



FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1923

THÈSE

N° 170

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

A. PONSELLE

ASSISTANT A L'INSTITUT PASTEUR

ANCIEN EXTERNE DES HÔPITAUX

Né à Paris le 2 Mars 1883

CONTRIBUTION

A

L'ÉTUDE DES TRYPANOSOMES

CULTURE — VACCINATION

Président : E. BRUMPT, Professeur



MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS

1923

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1923

THÈSE

N^o
176

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

A. PONSELLE

ASSISTANT A L'INSTITUT PASTEUR
ANCIEN EXTERNE DES HÔPITAUX
Né à Paris le 2 Mars 1883

CONTRIBUTION

A

L'ÉTUDE DES TRYPANOSOMES

CULTURE — VACCINATION

Président : E. BRUMPT, Professeur



MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS

1923

LE DOYEN : M. ROGER

PROFESSEURS : MM.

Anatomie.	NICOLAS.
Anatomie médico-chirurgicale.	CUNÉO.
Physiologie.	RICHET CH.
Physique médicale.	BROCA ANDRÉ.
Chimie organique et chimie générale.	DESGREZ.
Bactériologie.	BESANÇON.
Parasitologie et histoire naturelle médicale.	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales.	LABBÉ MARCEL.
Pathologie médicale.	RÉNON.
Pathologie chirurgicale.	LECÈNE.
Anatomie pathologique.	LETULLE.
Histologie.	PRENANT.
Pharmacologie et matière médicale.	POUCHET.
Thérapeutique.	CARNOT.
Hygiène.	BERNARD.
Médecine légale.	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.	MENETRIER.
Pathologie expérimentale et comparée.	ROGER.
	ACHARD.
Clinique médicale.	WIDAL.
	GILBERT.
	CHAUFFARD.
Hygiène et clinique de la première enfance.	MARFAN.
Clinique des maladies des enfants.	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	DUPRÉ.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	JEANSELMÉ.
Clinique des maladies du système nerveux.	MARIE P.
Clinique des maladies contagieuses.	TEISSIER.
	DELBET.
Clinique chirurgicale.	LEJARS.
	HARTMANN.
	GOSSET.
Clinique ophtalmologique.	De LAPERSONNE.
Clinique des maladies des voies urinaires.	LEGUEU.
	BAR.
Clinique d'accouchement.	COUVELAIRE.
	BRINDEAU.
Clinique gynécologique.	FAURE J.-L.
Clinique chirurgicale infantile.	BROCA AUGUSTE.
Clinique thérapeutique.	VAQUEZ.
Clinique oto-rhino-laryngologique.	SEBILEAU.
Clinique thérapeutique chirurgicale.	DUVAL.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.	MM.	MM.	MM.
ABRAMI.	DUVOIR.	LARDENNOIS.	RATHERY.
ALGLAVE.	FISSINGER.	LE LOHIER.	RETTERER.
BASSET.	GARNIER.	LEMIERRE.	RIBIERRE.
BAUDOUIN.	GOUGEROT.	LEQUEUX.	RICHAUD.
BLANCHETIÈRE.	GRÉGOIRE.	LEREBoullet.	ROUSSY.
BRANCA.	GUENIOT.	LÉRI.	ROUVIÈRE.
CAMUS.	GUILLAIN.	LÉVY-SOLAL.	SCHWARTZ.
CHAMPY.	GUILLEMINOT.	MATHIEU.	TANON.
CHEVASSU.	HEITZ-BOYER.	METZGER.	TERRIEN.
CHIRAY.	JOYEUX.	MOCQUOT.	TIFFENEAU.
CLERC.	LABBÉ HENRI.	MULON.	VILLARET.
DEBRÉ.	LAIGNEL-LAVASTINE.	OKINCZYC.	
DESMAREST.	LANGLOIS.	PHILIBERT.	

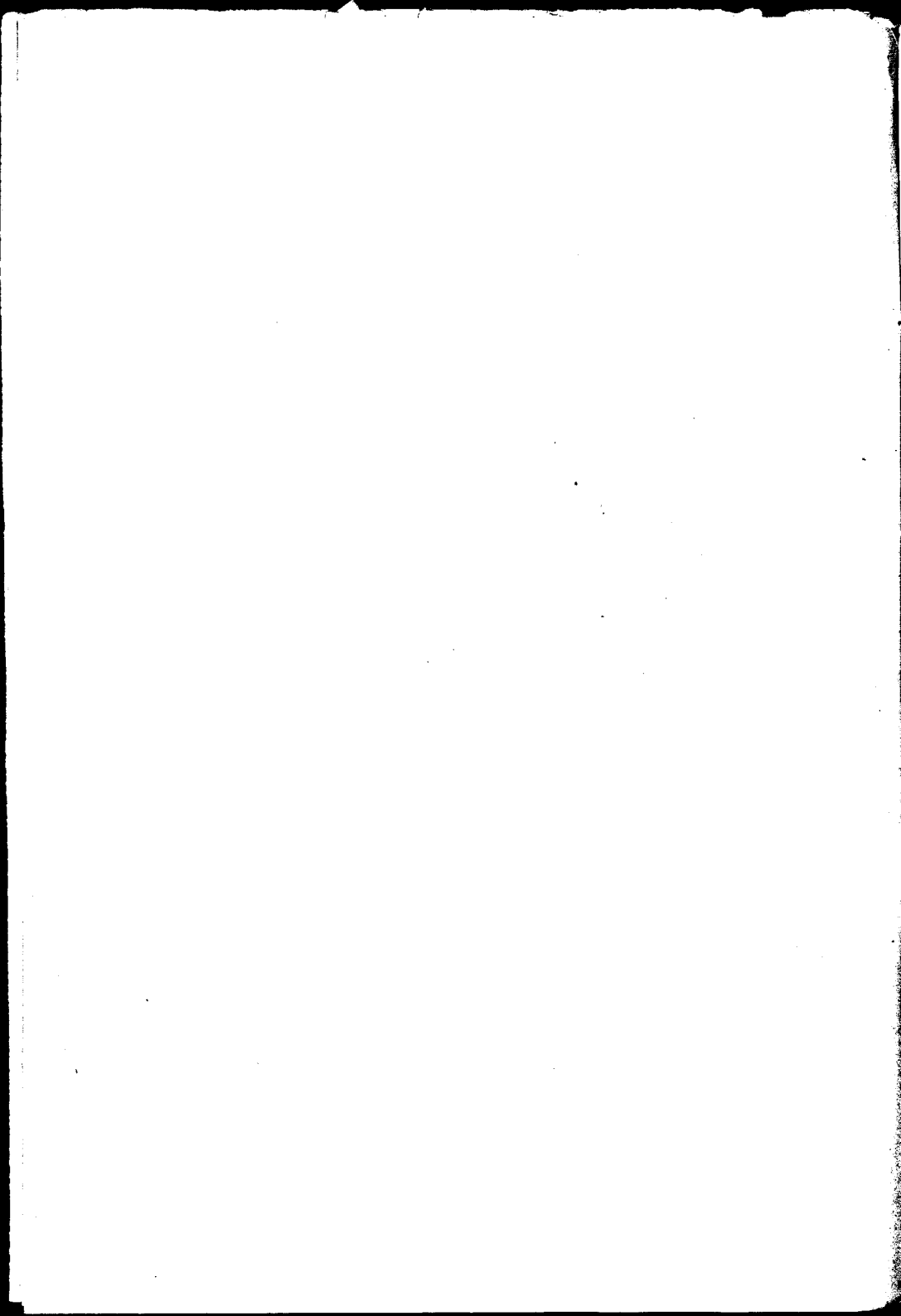
Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MA FEMME

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur E. BRUMPT

Membre de l'Académie de Médecine,
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris,
Secrétaire général de l'Institut de Médecine coloniale,
Ancien professeur de parasitologie à la Faculté de Médecine de Sao-Paulo (Brésil)



A Monsieur le Docteur ROUX

Directeur de l'Institut Pasteur,
Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine

Hommage de respectueuse gratitude.

A MON MAÎTRE ET AMI

Monsieur le Docteur P. RAVAUT

Médecin de l'Hôpital Saint-Louis

A MES MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX

A Monsieur le Docteur AUGUSTE MARIE

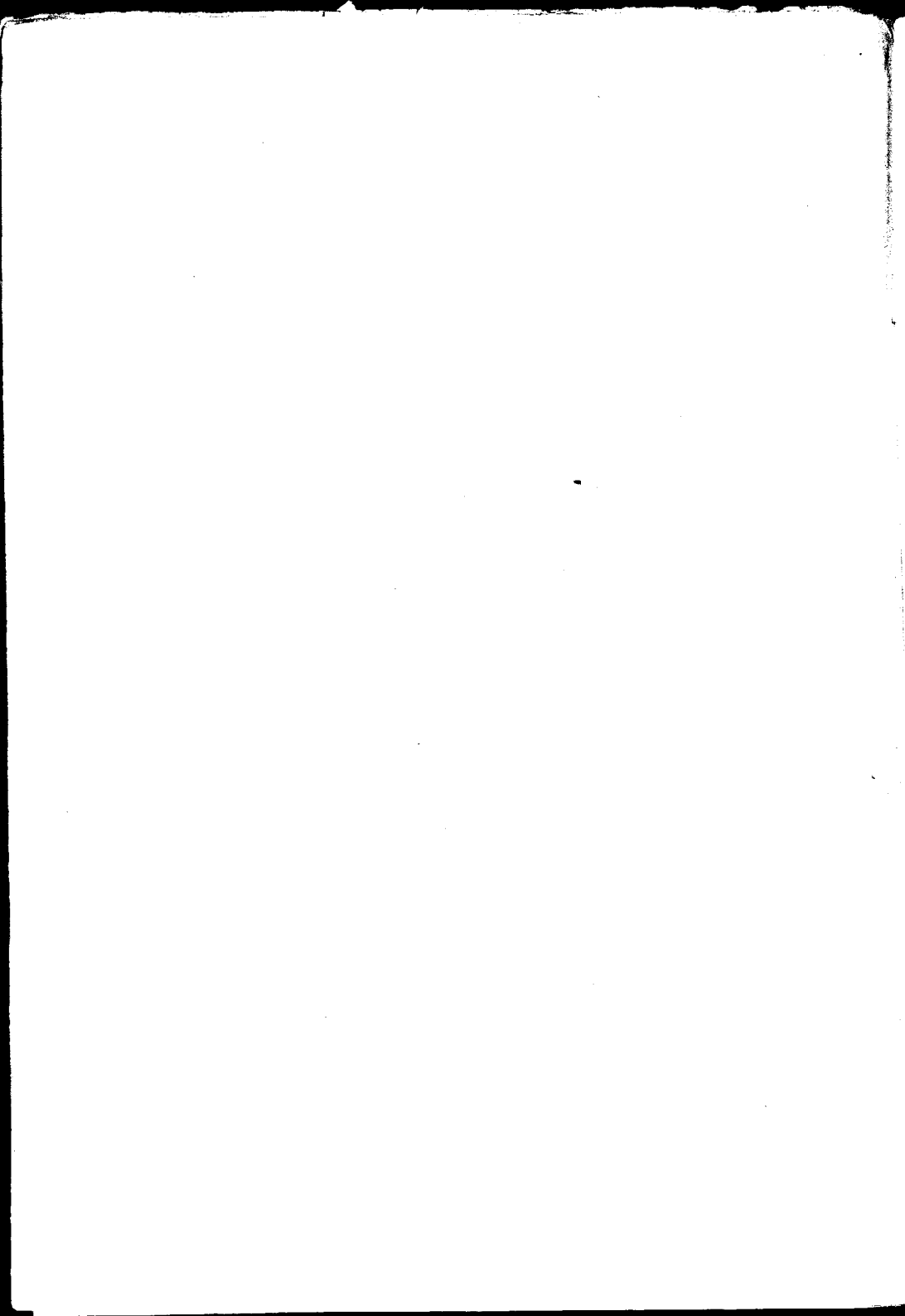
Professeur à l'Institut Pasteur

En témoignage d'affection.

A Monsieur FÉLIX MESNIL

Professeur à l'Institut Pasteur, Membre de l'Institut

Hommage reconnaissant.



