

ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

TOME V

1^{er} JANVIER 1927

N^o 1

MÉMOIRES ORIGINAUX

ESSAI DE CULTURE *IN VITRO* DE SCOLEX ET D'HYDATIDES ÉCHINOCOCCIQUES (*ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*)

Par F. COUTELEN

Introduction

A la suite d'un travail de F. Dévé sur des essais de culture de scolex échinococciques, notre maître M. le professeur Brumpt nous engagea à reprendre ces recherches dans le Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de médecine de Paris qu'il dirige. Nous sommes heureux de lui exprimer ici notre affectueux attachement et notre profonde reconnaissance pour l'accueil qu'il nous y a fait, pour les conseils qu'il nous a prodigués et pour toutes les facilités matérielles qu'il nous a données dans l'accomplissement de notre tâche.

Nous adressons nos vifs remerciements au D^r F. Dévé, professeur à l'École de médecine de Rouen, dont le nom personnifie l'échinococcose expérimentale et qui, tout en continuant ses propres recherches, n'a pas cessé de s'intéresser à nos expériences personnelles.

Enfin nous exprimons toute notre gratitude à M. le professeur agrégé M. Neveu-Lemaire, secrétaire des *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, qui a corrigé nos épreuves, à M. le professeur agrégé Ch. Joyeux dont nous avons consulté avec fruit les travaux en helminthologie, au D^r M. Langeron, chef des Travaux pratiques à l'Institut de médecine coloniale, à qui nous devons les micropho-

tographies démonstratives qui accompagnent cette publication, à M. le médecin-vétérinaire Alleaux, chef de secteur aux abattoirs de la Villette, qui nous a aimablement procuré tous les kystes hydatiques que nous avons utilisés.

Elevages artificiels d'helminthes; cultures pures d'embryons de nématodes. — Les premiers essais d'élevages d'helminthes paraissent avoir été effectués par Lönnerberg en 1892, puis par W.-L. Tower en 1900, tous deux expérimentant sur des cestodes. Tower gardait vivants pendant cinq jours des *Moniezia expansa* (Rud.), cestodes de ruminants, en les plaçant dans une solution aqueuse d'albumine d'œuf, de peptone, de sucre de canne et d'extrait de viande de bœuf (Bovox).

Lewis, étudiant les nématodes parasites des végétaux, avait composé un milieu solide pour leur élevage en boîte de Pétri : ce milieu contenait, en solution dans l'eau, des sulfates de fer et de magnésie, des nitrates d'ammoniaque, de potasse et de soude, des chlorures de calcium et de potassium, du phosphate de potasse, de la peptone, du glucose, du saccharose et de l'agar-agar.

Mais il faut arriver à Wellman, Johns et Querens, en 1912 et 1914, pour avoir la relation de cultures pures d'helminthes ; ces auteurs, étudiant deux nématodes, *Dirofilaria immitis* et *Setaria labiato-papillosa*, parvinrent à cultiver leurs embryons pendant plusieurs semaines, soit dans du sang citraté à 1,5 pour 100, soit dans du sang de chien défibriné contenant en dissolution 0,5 pour 100 de dextrose ; leurs tubes de culture, placés à l'étuve à 37°, gardèrent vivants, 15 jours durant, les embryons de *Dirofilaria immitis* et 52 jours les embryons de *Setaria labiato-papillosa* : chez ces derniers la taille doubla ; de plus, ils virent apparaître une ébauche du tube digestif et un début de développement de la bouche et du spicule terminal.

Takeshita et Okuda, en 1925, ont pu à leur tour cultiver des embryons de *Wuchereria bancrofti* (= *Filaria bancrofti*), les uns de 12 à 14 jours, les autres 23 jours, en les plaçant dans des milieux hémoglobinisés isotoniques, à la température de 11°5. L'emploi de fragments d'organes, tels que poumon et foie, leur donna des résultats inférieurs aux précédents.

Culture de scolex d'*Echinococcus granulosus*. — Les scolex échinococciques, contenus dans une hydatide parfaitement close et normalement aseptique, s'y développent, puis sont capables d'y vivre pendant plusieurs années. Ils se nourrissent aux dépens de substances nutritives empruntées au sérum sanguin de l'hôte intermédiaire

