées, ce qui correspond à 56,2 parasites pour chaque individu. Chez les mollusques étudiés par dix, il y a seulement 40 métacercaires par groupe, soit 4 parasites par limnée.

La répartition numérique des métacercaires a été étudiée par rapport à la durée de la période d'émission. Chez les limnées isolées, les valeurs sont sensiblement constantes tout au long de la période. Chez les couples, la production est optimale jusqu'au 8^e jour; par la suite, elle diminue et présente une certaine constance jusqu'à la fin. Enfin, les moyennes sont relativement homogènes dans le cas des groupes de dix limnées.

Cette première expérimentation démontre que la population de Courcelles peut être utilisée comme un "bon" matériel pour produire des métacercaires de *F. hepatica* à la demande. Cependant, il reste encore des inconnues pour compléter cette technique de production. La principale d'entre elles serait de mettre au point une technique permettant l'élevage des nouveau-nés et des juvéniles en se basant sur la culture des algues unicellulaires qui sont présentes naturellement dans leur habitat naturel.

BIBLIOGRAPHIE

- ABROUS, M., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G., 1996.- *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the effect of dual infection on prevalence and cercarial shedding in preadult *Lymnaea glabra*. *J. Parasitol.*, **82**, 1026-1029.
- ABROUS, M., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G., CABARET, J., 1997b.- Unusual transmission of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, by *Lymnaea glabra* or *Planorbis leucostoma* in France. *J. Parasitol.* (sous presse).
- AUDOUSSET, J.C., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G., VAREILLE-MOREL, C., 1989.- Les émissions cercariennes de *Fasciola hepatica* L. chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. A propos de quelques observations chronobiologiques. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, **7**, 217-224.
- AUGOT, D., 1994.- Caractérisation des générations rédiennes chez *Fasciola hepatica* Linné 1758 (Trematoda: Fasciolidae). Intérêt pratique et épidémiologique. Mémoire D.E.S.U., Limoges, Parasitol., 67 p.
- AUGOT, D., ABROUS, M., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G., 1996.- *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the redial burden and cercarial shedding in *Lymnaea truncatula* submitted to successive unimiracidial cross-exposures. *Parasitol. Res.*, **82**, 623-627.
- AUGOT, D., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G., CABARET, J., BAYSSADE-DUFOUR, C., ALBARET, J.L., 1997.- Characterization of *Fasciola hepatica* redial generations (Trematoda: Fasciolidae) by morphometry and chaetotaxy under experimental conditions. *J. Helminthol.* (sous presse).

- BAILLENGER, J., TRIBOULEY, J., AMYOT, B., DURET, J., 1965.- Importance des Léporidés comme réservoirs sauvages dans l'épidémiologie des distomatoses à *Fasciola hepatica* et *Dicrocoelium dendriticum*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **40**, 51-54.
- BARRET, F., 1996.- Les émissions cercariennes de *Fasciola hepatica* Linné chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. A propos de l'influence de deux facteurs. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, n° 311, 93 p.
- BORAY, J.C., 1969.- Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.*, **7**, 95-210.
- BORAY, J.C., 1978.- The potential impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australasia. *Vet. Parasitol.*, **4**, 127-141.
- BORAY, J.C., 1981.- Fascioliasis and other trematode infections. I. Recent advances in research on *Fasciola* and other trematodes in animals. *In: Review of advances in parasitology*, par SLUSARKI, W., éd., Warszawa (Pologne), 317-339.
- BORAY, J.C., 1982.- Fascioliasis. Vol. III. *In: C.R.C. Handbook series in zoonoses*, par HILLER, J.G. et HOPLA, C.E., éd. C.R.C. Press Inc., Florida (U.S.A.), 77-88.
- BROWN, D.S., 1994.- Freshwater snails of Africa and their medical importance. Taylor and Francis Ltd., London, 606 p.
- BRUMPT, E., 1936.- Précis de parasitologie. Tome I. Masson et Cie, Paris, 1.082 p.
- BRUMPT, E., 1949.- Précis de parasitologie. Tome I. 6^e édition. Masson et Cie, Paris, 1.042 p.
- BURCH, J.B., BRUCE, J.I., AMR, Z., 1989.- Schistosomiasis and malacology in Jordan. *J. Med. Appl. Malacol.*, **1**, 139-164.
- BUSSON, P., 1981.- Contribution à l'étude du rôle de plusieurs espèces de limnées dans la transmission de la distomatose à *Fasciola hepatica* L. Thèse Doct. Médecine, n° 110, 102 p.
- BUSSON, P., BUSSON, D., RONDELAUD, D., PESTRE-ALEXANDRE, M., 1982.- Données expérimentales sur l'infestation des jeunes de cinq espèces de limnées par *Fasciola hepatica* L. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **57**, 555-563.
- DREYFUSS, G., 1994.- Contribution à l'étude des émissions cercariennes et de la charge parasitaire *post-mortem* chez trois espèces de limnées infestées par *Fasciola hepatica* Linné ou par *Fasciola gigantica* Cobbold. Thèse Doct. Univ. Limoges, n° 305E, 246 p.