DU MÊME AUTEUR

1906. Contribution à l'étude clinique et bactériologique des lésions encéphalo-méningées chez les nouveau-nés syphilitiques. *Société médicale des Hôpitaux*, 12 janvier 1906 (en collaboration avec M. P. Ravaut).
- Recherche sur la présence du Spirochète pallida dans le sang des syphilitiques. *Gazette des Hôpitaux*, 31 juillet 1906 (en collaboration avec M. P. Ravaut).
1907. Recherche sur la présence du Spirochète pallida dans le système nerveux de l'homme, au cours de la syphilis acquise et héréditaire. *Société médicale des Hôpitaux*, 13 décembre 1907 (en collaboration avec M. P. Ravaut).
1908. Imprégnation du Spirochète pallida dans le frottis sur lames au moyen de la largine (albuminate d'argent). *Société de Biologie*, 14 novembre 1908 (en collaboration avec M. P. Ravaut).
1910. Compresseurs conjugués pour prise de sang sur les artères des petits animaux.
- Contribution à la physiologie du *Spirillum Gallinerum*. Assimilation du Glucose. *C. R. Soc. Biologie*, 1910, T. LXIX, p. 307.
1913. Recherches sur la culture *in vitro* du Trypanosome de l'anguille (*Trypanosoma granulosum*, Laveran et Mesnil, 1902). Une nouvelle modification au milieu de Novy et Mac Neal. *C. R. Soc. Biologie*, 1913, T. LXXIV, p. 339.
- Même titre, deuxième note. *C. R. Soc. Biologie*, 1913, T. LXXIV, p. 522.
- Culture *in vitro* du *Trypanoplasma varium* Leger. *C. R. Soc. Biologie*, 1913, T. LXXIV, p. 685.
- Technique pour la coloration des Trypanosomes et Trypanoplasmes de culture. *C. R. Soc. Biologie*, 1913, T. LXXIV, p. 1072.
1917. Déterminisme de la culture du Trypanosome de la Grenouille. *Trypanosoma rotatorium* Mayer (1813). *C. R. Soc. Biologie*, 1917, T. LXXIX, p. 821.
1919. Hexamitus intestinalis Dujardin. Parasite habituel de l'intestin des Batraciens, trouvé dans le sang de *Rana esculenta*. *C. R. Soc. Biologie*, 1919, T. LXXXII, p. 23.
- Procédé simple de neutralisation de l'eau distillée destinée aux colorations dérivées de la méthode de Romanowsky. *C. R. Soc. Biologie*, 1919, T. LXXXII, p. 1328.
- Sur la culture des Trypanosomes. *C. R. Soc. Biologie*, 1919, T. LXXXII, p. 163.
1920. Abreuvoir pour Rats et Souris permettant également l'absorption sans pertes ni souillures de solutions diverses à doses contrôlables. *Ann. Inst. Pasteur*, 1920, T. XXXIV, p. 55.
- Détermination de la réaction des milieux de culture par la mesure de la concentration en ions hydrogène. *Revue in Bull. Inst. Pasteur*, 1920, T. XVIII.



CONTRIBUTION A L'ETUDE DES TRYPANOSOMES

CULTURE — VACCINATION

Par A. PONSELLE

Introduction

En entreprenant cette série de recherches que nous poursuivons depuis plusieurs années, sur le déterminisme de la culture de divers Trypanosomes, nous nous étions donné comme but, de trouver un mode de culture pratique pour les Trypanosomes pathogènes des mammifères, qui permit d'aborder l'étude d'un procédé d'immunisation efficace contre les Trypanosomes. Cet espoir n'a pas été réalisé jusqu'à présent, tout au moins en ce qui concerne la culture, mais nous avons observé en chemin quelques faits qui ne nous semblent pas dénués d'intérêt, au point de vue de la biologie de ces parasites.

Nous sommes arrivés par une autre voie à obtenir un vaccin dont l'action, chez la Souris, seul animal sur lequel nous ayons expérimenté jusqu'à ce jour, nous a donné des résultats encourageants. Ce procédé de vaccination sera peut-être susceptible d'application plus étendue à l'égard d'autres virus difficilement cultivables ou incultivables.

Historique

La culture des Trypanosomes a été réalisée pour la première fois en 1903 par Novy et Mac-Neal pour le *Trypanosoma lewisi* du Rat. Ces auteurs ensemençaient quelques gouttes du sang d'un Rat parasité dans l'eau de condensation d'un milieu agar-sang très voisin de celui préconisé antérieurement dans un autre but par Bezançon et Griffon. Les cultures devenaient rapidement riches et se perpétuaient facilement par réensemencement. En 1904 les mêmes auteurs annonçaient avoir réussi la culture d'un Trypanosome pathogène, le *Trypanosoma brucei*, agent du nagana, en se

servant d'un milieu beaucoup plus riche en sang que le précédent ; les premières cultures étaient d'ailleurs très difficiles à obtenir, les échecs étant fréquents et dans les cas les plus heureux, seuls quelques tubes d'une série donnaient des succès. Les réensemencements se faisaient par contre avec facilité. Malheureusement la difficulté d'obtenir les premières cultures paraît être plus grande encore que ne le faisait penser le succès de Novy Mac-Neal. Smedley en Angleterre semble avoir été le seul à en obtenir et encore ses cultures étaient-elles peu florissantes et se perdaient rapidement au cours des subcultures. Bruce ne réussit pas à cultiver le *Tr. brucei* malgré de nombreux essais et quoiqu'il ait minutieusement suivi les instructions de Novy (1). Nous-même avons constamment échoué.

A cette époque, dans les grandes lignes, la culture des Trypanosomes non pathogènes était devenue facile, mais celle des Trypanosomes pathogènes restait très difficile sinon impossible. Les chercheurs qui cultivèrent de nombreuses espèces de Trypanosomes se servirent du milieu initial N. N. Les seules modifications intéressantes furent celles qu'y apporta en 1906 Mathis, en montrant que le milieu N. N. pouvait être porté au bain-marie à 100° sans perdre ses propriétés et que ce chauffage semblait même l'améliorer en détruisant certaines propriétés du sang nuisibles au Trypanosome et Miyajima qui se servit de bouillon ordinaire des laboratoires de bactériologie additionné de 1/10 à 1/5 de sang défibriné aseptique pour cultiver le *Tr. Theileri* des Bovidés. Postérieurement Nöller, Ogawa et nous-même l'employèrent avec succès pour d'autres Trypanosomes.

En 1906, Ch. Nicolle préconisa, au contraire, pour la culture des *Leishmania* un milieu où le bouillon et la peptone étaient supprimés et où le sang défibriné était mélangé avec une gelée d'agar dans la solution physiologique de chlorure de sodium. Ce milieu fut utilisé par Brumpt, Laveran, etc., pour la culture de divers Trypanosomes.

Mais le déterminisme de la culture des Trypanosomes étant ignoré, les milieux restaient empiriques, beaucoup de modifications de détails y étaient apportées souvent sans grande utilité. Les

(1) Reports of the Sleeping Sickness commission of the Royal Society, N° X, 1910, p. 20.

It may be mentioned here that attempts have been made in this laboratory to cultivate these three species (*Tr. lewisi*, *brucei*, *evansi*). The cultivation of the first was found to be a comparatively easy matter ; but all attempts, and they were many, to cultivate the last two, have, up to the present, failed, although Novy's instructions were carefully followed.

efforts se portaient surtout sur la culture des Trypanosomes pathogènes ; les deux plus intéressantes tentatives à cet égard furent celles de J.-G. Thomson et J.-A. Sinton qui, modifiant légèrement le milieu de Nicolle, obtinrent, difficilement il est vrai, des premières cultures et quelques subcultures de *Tr. gambiense* et *rodhesiense* et celle de Behrens qui substitue au bouillon-agar du milieu N. N. un agar au bouillon dialysé avec lequel il dit obtenir 100 0/0 de succès dans la culture de *Tr. brucei* et des subcultures faciles et abondantes. Ce milieu restant sans valeur pour les autres Trypanosomes pathogènes. Nous avons également utilisé le milieu préconisé par Behrens pour la culture de *Tr. brucei*, mais les résultats furent médiocres : des débuts de culture qu'il fut impossible de repiquer.

C'est dans une autre voie que, dès 1913, nous nous sommes engagés ; nous avons repris l'étude de la culture de certains Trypanosomes non pathogènes et pathogènes de Poissons et de Batraciens et nous sommes arrivés à en connaître le déterminisme exact différent d'ailleurs pour certaines des espèces étudiées et semblant caractériser deux groupes qui englobent la majorité des Trypanosomes connus. C'est l'exposé de nos recherches qui constitue notre travail.



TABLEAU DES TRYPANOSOMES ET TRYPANOPLASMES
DE VERTÉBRÉS DONT LA CULTURE A ÉTÉ OBTENUE (1)

NOM DE L'ESPÈCE DU TRYPANOSOME	NOM DU VERTÉBRÉ PARASITÉ	MILIEU EMPLOYÉ	NOM DE L'AUTEUR ET INDICATION BIBLIOGRAPHIQUE
<i>Trypanosoma avium</i> ...	Oiseaux	N. N.	NOVY et MAC NEAL. <i>Journ. of infect. diseases</i> , II, 1905.
T. barbatulæ	<i>Cobitis barbatula</i>	Ponselle	PONSELLE (A.). <i>C. R. Soc. biologie</i> , LXXIV, 1913.
T. Bocagei	<i>Bufo melanostictus</i>	Mathis	MATHIS et LÉGER. <i>C. R. Soc. biologie</i> , LXX, 1911.
T. Brucei	Bovidés, Equidés, etc.	N. N. 2 ^e formule Milieu de l'auteur	NOVY et MAC NEAL. <i>Journ. of infect. diseases</i> , I, 1904. BEHRENS. <i>Journ. of infect. diseases</i> , V, 1914.
T. cuniculi	Lapin	N. N.	PETRIE (G.-F.). <i>Centralb. f. Bakt., I. Orig.</i> , XXXV, 1904. <i>Journ. of Hygiene</i> , 1905.
T. Danilewsky ..	<i>Carassius auratus</i>	N. N.	THOMSON (J.-D.). <i>Journ. of Hygiene</i> , VIII, 1908.
T. dimorphon ...	Bovidés, Equidés, etc.	N. N.	LAVERAN et PETIT. <i>Bull. Soc. path. exot.</i> , II, 1909.
T. Duttoni	<i>Mus morio musculi</i>	N. N. 2 ^e formule	THIROUX. <i>Ann. Inst. Pasteur</i> , XIX, 1905.
T. elegans	<i>Gobio fluvialilis</i>	N. N. N.	ROUDSKY. in Laveran et Mesnil, <i>Trypanosomes et Trypanosomiasis</i> , 1912, 2 ^e édit.
T. equiperdum ..	Equidés	N. N. 2 ^e formule	MOHLER. <i>U. S. Dept. of Agric. Bureau of anim. Indust.</i> , Bull. 142, 1911.
T. Evansi	Bovidés, Equidés	N. N.	LAVERAN et MESNIL. <i>Trypanosomes et Trypanosomiasis</i> , 1912, 2 ^e édit.
T. fringillinarum	<i>Fringilla cælebs</i>	N. N. et Mathis	WOODCOCK. <i>Quart. Journ. of micr. Sc.</i> , LV, 1910.
T. gallinarum ...	<i>Gallus domesticus</i>	N. N.	BRUCE, HAMERTON, BATEMAN et MACKIE. <i>Reports of the sleeping sickness Commission of the Royal Soc.</i> , XI, 1911.
T. gambiense ...	Homme	Milieu des auteurs	THOMSON (J.-G.) et SINTON (J.-A.). <i>Ann. of Trop. Med. and Parasitology</i> , VI, 1912.
T. granulosum ..	<i>Anguilla vulgaris</i>	Ponselle	PONSELLE (A.). — <i>C. R. Soc. Biologie</i> , LXXIV, 1923.
T. inopinatum ...	<i>Rana esculenta</i>	Ponselle	PONSELLE (A.). — <i>Thèse médecine</i> , Paris, 1913.
T. Laverani	<i>Spinus tristis</i>	N. N.	NOVY et MAC NEAL. <i>Journ. of infect. Diseases</i> , II, 1905.

(1) Abréviations : N. N., milieu de Novy Mac Neal. — N. N. N., milieu de Novy, modifié par Ch. Nicolle.