et dialysées à travers la membrane cuticulaire anhiste du parasite ; cette cuticule, perméable dans les deux sens aux substances cristalloïdes et colloïdes, est imperméable, quand elle est intacte, aux éléments figurés : c'est une véritable culture pure de scolex, *in vivo*, qui est réalisée là par la nature. Dès le début de ses belles recherches expérimentales sur la greffe hydatique, en 1900, F. Dévé avait eu l'idée d'essayer, *in vitro*, une évolution vésiculaire des scolex : pour cela, il avait placé, dans 3 tubes d'ascite humaine mis à l'étuve, une vingtaine de capsules prolifères d'un kyste hydatique humain découvert à l'autopsie ; les milieux ayant été souillés accidentellement, il avait observé, 28 jours après, des scolex dégénérés et méconnaissables. Vingt-sept ans après, en février 1926, reprenant cette expérience, il avait recueilli, dans plusieurs tubes stériles, le contenu de kystes de foie et de poumon de mouton. Ces tubes, contenant 2 cm³ de liquide hydatique environ, capuchonnés et placés à l'étuve à 37°, avaient reçu tous les six jours de 0 cm³, 5 à 1 cm³ de sérum de cheval frais non chauffé. Il avait alors suivi régulièrement, par prélèvement à la pipette, une évolution vésiculaire des scolex ; cette évolution, déjà manifeste au 4^e jour, se poursuivait et pouvait être suivie jusqu'au 14^e jour, époque à laquelle il observait des scolex nettement vésiculeux au milieu de scolex plus ou moins quiescents et encore doués de mouvements. Dévé avait ainsi réalisé pour la première fois la « scoliculture hydatique ». Cette expérience princeps a été publiée à la Société de biologie, dans sa séance du 20 février 1926, et, dans sa communication, Dévé indiquait tout l'intérêt que présenteraient la recherche et l'étude des conditions physico-chimiques de la scoliculture.

Nous avons repris l'expérience de Dévé, en essayant de déterminer les principales conditions biologiques d'une culture artificielle du parasite échinococcique sous sa forme vésiculaire. Au cours de nos recherches, nous avons eu l'occasion de préciser certains détails controversés de la morphologie des hydatides, d'étudier la topographie kystique d'un foie de mouton très parasité, de conserver en culture des hydatides-filles, de constater quelques phénomènes nouveaux dans les cultures *in vitro* et nous avons pu enfin mettre en évidence le rôle très important du plasmode prolifère dans la nutrition et l'évolution ultérieure des scolex.

I. Méthodes d'expérimentation

1. **Matériel hydatique.** — Nous nous sommes adressés à des kystes hydatiques de foie et de poumon de mouton ou de porc, indistinctement ; nous avons eu une seule fois un kyste du poumon du bœuf. Nous avons opéré sur un ensemble de onze pièces parasitées, représentant environ 80 kystes ponctionnés au cours d'une huitaine de mois : notons ici qu'on reste quelquefois de longues semaines sans trouver du bétail parasité et que, toutes proportions gardées, l'échinococcose paraît diminuer de fréquence.

Un laps de temps moyen de trois à six heures s'est toujours écoulé entre l'abattage et la ponction des kystes, c'est ce qui explique probablement les ponctions septiques assez nombreuses. Ces ponctions ont été faites à la pipette à boule ou au trocart court stérilisés avant usage. Avant de ponctionner nous avons, autant que possible, débarrassé les hydatides des tissus organiques environnants ; un tapotement léger sur toute leur surface assurait la désinsertion des capsules prolifères, et l'aseptisation du lieu de la ponction était obtenue par des badigeonnages répétés d'alcool-éther-iodé, puis par une large cautérisation ignée. L'emploi particulièrement commode du trocart permettait de rejeter le premier jet de liquide et d'éliminer ainsi mécaniquement les souillures accidentelles provenant de l'épaisseur de la paroi kystique. Le contenu de l'hydatide, jaillissant d'abord par pression, s'écoulait ensuite sous l'effet de la pesanteur et était recueilli soit dans des tubes à essai, soit dans des flacons d'Erleñmeyer stériles, bouchés à l'ouate et capuchonnés.

Pour nos huit séries d'expériences, nous avons pratiqué des examens quotidiens, par prélèvement à la pipette stérile, du 1^{er} au 10^e jour ; à partir du 10^e jour, nos examens ont été faits tous les 4 ou 5 jours seulement ; les milieux de culture ont été soit changés, soit modifiés, suivant le cas, tous les cinq jours environ.

Les examens ont été faits dans l'étuve à microscope de Foot à une température variant entre 37° et 38°,5. La détermination de la concentration-en ions hydrogène du liquide hydatique, à la ponction, et de quelques milieux de culture, à différentes époques, a été effectuée par la méthode de Medalia ou par la méthode des gouttes de Felton : cette dernière, simple et rapide, a le gros avantage de permettre d'opérer sur de très petites quantités de liquide.

Nous avons mesuré au manomètre à eau quelques pressions intrakystiques. Nos tubes de culture ont été placés d'abord dans des étuves à température variable, pour la recherche de l'influence de la température, puis uniformément à l'étuve à 37°.

Nous avons effectué des colorations vitales au rouge neutre et au bleu de méthylène ; la recherche du glycogène a été faite soit par la réaction iodée (liqueur de Gram), soit par la méthode du carmin de Best.

Nous avons monté dans le baume des préparations colorées par le carmin chlorhydrique ; d'autres préparations sans coloration préalable, ont été montées dans du formol glyciné. La méthode à l'encre de Chine nous a été utile pour examiner le contour et l'épaisseur de la membrane cuticulaire des scolex vésiculeux ; notons enfin qu'il est commode de conserver des cultures de scolex, à tous les stades, en les plaçant dans de petits tubes scellés à la lampe contenant une solution de formol à 5 p. 100.

