

LA MORPHOLOGIE INTERNE DES STIGMATES PROTHORACIQUES
CHEZ LE TROISIÈME STADE LARVAIRE
DE *GASTEROPHILUS INTESTINALIS* (DIPTERA: *GASTEROPHILIDAE*)
EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE
A BALAYAGE ET A TRANSMISSION

M. PRINCIPATO*, M. TOSTI**

RÉSUMÉ. Nous avons étudié au MES et au MET les stigmates prothoraciques de larves au 3^e stade de *Gasterophilus intestinalis*. Ceux-ci apparaissent constitués intérieurement de trois types différents de tissus trabéculaires à mailles plus ou moins serrées. Ces structures trabéculaires communiquent entre elles et demeurent morphologiquement identiques même chez la puppe. A l'aide d'observations à frais, on démontre la perméabilité des stigmates prothoraciques larvaires et leur capacité à retenir de l'air dans leur lumière. En outre, sur la partie basale de la paroi externe, nous avons relevé des annexes cellulaires et glandulaires inconnues. Nous soulignons la complexité structurale et fonctionnelle des stigmates prothoraciques et nous formulons quelques hypothèses sur leur fonction possible durant la vie parasitaire larvaire.

Mots-clés : Stigmates prothoraciques. *Gasterophilus intestinalis*. Microscopie électronique.

Scanning and transmission electron microscopic study on the internal morphology of the prothoracic spiracles in *Gasterophilus intestinalis* larvae III (Diptera: *Gasterophilidae*).

SUMMARY. Prothoracic spiracles of the third stage larvae of *Gasterophilus intestinalis* are studied with scanning and transmission electron microscope. They seemed to consist of 3 different kinds of network-like tissues. No change occurs in those trabecular structures during the whole larval development and even during the nymphal stage. On the basis of light microscope observations we can say that larval prothoracic spiracles are permeable and able to retain air in their lumen. Moreover in the lower part of the external wall, we discovered new cellular and glandular structures. We insist on the structural and functional complexity of the prothoracic spiracles and we are making some hypothesis on their role during the parasitical larval life.

Key-words: Prothoracic spiracles. *Gasterophilus intestinalis*. Electron microscope.

Les larves de *Gasterophilus intestinalis* sont des parasites obligatoires des équidés. Les larves du 3^e stade séjournent dans l'estomac pendant environ 10 mois, puis passent dans les selles pour se transformer en adultes. Durant le séjour dans

* Istituto di Parassitologia, Facoltà di Med. Veterinaria, Via S. Costanzo, 4, 06100 Perugia, Italia.

** Centro Universitario di Microscopia Elettronica, Facoltà di Med. Veterinaria, Via S. Costanzo, 4, Perugia.

Accepté le 5 juin 1988.

la cavité gastrique, ces larves sont accrochées à la muqueuse au moyen de forts crochets chitineux et elles enfoncent le pseudocéphale entier dans la lésion à cratère qu'elles ont elles-mêmes provoquée. A ce stade, les stigmates prothoraciques restent repliés à l'intérieur du corps larvaire, mais ils se déploient dans le milieu extérieur lorsque les larves au 3^e stade se transforment en pupes.

Des études de Keilin (1944), Levenbook (1951), Tatchell (1960) et de Principato et Tosti (1987) ont montré que ces structures ne fonctionnent pas durant la vie larvaire, mais seulement pendant la transformation en pupes, c'est-à-dire lorsqu'elles sont émises à l'extérieur. Leur déploiement est une condition essentielle pour la poursuite de l'évolution pupale (Principato et coll., 1987).

Dans le travail présent, nous étudions au MES la morphologie interne de ces organes, soit chez la larve que chez la pupes, en cherchant à interpréter leur fonction possible au cours de la vie parasitaire larvaire.

Matériel et méthodes

Les échantillons, dès leur prélèvement, ont été pré-fixés au Gluteraldeide au 2,5 % en tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 pendant 12 heures. Ils ont été lavés avec le même tampon pendant 5 heures, puis fixés à l'OsO₄ 2 % pendant 2 heures. Ensuite nous avons effectué la déshydratation alcoolique.

Les échantillons destinés à l'observation au microscope électronique à transmission (MET) ont été mis dans l'oxyde de propylène et inclus en Epon-Araldite. Ils ont été ensuite sectionnés avec un ultramicrotome et observés au TEM Philips EM 400 T.