NOM DE L'ESPÈCE DU TRYPANOSOME	NOM DU VERTÉBRÉ PARASITÉ	MILIEU EMPLOYÉ	NOM DE L'AUTEUR ET INDICATION BIBLIOGRAPHIQUE
T. leptodaetyli ..	<i>Leptodactylus oscellatus</i>	N. N.	ASTROGILDO MACHADO. <i>Mem. Inst. Osw. Cruz.</i> , III, 1911.
T. Lewisi	<i>Mus rattus, decu- manus, alexan- drinus, etc.</i>	N. N.	NOVY et MAC NEAL. <i>Contrib. to med. Research. dedic. to V. Vaughan</i> , 1903.
T. Mathisi	<i>Chelidon urbica</i>	N. N.	SERGEANT (Ed. et El.). <i>Ann. Inst. Past.</i> , XXI, 1907.
T. melophagium .	Ovidés	Bouillon sang de mouton et agar sang de mouton	NÖLLER (W.). <i>Arch. Schiffss. Trop. Hyg.</i> , XXIII, 1919.
T. Mesnili	<i>Buteo lineatus</i>	N. N.	NOVY et MAC NEAL. — <i>Journ. of infect. diseases</i> , II, 1905.
T. minasense	<i>Hapale penicillatus</i>	N. N. N.	BRUMPT (E.). — <i>Bull. Soc. Path. exotique</i> , 1909, II.
T. noctuæ	<i>Athene noctua Syrnium aluco</i>	N. N.	ROSENBUSCH. <i>Arch. f. Pros- tikenkunde</i> , XV, 1909.
T. paddæ	<i>Padda oryzivora</i>	N. N.	MAYER. <i>Ibid.</i> , XXI, 1911.
T. phoxini	<i>Phoxinus levis</i>	ausang d'oie	THIROUX. <i>Ann. Inst. Past.</i> , XIX, 1905.
T. primeti	<i>Tropidonotus pis- cator et Hipsti- rhina chinensis.</i>	N. N.	DELANOË. <i>C. R. Soc. biolo- gie</i> , LXIII, 1911.
T. rajæ	<i>Raja</i>	Mathis	MATHIS et LÉGER. <i>C. R. Soc. biologie</i> , LXVII, 1909.
T. rotatorium ...	<i>Rana esculenta et temporaria</i>	N. N.	BRUMPT. <i>Soc. path. exotique</i> , 1910.
T. rhodesiense ..	Homme	2 ^e formule Milieu des auteurs	BOCET. <i>Ann. Inst. Past.</i> , 1905.
T. scardinii	<i>Scardinius erythroptalmus</i>	N. N.	THOMSON (J.-G) et SINTON (J.-A.). <i>Ann. of Trop. Med. and Parasitology</i> , VI, 1912.
T. scylli	<i>Scyllium</i>	N. N. N.	DELANOË. <i>C. R. Soc. biolo- gie</i> , LXIII, 1911.
T. Theileri	Bovidés	Bouillon sang	BRUMPT. <i>Soc. path. exoti- que</i> , 1910.
T. tritonis	<i>Triton pyrrhogaster</i>	Bouillon au sang 1/10	MIYAJIMA. <i>Philippine Journ. of Sc., B. med. sc.</i> , II, 1909.
T. vespertilionis .	<i>Vespertilio kühli</i>	N. N.	OGAWA. <i>C. R. Soc. biologie</i> , LXV, 2 ^e .
T. vickersæ	<i>Macaus cynomolgus</i>	N. N. N.	NICOLLE et COMTE. <i>Ann. Inst. Past. de Tunis</i> , II, 1908.
Schizotrypanum Cruz.	Homme	N. N.	BRUMPT (E.). <i>Bull. Soc. path. exotique</i> , II, 1909.
S. pipistrelli	<i>Vesperugo pipistrellus</i>	N. N. N.	CHAGAS (C.). — <i>Brasil me- dico</i> , 1909.
Trypanoplasma varium.	<i>Cobitis barbatula</i>	Ponselle	CHATTON (E.) et COURBIER (R.). <i>C. R. Soc. biologie</i> , LXXXIV, 1921.
			PONSELLE (A.). — <i>C. R. Soc. Biologie</i> , LXXIV, 1913.

CHAPITRE I^{er}

Le Trypanosome de l'Anguille et les Trypanosomes des Poissons

Le Trypanosome de l'Anguille : *Trypanosoma granulosum* a été découvert en 1911 par Sabrazès et Muratet. Ce Trypanosome a été étudié par França et surtout par Brumpt qui a démontré sa transmission aux Anguilles par la piqûre d'*Hemiclepsis marginata* et en a étudié d'une manière très complète le cycle évolutif chez cette Hirudinée.

Malgré sa grande vitalité, déjà signalée par Sabrazès et Muratet, Brumpt n'avait jamais pu en obtenir de cultures et s'exprimait ainsi à ce sujet : « Dans le milieu de Novy et Mac-Neal nous n'avons pu obtenir de culture et malgré la différence de constitution du milieu avec le sang de l'Anguille nous avons observé des formes parfaitement typiques huit et dix jours après l'ensemencement. »

Les nombreux essais de culture que nous avons tentés en 1912 et 1913 et ceux de Delanoë avaient confirmé que ce Trypanosome était incultivable dans le milieu de Novy et Mac-Neal type ou modifié par Nicolle, qu'il soit chauffé ou non, et qu'il était seulement possible d'obtenir une survie prolongée de plus d'un mois sans trace de multiplication.

Cette absence d'évolution culturale contrastant avec la multiplication extrêmement rapide qui a lieu dans le tube digestif d'*Hemiclepsis marginata*, n'étant pas liée à une fragilité particulière de *Tr. granulosum*, nous avons pensé que la culture était terminée chez la Sangsue par un facteur probablement assez simple qu'il serait possible de faire intervenir dans le milieu de culture.

Les observations que Miss Robertson avait faites quelques années auparavant sur le Trypanosome du Cyprin doré, d'ailleurs facilement cultivable en milieu N. N., nous mirent sur la voie.

Ses expériences d'une durée relativement courte qui avaient été effectuées uniquement entre lame et lamelle avaient montré que l'on provoquait une multiplication rapide de ce Trypanosome en abaissant la pression osmotique du milieu où il se trouve.

Pensant que l'absence de multiplication du Trypanosome de l'Anguille en milieu N. N. ou N. N. N. venait de ce que ces milieux

n'étaient pas encore assez hypotoniques par rapport à la pression osmotique du sang de l'Anguille, nous avons constitué un milieu agar-sang hypotonique de la formule suivante :

Agar : 20 gr.

Eau ordinaire : 1.000 gr.

Après chauffage à 120° et filtration, le milieu réparti en tubes

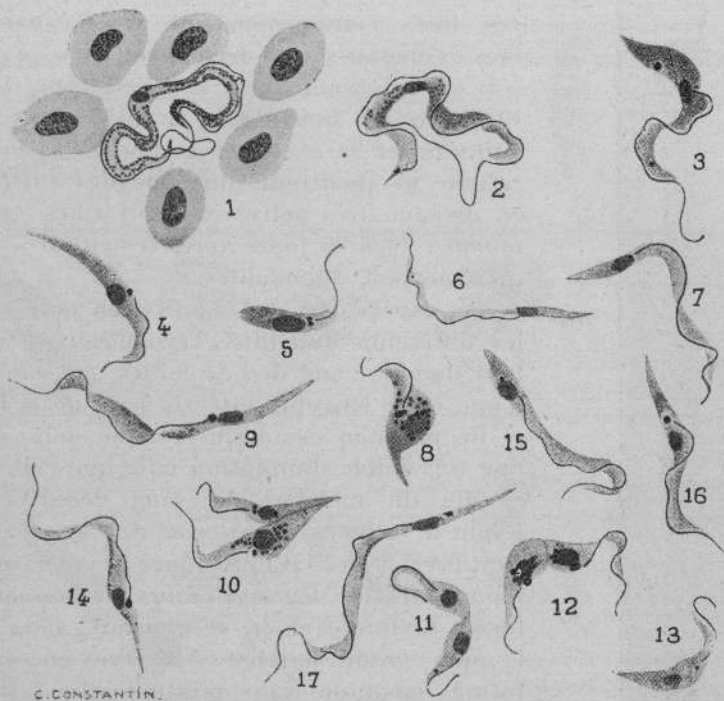


FIG. 1. — 1, 2, *Tr. granulorum*, dans le sang de l'Anguille; 3, forme épaissie, douze heures après l'ensemencement; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, formes *Crithidia Leptomonas*; 14, 15, 16, 17, forme *Trypanosome* de culture (Gross. 1000 diamètres. Coloration au Giemsa).

est mélangé vers 50° avec son volume de sang de lapin défibriné recueilli aseptiquement et incliné pour solidification.

Sur un tel milieu, il suffit d'ensemencer une goutte du sang d'une Anguille parasitée même faiblement pour obtenir rapidement des cultures d'une extrême richesse où les formes de multiplication abondent ainsi qu'en témoignent les dessins 10, 11, 12 de la figure I.

La marche de ces cultures, observées au moyen de prélèvements

répétés à des intervalles rapprochés, montre que l'évolution culturale du Trypanosome dans ce milieu est identique à celle que

Brumpt a décrite au cours de ses belles recherches sur le mode de transmission et l'évolution des Trypanosomes des Poissons, dans l'estomac et l'intestin de la Sangsue *Hemicleipsis marginata*. Déjà quelques heures après l'ensemencement, les Trypanosomes s'épaississent, deviennent peu à peu piriformes, tandis que le blépharoplaste se rapproche du noyau pour arriver à la forme *Crithidia* et 24 à 48 heures après, les préparations ne montrent plus que des *Crithidia* en division très active et des formes *Leptomonas* ; 15 à 20 jours après les cultures sont extrêmement abondantes.

Nos expériences ont montré, en outre, que les différents individus Trypanosomes, existant dans le sang des Anguilles, ne sont pas d'une égale susceptibilité vis-à-vis de la baisse de pression osmotique et que déjà, pour une très faible diminution telle que celle qui résulte du mélange du sang défibriné de Lapin à volumes égaux avec de l'agar contenant 0,4 0/0 de NaCl, quelques Trypanosomes répondent à ce léger stimulus en prenant la forme *Crithidia* et en se divisant, alors que le plus grand nombre conserve encore la forme sanguine sans multiplication. Il est vrai que dans ce cas la culture reste toujours maigre, contrastant avec celles où la pression osmotique est optima et où tous les Trypanosomes se divisent et se multiplient avec une grande rapidité. Ce fait est à rapprocher selon nous de la résistance des Trypanosomes aux agents chimiothérapiques et peut servir d'argument aux théories qui voient à la base de cette résistance une sélection. Ajoutons d'ailleurs que dans ce même milieu hypotonique tous les Trypanosomes de Poissons

se développent beaucoup mieux que dans le milieu Novy et Mac-Neal, certaines espèces y donnent (*Tr. phoxini*, *barbatulæ*,



FIG. 2. — Culture de 17 jours. *Trypanosome phoxini* en milieu hypotonique de l'auteur, tube vu par transparence à 10 centimètres d'une lampe électrique de 16 bougies.

etc.) des formes pigmentées identiques à celles que Brumpt a signalées pour divers Trypanosomes de Poissons de mer et d'eau douce en culture sur le milieu N. N. N. et dans le tube digestif de *Calobdella punctata* et d'*Hemicleipsis marginata*. Dans les cultures sur notre milieu, la multiplication de ces formes pigmentées est si active qu'au bout de quelques jours le milieu exa-

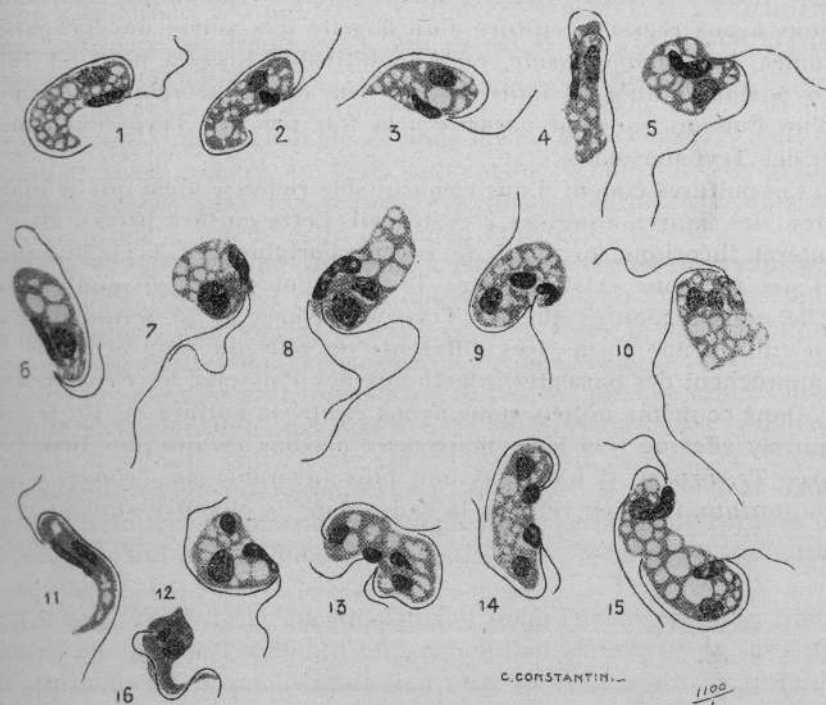


FIG. 3. — Culture de 20 jours. Coloration Giemsa. Grossissement, 1.100 diamètres. 1, 2, 3 4, 5, 6, 7, Trypanoplasmes de culture ; 8, 9, individus présentant une division du noyau ; 10, division simultanée du noyau et du centrosome ; 11, 12, division du centrosome précédant celle du noyau ; 13, 14, 15, individus à la fin de la division ; 16, *Trypanosoma barbatulae* forme de culture.

miné par transparence montre une large tache noire, sur le fond rouge du sang laqué, dans la zone où les Trypanosomes se sont développés dans l'agar.