2. Milieux de culture essayés. Leur influence sur l'évolution vésiculaire des scolex. — Pour l'étude de nos divers milieux de culture, nous avons dû procéder par tâtonnements, en nous rappelant toutefois que l'hydatide trouve sa nourriture dans le sérum sanguin de l'hôte parasite ; nous nous sommes efforcés de réaliser *in vitro* les conditions de nutrition que les scolex trouvent *in vivo*. *A priori*, la culture devait être possible en anaérobiose relative et nous l'avons obtenue, en effet, en plaçant au-dessus de nos milieux de culture une couche d'huile de vaseline stérile de 1 à 2 cm. de hauteur ; mais la culture se fait également bien en milieu aérobique.

Les milieux, sans matières albuminoïdes, isotoniques, tels que le liquide de Ringer, la solution physiologique de chlorure de sodium à 9 p. 1.000, et le liquide hydatique, filtré sur bougie Chamberland L₃, sont impropres à la vie des scolex ; ils y meurent rapidement en deux ou trois jours, sans même s'y évaginer complètement : c'est là, du moins, ce qui se passe en général et nous croyons utile, dès maintenant, de bien insister sur le caractère relatif de toutes les constatations que nous avons faites au cours de nos recherches sur l'évolution vésiculaire des scolex *in vitro* : le parasite échinococcique est sujet à des malformations, à des monstruosité : toutes les règles que nous avons essayé d'établir sont sujettes à des exceptions ; elles ne valent que pour la généralité des cas.

En liquide hydatique, stérile mais non filtré, on peut quelquefois obtenir des évaginations, des commencements de vésiculation, mais de courte durée ; c'est que le liquide hydatique renferme très

peu ou pas d'albumine ; il n'est pas coagulable par la chaleur, ni par les acides et l'albumine, qui provient du plasma sanguin, est utilisée à la nutrition de l'hydatide au fur et à mesure de sa dialyse à travers la membrane cuticulaire.

Quelques milieux albuminés utilisés couramment en bactériologie, tels que le bouillon nutritif seul ou glucosé, l'eau peptonée salée, la gélatine nutritive liquide, le lait, le petit lait, ne nous ont donné aucun résultat, employés purs ou ajoutés au liquide hydatique contenant le sable échinococcique. Seuls les milieux, constitués par du liquide hydatique ou de l'eau peptonée salée, additionnés d'exsudats ou d'extraits d'organes nous ont donné des résultats intéressants ; nous nous sommes adressés à du sérum de cheval frais non chauffé, à du sérum de bœuf frais non chauffé, à du liquide d'ascite, à de l'extrait alcoolique de foie de mouton et à de l'extrait globulaire préparé suivant le procédé du D^r Legroux, de l'Institut Pasteur. Ces milieux n'ont pas été sensiblement améliorés par adjonction de gélatine liquide, d'extrait d'amidon, de glycogène et de fragments de foie de mouton.

Employés seuls, ces exsudats et ces extraits d'organes donnent de moins bons résultats, soit que leur concentration moléculaire soit trop éloignée de celle du liquide hydatique *in vivo* ($\Delta =$ de $-0^{\circ},70$ à $-0^{\circ},53$ environ), soit que l'évolution vésiculaire des scolex nécessite un milieu faiblement nutritif mais entretenu.

En cultivant des scolex, appartenant à un kyste du foie du porc, les uns dans du liquide hydatique — sérum ascite, les autres dans du liquide hydatique — extrait globulaire, nous avons pu conserver des scolex très vésiculeux (leur volume était de 25 à 30 fois plus grand que celui d'un orthoscolex ordinaire), pendant 31 jours (du 20 avril au 21 mai 1926 : 4^e expérience, tubes L₁ et L₂).

Il nous est arrivé une seule fois d'avoir un kyste du foie du porc contenant quatre hydatides-filles ; ce kyste était malheureusement infecté, mais nous avons pu quand même conserver l'une d'elle pendant 7 jours dans du liquide hydatique-sérum de cheval (4^e expérience, Z₁), deux autres, dans le même milieu, pendant 7 jours également, et la quatrième en liquide hydatique + sérum de cheval + eau peptonée pendant 12 jours (4^e expérience, Z₂ et Z₂ modifié). Nous ne doutons pas qu'il nous eût été possible de les conserver plus longtemps en milieu parfaitement stérile.