Les échantillons destinés à l'observation au microscope électronique à balayage (MES) après leur déshydratation alcoolique, ont été placés sur stub d'aluminium avec un ruban biadhésif et métallisés avec 200 Å d'or et observés au MES Philips 501/B.

Résultats

Les stigmates respiratoires prothoraciques larvaires sont en relation dans leur partie proximale (chambre feutrée) avec un gros tronc trachéal latéral interne alors que dans la partie médiane distale, ils présentent des papilles ouvertes communiquant avec l'extérieur par le sillon stigmatique. A l'intérieur le stigmate est constitué de tissu trabéculaire organisé en trois régions distinctes :

- 1 — Région proximale, reliée au tronc trachéal.
- 2 — Région médiane ou filtre.
- 3 — Région distale, comprenant presque entièrement la chambre feutrée et le sommet du stigmate. Cette dernière zone est la plus grande alors que les deux premières occupent seulement la portion basale du stigmate (*fig. 1*).

1 — *Région proximale* : C'est une barrière trabéculaire à mailles larges organisée en troncs étroits plus ou moins parallèles et peu distincts qui se séparent de la paroi du stigmate. Ces troncs sont reliés entre eux par des branches latérales qui se ramifient et se réunissent pour constituer une structure d'aspect irrégulier (*fig. 2*).

2 — *Région médiane ou filtre* : Elle est constituée de tissu trabéculaire très serré. Ce tissu paraissant s'organiser autour de gros troncs creux (*fig. 3*) tous du même diamètre et irrégulièrement distribués. Ceux-ci naissent de quelques troncs principaux, qui traversent la paroi du stigmate et s'élargissent en forme d'entonnoir pour s'ouvrir à l'extérieur (*fig. 2*). Sur la paroi du stigmate, ces ouvertures sont distribuées irrégulièrement (*fig. 4*). A fort grossissement, il apparaît à l'intérieur de ceux-ci, des cloisons disposées en étoile (*fig. 5*). Des sections de cette région observées au MET montrent la présence de cellules non identifiées périphériques (*fig. 6-7*). En outre, des structures probablement glandulaires sont présentes à l'extérieur, sur la paroi du stigmate (*fig. 8*).

3 — *Région distale* : Celle-ci est constituée de tissu trabéculaire régulièrement organisé en structures individuelles à aspect spongieux. Chacune de ces structures est constituée d'un canal central (*fig. 9*), d'où partent de nombreuses branches qui s'entrecroisent et s'anastomosent finement entre elles donnant une image de villosités spongieuses (*fig. 10*). Celles-ci sont disposées l'une à côté de l'autre afin de constituer un tapis trabéculaire qui recouvre la partie interne du stigmate. Le sommet de ces villosités est tourné vers la lumière du stigmate, dans laquelle se distinguent deux zones différentes (Principato et Tosti, 1987) : a) la chambre feutrée proprement dite ; b) le sommet du stigmate.

La chambre feutrée est semblable comme aspect à un large tube dont la lumière est régulièrement délimitée par des villosités spongieuses, alors que le sommet du stigmate, bien qu'ayant une structure interne semblable, montre des cloisons trabéculaires en face des papilles stigmatiques. Ces cloisons divisent le sommet du stigmate en différentes chambres chacune s'ouvrant dans la lumière du stigmate (*fig. 1*). Les papilles qui s'ouvrent à l'extérieur de la paroi, contiennent à l'intérieur, un tissu trabéculaire irrégulier (*fig. 11*). La paroi interne de chacune des papilles, au contraire, contient seulement de petites excroissances parfois ramifiées (*fig. 12*). Le sommet du stigmate et une grande partie de la chambre feutrée sont invaginés dans le corps larvaire et sont donc, entourés, de l'intérieur, par l'exocuticule (*fig. 13*).

Pupe : Nous avons fait impuper en laboratoire quelques larves au 3^e stade de *G. intestinalis* selon la technique de Principato et coll. (1985) et vingt jours après nous avons observé les stigmates.

Après la mue, le sommet des stigmates apparaît complètement libre de l'exocuticule larvaire. Les papilles stigmatiques, désormais toutes à l'extérieur, sont ouvertes et libres. Le tissu trabéculaire de la pupe demeure identique à celui de la larve (*fig. 14*). La seule modification importante que l'on peut observer est la consistance qui, de spongieuse, molle et élastique, devient dure et rigide. La paroi se sclérifie et tout le tissu spongieux interne devient rigide.

