

## LA CULTURE DE *TRYPANOSOMA INOPINATUM* TRYPANOSOME PATHOGÈNE DE LA GRENOUILLE

Par A. PONSELLE

Ce trypanosome a été découvert en 1904 par Ed. et Et. Sergent dans le sang d'une grenouille verte (*Rana esculenta*) capturée à Dra-el-Mizan (Kabylie), et a été retrouvé la même année à Constantine 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 *Helobdella algira* 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 gaine 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 Novy 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'hypotonie 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 inactivés 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

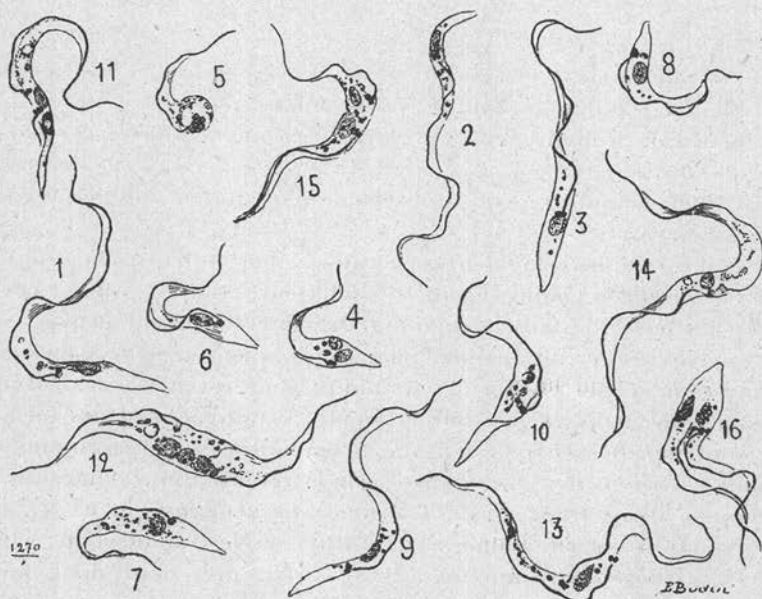


FIG. — *Trypanosoma inopinatum* en culture dans le milieu de l'auteur. — 1, 2, 3, 4, 5, formes *Crithidia* ; 6, 7, 8, 9, 10, formes trypanosome métacyclique ; 11, 12, 13, 14, 15, formes de multiplication avec contact des extrémités postérieures particulières à *Tr. inopinatum* ; 16, forme de multiplication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

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 tubesensemencés 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 domi-

nent 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 la figure annexée 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. Pour notre virus, les trypanosomes apparaissent 8 jours après la piqûre, entraînant la mort du 16<sup>e</sup> au 20<sup>e</sup> 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<sup>e</sup> au 20<sup>e</sup> 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 (1).

Cette résistance des *Rana temporaria* ne peut pas être attribuée à l'absence de formes trypanosome métacyclique 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

(1) Le professeur Brumpt a bien voulu nous communiquer qu'avec des cultures de *Trypanosoma inopinatum* que nous lui avions remis il a réussi à infecter, il est vrai avec un retard sur les témoins (grenouilles vertes), une jeune grenouille rousse âgée de quelques mois. Deux autres grenouilles rousses adultes âgées de deux ans environ et inoculées en même temps se sont montrées réfractaires comme dans nos expériences.



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 *Tr. 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 stricts, du bouillon ensemençé avec les deux espèces donne des cultures mixtes ainsi que le démontre l'élégant procédé de Debrand pour la culture en milieu aérobie de *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, XIV, p. 757, et 1902, XVI, p. 427.