Enfin nous avons vainement tenté, à plusieurs reprises, de conserver vivantes, *in vitro*, dans du liquide de Ringer ou dans une solution physiologique de NaCl, additionnés de sérum de cheval, des hydatiques-mères décapsulées, dont nous avons mesuré le volume et le poids, dans une éprouvette graduée, par double pesée. Nous

avons essayé de stériliser rapidement leur surface cuticulaire par immersion dans une solution de sublimé à 1 p. 1.000, mais, même en renouvelant deux fois par jour le milieu nutritif, les kystes se sont rapidement infectés. Par contre, des kystes placés tels quels en chambre humide, pour éviter la dessiccation, à une température inférieure à 10°, ont présenté huit jours après des scolex non évaginés, mais vivants et mobiles dans leurs capsules prolifères (réchauffement à l'étuve de Foot).

3. Influence de la concentration en ions hydrogène (pH). — Nous avons recherché le pH du liquide hydatique d'une vingtaine de kystes, à la ponction; les liquides stériles ont un pH légèrement alcalin : 7,4 en moyenne; les liquides de kystes très infectés ont des pH alcalins : 8,9-9. Les milieux de cultures infectés accidentellement, ou qui le sont depuis la ponction, s'alcalinisent rapidement et nous avons trouvé des pH de 8,3-8,4-8,6-8,8-8,9, au moment de la mort des scolex; il ne nous a pas été possible, faute de matériel et de temps, de déterminer exactement le rôle de l'alcalinité des milieux de culture sur l'évolution des scolex.

Le contenu d'un même kyste, additionné de sérum de cheval, ayant été réparti en deux tubes, l'un a été conservé comme témoin; ayant ramené le pH de l'autre tube de 7,4 à 6,8, par adjonction de quelques gouttes d'une solution d'acide acétique à 1/100, nous avons constaté la mort des scolex du tube à pH légèrement acide en 48 h.; mais ce tube ayant été infecté par une souillure accidentelle, nous n'avons pu conclure avec certitude d'après cet essai. Toutefois, signalons ici que le professeur agrégé Joyeux, dans sa thèse de doctorat ès-sciences, relate qu'au cours de ses recherches sur le cycle évolutif de l'*Hymenolepis diminuta*, il a constaté que les cysticercoides de ce cestode sont détruits en milieu acide et résistent au contraire aux alcalis: après action de la soude diluée (réaction franchement alcaline au tournesol) « le scolex n'est nullement altéré et peut évoluer ultérieurement ». Il s'agit ici, toutefois, d'une évolution normale vers l'état adulte chez l'hôte définitif.

4. Influence de la température. — Les scolex résistent à des températures basses: une de nos cultures en liquide hydatique-sérum de cheval est restée vivante après avoir été soumise pendant 48 heures à une température ayant varié de — 4° à 0°. Il est d'ailleurs commode de laisser séjourner à la glacière les foies ou les poumons parasités, depuis le moment de l'abattage jusqu'à celui de la ponction. Quand on examine des scolex ainsi refroidis, ils sont immo-

biles, quiescents, même s'ils s'étaient déjà évaginés ; en les soumettant à un réchauffement progressif dans l'étuve à microscope, ils recouvrent leur mobilité aux environs de 35°, 36°. Vers 42° ils s'immobilisent, mais nous les avons gardés vivants plus de 24 heures dans une étuve réglée à cette température ; à une température plus élevée, leur contenu granuleux s'éclaircit, leur cuticule perd son contour net et régulier, leurs crochets et leurs granulations calcaires deviennent plus brillants, plus réfringents ; entre 42° et 44°, ils ne tardent pas à se désagréger.

La température optima pour les cultures paraît varier entre 37° et 39°.

Voici le tableau d'une expérience qui nous a permis d'étudier en même temps l'influence de la température et l'influence d'un milieu complètement désalbuminé sur l'évolution vésiculaire des scolex *in vitro* ; le contenu d'un gros kyste du foie du porc est recueilli dans trois tubes A, B et C, bouchés à l'ouate, capuchonnés et placés : le 1^{er} dans l'étuve à 37°, le 2^e dans l'étuve à 25°, le 3^e à la température du laboratoire dont la moyenne est de 15° environ. Tous les jours nous avons enlevé 3 cm³ de liquide dans chaque tube en les remplaçant par 3 cm³ de liquide hydatique filtré sur bougie Chamberland L₃. Les résultats de cet essai, exposés dans notre tableau, tendent à montrer :

Jours	1 ^{re} JOURNÉE	2 ^e JOURNÉE	3 ^e JOURNÉE	4 ^e JOURNÉE	5 ^e JOURNÉE
Tube A à 37°	Scolex vivants mobiles tous invaginés.	Scolex mobiles augmentés de volume à demi- évaginés.	Scolex morts en grande partie.	Tous les scolex sont morts.	
Tube B à 25°	Scolex vivants mobiles tous invaginés.	Scolex mobiles volume normal q. q. demi- évaginés.	Scolex quiescents demi-évaginés q. q. morts.	Quelques scolex seule- ment encore vivants.	Tous les scolex sont morts.
Tube C à 15° (moyenne).	Scolex vivants mobiles tous invaginés.	Scolex mobiles volume normal non évaginés.	Scolex ± quies- cents q. q. demi- évaginés, q. q. morts.	Scolex ± quies- cents q. q. demi- évaginés, q. q. morts.	Quelques rares scolex encore vivants.