- DREYFUSS, G., RONDELAUD, D., 1994.- *Fasciola hepatica*: a study on the shedding of cercariae from *Lymnaea truncatula* raised under constant conditions of temperature and photoperiod. *Parasite*, **1**, 401-404.
- DREYFUSS, G., VAREILLE-MOREL, C., RONDELAUD, D., 1997.- Les habitats de *Lymnaea truncatula* Müller (Mollusque) le long de deux rivières. *Ann. Limnol.*, **33**, 67-72.
- EUZEBY, J., 1971.- Les maladies vermineuses et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tome II: Maladies dues aux Plathelminthes. Fasc. 2: Trématodes. Livre 1: Généralités. Distomatoses hépato-biliaires. Vigot frères éd., Paris, 798 p.
- GAILLET, P., 1983.- Contribution à l'étude épidémiologique de la distomatose humaine à *Fasciola hepatica* en France métropolitaine depuis 1956. A propos de quelques 10.000 cas. Thèse Doct. Médecine, Paris-Créteil, n° 32, 151 p.
- GERMAIN, L., 1930/1931.- Mollusques terrestres et fluviatiles. Faune de France, tome 21. Libr. Fac. Sci. éd., Paris, 893 p.
- GOLD, D., 1980.- Growth and survival of the snail *Lymnaea truncatula*: effects of soil type, culture medium and *Fasciola hepatica* infection. *Is. J. Zool.*, **29**, 163-170.
- GUICHARD, D., 1997.- Contribution à l'étude du parasitisme naturel chez cinq espèces de Mollusques dulçaquicoles dans 13 exploitations agricoles de la Vienne et de la Haute-Vienne. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, n° 344, 88 p.
- HEPPLESTON, P.B., 1972.- Life history and population fluctuations of *Lymnaea truncatula* Müller, the snail vector of fascioliasis. *J. Appl. Ecol.*, **9**, 235-248.
- HOURDIN, A., RONDELAUD, D., CABARET, J., 1993.- The development of *Fasciola hepatica* parthenitae in *Lymnaea truncatula* by modification of *Muellerius capillaris* infection. *Int. J. Parasitol.*, **23**, 235-243.
- HUBENDICK, B., 1951.- Recent *Lymnaeidae*. Their variation, morphology, taxonomy, nomenclature and distribution. *Klung, Svenska Vetenskaps. Akad. Handl.*, **3**, 1-222.
- HUNTER, W.R., 1964.- Physiological aspects of ecology in nonmarine molluscs. In: *Physiology of Mollusca*, volume 1, par WILBUR, K.M. et YONGE, C.M., éd. Academic Press, New-York/San Francisco/London, 83-126.
- JABBOUR-ZAHAB, R., POINTIER, J.P., JOURDANE, J., JARNE, P., OVIEDO, J.A., BARGUES, M.D., MAS-COMA, S., ANGLES, R., PERERA, G., BALZAN, C., KHALLAAYOUNE, K., RENAUD, F., 1997.- Phylogeography and genetic divergence of some lymnaeid snails, intermediate hosts of human and animal fascioliasis, with special reference to lymnaeids from the Bolivian Altiplano. *Acta Tropica*, **64**, 191-203.