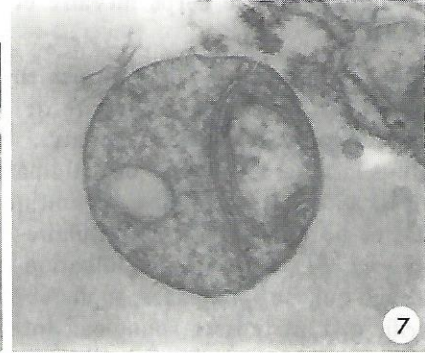
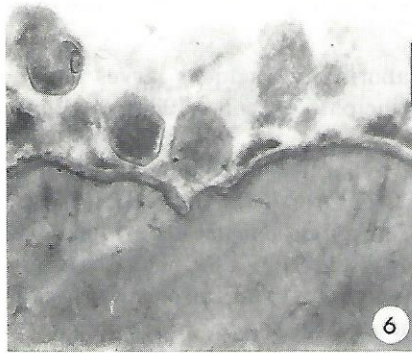
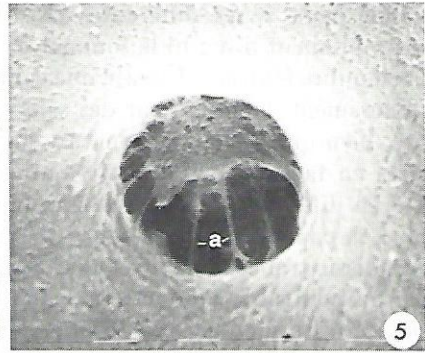
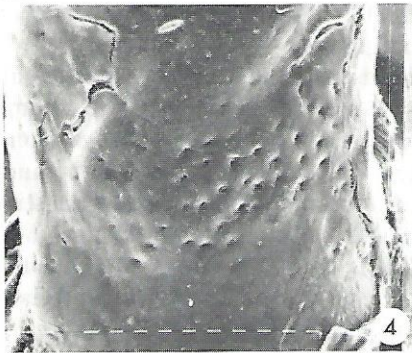
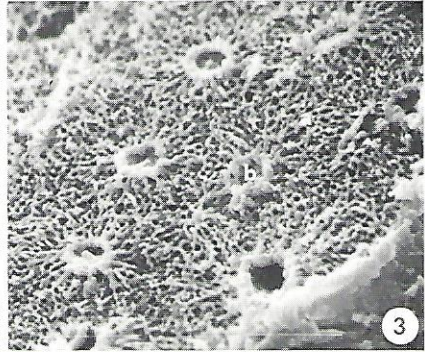
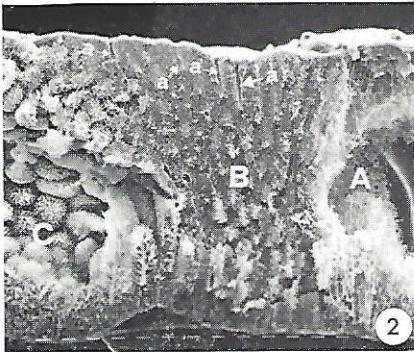
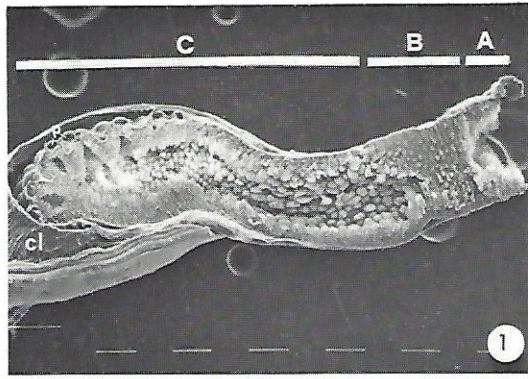


PLANCHE I

- Fig. 1.* — Stigmate prothoracique interne sectionné horizontalement : A) Région proximale B) Région médiane ou filtre, C) Région distale ; p : Papille ; cl : Cuticule larvaire ; c : Chambre du stigmate (échelle 100 μm).
- Fig. 2.* — Portion basale du stigmate : a) Troncs stigmatiques internes. A) Région proximale ; B) Région médiane ou filtre ; C) Région distale (échelle 10 μm).
- Fig. 3.* — Région médiane (filtre) du stigmate : a) Tissu trabéculaire ; b) Troncs stigmatiques internes (échelle 10 μm).
- Fig. 4.* — Base du stigmate : paroi externe avec trous à entonnoir (échelle 10 μm).
- Fig. 5.* — Trous à entonnoir de la paroi externe du stigmate : a) Cloisons disposées en étoile (échelle 1 μm).
- Fig. 6.* — Cellules non identifiées recueillies autour des trous à entonnoir de la paroi externe du stigmate, 28 000 \times .
- Fig. 7.* — Cellule non identifiée, 36 000 \times .