1° Que le liquide hydatique seul, filtré sur bougie Chamberland L₃, même renouvelé largement, ne permet pas une vie prolongée aux scolex.

2° Que la mobilité, l'évagination et la vésiculation des scolex est en raison directe de la température (celle-ci restant bien entendu dans les limites compatibles avec la vie et antérieurement fixées).

3° Que la résistance des scolex à la dénutrition paraît croître quand la température diminue, comme si l'immobilité relative et la faible dépense d'énergie qu'ils manifestent aux basses températures, leur permettait une plus longue survie.

5. **Influence de la lumière.** — Les scolex évoluent à la lumière comme dans l'obscurité. La lumière paraît les exciter à se mouvoir, à s'évaginer ou à s'invaginer, quelquefois successivement et en quelques instants. Ils sont ordinairement immobiles quand on les sort de l'étuve à 37° ; examinés aussitôt dans l'étuve à microscope, également chauffée au préalable à 37°, ils commencent à s'agiter si l'on ouvre largement le diaphragme du microscope et si on les éclaire violemment. La lumière puissante d'une lampe de 600 bougies, refroidie par un ventilateur électrique, les excite fortement et presque immédiatement, et le D^r Langeron a dû faire des instantanés pour toutes nos microphotographies.

6. **Pressions intra-kystiques. Influence de la décompression.** — Nos essais de culture ont été faits à la pression atmosphérique normale; n'ayant pu réaliser encore un appareillage permettant des cultures à diverses pressions, nous ignorons l'influence exacte de la pression sur l'évolution vésiculaire des scolex *in vitro*. Mais il nous a paru intéressant de rechercher quelques pressions intra-kystiques et de les comparer respectivement au volume et à la fertilité des kystes étudiés. Ayant eu la bonne fortune d'avoir un foie de mouton très parasité (une trentaine d'hydatides environ) nous avons dressé un tableau comparatif pour 22 kystes. Ces kystes, relativement jeunes, étaient les uns stériles, les autres fertiles et notre étude en a été beaucoup facilitée. Notons ici, en passant, que la répartition topographique des kystes de ce foie, petits et gros, paraissait sans ordre apparent et sans égard à l'épaisseur du parenchyme hépatique et à leur distance du pédoncule. Voici ce tableau comparatif ; bien entendu ces résultats ne valent que pour le foie examiné et il est probable, qu'*in vivo*, nous aurions des chiffres de pression un peu plus élevés :

PRESSION ÉVALUÉE en centimètres d'eau	DIMENSIONS DES KYSTES (cm.)		FERTILITÉ (capsules prolifères)
	Grand diamètre	Petit diamètre	
3	1	1	—
4	2	1	—
5	1,5	1	—
5,5	1,5	1,5	—
5,5	2,5	1,5	—
5,5	1,5	1	—
5,5	1	1	—
6	1,5	1,5	—
6	1,5	1,5	bourgeons
6	2,5	2	—
6,5	1,5	1	—
6,5	1,5	1	—
7	1,5	1,5	+
7,5	3	2	—
8	2,5	2	—
8,5	2	1,5	—
8,5	1,5	1,5	bourgeons
9,5	2,5	2	bourgeons
9,5	1,5	1	—
11	1,5	1,5	+
12	2,5	2,5	+
16,5	2	2	bourgeons

Pression minima observée : 3 cm., pour un kyste de 1 cm. × 1 cm.
 Pression maxima » : 16 cm., 5 » » » 2 cm. × 2 cm.
 Pression moyenne : 7 cm., 5 pour l'ensemble de ces kystes

Ces chiffres paraissent mettre en évidence les rapports suivants :

1° La pression intra-kystique n'est pas directement proportionnelle au volume du kyste ; de gros kystes ont une tension faible, de petits kystes sont hypertendus.

2° En général, la pression croît en même temps que la fertilité : la fertilité conditionne donc peut-être la pression.

3° La fertilité ne paraît pas dépendre absolument du volume des kystes : de petits kystes sont fertiles, des kystes plus gros n'ont même pas de bourgeons au niveau de leur membrane prolifère.