- JIMENEZ-ALBARRAN, M., GUEVARA-POZO, D., 1977.- Estudios experimentales sobre biología de *Fasciola hepatica*: 1°. - Numero y viabilidad de los huevos de *Fasciola hepatica* hallados en vesícula biliar de vaca, oveja y cabra. *Rev. Ibér. Parasitol.*, **37**, 291-300.
- KENDALL, S.B., 1949.- Nutritional factors affecting the rate of development of *Fasciola hepatica* in *Limnaea truncatula*. *J. Helminthol.*, **23**, 179-190.
- KENDALL, S.B., 1953.- The life-history of *Limnaea truncatula* under laboratory conditions. *J. Helminthol.*, **27**, 17-28.
- KENDALL, S.B., 1965.- Relationships between the species of *Fasciola* and their molluscan hosts. *Adv. Parasitol.*, **3**, 59-98.
- KENDALL, S.B., OLLERENSHAW, C.B., 1963.- The effect of nutrition on the growth of *Fasciola hepatica* in its snail host. *Proc. Nutr. Soc.*, **22**, 41-46.
- LACOURARIE, C., 1996.- Étude éco-éthologique des populations de *Lymnaea truncatula* Müller vivant le long des rivières. Leur infestation par *Fasciola hepatica* Linné. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, n° 308, 118 p.
- LARAMBERGUE, M. de, 1928.- Etude sur l'appareil génital de quelques limnées. Ses rapports avec la systématique. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **53**, 491-509.
- LEE, C.G., KIM, S.K., LEE, C.Y., 1992.- Laboratory cultivation of brue-green algae for use as a food for Lymnaeids, the intermediate host of *Fasciola hepatica*. *Korean J. Vet. Res.*, **32**, 239-243.
- LEE, C.G., KIM, S.K., LEE, C.Y., 1994.- Rapid growth of *Lymnaea viridis*, the intermediate host of *Fasciola hepatica*, under laboratory conditions. *Vet. Parasitol.*, **51**, 327-331.
- LEIMBACHER, F., MOREL, C., RONDELAUD, D., 1972.- L'hôte intermédiaire de la Grande Douve en France. *Cahiers de l'Elevage*, n° 402. S.P.E.O./Pâtre éd., Paris, 17 p.
- MASSIAS, E. de, 1995.- Contribution à l'étude des générations annuelles chez *Lymnaea truncatula* Müller (Mollusque), vecteur de *Fasciola hepatica* Linné (Trématode) en fonction de l'altitude des prairies. Thèse Doct. Méd. Vétérinaire, Lyon, n° 20, 92 p.
- MASSIAS, E. de, RONDELAUD, D., MAGE, C., GEVREY, J., 1996.- *Lymnaea truncatula* Müller: une seule génération annuelle dans les prairies d'estive du Jura et des Alpes. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, **14**, 54-61.
- MOREL-VAREILLE, C., 1973.- Contribution à l'étude du cycle biologique de *Lymnaea truncatula* dans le Nord-ouest du Limousin. *Rev. Méd. Vét.*, **124**, 1447-1457.

- MOUKRIM, A., 1991.- Étude écologique et éthologique de *Lymnaea truncatula* Müller et de son parasite, *Fasciola hepatica* L. dans le système d'irrigation de Tassila, province d'Agadir. Charge parasitaire et conséquences histopathologiques. Thèse Doct. ès-Sci. Nat. (Maroc), Parasitol., Agadir, n° 2, 203 p.
- NOZAIS, J.P., 1996.- Fasciolose (distomatose à *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*). 651-670. In: Traité de parasitologie médicale, par NOZAIS, J.P., DATRY, A. et DANIS, M. Pradel éd., Paris.
- OLLERENSHAW, C.B., 1971.- Some observations on the epidemiology of fascioliasis in relation to the timing of molluscicide applications in the control of the disease. *Vet. Rec.*, **88**, 152-164.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, 1993.- Infestations à Trématodes d'origine alimentaire. *De point en point*, n° 80, 5 p.
- OSBORN, G.D., GRON, N., SIMMONS, D., 1982.- Maintenance and infection of the mud snail *Lymnaea truncatula* for *Fasciola hepatica* studies. *J. Inst. Ani. Tech.*, **33**, 1-5.
- PÉCHEUR, M., 1974.- Lutte stratégique contre la distomatose. Comptes-Rendus de Recherches, Travaux du Centre de Recherches sur les Maladies Parasitaires des Animaux Domestiques. I.R.S.I.A., Bruxelles, n° 38, 85-150.
- ROBERTS, E.W., 1950.- Studies on the life-cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its snail host, *Limnaea (Galba) truncatula* Müller in the field and under controlled conditions. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **44**, 187-206.
- RONDELAUD, D., 1974.- Le cycle journalier d'activité de *Galba truncatula* Müller et sa relation avec le parasitisme. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **49**, 427-434.
- RONDELAUD, D., 1978.- Contribution à l'étude écologique et éthologique de *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller, vecteur de *Fasciola hepatica* L. Recherche de moyens de lutte biologique en Limousin. Thèse Doct. ès-Sci. Nat., Limoges, n° 4, 302 p.
- RONDELAUD, D., 1993.- Variabilité interpopulationnelle de l'infestation fasciolienne chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. Influence du contact préalable de la population avec le parasite. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **118**, 185-193.
- RONDELAUD, D., BARTHE, D., 1982.- Les générations rédiennes de *Fasciola hepatica* L. chez *Lymnaea truncatula* Müller. A propos des effets de plusieurs facteurs. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **57**, 245-262.
- RONDELAUD, D., DREYFUSS, G., 1995.- *Fasciola hepatica*: the influence of the definitive host on the characteristics of infection in the snail *Lymnaea truncatula*. *Parasite*, **2**, 275-280.