Si nous examinons la pression osmotique du sang de divers Poissons d'eau douce, nous remarquons qu'elle correspond en moyenne à une solution de chlorure de sodium à 0,66 0/0, tandis que le Δ du sang de Lapin = celui d'une solution de chlorure de sodium à 0,95 0/0.

Le Δ du milieu de Novy Mac-Neal correspond à celui d'une solution NaCl à 0,65 au lieu de 0,45 pour notre milieu.

Cette influence déterminante de la pression osmotique, explique pourquoi Brumpt a obtenu de beaucoup plus belles cultures des Trypanosomes des Poissons de mer avec le milieu au sang de Lapin qu'avec un milieu agar-sang au sang de Poissons marins (dont le $\Delta = 1,072$ 0/0 NaCl). Dans ce même milieu hypotonique agar-sang nous avons réussi la culture d'un flagellé très voisin des Trypanosomes, le *Trypanoplasme*, resté incultivable jusqu'à nous, et cela en partant d'un seul individu isolé en goutte pendante, du sang d'un Poisson qui était parasité à la fois par des Trypanoplasmes et des Trypanosomes.

Ces cultures étaient d'une remarquable richesse ainsi que le montrent les figures annexées à ce travail. Cette culture présentait un intérêt théorique au point de vue de l'origine des Trypanosomes et des relations existant entre Trypanosomes et Trypanoplasmes. Elle nous a montré que les Trypanoplasmes ne présentaient pas en culture une forme très différente de celle du sang et qu'ils se rapprochent des parasites intestinaux des Poissons, les *Prowazekia*.

Dans ce même milieu, nous avons étudié la culture de *Tr. lewisi* qui s'y effectue très bien, mais nous n'avons eu que des succès avec *Tr. brucei*. Il n'est pas non plus favorable au *Trypanosoma rotatorium*, nous en verrons la cause dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II

Trypanosoma rotatorium

On obtenait facilement la culture de *Tr. rotatorium* et Mathis dans son milieu chauffé avait retrouvé les stades si particuliers déjà entrevus par Danilewsky, qui caractérisent l'évolution culturale de ce Trypanosome.

Nöller, d'autre part, avait montré que le bouillon sang était un milieu encore plus favorable et nous-même avons observé que le bouillon sang préparé au 1/10, suivant la formule de Miyajima, donnait encore plus rapidement des formes culturales. Mais le déterminisme exact de cette évolution était resté inconnu.

Dollein, dans l'étude qu'il lui a consacrée en 1910, s'exprime ainsi : « Je n'ai jamais réussi à obtenir entre lame et lamelle sous le microscope, directement du sang de Grenouille, la multiplication des grosses formes de Trypanosomes de la Grenouille. J'ai entrepris de nombreuses recherches dans ce but, en plus de celles faites avec le sang pur, dans ces expériences les Trypanosomes restaient vivants des jours entiers. Ils éprouvaient bien pendant ce temps des modifications intéressantes sur lesquelles je reviendrai dans un prochain travail, mais dans la règle ils ne se multipliaient pas. »

Nöller, d'autre part, dans son travail sur *Tr. rotatorium*, se borne à de vagues hypothèses.

Tel était l'état de la question quand nous l'avons abordée. Nous sommes partis de l'étude du milieu bouillon avec 1/10 de sang de Lapin défibriné, le meilleur milieu pour la culture du *Tr. rotatorium*, déjà préconisé par Ogawa pour la culture de *Trypanosoma tritonis* du *Triton pyrrhogaster*.

Après avoir constaté que le simple fait de la dilution du sang avec de l'eau physiologique ou de l'eau distillée était impuissant à constituer un milieu propice à l'évolution du *Tr. rotatorium*, nous avons étudié l'action de plusieurs dérivés des protéiques existant dans les infusions de viande : syntonines, peptones, acides aminés et divers sels : chlorure de calcium, sulfate de magnésie, etc., des lipoides, des savons, sans aucun succès.

L'étude de la réaction du bouillon nous conduisit au contraire à une découverte intéressante. Le bouillon employé couramment dans les laboratoires de bactériologie, alcalinisé légèrement avec le papier de tournesol comme indicateur, avant la stérilisation, se

trouve après le passage à l'autoclave non seulement toujours acide à la phthaléine du phénol, mais encore très souvent neutre ou légèrement acide au tournesol. La durée du chauffage et le degré auquel la stérilisation est effectuée, influent beaucoup sur cette réaction qui tend à augmenter vers l'acidité, surtout si le bouillon contient du glucose. Ces notions sont d'ailleurs connues.

Basée sur cette observation, notre première expérience consista à mélanger à volumes égaux une goutte de sang de Grenouille parasitée avec une solution à deux pour mille en volumes dans l'eau physiologique d'HCl à 22° Bé. Une goutte du mélange mise entre lame et lamelle fut placée sous le microscope et un Trypanosome de la grande forme striée ayant été amené dans le champ, fut soumis à des observations répétées. Déjà quelques heures après le début de l'observation, commencée au matin, le Trypanosome s'épaissit et vers le soir devient sphérique ayant perdu son flagelle.

Le lendemain matin, à la place du Trypanosome, se trouvait une masse composée de 8 petites sphères qui continuaient à se diviser et qui vers le soir prirent un aspect piriforme avec une petite saillie au pôle libre. Le lendemain au matin, pas de modification apparente, mais vers 17 heures des mouvements commencèrent à se distinguer dans la masse et plusieurs des cellules filles montrèrent de courts flagelles mobiles ; à 21 h., deux Trypanosomes se détachèrent de la masse commune.

Cette expérience nous conduisit à étudier de plus près l'action de l'acidité et à trouver le point correspondant au maximum de rapidité dans l'évolution culturale du Trypanosome.

Le mélange d'une goutte de sang parasité avec 10 fois son volume d'HCl à 0,6 0/00 dans NaCl à 5 0/00 nous donna des résultats encore meilleurs.

En remplaçant pour la dilution de l'acide chlorhydrique la solution à 5 0/00 NaCl par une solution minérale complexe du genre du liquide de Ringer Locke, nous obtenions déjà au bout de 24 heures des formes culturales flagellées.

Pensant alors à la possibilité d'une action secondaire nuisible de l'acide chlorhydrique libre sur les Trypanosomes, nous essayâmes de remplacer HCl par du phosphate monopotassique, mais, fait curieux, si le début de l'évolution culturale, caractérisé par la mise en boule et la perte du flagelle, se produisait rapidement, quelquefois, avant toute division ou au cours des divisions ultérieures, intervenait une cytolysse brusque des éléments qu'aucune modification dans la tonicité ou dans la composition saline de la solution

ne parvenait à supprimer. Seule l'adjonction de peptone au taux de 0,5 à 1 0/0 ou de gélatine, la présence des deux est encore préférable, ou même d'agar (celle-ci est difficile à manier à cause de son pouvoir gélifiant considérable), supprimait complètement la cytolyse. Ces substances n'ayant comme caractère commun que

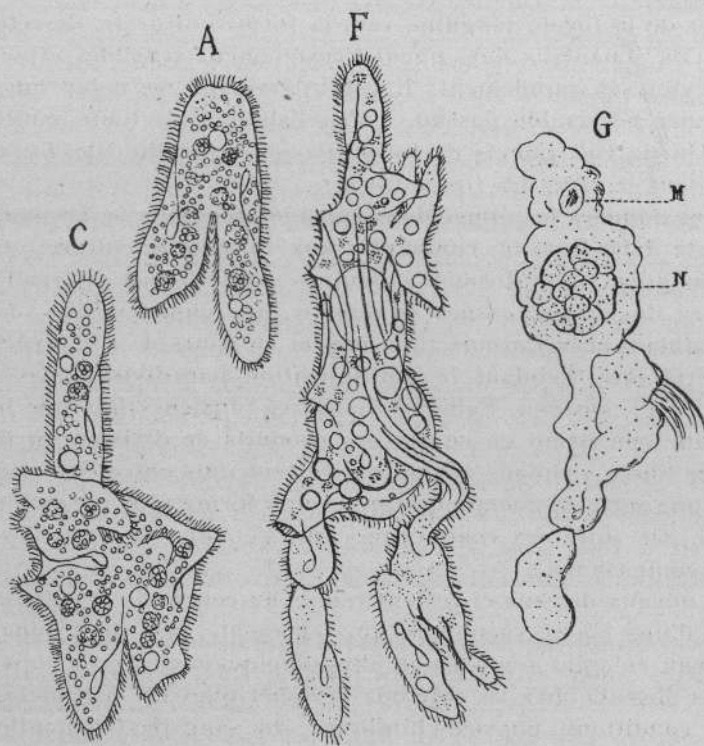


FIG. 4. — Formation d'un agrégat de paramécies ayant pour point de départ un mérozoïte postérieur. A, C, F, états d'accroissement successifs par division du merozoïte. G, montre l'agrégat F après traitement par les réactifs qui mettent en évidence dans la masse commune un gros noyau et un micronucleus (D'après Balbiani, 1893).

leur pouvoir adsorbant, nous avons pensé qu'il fallait attribuer cette cytolyse à la présence des anticorps existant dans le sang de Grenouille parasité, qui, s'ils sont inactifs sur les Trypanosomes du sang circulant, détruisent 90 0/0 des Trypanosomes de culture ainsi que l'a montré Nöller.

Il est donc vraisemblable qu'au moment du mélange de la solution d'HCl avec le sang de Grenouille, les anticorps se trouvent

détruits ou paralysés, soit qu'HCl n'agisse qu'en donnant avec les phosphates alcalins du sang des phosphates monobasiques et que l'excès se fixe sur les protéiques en les transformant, soit qu'il s'agisse d'une action spéciale de l'anion Cl.

Tandis que le phosphate monopotassique respecte ces anticorps qui agissent alors sur les Trypanosomes dès qu'ils se mettent à évoluer de la forme sanguine vers la forme culturale, de réfractaires qu'ils étaient ils deviennent brusquement sensibles et se trouvent cytolysés rapidement. Il est intéressant de noter que cette résistance ne semble possible qu'en l'absence de toute multiplication. On ne voit jamais de forme de multiplication de *Tr. rotatorium* dans le sang des Grenouilles.