Lorsqu'on ponctionne un kyste hydatique, quelle que soit sa grosseur et quelle que soit la quantité de capsules prolifères qu'il

contienne, les scolex sont presque toujours invaginés; mis en liberté et recueillis dans des tubes stériles, ces scolex ne tardent pas à s'évagner; si l'on prend deux kystes de même taille, d'un même foie, et qu'on place l'un en chambre humide à l'étuve, tandis que le contenu de l'autre est recueilli aseptiquement dans un tube, placé lui aussi dans la même étuve, on observe ceci 12 heures après; les scolex recueillis dans le tube sont presque tous évaginés, les scolex qui sont demeurés sous pression à l'intérieur de leur kyste, sont restés invaginés, mais ils s'évagneront à leur tour en quelques heures dans le tube stérile où ils auront été recueillis; dans les deux cas la température, le milieu, la luminosité sont restés sensiblement les mêmes, seule la pression a changé. Parmi les causes multiples d'évagination et d'évolution vésiculaires des scolex, fort bien mises en relief par Dévé dans son étude sur le kyste hydatique multivésiculaire du foie: dialyse de substances nocives pour les scolex (bile, antiseptiques), traumatismes (ponction exploratrice: diminution de la pression), fissure de la membrane cuticulaire qui laisse alors passer les bactéries, etc., la décompression nous paraît jouer un rôle très important, surtout dans nos expériences *in vitro*; nous verrons plus loin qu'elle n'est peut-être pas étrangère à certaines formations bulleuses constatées dans les cultures.

7. Résistance des scolex *in vitro* à l'infection et à quelques antiseptiques usuels: aldéhyde formique, sublimé. — La résistance des scolex, dans un milieu infecté, est variable: dans des milieux riches, où la pullulation microbienne est rapide et intense, les scolex ne résistent pas plus de 48 heures. En milieu pauvre, comme l'eau peptonée salée, avec une pullulation réduite, nous avons eu des survies d'une semaine environ.

La résistance des scolex, *in vitro*, au sublimé et au formol, déjà étudiée par Dévé, nous a donné des résultats semblables aux siens; le sublimé à 1 p. 1.000 et le formol à 5 p. 1.000 altèrent et détruisent la vitalité des scolex après un contact de 2 à 3 minutes.

II. Résultats des observations

1. L'évolution vésiculeuse des scolex échinococciques *in vitro*. — Quand on cultive des scolex, *in vitro*, on peut observer très rapidement les phénomènes suivants : certains d'entre eux commencent à s'évagner plus ou moins au bout de quelques heures, la plupart demeurant rattachés à un fragment de capsule proligère ; au bout de trois ou quatre jours, graduellement, on note un accroissement déjà sensible de la taille, accroissement qui peut s'observer même chez des scolex non évaginés (fig. 1, B x y z et 2, A x y) ; ce boursoufflement continue les jours suivants et il devient tel que certains scolex, vers le dixième jour, ont décuplé leur volume primitif. En même temps que s'opère cette vésiculation, la cuticule s'amincit, les ventouses s'estompent (fig. 1, E), la couronne d'implantation des crochets agrandit sa circonférence et le contenu du scolex paraît s'éclaircir ; en réalité, le tissu qui constituait la partie interne du scolex devient plus lâche, se transforme soit en un réseau trabéculaire qui parcourt longitudinalement le scolex, du pourtour du rostre au pédicule (fig. 2, B x), soit, plus souvent, en une masse plasmodiale mince qui vient doubler intérieurement la cuticule (fig. 2, B y) ; réseau fibrillaire ou pellicule plasmodiale interne supportent les granulations et les plaques calcaires ; ils contiennent du glycogène, décelable par la méthode du carmin de Best ou par les réactifs iodés. Longtemps le scolex en voie de vésiculation conserve sa mobilité : elle s'atténue progressivement à mesure que sa taille croît, pour faire place à des mouvements de contraction de moins en moins accentués. Ces scolex vésiculeux, parfaitement vivants, sont colorables par les colorants vitaux. Leur cytoplasme seul prend le rouge neutre à l'exclusion des noyaux. L'augmentation de volume devient inappréciable à partir du 15^e jour environ ; mais il semble, qu'à partir de ce moment, la cuticule s'épaississe ; jusqu'à ce jour nous n'avons jamais observé sa stratification.

Tous les scolex ne s'évagnent pas : un quart d'entre eux environ demeurent invaginés et quelques-uns de ceux-ci se boursoufflent légèrement. Les autres scolex s'évagnent complètement avant de vésiculer ; quelques-uns vésiculeront à demi évaginés. Tous ces stades peuvent se rencontrer en même temps dans une même culture pro-

venant d'un même kyste et seuls quelques rares scolex privilégiés atteindront une vésiculation parfaite : leur nombre en est d'un pour cinquante environ ; mais il est impossible de donner des pourcentages exacts, tant ils varient d'une culture à l'autre.

