REVUE CRITIQUE

LA CULTURE DES TRYPANOSOMES ET LES CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES QUI LA DÉTERMINENT

Par A. PONSELLE

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 et 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 trypano-

(1) *Reports of the Sleeping Sickness commission of the Royal Society*, 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.

nosomes 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 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 arrivé 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. Ce sont ces recherches que nous allons maintenant exposer.

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. Danilewskyi ..	<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 PETTIT. <i>Bull. Soc. path. exot.</i> , II, 1909.
T. Duttoni	<i>Mus morio, musculus</i>	N. N. 2 ^e formule	THIROUX. <i>Ann. Inst. Pasteur</i> , XIX, 1905.
T. elegans	<i>Gobio fluviatilis</i>	N. N. N.	ROUDSKY, in Laveran et Mesnil, <i>Trypanosomes et Trypanosomiasés</i> , 1912, 2 ^e édit.
T. equiperdum ..	Equidés	N. N. 2 ^e formule	MOHLER. <i>U.S. Dep. of Agric. Bureau of anim. Indust.</i> , Bull. 142, 1911.
T. Evansi	Bovidés, Equidés	N. N.	LAVERAN et MESNIL. <i>Trypanosomes et Trypanosomiasés</i> , 2 ^e édit., 1912.
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. granulorum ..	<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, 1923.
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. leptodactyli ..	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	N. N.	ASTROGILDO MACHADO. <i>Mem. Inst. Osw. Cruz.</i> , III, 1911.
T. Lewisi	<i>Epimys rattus</i> , <i>norvegicus</i> , <i>alex-</i> <i>andrinus</i> , etc.	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 Et.). <i>Ann. Inst. Past.</i> , XXI, 1907.
T. melophagium .	Ovidés	Bouillon sang de mouton et agar sang de mouton	NÖLLER (W.). <i>Arch. Schiff's. 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</i> <i>Syrnium aluco</i>	N. N.	ROSENBUSCH. <i>Arch. f. Proslitenkunde</i> , XV, 1909.
T. paddæ	<i>Padda oryzivora</i>	N. N.	MAYER. <i>Ibid.</i> , XXI, 1911.
T. phoxini	<i>Phoxinus lævis</i>	ausang d'oise	THIROUX. <i>Ann. Inst. Past.</i> , XIX, 1905.
T. Primeti	<i>Tropidonotus piscator et Hipsirrhina chinensis</i> .	N. N.	DELANOË. <i>C. R. Soc. biologie</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	BOUET. <i>Ann. Inst. Past.</i> , 1905.
T. scardinii	<i>Scardinius erythrophthalmus</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. biologie</i> , LXIII, 1911.
T. Theileri	Bovidés	N. N.	BRUMPT. <i>Soc. path. exotique</i> , 1910.
T. tritonis	<i>Triton pyrrhogaster</i>	Bouillon sang	MIYAJIMA. <i>Philippine Journ. of Sc., B. med. sc.</i> , II, 1909.
T. vespertilionis .	<i>Vespertilio kühli</i>	Bouillon au sang 1/10 N. N. et N. N. N.	OGAWA. <i>C. R. Soc. biologie</i> , LXV, 2 ^e .
T. vickersæ	<i>Macacus cynomolgus</i>	N. N. N.	NICOLLE et COMTE. <i>Ann. Inst. Past. de Tunis</i> , II, 1908.
Schizotrypanum Cruzi. .	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>Brazil-Medico</i> , 1909.
Trypanoplasma varium.	<i>Cobitis barbatula</i>	Ponselle	CHATTON (E.) et COURRIER (R.). <i>C. R. Soc. biologie</i> , LXXXIV, 1921.
			PONSELLE (A.). <i>C. R. Soc. biologie</i> , LXXXIV, 1913.

Le trypanosome de l'anguille et les trypanosomes des poissons

Le trypanosome de l'anguille, *Trypanosoma granulosum*, a été découvert en 1901 par Sabrazès et Muratet. Ce trypanosome a été étudié par França et surtout par Brumpt qui a démontré sa transmission aux anguilles par la piqure 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 Delanoé 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 déterminée 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.

Ces 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.

Pendant 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 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

FIG. 1. — 1, 2, *Trypanosoma granulosum*, 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* et *Leptomonas* ; 14, 15, 16, 17, forme *Trypanosoma* de culture (Gross. 1000 diamètres. Coloration au Giemsa).

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 1.

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 trans-

mission et l'évolution des trypanosomes des poissons, dans l'estomac et l'intestin de la sangsue *Hemiclepsis 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 optimale 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*, 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'*Hemiclepsis marginata*. Dans les cultures sur notre

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

milieu, la multiplication de ces formes pigmentées est si active qu'au bout de quelques jours le milieu examiné 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 (fig. 2).

Si nous examinons la pression osmotique du sang de divers pois-

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.

sons 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 ci-jointes (fig. 3). 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. Lewisii* qui s'y effectue très bien, mais nous n'avons eu que des insuccès avec *Tr. Brucei*. Il n'est pas non plus favorable au *Trypanosoma rotatorium*, nous verrons plus loin pourquoi.

Trypanosoma rotatorium

La culture de *Tr. rotatorium* s'obtient facilement et Mathis, dans son milieu chauffé, avait retrouvé les stades si particuliers déjà entrevus par Danilewsky, qui caractérisent l'évolution culturelle 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 culturelles. Mais le déterminisme exact de cette évolution était resté inconnu.