Etant données les dimensions considérables que le Trypanosome présente dans le sang, comparées aux formes de culture, on peut se demander si les formes sanguines ne sont pas en réalité des colonies de Trypanosomes analogues aux monstruosité décrites par Balbiani chez *Paramecium aurelia* au cours de ses expériences de mérotomie. Pendant la multiplication par division des mérozoïtes de Paramécies, Balbiani a observé plusieurs fois une bizarre anomalie consistant en ce que les produits de division au lieu de devenir libres à chaque génération restent unis entre eux et constituent une sorte de colonie qui prend une forme plus ou moins irrégulière par suite des coalescences qui s'établissent entre les individus composants.

Les noyaux de ceux-ci restent réunis au centre de la colonie sous forme d'une masse vacuolaire qui représente sans doute une sorte de noyau colonial remplaçant physiologiquement les noyaux individuels absents chez les rejetons périphériques de la colonie.

Les conditions physico-chimiques du sang de Grenouille agiraient sur le Trypanosome en ralentissant considérablement la vitesse de multiplication et lui imprimant un caractère spécial qui le rendrait résistant aux anticorps.

L'emploi indifférent de l'acide chlorhydrique ou du phosphate monopotassique pour déclencher l'évolution culturale, toute question d'activité des anticorps mise à part, permettait déjà de supposer qu'il ne s'agissait pas d'une action de la molécule de ces corps, mais de leur réaction acide.

Pour fixer nos idées sur l'acidité optima, nous avons d'abord utilisé la méthode titrimétrique, mais après quelques dosages nous sommes rapidement rendu compte qu'elle était absolument impuissante à nous renseigner exactement et que seule la concentration en ion H intervenait dans le déterminisme du phénomène.

C'est surtout depuis les recherches de Sörensen (1909) que l'importance en biologie de la notion de concentration en ion H est bien connue. Dans ses *Etudes Enzymatiques*, ce dernier auteur a mis au point une méthode colorimétrique de mesure de la concentration en ions Hydrogène, qui a été encore perfectionnée dans ces dernières années principalement par les auteurs américains Clark et Lubs.

Le principe de cette méthode, dans ses grandes lignes, est de comparer, sous une même épaisseur et sous le même volume, la solution dont on veut estimer la concentration en ions Hydrogène, et une série de solutions étalons de concentration en ions H croissante ou décroissante additionnées de la même quantité d'un indicateur approprié. Une fois trouvée la solution dont la teinte est identique à celle du liquide étudié, il suffit de connaître la concentration en ions H de l'étalon pour avoir celle de l'échantillon.

C'est cette méthode colorimétrique que nous avons employée pour déterminer la concentration en ions Hydrogène.

Nous basant sur la composition saline du bouillon de viande et suivant la méthode synthétique employée par Raulin dans ses mémorables expériences sur l'*Aspergillus niger*, nous avons constitué une solution minérale qui, additionnée des substances adsorbantes dont nous avons expliqué plus haut l'utilité, et mélangée au sang de Grenouille parasité à raison de 1 de sang pour 10 de solution, a permis d'obtenir très rapidement l'évolution culturale du Trypanosome.

C'est le minimum de temps nécessaire à l'apparition des formes culturales flagellées, qui a servi de critérium pour établir le meilleur milieu de culture.

Nous avons étudié deux formules de ce bouillon artificiel qui donnent sensiblement les mêmes résultats.

L'une comporte comme « régulateur » un mélange de phosphates mono et bibasiques et en voici la formule :

• Chlorure de sodium	0,55
» de calcium	0,02
» de magnésium	0,02
Phosphate monoplassique pur	0,195
» bisodique + 2 H ² O	0,005
Glucose	0,2
Peptone Witte	0,5
Gélatine pure	0,5
Eau bidistillée	100 cc.

et un second dont le système régulateur est constitué par un mélange de glycérophosphate de soude et d'acide succinique.

Chlorure de sodium	0,55	
» de potassium	0,03	
» de calcium	0,02	
Sulfate de magnésie	0,02	
Glycérophosphate de soude crist. ...	0,20	
Glucose	0,2	
Gélatine pure	0,5	
Peptone de Witte	0,5	
Acide lactique de densité 1,21 au 1/10		} ou acide succinique pur cristallisé 0,065
(en volumes)	0,8	
Eau bidistillée	100 cc.	

Ces deux solutions sont à peu près équivalentes, néanmoins la dernière paraît légèrement supérieure.

Ces deux solutions avant le mélange avec le sang de Grenouille présentent une concentration en ions Hydrogène désignée par le symbole pH de 5,4 et après mélange avec le sang de Lapin de 6,3. Nous n'avons pas procédé à nos mesures avec du sang de Grenouilles, vu les quantités nécessaires pour les essais, mais nous nous sommes assurés que 3 cc. du mélange, 10 de solution + 1 de sang de Lapin, ensemencé avec une trace de sang de Grenouille parasité, donnait des cultures aussi rapides.

C'est donc la concentration en ions H de pH 6,3 qui paraît réaliser l'optimum d'acidité pour le phénomène qui nous intéresse.

Tous nos essais étaient faits entre lame et lamelle, aussi aseptiquement que possible, et, voici comment nous procédions :

Une lame et une lamelle sont stérilisées au four Pasteur enfermées dans une boîte de Pétri.

Avec une pince flambée la lamelle est saisie et on dépose sur une de ses faces aux quatre coins une trace de paraffine fondue de façon à constituer après retournement de la lamelle sur la lame une chambre d'environ 1/10 de mm. de hauteur.

Avec une pipette Pasteur effilée et préalablement étalonnée avec de l'eau distillée et portant deux traits, un à 0,01 cc., l'autre à 0,1 cc., on aspire 0,1 cc. de la solution que l'on refoule aussitôt après dans une lame à concavité flambée, puis on ponctionne suivant le procédé de Nöller, après nettoyage de la région avec un tampon imbibé d'alcool et assèchement, la veine faciale d'une Grenouille parasitée au niveau de la commissure labiale, on laisse le sang arriver au trait 0,01 cc. et l'on opère soigneusement le mélange

dont on dépose une goutte sur une lame flambée, on recouvre de la lamelle préparée et on lutte à la paraffine.

Un Trypanosome (grande forme striée) ayant été amené au milieu du champ, il est alors facile, en se servant de préférence d'un condensateur à fond noir et d'un objectif apochromatique de 8 mm. avec un oculaire comp. n° 12, de suivre l'évolution culturale dans tous ses détails.

Progressivement le Trypanosome s'épaissit, les côtes très marquées qui caractérisent les grandes formes s'atténuent peu à peu, le Trypanosome tend à prendre une forme sphérique, les mouvements de la membrane ondulante et du flagelle sont toujours rapides, quelques fois même accélérés, mais ne communiquent au Trypanosome qu'un mouvement de rotation sur place. Au bout de 2 heures environ, le Trypanosome est complètement sphérique avec le flagelle toujours mobile, la membrane ondulante qui bordait la sphère disparaît et le flagelle commence à se détacher par l'extrémité voisine de la portion libre ; ses mouvements continuent jusqu'au moment où il se détache violemment du Trypanosome dont il s'écarte même sensiblement, il présente encore quelques secousses, puis s'immobilise.

La sphère reste immobile avec seulement des granulations en mouvement bien visibles à l'éclairage au fond noir, peu à peu suivant un diamètre, se produit un étranglement qui bientôt donne au Trypanosome un aspect de biscuit ; cet étranglement s'accroît et au bout de deux heures la division est complète, donnant deux sphères de diamètre moitié moindre que la sphère primitive.

Sans accroissement de leur diamètre les deux sphères commencent à se diviser et cette division se trouve terminée en deux heures.

Les divisions des cellules filles se répètent alors jusqu'à donner 64 éléments sphériques.

Ces sphères ne sont animées d'aucun mouvement si la concentration en ions H de la solution correspond bien à l'optimum. Si cette concentration est trop faible, les sphères présentent des mouvements amiboïdes prononcés qui les déforment incessamment, le temps nécessaire aux divisions successives est beaucoup plus grand et les cellules ne se divisent plus avec la même vitesse, si bien qu'il coexiste des éléments non divisés des stades antérieurs avec des éléments déjà divisés. Si, au contraire, la concentration en ions H est trop forte, la mise en boule se fait bien, mais tout s'arrête là et les divisions ultérieures ne se produisent plus.

Arrivés au stade 64 les éléments commencent à modifier leur

forme, de sphériques qu'ils étaient ils deviennent légèrement piri-formes et commencent à présenter de très faibles mouvements d'oscillation dus à l'apparition du nouveau flagelle extrêmement court et très difficile à voir même au fond noir.

Progressivement le flagelle s'allonge et les mouvements prennent plus d'amplitude, puis les éléments se divisent encore longitudinalement donnant deux petits *leptomonas* dont la mobilité s'accroît et qui se mettent à circuler dans la préparation. La totalité de l'évolution, quand toutes les conditions se trouvent réalisées, demande en tout 17 heures et les différentes phases se succèdent avec une régularité remarquable.

Comme nous l'avons déjà indiqué en passant, même si l'optimum d'acidité se trouve réalisé, différents facteurs peuvent inhiber le processus ou lui donner une allure anormale.

La tonicité de la solution joue un rôle, elle doit correspondre à une solution de NaCl de 5 à 6 0/00. Trop hypotonique, elle favorise la cytolysse, hypertonique le processus s'arrête après le stade de mise en boule.

L'action la plus intéressante à étudier est celle des anticorps. Nous avons déjà dit que pour obtenir régulièrement des cultures il était de toute nécessité d'adsorber ces anticorps, car sans cette précaution on assistait à une lyse plus ou moins précoce des formes allagellées au cours de l'évolution culturale.

En leur présence la mise en boule, y compris la perte du flagelle, s'accomplit généralement d'une manière normale, puis après un laps de temps variable suivant les Trypanosomes et probablement l'activité des anticorps du sang de grenouille étudié, la sphère augmente légèrement de volume et brusquement devient moins réfringente tandis que les granulations intraprotoplasmiques s'animent de mouvements browniens, indiquant la pénétration du liquide à l'intérieur de la cellule qui néanmoins conserve sa forme.

Souvent, au contraire, c'est au cours de la division en deux que se produit cette brusque cytolysse. On peut l'observer encore plus tardivement, et fréquemment quand les divisions sont assez avancées elle n'est que partielle, ne portant que sur certains éléments qui semblent résistants, alors qu'un des produits de la division ultérieure peut être sensible et se trouver lysé à son tour. Quand, malgré la présence des anticorps probablement d'une activité limitée, quelques formes *Leptomonas* ont pu se produire, elles sont définitivement résistantes, ce qui confirme les observations de Nöller que les Trypanosomes de culture mis en présence de sang de Grenouille à anticorps ne sont jamais détruits que dans une

proportion de 90 0/0. La sensibilité des Trypanosomes de la Grenouille vis-à-vis des anticorps semble donc présenter son maximum au moment de la première division. Ces faits sont suggestifs et nous verrons dans la seconde partie de ce travail quel parti nous avons essayé d'en tirer. Le Trypanosome de la Grenouille ne paraît pas être le seul à présenter ce déterminisme de l'évolution culturelle. Nous avons obtenu de très belles et très rapides cultures de *Tr. fringillinarum*, le Trypanosome du Pinson, en ensemençant dans le bouillon sang au 1/10 une trace de moelle osseuse prélevée aseptiquement.

Le Trypanosome non pathogène des Bovidés cultive aussi parfaitement dans le bouillon sang et c'est même ainsi que les premières cultures en avaient été obtenues par Miyajima. Comme dans nos expériences, le mélange du sang avec de l'eau physiologique ou de l'eau distillée ne donne lieu à aucune culture. Howard Crawley et Paul Bhen, qui avaient noté séparément ce fait et constaté la nécessité du bouillon, n'avaient pas rapporté son action à l'acidité, qui est seule agissante cependant. Cette étude du déterminisme de la culture de quelques Trypanosomes nous semble susceptible de faire mieux comprendre l'étroite spécificité des hôtes intermédiaires dans la transmission des Trypanosomes. Elle explique parfaitement le rôle des Sangsues et de certains Insectes.