2. De quelques phénomènes particuliers observés au cours de nos expériences. — SCOLEX A SPHÉRULES BULLEUSES. — Dans certaines cultures, vers le deuxième jour, nous avons observé chez des scolex mobiles, évaginés ou non et plus ou moins vésiculeux, l'apparition de petites hernies bulleuses, sphéroïdales et extrêmement minces ; ces sphérules, plissées à leur point d'attache, étaient fixées soit au niveau du pédoncule (fig. 2, F), soit au niveau du pôle antérieur (fig. 2, E x), soit, plus rarement, à ces deux niveaux à la fois. Ces sphérules, tendues, accusent chez les scolex, une pression interne supérieure au milieu extérieur et cette pression interne, héritée de la pression intrakystique première, n'est peut-être pas étrangère à la formation de ces sphérules. Ces sphérules, souvent sans structure propre, paraissent présenter quelquefois, çà et là, quelques fines granulations : est-ce là un phénomène de dégénérescence ? est-ce une de ces malformations que Dévé a déjà observées, *in vivo*, chez des scolex qui vésiculent en bourgeonnant et en cloisonnant leur cavité ? L'histologie de ces formations pourra peut-être ultérieurement nous en donner l'explication. Par communication verbale récente, nous savons que F. Dévé a également observé ces scolex à sphérules.

CAPSULES PROLIGÈRES RECONSTITUÉES APRÈS RETOURNEMENT. — Nous avons fréquemment observé, dans nos différents milieux de culture, des capsules proligères légèrement augmentées de volume, parfaitement rondes, vivantes, glycogénées et contractiles, qui étaient comme couronnées extérieurement par leurs scolex ; ces scolex étaient plus ou moins mobiles, évaginés et quelquefois entièrement vésiculeux (fig. 1, A et 2, A, B, C). Sans que nous ayons pu saisir sur le vif le phénomène, il semble que ces capsules proligères se soient d'abord rompues en un point, puis inversées complètement, les scolex étant devenus externes, et enfin reconstituées, par soudure des bords de la solution de continuité.

SCOLEX ENCAPSULÉS. — D'autres fois, nous avons observé des scolex vivants, mobiles, en voie de vésiculation (fig. 2, D x) ou déjà vésiculeux, complètement enveloppés d'une sorte de capsule proligère individuelle, tels des chrysalides dans leur cocon (fig. 2, D x y z) ; ces formations ont été vues au septième jour de culture en

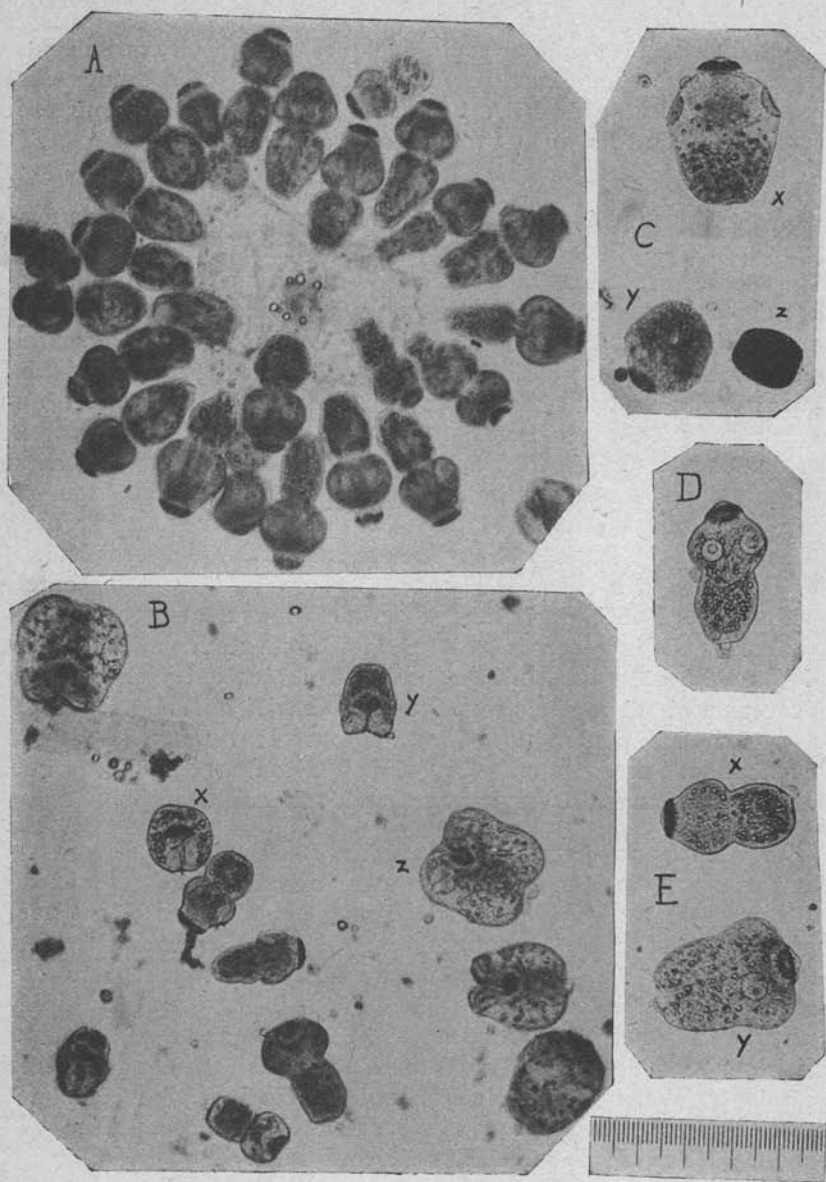


FIG. 1. — A, capsule proligère rompue, retournée et reconstituée avec scolex externes; B, culture en liquide hydatique — extrait globulaire de 6 jours; C, culture au 10^e jour en liquide hydatique — sérum de cheval, scolex à différents stades d'évolution; D, même culture, scolex évaginé, demi-vésiculeux à ventouses encore nettes; E, même culture, scolex avec ventouses en voie d'effacement. Echelle = 0 mm., 50.