Doflein, 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 phtaléine 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 glycose. 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° B. 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 culturelle 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 culturelles 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 culturelle, 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 cytolyse 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 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 culturelle, 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 monstruosités décrites par Balbiani chez *Paramecium aurelia* au cours de ses expériences

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 mérozoïte. 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).

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 (fig. 4).

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 déclancher 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 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 Sørensen (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 monopotassique pur	0,195
» bisodique + 2 H ² O	0,005
Glycose	0,2
Peptone de Witte	0,5
Gélatine pure	0,5
Eau bidistillée	100 cc.

Dans la seconde 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 magnésium	0,02	
Glycérophosphate de soude crist. ..	0,20	
Glycose	0,2	
Gélatine pure	0,5	
Peptone de Witte	0,5	
Acide lactique de densité 1,21 au 1/10 (en volumes)	0,8	} ou acide succinique pur cristallisé 0,065
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 d'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 grenouille, vu les quantités nécessaires pour les essais, mais nous nous sommes assuré que 3 cm³ 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 compensateur 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 piriformes 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 aflagellées 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 cytolyse. 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. 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.*, 1912.
- DOFLEIN (F.). — Studien zur Naturgeschichte der Protozoen. VI. Experimentelle 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 la diastase protéolytique du malt. *C. R. Acad. sciences*, CXXXI, 1900, p. 293.
- FRANÇA (C.). — Le trypanosome de l'anguille (*Tr. granulosum* Laveran et Mesnil). *Archivos Do Real Instituto Bacteriologico Camara Pestana*, II, 1908, p. 113, 1 pl.
- MATHIS. — Sur une modification au milieu de Novy-Mac Neal pour la culture des trypanosomes. *C. R. Soc. biologie*, LVIII, 1906, vol. II, p. 550.
- Cultures de *Leishmania infantum* et *L. tropica* sur milieux au sang chauffés. *C. R. Soc. biologie*, LXIII, 1911, vol. II, p. 538.
- MENDELEEFF-GOLDBERG (P.). — Die Immunitätsfrage bei der Trypanosomenkrankheit der Frösche. *Arch. f. Protistenk.*, XXXI, 1913, p. 241-276, 2 pl.
- MIYAJIMA (M.). — On the cultivation of a bovine *Piroplasma*, a preliminary communication. *Philippine Journ. of Science. B. Medical*, II, 1907, p. 84.
- MOHLER (J.-R.). — U. S. Dep. of Agric., Bureau of anim. Indust., Washington, Bull. 142, 1911.
- NIGOLLE (Ch.). — *C. R. Acad. sc.*, CXL, 1908, p. 842.
- NÖLLER (W.). — Kleinere Mitteilungen. Die Blutprotisten des Wasserfrosches und ihre Uebertragung. (Vorläufige Mitteilung). *Arch. f. Protistenk.*, XXVIII, 1913, p. 313-316.
- Die Blutprotozoen des Wasserfrosches und ihre Uebertragung. 1 Teil. *Arch. f. Protistenk.*, XXXI, 1913, p. 169-240, 3 pl.
- NOVY (F.-G.) et MAC NEAL (W.-J.). — On the cultivation of *Trypanosoma Lewisi*. Contribution to Medical Research, dedicated to V. C. Vaghan, 1903, p. 549.
- On the cultivation of *Trypanosoma Brucei*. *Jour. of infect. dis.*, I, 1904, p. 1.

- OGAWA (M.). — Sur un trypanosome du *Triton pyrrhogaster*. *C. R. Soc. biologie*, LXXV, 1913, p. 268.
- PONSELLE (A.). — 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*, LXXV, 1913, p. 339 et 552.
- Culture *in vitro* du *Trypanoplasma varium* léger. *C. R. Soc. biologie*, LXXIV, 1913, p. 685.
- Déterminisme de la culture du trypanosome de la grenouille (*Trypanosoma rotatorium*, Mayer, 1843). *C. R. Soc. biologie*, LXXIX, 1917, p. 824-894.
- Sur la culture des trypanosomes. *C. R. Soc. biologie*, LXXXII, 1919, p. 163.
- QUINTON (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*, 1904, p. 471.
- ROBERSTON (M.). — Transmission of Flagellates Living in the Blood of certain Freshwater Fishes. *Phil. Trans. Roy. Soc. of London*, CCII (B), 1911, p. 29, pl. 1 et 2.
- SABRAZÈS et MURATET. — Trypanosome de l'anguille. Processus de division. *C. R. Soc. biologie*, LVI, 1904, p. 66.
- Vitalité du trypanosome de l'anguille dans les sérosités humaines et animales. Osmonocivité de l'eau. *C. R. Soc. biologie*, LVI, 1904, p. 159.
- SMEDLEY (R.-D.). — The cultivation of Trypanosomata. *Journ. of Hygiene*, V, 1905, p. 24, 1 pl.
- SÖRENSEN. — 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. 396.
- THOMSON (J.-G.). — Cultivation of the Trypanosome found in the Blood of the Goldfish. *Journ. of Hygiene*, VIII, 1908, p. 75.
- THOMSON (J.-G.) et SINTON (J.-A.). — The morphology of *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma rhodesiense* in cultures and a comparison with the developmental forms described in *Glossina palpalis*. *Annals of Trop. Med. and Parasitology*, VI, 1912, p. 331, 2 pl.

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