BIBLIOGRAPHIE

- BALBIANI (E.). — Etudes sur l'action des sels sur les infusoires. *Archives d'Anatomie microscopique*, II, 1898.
- BEHN (P.). — Gehen die bei Rindern Kulturell nachweisbaren Flagellaten aus Trypanosomen hervor? *Zeitschr. f. Hyg.*, LXX, 1912, p. 371, 2 pl.
- BEHRENS (C.-A.). — An attenuated culture of *Trypanosoma Brucei*. *Journ. of Infect. Diseases*, XV, 1914, p. 24.
- BRUMPT (E.). — Sur quelques espèces nouvelles de Trypanosomes parasites de Poissons d'eau douce : leur mode d'évolution. *C. R. Soc. Biologie*, LVIII, 1906, vol. I, p. 160.
- Mode de transmission et évolution des Trypanosomes de Poissons. Description de quelques espèces nouvelles de Trypanoplasmes de Poissons d'eau douce. Trypanosome d'un Crapaud africain. *C. R. Soc. Biologie*, LVIII, 1906, vol. I, p. 162.
- Sur quelques particularités morphologiques et physiologiques des Trypanosomes (perte du flagelle et formation de pigments divers). *Bull. Soc. Path. exotique*, III, 1910, p. 366.
- *Précis de Parasitologie*, 1922, 3^e édition, Masson et Cie, p. 232.
- CLARK (W.-M.) et LUBS (H.-A.). — The colorimetric determination of the hydrogen ion concentration and its applications in bacteriology. *Jour. of Bact.*, II, 1917, p. 1, 109, 191.

- CRAWLEY (H.). — *Trypanosoma americanum*, a Common Blood Parasite of American Cattle. *Bureau of anim. Ind.*, Bull. 1912.
- DOULEIN (F.). — Studien zur Naugeschichte des Protozoen XI. Experimentelles Studien über die Trypanosomen des Frosches. *Archiv für Protistenkunde*, XIX, 1910, p. 211.
- FERNBACH (A.) et HUBERT (L.). — De l'influence des phosphates et de quelques autres matières minérales sur le diastase protolytique du muscle. *C. R. Acad. Sciences*, CXXXI, p. 293.
- FRANCA (C.). — Le Trypanosome de l'Anguille (*Tr. granulosum* Laveran et Mesnil). *Archiv. Do Real Instituto Bacteriologico Central Prussiano*, II, 1908, p. 102, 1 pl.
- MEYERS. — Sur une modification au milieu de NOXY-MAC. Neutrophilisme des Trypanosomes. *C. R. Soc. Biologie*, LVIII, 1906, vol. II, p. 539.
- Cultures de *Leishmania infandum* et *L. tropica* sur milieux au sel. *C. R. Soc. Biologie*, LXIII, 1911, vol. II, p. 538.
- MENDELBERG-GOLDBERG (P.). — Die Immunitätsfrage bei der Trypanosomenkrankheit der Fische. *Arch. f. Protistenk.*, XXXI, 1913, p. 271-280.
- MIRAMIS (M.). — On the cultivation of a bovine trypanosome in vitro. *communication, Philippine Journ. of Science, B. Medical*, II, 1909.
- MOHRER (J.-B.). — U. S. Dept. of Agric., Bureau of anim. Indust., W. Bull. 142, 1911.
- NICHOL (J.H.). — *C. R. Acad. Sc.*, CXL, 1908, p. 812.
- NOXY (W.). — Kleinere Mitteilungen. Die Blutparasiten des Wasserschneiders ihre Übertragung. (Vorläufige Mittheilung). *Arch. Protistenk.*, 1913, p. 315-316.
- Die Blutprotozoen des Wasserschneiders und ihre Übertragung. *Arch. Protistenk.*, XXXI, 1913, p. 109-240, 3 pl.
- NOXY (F.-G.) et MAC NEAL (W.-J.). — *On the cultivation of Trypanosoma*. Contribution to Medical Research, dedicated to A. C. Naughton, 1907.
- On the cultivation of *Trypanosoma Brucei*. *Journ. of exp. Med.*, 1910.
- OGAWA (M.). — Sur un Trypanosome du *Filix pyrrhogasus*. *C. R. Soc. Biologie*, LXXV, 1915, p. 268.
- PONCELET (A.). — Recherches sur la culture *in vitro* du Trypanosome de l'Anguille (*Trypanosoma granulosum* Laveran et Mesnil, 1902). Culture in vitro au milieu de Noxy et Mac Neal. *C. R. Soc. Biologie*, LXXV, 1915, p. 339 et 552.
- Culture *in vitro* du *Trypanoplasma carinatum* Leuck. *C. R. Soc. Biologie*, 1913, p. 685.
- Déterminisme de la culture du Trypanosome de la crevette (*Trypanoplasma rotatorum*, Mayer, 1813). *C. R. Soc. Biologie*, LXXIX, 1914, p. 821-829.
- Sur la culture des Trypanosomes. *C. R. Soc. Biologie*, LXXXII, 1916, p. 1.
- QUINON (R.). — Degré de concentration saline du milieu vital de l'anguille dans l'eau de mer et dans l'eau douce, et après son passage expérimental de la première eau dans la seconde. *C. R. Soc. Biologie*, 304, p. 471.
- ROBERTSON (M.). — Transmission of Flagellates Living in the Blood of certain Freshwater Fishes. *Phil. Trans. Roy. Soc. of London*, CGLIII, 1911, p. 24, 2 pl., 1 et 2.
- SABRAZIS et MEYER. — Trypanosome de l'Anguille. Processus de division. *C. R. Soc. Biologie*, LVI, 1904, p. 60.
- Vitalité du Trypanosome de l'Anguille dans les sécrètes lymphatiques et osseuses. Osmométrie de l'eau. *C. R. Soc. Biologie*, LVI, 1904, p. 159.
- SAVILEY (H. D.). — The cultivation of *Trypanosomula*. *Ann. of Hygiene*, V, 1903, p. 24, 1 pl.

- SORENSEN. — Etudes enzymatiques: II. Sur la mesure et l'importance de la concentration des ions hydrogène dans les réactions enzymatiques. *C. R. Labo. Carlsberg*, VIII, 1909, p. 1.
- Note supplémentaire au mémoire intitulé: Etudes enzymatiques. II. *C. R. Labo. Carlsberg*, VIII, 1909, p. 306.
- TEGENSEN (J. G.). — Cultivation of the Trypanosome found in the blood of the Gadfish *Lamprologus*, VIII, 1908, p. 75.
- TEGENSEN (J. G.) et SIXTUS (J. A.). — The morphology of *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma rhodesiense* in cultures, and a comparison with the morphological forms described in *Glossina palpalis*. *Annals of Trop. Med. & Parasitology*, VI, 1932, p. 331, 2 pl.

CHAPITRE III

Le Trypanosome pathogène de Grenouilles *Trypanosoma inopinatum*, Ed. et Et. Sergent, 1904

Trypanosome a été découvert en 1904 par Ed. et Et. Sergent dans le sang d'une Grenouille verte (*Rana esculenta*) capturée à Grand-Mizan (Kabylie), et a été retrouvé la même année à Constanine par Billet.

En 1906, Brumpt reprit l'étude de ce parasite en vue de préciser son cycle évolutif.

Il établit définitivement le rôle, entrevu par Billet, de la Sangsue *Leishadella agira* comme agent transmetteur, étudia en détail l'évolution du parasite dans le tube digestif de cette Hirudinée, démontra qu'elle a lieu uniquement dans l'estomac où le Trypanosome donne rapidement des formes *Crithidia* pour revenir à des formes Trypanosome dans la guêpe de la trompe et que ce sont ces formes qui sont inoculées par la Sangsue. Trypanosomes métacycliques de Brumpt. Ses belles recherches démontrèrent enfin d'une façon précise le rôle pathogène de *Trypanosoma inopinatum*.

L'étude du déterminisme de la culture de ce Trypanosome, seule espèce pathogène d'animaux à sang froid, présentait donc pour nous un grand intérêt. A notre connaissance, personne ne l'avait cultivé et nos essais dans le milieu de Neveu-Mac-Neal ou dans la modification de Nicolle restèrent infructueux.

La biologie de ce parasite, hôte habituel du tube digestif d'une Hirudinée chez laquelle il se multiplie et peut même se transmettre par voie héréditaire, ainsi que Brumpt l'a démontré, nous fit penser que l'hypolonie pourrait bien être comme pour les Trypanosomes des poissons le facteur déterminant de la culture.

En possession d'une souche très pathogène provenant d'une *Rana esculenta* infectée par piqûres d'Helobdelle, nous avons tenté de cultiver ce Trypanosome. Ces Sangsues nous avaient été adressées par le Professeur Seurat, que nous tenons à remercier ici de son inlassable obligeance, et provenaient des environs d'Alger:

En ensemençant une goutte du sang du cœur d'une *Rana esculenta* infectée expérimentalement et présentant de très nombreux Trypanosomes, dans un milieu composé de sang de Lapin défibriné aseptique et d'eau bidistillée stérilisée mélangés à volumes égaux et inactivé 30 minutes à 56° (car le sang de Lapin est souvent fortement trypanolytique pour cette espèce), nous avons obtenu rapidement de belles cultures. Le lendemain déjà, à la température du Laboratoire, on peut constater la présence de formes *Crithidia* très mobiles en multiplication active. Quatre jours après, elles sont devenues nombreuses, formes isolées et rosaces avec flagelles à l'extérieur. En pratiquant une numération approximative par champ de microscope, on peut constater que le nombre des Trypanosomes se trouve multiplié par 2 en 48 heures; au bout de 10 à 15 jours les cultures deviennent extrêmement riches.

Tous les tubes ensemencés donnent des cultures, les subcultures se font très facilement et sont déjà très abondantes 8 jours après l'ensemencement.

Au début on ne constate que la présence de formes *Crithidia* trapues, au bout d'une dizaine de jours les formes allongées dominent avec de nombreux Trypanosomes métacycliques qui rappellent absolument ceux qui existent dans les cultures de *Tr. granulorum*.

On observe des formes de multiplication où les Trypanosomes ne sont en contact que par leurs extrémités postérieures, ces formes, que nous avons colorées et reproduites dans une des figures annexées à ce travail, ont été également observées à l'état vivant au condensateur à fond noir (elles ne résultent donc pas des manipulations de l'étalement) et sont assez particulières et presque caractéristiques de cette espèce de Trypanosome, car ce sont celles qui dominent.

Fait curieux, les formes *Crithidia* présentent de gros grains de pigment noir identiques à ceux que montrent les Trypanosomes

de Poissons en culture dans le milieu N. N. N., dans le tube digestif d'*Hemiclepsis marginata*, ou en culture dans notre milieu hypotonique.

Ces Trypanosomes de culture montrent une virulence tout à fait comparable à celle des Trypanosomes inoculés par les Helobdelles.

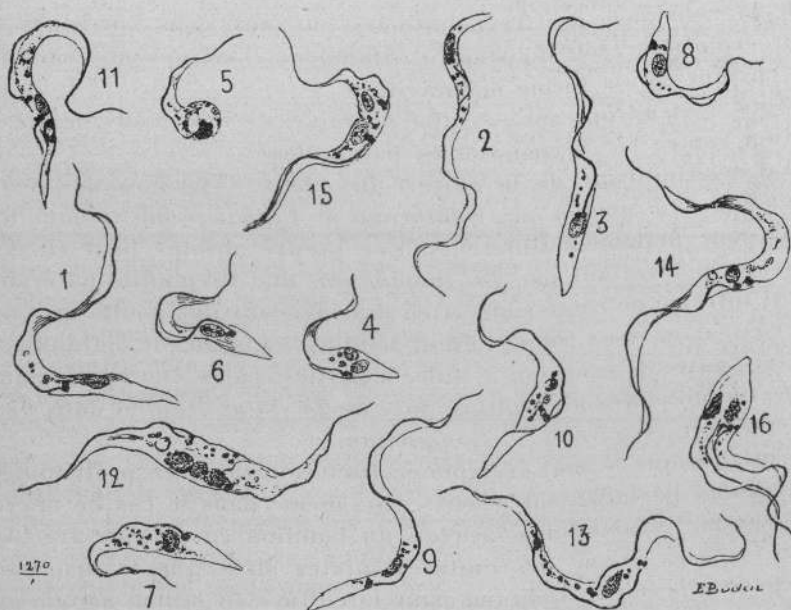


FIG. 5. — *Trypanosoma inopinatum* en culture dans le milieu de l'auteur. 1, 2, 3, 4, 5, formes *Crithidia* ; 6, 7, 8, 9, 10, formes Trypanosome métacyclique ; 11, 12, 13, 14, 15, formes de multiplication avec contact des extrémités postérieures particulières à *Tr. inopinatum* ; 16, forme de multiplication du type normal.