- RONDELAUD, D., DREYFUSS, G., 1997.- Variabilité de l'infestation fasciolienne chez *Lymnaea truncatula* Müller par rapport à la localisation de ses gîtes sur les réseaux hydrographiques. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, **14**, 189-194.
- RONDELAUD, D., MAGE, C., 1988.- Limnée tronquée et molluscicides. *Bull. Group. Tech. Vét.*, **6**, 69-76.
- RONDELAUD, D., MAGE, C., 1992.- *Lymnaea truncatula* Müller: les conséquences d'une seule génération annuelle sur les caractéristiques de l'infestation par *Fasciola hepatica* L. *Rev. Méd. Vét.*, **143**, 843-846.
- ROUMIEUX, L., 1997.- Proposition d'une technique simple pour la production métacercarienne de *Fasciola hepatica* Linné à partir du mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. Rapport de Stage, Maîtrise de Biochimie, Faculté des Sciences, Limoges, 10 p.
- ROZKOWSKI, W., 1922 (1923).- Contribution à l'étude de la famille des *Lymnaeidae*. VI. Apparat plciowy *Galba truncata* Müll. *Arch. Nauk Biologicznych*, **I**, 5, 1-6.
- RUELLAN, L., 1991.- Contribution à l'étude du tissu hémostatique et des cellules circulantes chez *Lymnaea truncatula* Müller (Mollusque Gastéropode Pulmoné). Impact du parasitisme et d'une iridovirose. Thèse Doct. Univ. Limoges, Sci. Nat., n° 18, 148 p.
- SCHUMACHER, W., 1938.- Untersuchungen über den Wanderungsweg und die Entwicklung von *Fasciola hepatica* im Endwirt. *Z. Parasitenkd.*, **10**, 608-643.
- SEVO, S., 1973.- Technique de production des métacercaires. *Haliotis*, **3**, 185-189.
- SIMINTZIS, G., 1951.- Distomatose des Léporidés sauvages dans les Dombes. Forte mortalité des Léporidés sauvages due à *Fasciola hepatica*. *Bull. Soc. Sci. Vét. Lyon*, **4**, 136-141.
- SINDOU, P., 1989.- Contribution à l'étude de la pathologie viscérale chez plusieurs espèces de limnées infestées par *Fasciola hepatica* L. Thèse Doct. Univ. Limoges, Sci. Nat., n° 16, 167 p.
- SINDOU, P., RONDELAUD, D., BARTHE, D., 1991.- Comparative studies on the lesions of the digestive gland and of the kidney in young and adult snails from four lymnaeid species infected by *Fasciola hepatica*. *Proc. Tenth Int. Malacol. Congr., Tübingen, 1989*, 255-258.
- SMITH, G., 1981.- A three-year study of *Lymnaea truncatula* habitats, disease foci of fascioliasis. *Brit. Vet. J.*, **17**, 329-342.
- SOULSBY, E.J.L., 1982.- Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7th edit. Baillière Tindall éd., London, 809 p.