Observations à frais : En observant au stéréomicroscope les stigmates prothoraciques, prélevés sur des larves vivantes, nous nous sommes rendus compte de la présence d'air dans la chambre feutrée. En effet, une pression exercée sur le sommet du stigmate, au niveau des papilles, fait bouger la colonne d'air contenue dans l'organe. Si nous immergeons le stigmate entier, détaché du tronc trachéal, dans une goutte d'eau et que nous exerçons une pression au sommet du stigmate, nous observons un écoulement d'air par la région proximale du stigmate. Cet air apparaît bien visible au stéréomicroscope sous forme de petites bulles.

De même si nous exerçons une pression à la base du stigmate, l'air contenu à l'intérieur sort des papilles. On peut en conclure que le stigmate communique avec l'extérieur. La pression exercée ne déforme pas le stigmate qui se comporte ainsi comme une éponge dont le tissu trabéculaire est parfaitement élastique.

Si nous tenons les stigmates immergés dans de l'eau et que nous les comprimons afin de faire sortir tout l'air contenu à l'intérieur, nous observons que l'eau se substitue immédiatement à l'air.

La substitution du liquide par le gaz est visible également de l'extérieur du stigmate qui, de marron (rempli d'eau) devient jaune paille (rempli d'air).

Si nous détachons avec la lame d'un bistouri la base du stigmate (la région proximale et/ou médiane), celle-ci flotte. Si nous la comprimons, immergée dans une goutte d'eau, il en sort des bulles d'air. Donc, les mailles serrées de cette zone contiennent également de l'air.

Conclusion

Selon nos observations, la constitution interne des stigmates prothoraciques, comprend trois types différents de tissus trabéculaires, dont la fonction, outre que celles de filtre et de soutien supposées par nous-mêmes précédemment (Principato et Tosti, 1988), doit être plus complexe.

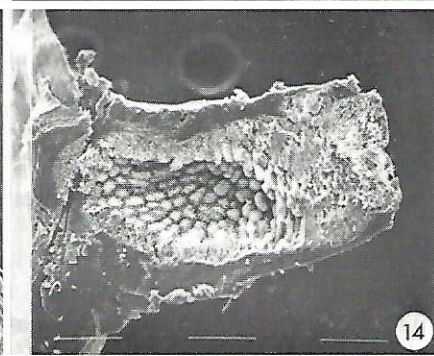
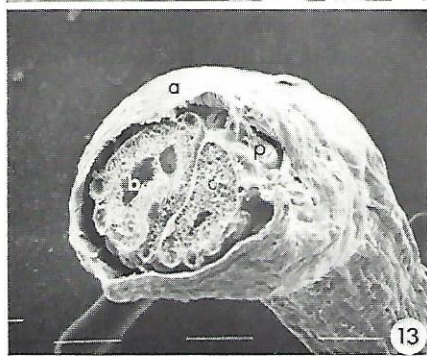
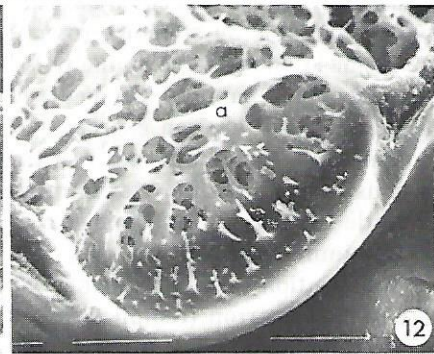
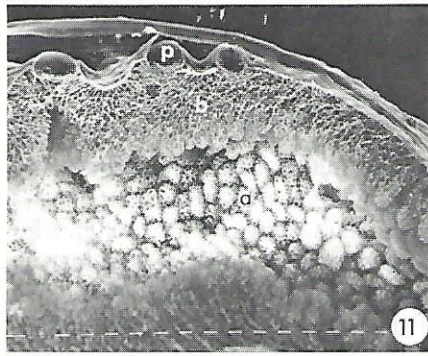
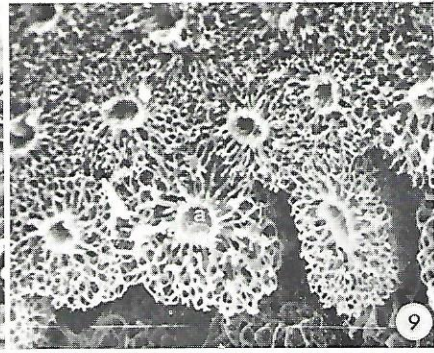
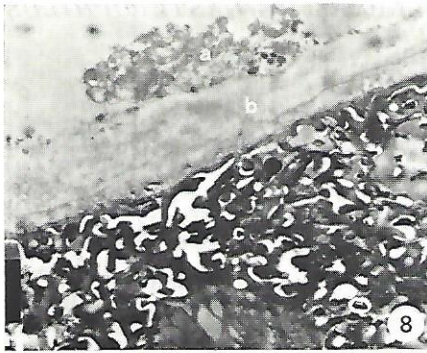