Pour notre virus les Trypanosomes apparaissent 8 jours après la piqûre, entraînant la mort du 16^e au 20^e jour.

Avec nos quatrième et huitième subcultures, nous avons inoculé des Grenouilles vertes à la dose d'une goutte dans le péritoine ; déjà 6 jours après elles ont montré des Trypanosomes encore rares, mais qui ont été en se multipliant rapidement jusqu'à la mort, survenue du 16^e au 20^e jour avec un nombre considérable de Trypanosomes dans le sang.

Les Grenouilles rousses (*Rana temporaria*) sont au contraire complètement réfractaires aux inoculations de culture comme elles le sont à l'infection par piqûres d'Helobdelles (Brumpt), tandis

qu'elles sont sensibles à l'inoculation de sang de Grenouille infectée.

Cette résistance des *Rana temporaria* ne peut pas être attribuée à l'absence de formes Trypanosomes métacycliques dans nos cultures, car elles sont nombreuses déjà au huitième jour et d'ailleurs ces formes sont celles qu'inoculent les Helobdelles, ce qui prouve que la résistance des Trypanosomes aux anticorps, au cours de leur évolution, croît du stade *Crithidia* au Trypanosome sanguin en passant par la forme métacyclique.

Nous reviendrons sur ce sujet à propos de nos essais de vaccination contre les Trypanosomes pathogènes.

Le déterminisme de la culture des deux Trypanosomes de la Grenouille : *Trypanosoma rotatorium* et *Trypanosoma inopinatum* sont donc nettement différents. Une preuve absolue peut en être donnée en infectant par *Tr. inopinatum* une Grenouille naturellement infectée de *rotatorium* et en ensemençant une goutte du sang du cœur dans deux tubes, l'un de bouillon sang au pH optimum de 6,3, et l'autre de sang eau distillée à parties égales. Dans le premier tube, on obtiendra une culture pure de *Tr. rotatorium* et dans l'autre une culture pure de *Tr. inopinatum*.

C'est presque le seul exemple en bactériologie et en protistologie de milieux parfaitement électifs, car, même dans le cas de microbes aérobies et anaérobies strictes, du bouillonensemencé avec les deux espèces donne des cultures mixtes ainsi que le démontre l'élégant procédé de Debrand pour la culture en milieu aérobie du *B. tetani* en présence de *B. subtilis* (1).

BIBLIOGRAPHIE

- BILLET (A.). — Sur le *Trypanosoma inopinatum* de la grenouille verte d'Algérie et sa relation possible avec les *Drepanidium*. *C. R. Soc. Biologie*, LVI, 1904, vol. 2, p. 161.
- BRUMPT (E.). — Rôle pathogène et mode de transmission du *Trypanosoma inopinatum* Ed. et Et. Sergent. *C. R. Soc. Biologie*, LVIII, 1906, vol. 2, p. 167.
- SERGENT (Ed. et Et.). — Sur un Trypanosome nouveau parasite de la grenouille verte. *C. R. Soc. Biologie*, LVI, 1904, p. 123.

(1) DEBRAND. — Sur un nouveau procédé de culture du bacille du tétanos. *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, T. XIV, p. 757, et 1902, T. XVI, p. 427.

IMMUNISATION CONTRE LES TRYPANOSOMES PATHOGÈNES

Historique

En 1902, Laveran et Mesnil firent des essais d'immunisation par inoculation de sang à Trypanosomes ayant perdu toute virulence après séjour à 40°. Ils n'observèrent dans ces conditions ni immunité aux inoculations subséquentes de virus frais ni modification dans la marche de l'infection. En 1907, Novy reprit cette question en utilisant comme vaccin des cultures de *Tr. brucei* ayant perdu toute virulence après exposition de 2 jours à 37°, mais les résultats furent négatifs, les Cobayes traités n'ayant montré que quelques jours de retard sur les témoins. Avec le *Tr. lewisi*, au contraire, l'immunisation fut obtenue, les Rats traités ne s'infectant plus à la suite d'inoculation de sang virulent et leur sérum devenant protecteur contre une inoculation simultanée et séparée du virus. Le vaccin utilisé était obtenu en dialysant contre l'eau distillée des cultures de *Tr. lewisi* placées en sac de collodion ; dans ces conditions, les Trypanosomes étaient plasmolysés et le contenu du sac constituait le vaccin.

Ross et J.-G. Thomson, en 1911, utilisèrent du sang de Rat infecté de *Tr. rhodesiense* chauffé à 55° dans un but de vaccinothérapie sur le Rat, sans succès.

Latapie, la même année, inocule des Souris avec des corps de Trypanosomes (*Tr. equinum*) séparés par centrifugation du sang de Rat infecté broyé dans un appareil spécial et mis à macérer dans le sérum des animaux fournisseurs de virus. Les animaux traités meurent avec quelques jours de retard (4) sur les témoins.

Teichmann et Braun, 1911, — Trypanosomes secs obtenus par centrifugation remis en suspension dans l'eau physiologique avec addition de 1 0/0 de toluène qu'on chasse ensuite par barbotage d'air — déclarent avoir obtenu de très bons résultats. Ils vaccinent des Souris et des Lapins contre la dourine ; des Souris, des Rats, des Cobayes contre le nagana.

Laveran, par un procédé analogue, essaie de vacciner des Souris et un Cobaye en leur inoculant en suspension dans l'eau distillée une poudre obtenue en broyant le produit de dessiccation de Trypanosomes séparés des hématies par centrifugation de sang de Rat infecté de *Tr. gambiense*. Résultats négatifs ; les animaux traités succombant plus rapidement que les témoins.

Schilling, 1912, partant de l'idée que l'immunité de courte durée qui suit la guérison par un médicament est due à la résorption des Trypanosomes tués par ce médicament, utilise des Trypanosomes (obtenus par centrifugation de sang citraté de Rats naganés) tués *in vitro* par une solution d'émétique à 1 p. 400, après 2 heures de contact et centrifugation le culot dilué dans du bouillon sert de vaccin en injection intra-péritonéale. Il obtient ainsi chez les Rats et les Souris une certaine immunité avec allongement de la période d'incubation et résistance complète de certains animaux.

Rondoni et Goretli, 1913, après avoir essayé comme vaccin des Trypanosomes séparés par centrifugation du sang de Rats infectés et traités par l'eau distillée, par une solution hypertonique de NaCl ou des sels de quinine ou de salvarsan, sont arrivés à la conclusion que seuls les Trypanosomes traités par le salvarsan fournissaient un vaccin de quelque valeur ; la dilution au 40.000 serait la meilleure au bout de 30 minutes ; à la température du laboratoire les Trypanosomes dont la mobilité est seulement ralentie sont centrifugés et employés comme vaccin après dilution dans l'eau physiologique. Des Souris vaccinées contre le nagana résistent dans la proportion de 40 à 50 0/0 à une inoculation de sang virulent ou bien s'infectent, mais meurent plus tard que les témoins.

Laveran et Marullaz, 1914, qui ont répété les expériences de Rondoni et Goretli, ont infecté les deux tiers des Souris avec le vaccin et celles qui ont survécu à une première inoculation virulente sont mortes à la seconde.

Schilling et Rondoni, 1913, ont utilisé des Trypanosomes maintenus à 37° (sang de Rat nagané en bouillon citraté) jusqu'à ce qu'ils meurent, ce qui arrive au bout de 3 heures. Ces Trypanosomes deviennent toxiques et tuent la Souris à la dose de 1/4 de centimètre cube sans infection. Si le temps de séjour à 37° est prolongé, la toxicité diminue et devient nulle au bout de 18 heures ; elle disparaît également par chauffage de 30 minutes à 56°. Ces Trypanosomes toxiques à dose non mortelle ou ceux rendus non toxiques par chauffage à 56° constituent un vaccin. Les Souris traitées même par de petites doses résistent aux inoculations virulentes.

Malheureusement les essais de Laveran, 1913, avec la même technique, ne donnèrent que des insuccès ou de mauvais résultats.

Aoki et Koduna n'obtinrent également que des résultats négatifs dans des essais de vaccination contre la dourine sur Lapins, Rats et

Souris avec des Trypanosomes tués par le formol ou des Trypanosomes séparés par centrifugation, desséchés et pulvérisés.

Enfin Hintze, reprenant en 1915 les essais de vaccination au moyen de Trypanosomes desséchés et de poudre de rates d'animaux naganés, confirma Laveran, Aoki et Koduna, car, malgré la variété des moyens mis en œuvre, il n'eut que des résultats négatifs à une exception près : un Cobaye ayant reçu 0 gr. 4 de poudre de rate de Rat nagané résista à l'inoculation virulente.

Ainsi donc, malgré la multiplicité des vaccins proposés, les résultats paraissent encore très aléatoires, les bons résultats publiés par certains auteurs n'étant pas confirmés par d'autres chercheurs utilisant le même mode de préparation et aucun de ces vaccins en tous cas ne semble avoir été utilisé pratiquement.

VACCINATION CONTRE LES TRYPANOSOMES PATHOGÈNES

Comme on l'a vu dans la première partie de ce travail au chapitre relatif à la culture de *Tr. rotatorium*, les formes de cultures : *Crithidia*, *Leptomas* et les formes Trypanosomes sanguicoles présentent une sensibilité très inégale aux anticorps. Le maximum de vulnérabilité existant au moment du passage de la forme sanguicole à la forme culturale.

Le Trypanosome pathogène de Grenouille *Trypanosoma inopinatum* montre la même susceptibilité. Brumpt, en effet, a démontré que la Grenouille rousse (*Rana temporaria*) ne peut pas être infectée de ce Trypanosome par piqûre d'Helobdelles, alors que l'infection est facilement réalisée par inoculation de sang de Grenouille verte infectée. Avec nos cultures cependant fort riches et où existent de nombreux Trypans métacycliques, l'infection de la Grenouille rousse n'est pas possible alors que la Grenouille verte succombe plus rapidement à l'inoculation de culture que par piqûre d'Helobdelles ; cela prouve que si le Trypanosome métacyclique est la forme de culture la plus résistante et celle qui infecte le vertébré réceptif, elle l'est moins cependant que la forme Trypanosome sanguicole.

Il en est de même pour les Trypanosomes pathogènes de mammifères. Les travaux de Kleine et Taute, Bruce, Hamerton, Bateman et Maekie ont bien montré que les formes de cultures *Crithidia* qui se multiplient dans la trompe et le tube digestif des Glossines ne sont pas infectantes et que seuls les Trypanosomes métacycliques

des glandes salivaires sont susceptibles d'infecter les animaux réceptifs.

C'est également le cas pour *Trypanosoma cruzi* évoluant chez *Gonorrhinus megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex boueti* et *Ornithodoros moubata*, ainsi qu'il résulte des expériences si précises que Brumpt a faites au cours de ses nombreuses recherches et que l'on peut résumer ainsi :

Les déjections de *Gonorrhinus* renferment toujours des flagellés du type *Crithidia* 15 à 20 jours après leur repas infectieux et ne sont infectieuses que par hasard ; passé ce délai, elles renferment de moins en moins de *Crithidia*, tandis que les formes Trypanosomes deviennent plus nombreuses, elles sont alors toujours infectantes pour les animaux sensibles.

Chez *Cimex lectularius*, l'évolution est encore plus rapide, au bout de dix jours les déjections sont infectieuses et présentent des cultures presque pures de Trypanosomes.

L'évolution est analogue chez *Cimex boueti* et *Ornithodoros moubata*.

Il semble donc que ce soit aux cultures de Trypanosomes qu'il faille s'adresser pour obtenir des vaccins. C'est, en effet, avec des cultures que Novy et Mac-Neal ont obtenu l'immunisation du Rat contre *Trypanosoma lewisi*. A l'heure actuelle, il n'existe pas malheureusement de milieu de culture donnant des résultats vraiment constants pour les Trypanosomes pathogènes et pratiquement ils sont restés incultivables.

Nous avons donc songé à obtenir tout au moins le début de l'évolution culturale de façon à rendre les Trypanosomes vulnérables aux anticorps existant dans le sang des animaux infectés à la dernière période de la maladie (Rats, Souris) ou au moment des crises trypanolytiques (Cobaye), réalisant ainsi une sorte de sensibilisation du Trypanosome tué par l'action des anticorps.