- STAT-ITCF, 1988.- Manuel d'utilisation. Institut Technique des Céréales et des Fourrages, Service des Études Statistiques, Boigneville, 210 p.
- SZMIDT-ADJIDÉ, V., 1996.- Les distomatoses à *Paramphistomum daubneyi* Dinnik et à *Fasciola hepatica* Linné dans la région du Limousin (France). Recherches sur l'hôte définitif et le mollusque hôte. Thèse Doct. Univ. Limoges, Sci. Pharm., n° 302B, 141 p.
- SZMIDT-ADJIDÉ, V., ADJIDÉ, C.C., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G., MAGE, C., 1996.- L'état des connaissances sur *Fasciola hepatica* Linné, 1758 et *Paramphistomum daubneyi* Dinnik, 1962. *Bull. Group. Tech. Vét.*, n° 529, 45-54.
- TAPIE, C., 1996.- Contribution à l'étude d'un Mollusque, *Lymnaea peregra peregra* Müller, dans le nord de la Haute-Vienne. Son infestation expérimentale par *Fasciola hepatica* Linné. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, n° 310, 72 p.
- TAYLOR, E.L., MOZLEY, A., 1948.- A culture method for *Lymnaea truncatula*. *Nature*, **161**, 894.
- TAYLOR, E.L., 1965.- Fascioliasis and the liver-fluke. *F.A.O. Agricultural Studies*, n° 64, 235 p.
- THOMAS, A.P., 1883.- The natural history of the liver fluke and the prevention of rot. *J. Roy. Agric. Soc. Engl.*, **19**, 276-305.
- VAREILLE, L., 1996.- Les caractéristiques des gîtes à limnées dans le département de la Haute-Vienne. Infestations expérimentales par *Fasciola hepatica* L. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, n° 309, 123 p.
- VILKS, A., 1991.- Analyse chorologique de la flore vasculaire du Limousin. Thèse Doct. ès-Sci. Nat., Limoges, n° 36, 241 p.
- WALTON, C.L., JONES, W.N., 1926.- Further observations on the life history of *Limnaea truncatula*. *Parasitology*, **18**, 144-147.

BON A IMPRIMER N° 4

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

La production métacercarienne de *Fasciola hepatica* Linné. Etude expérimentale d'une population de *Lymnaea truncatula* Müller à faible degré d'amphibiose. par S. LE GALLIARD.

Des Limnées tronquées provenant d'une population à faible degré d'amphibiose (Courcelles, département de la Creuse) ont été exposées aux miracidiums de *F. hepatica* et élevées à 20° C pendant 30 jours avant d'être suivies jusqu'à leur mort selon l'une des modalités suivantes: mollusques isolés, par couples ou par groupes de dix individus chacun. La production métacercarienne a été étudiée dans ces trois groupes.

La survie des mollusques au 30^e jour d'expérience est voisine, avec des valeurs se situant entre 71 et 76,2 %. La prévalence de l'infestation montre des valeurs plus variables. Si le taux est de 82 % chez les mollusques isolés, il n'est plus que de 63 % chez les limnées maintenues par couples et seulement de 46 % chez celles qui ont été suivies par groupes de dix individus.

Le nombre de métacercaires par limnée est de 107 chez les limnées isolées. Chez les mollusques maintenus sous forme de couples, le chiffre est de 112,5 parasites pour deux limnées, ce qui correspond à 56,2 parasites pour chaque individu. Chez les mollusques étudiés par dix, il y a seulement 40 métacercaires par groupe, soit 4 parasites par limnée.

La répartition numérique des métacercaires a été étudiée par rapport à la durée de la période d'émission. Chez les limnées isolées, les valeurs sont sensiblement constantes tout au long de la période. Chez les couples, la production est optimale jusqu'au 8^e jour; par la suite, elle diminue et présente une certaine constance jusqu'à la fin. Enfin, les moyennes sont relativement homogènes dans le cas des groupes de dix limnées.

Cette expérimentation démontre que la population de Courcelles peut être utilisée comme un "bon" matériel pour produire des métacercaires de *F. hepatica* à la demande.

Mots clés: *Fasciola hepatica*. *Lymnaea truncatula*. Métacercaire.