PLANCHE II

- Fig. 8.* — a) Structure glandulaire à l'extérieur de la paroi basale du stigmate ; b) Paroi du stigmate ; c) Tissu trabéculaire interne, 6 000 \times .
- Fig. 9.* — Région distale : section des villosités trabéculaires : a) Canal central (échelle 10 μ m).
- Fig. 10.* — Région distale : villosités trabéculaires (échelle 10 μ m).
- Fig. 11.* — Région distale : a) Villosités trabéculaires ; b) tissu trabéculaire irrégulier ; p) papille (échelle 10 μ m).
- Fig. 12.* — Section de l'une des papilles stigmatiques : a) Tissu trabéculaire (échelle 10 μ m).
- Fig. 13.* — Sommet du stigmate, section verticale : a) Exocuticule ; b) Chambre du stigmate ; p) Papille ; c) Tissu trabéculaire (échelle 100 μ m).
- Fig. 14.* — Section de la portion basale du stigmate d'une pupe de *G. intestinalis* (échelle 10 μ m).

Nos expériences actuelles montrent que les stigmates prothoraciques communiquent avec l'extérieur et que le passage d'air des papilles à la trachée et vice versa est possible.

Le « bouchon » tissulaire observé par nous-mêmes (Principato et Tosti, 1988) qui obstruait le passage d'air à la base de la chambre feutrée, s'est en fait révélé avec la présente étude en microscopie électronique à balayage, constitué d'un tissu trabéculaire serré, élastique, communiquant, et capable de retenir et de faire passer de l'air.

En outre, les stigmates prothoraciques sont reliés au tronc trachéal principal qui mène directement aux stigmates postabdominaux, dont le tissu trabéculaire interne, lorsqu'il est comprimé, se comporte comme celui des stigmates prothoraciques, capable d'absorber et de libérer de l'air.

Le rapport direct entre les deux structures et leur ressemblance non seulement morphologique nous fait supposer l'existence d'une relation fonctionnelle entre elles. L'une des fonctions des stigmates prothoraciques, à notre avis peut être celle de régulariser l'absorption de l'oxygène dans le système trachéal.

En outre, la présence de trous latéraux à tubules à la base des stigmates, de cellules annexes à leur entrée sur la paroi du stigmate et de structures glandulaires peuvent indiquer une fonction sécrétoire.

Certainement les stigmates prothoraciques apparaissent si spécialisées qu'on doit supposer leur rôle complexe au cours de la vie larvaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. KEILIN D. : Respiratory systems and respiratory adaptations in larvae and pupae of Diptera. *Parasitology*, 1944, 36, 1-66.
2. LEVENBOOK L. : The effect of carbon dioxide and certain respiratory inhibitors on the respiration of larvae of the horse bot-fly (*Gasterophilus intestinalis* De Geer). *J. Exp. Biol.*, 1951, 28, 181-202.
3. PRINCIPATO M., TOSTI M. : Scanning electron microscope observations on the anterior thoracic and post-abdominal spiracles of *Gasterophilus* larvae (*Diptera: Gasterophilidae*). *International J. for Parasitology*, 1988, 18, 191-196.
4. PRINCIPATO M., TOSTI M., ROSSODIVITA M. L., GROSSI M. : L'estroffessione degli stigmi prothoracici nell'impupamento delle larve al III stadio di *Gasterophilus intestinalis* (*Diptera: Gasterophilidae*) : osservazioni al M. E. S., 1987, *Atti del XVI Congresso di Microscopia Elettronica*, 223-224.
5. TATCHELL R. J. : A comparative account of the tracheal system of larvae of the horse bot-fly, *Gasterophilus intestinalis* (De Geer), and other dipterous larvae. *Parasitology*, 1960, 50, 481-496.