ESSAI D'IMMUNISATION CONTRE LES TRYPANOSOMES PATHOGÈNES

Par A. PONSELLE

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 Goretti, 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 Goretti, 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 succès 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 nous l'avons montré pour *Tr. rotatorium*, les formes de cultures : *Crithidia*, *Leptomonas* 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 par ce trypanosome par piqûre d'hélobdelles, 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 trypanosomes 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'hélobdelles ; 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 Mackie 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 *Conorhinus 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 *Conorhinus* 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 trypanosome 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 infectée de nagana à reproduire les phénomènes que nous avons observés avec le *Trypanosoma rotatorium*.

Dans ce but, nous avons additionné le sang de souris naganée, 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 Huber (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. 1. — 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 arrêté 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 ($\text{Po}^{\text{K}} \text{H}^{\text{F}}$)	1 gr. 80
Phosphate bisodique ($\text{Po}^{\text{Na}^2} \text{H} \ 2 \ \text{H}^2\text{O}$)	0 gr. 20
Eau bidistillée	100 cm^3 .

FIG. 2. — Sang de souris immunisée 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 *Trypanosoma 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 cm^3 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 cm^3 d'une dilution de sang de souris naganée 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

- AÓKI (K.) et KODAMA (H.). — Beiträge 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 Boueli* et *Ornithodoros moubata*. Cycle évolutif de ce parasite. *Bull. Soc. path. exot.*, V, 1912, p. 360.
- Etude expérimentale de la trypanosomose américaine de C. 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 trypanosomiases. *C. R. Soc. biol.*, 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. 680.
- 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.). — Ein neues Immunisierungsverfahren gegen Trypanosomen-Krankheiten. *Deutsche med. Woch.*, 1912, N° 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 künstlichen Immunisierung gegen Trypanosomen. *Berliner Klin. Woch.*, 1911, N° 34.

Travail du Laboratoire du D^r Marie à l'Institut Pasteur.