Nous avons cherché en augmentant *in vitro* la concentration en ions H de sang de Souris infecté de nagana à reproduire les phénomènes que nous avons observés avec le *Trypanosoma rotatorium*.

Dans ce but nous avons additionné le sang de Souris nagané, prélevé à la dernière période de la maladie au moment où il fourmille de Trypanosomes, d'un système « régulateur » constitué par un mélange en proportion déterminée de phosphates mono et bibasique d'alcali de manière à amener et à maintenir ce sang à une concentration en ions H déterminée. Nous savons, en effet, que de pareils mélanges ont la propriété d'amortir les variations de réac-

tion d'un milieu et de les rendre très faibles, pour des additions ménagées mais relativement considérables de bases ou d'acides, de là le nom de « tampons » qui leur fut donné par Fernbach et Hober (1900) qui les premiers ont montré leur importance dans les actions diastasiques. Dénomination reprise ensuite en 1909 par Sørensen dans son travail classique sur l'importance de la concentration en ions H dans les réactions enzymatiques. La courbe reproduite ici montre pour les solutions de phosphates la zone où elles sont susceptibles d'amortir le plus efficacement les variations de réaction. Nous remarquons que c'est précisément dans la

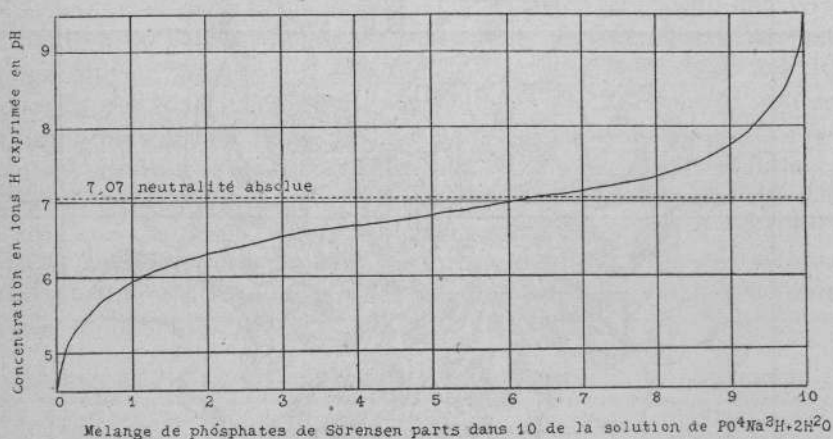


FIG. 6. — Courbe de la concentration en ions H pour les mélanges de phosphates de Sørensen

zone comprise entre pH 6 et 7,5 que leur action est la plus marquée et c'est à cette concentration en ions H que dans nos expériences le *Trypanosoma rotatorium* a montré la plus grande sensibilité à l'action lytique des anticorps.

Pour établir nos mélanges sang nagané-solutions tampons, deux alternatives étaient possibles : soit mettre les sels sous un volume relativement faible en solution isotonique et les utiliser en concentration relativement élevée ; soit diluer le sang dans une assez grande quantité d'une solution isotonisée par le chlorure de sodium et à teneur moindre en phosphates. C'est au premier procédé que nous nous sommes arrêtés après expérimentation, comme donnant les meilleurs résultats.

Nous utilisons pour préparer notre solution les phosphates très purs préparés selon Sørensen pour la mesure colorimétrique de la

concentration en ions H et en les dissolvant dans un vase en verre non soluble dans les proportions suivantes :

Phosphate monopotassique ($\text{Po}^+\text{K}^+\text{H}^-$)	1 gr. 80
Phosphate bisodique ($\text{Po}^+\text{Na}^+\text{H}^- 2 \text{H}^+\text{O}$)	0 gr. 20
Eau bidistillée	100 cc.

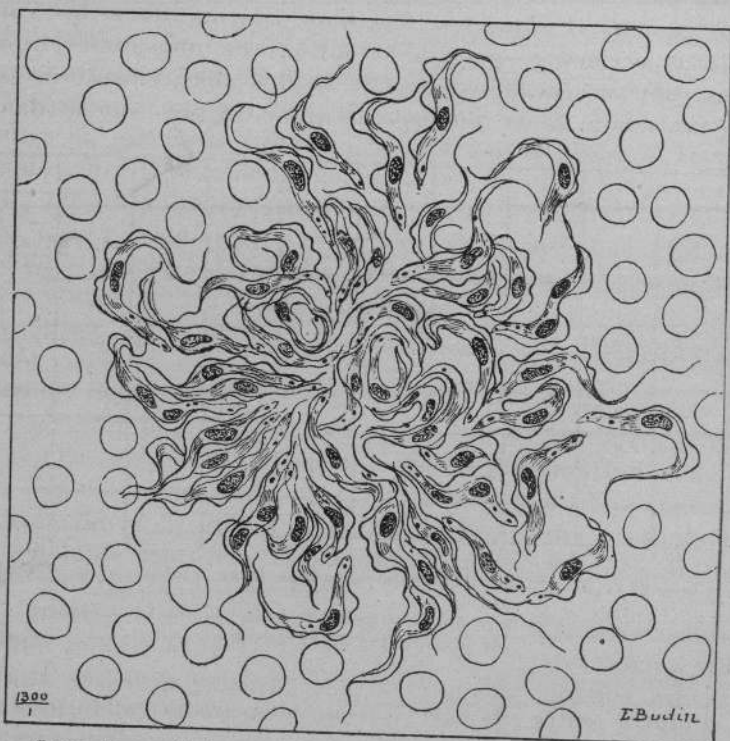


FIG. 7. — Sang de souris immunisé contre le nagana en mélange à volumes égaux avec du sang citraté de souris naganée. Agglutination persistante du *Trypanosoma brucei*. Coloration bleu Borrel éosine de Laveran. Gross., 1.300 diamètres.

Cette solution est répartie par fraction de 2,5 cc. dans des tubes à essais bouchés à l'ouate et stérilisée à l'autoclave vingt minutes à 115°.

Une Souris arrivée au terme ultime de l'infection à *Trypanosome brucei* est sacrifiée par strangulation et le sang du cœur aspiré en totalité dans une pipette avec toutes les précautions d'asepsie voulues, soit généralement 0,5 cc. Ce sang est immédiatement mélangé dans le tube avec 2,5 cc. de la solution et le tout est abandonné 20 à 24 h. à une température de 20°.

Au bout de ce laps de temps, les globules et les Trypanosomes sédimentés sont remis en suspension par agitation et le vaccin est prêt à être utilisé.

Une précaution essentielle consiste à prélever le sang trypanosomé à la période ultime de la maladie, le plus près possible de la mort.

Nous employons pour les Souris le vaccin à la dose de 1/10 de cc. en injection dans le péritoine. Aucune réaction ne peut être observée ni immédiatement ni plus tard. Déjà 4 à 5 jours après cette unique injection, le sang des Souris vaccinées en mélange avec une trace de sang nagané montre un pouvoir agglutinant avec formation de belles rosaces plus ou moins persistantes, il devient aussi souvent paralysant. Les Souris vaccinées éprouvées 8 à 10 jours après par inoculation sous-cutanée de 1/20 de cc. d'une dilution de sang de Souris nagané dans l'eau physiologique et présentant environ 4 Trypanosomes par champ d'objectif à immersion, résistent dans une forte proportion variable suivant l'âge des souris (les jeunes s'immunisent plus facilement que les vieilles) et qui peut atteindre 70 0/0, les autres meurent avec des retards variables de 4 à 8 jours sur les témoins qui meurent 5 à 6 jours après l'inoculation.

BIBLIOGRAPHIE

- AOKI (K.) et KODAMA (H.). — Beitrage zur Frage des Immunisierung mit abgetöteten Trypanosomen. *Zeitschr. Imm. Forsch.*, XVIII, 1913, p. 693.
- BRAUN (H.) et TEICHMANN (E.). — Versuche zur Immunisierung gegen Trypanosomen. Jena Fischer, 1912.
- BRUMPT (E.). — *Trypanosoma Cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lectularius*, *cimex Boueti* et *Ornithodoros moubata*. Cycle évolutif de ce parasite. *Bull. Soc. Path. Exot.*, V, 1912, p. 360.
- Etude expérimentale de la Trypanosomose américaine de G. Chagas. *Bull. Acad. Méd.*, 1912, p. 428.
- HINTZE — Versuche zur Immunisierung gegen Trypanosomeninfektion. *Zeitschr. f. Hyg.*, LXXX, 1915, p. 377.
- LATAPIE (A.). — Essai de vaccination et de traitement dans les spirilloses et les trypanosomiasés. *C. R. Soc. Biologie*, LXXI, 1911, p. 187.
- LAVERAN (A.). — Essai de vaccination contre le *Trypanosoma gambiense* avec des Trypanosomes morts, toxine de *Tr. gambiense*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, IV, 1911, p. (80).
- Trypanotoxines. Essais d'immunisation contre les Trypanosomes. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, VI, 1913, p. 693.
- LAVERAN et MARULLAZ. — Essais d'immunisation contre le nagana expérimental des souris. *Ibid.*, VII, 1914, p. 53.

- NOVY (F.-G.). — Immunity against Trypanosomes. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, IV, 1907, p. 42-44.
- RONDONI (P.) et GORETTI (G.). — Studien über Schutzimpfung gegen experimentelle Naganainfektion. *Zeitschr. Immun. Forsch.*, XVIII, 1913, p. 491.
- ROSS et THOMSON (J.-G.). — Experiments on the treatment of animals infected with Trypanosomes by means of atoxyl, vaccines, cold, X rays and leucocytes extracts; enumerative methods employed. *Proc. Roy. Soc., B.*, LXXXIII, 1911, p. 227 à 234.
- SCHILLING (Cl.). — Eins neues Immunisierungsverfahren gegen Trypanosomen Krankheiten. *Deutsche med. Woch.*, 1912, No 1, p. 13 et p. 1579.
- SCHILLING (G.) et RONDONI (P.). — Ueber Trypanosomen Toxine und Immunität. *Zeitschr. Imm. Forsch.*, XVIII, 1913, p. 665.
- TEICHMANN (E.) et BRAUN (H.). — Zur Frage des kunstlichen Immunisierung gegen Trypanosomen. *Berliner Klin. Woch.*, 1911, No 34.
-

CONCLUSIONS

I

Depuis les premières cultures de Trypanosomes obtenues par Novy Mac-Neal dans le milieu gélose-sang, on n'avait apporté à la technique de ces auteurs que de très légères modifications, le déterminisme exact de l'évolution culturale des Trypanosomes restant inconnu.

L'étude d'un Trypanosome de poissons, *Trypanosoma granulosum* incultivable dans le milieu type de Novy Mac-Neal et dans les variantes proposées par les auteurs, nous a permis de démontrer que pour tout un groupe de Trypanosomes (ceux transmis par Hirudinées) le déterminisme de la culture est lié à l'hypotonie du milieu, *Trypanosoma granulosum* étant l'espèce qui avec le Trypanosome pathogène de la grenouille présentent ce caractère au plus haut degré.

II

L'étude du déterminisme de culture du *Trypanosoma rotatorium* nous a montré que pour un autre groupe de Trypanosomes (les Trypanosomes transmis par Arthropodes) c'est l'augmentation de la concentration en ions H qui détermine l'évolution culturale.

III

En partant de l'observation des phénomènes de lyse qui se produisent au cours de l'évolution culturale des *Trypanosoma rotatorium*, quand on augmente *in vitro* la concentration en ions H du sang de grenouille parasitée, nous avons montré que le maximum de sensibilité du Trypanosome aux anticorps existe au début de cette évolution. Nous avons essayé de transformer *in vitro* en vaccin le sang de mammifère infecté de Trypanosome pathogène (*Tr. brucei*) en augmentant sa concentration en ions H. Ce procédé, qui nous a donné des résultats intéressants sur la souris, seul animal sur lequel nous ayons expérimenté, nous semble mériter d'être perfectionné et étendu à d'autres parasites sanguicoles ou non.

Vu : le Doyen,
ROGER.

Vu : le Président de la thèse,
E. BRUMPT.

P. APPELL.

Le Recteur de l'Académie de Paris,
Vu et permis d'imprimer :