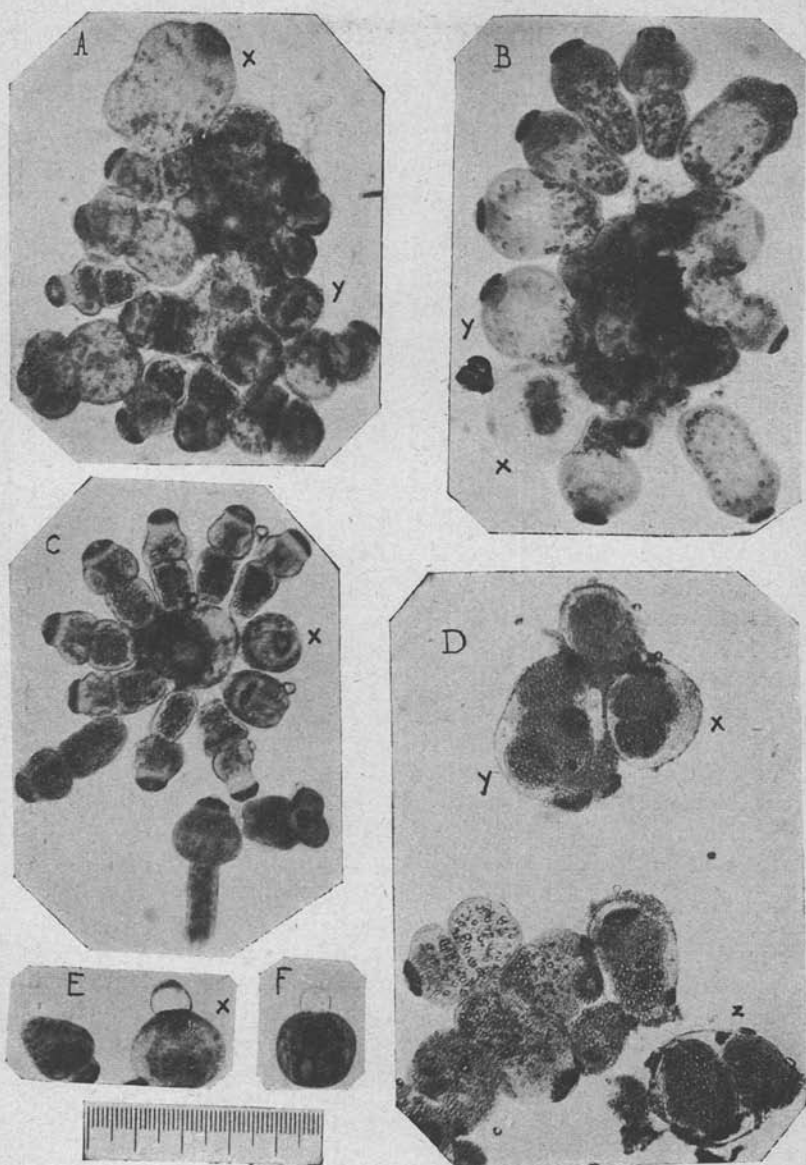


FIG. 2. — A, culture en eau peptonée — extrait globulaire de 4 jours avec scolex à tous les stades; B, culture de 8 jours en liquide hydatique — sérum de bœuf; C, culture de 3 jours en eau peptonée — sérum de cheval; D, scolex encapsulés en voie de vésiculation : culture de 4 jours en liquide hydatique — extrait globulaire; E, F, scolex à sphérules bulleuses. Echelle = 0 mm., 50.

liquide hydatique-extrait globulaire: est-ce là l'évolution d'une capsule prolifère contenant un scolex unique ou bien un lambeau d'une capsule rompue a-t-il enveloppé un scolex, en opérant la même soudure que dans le phénomène précédent? L'histologie pourra trancher la question; et c'est l'occasion pour nous, de préciser un point encore controversé de la morphologie des hydatides: une mince pellicule cuticulaire, qu'avaient bien vu les anciens auteurs mais que certains auteurs modernes nient, double intérieurement les capsules prolifères et se continue avec la cuticule des scolex au niveau de leurs pédicules; des coupes colorées par la méthode de Curtis mettent en évidence cette cuticule, et si l'on se souvient que la chitine est colorée électivement par cette méthode de Curtis, l'histologie vient ici à l'appui de la chimie biologique pour démontrer que les formations cuticulaires des hydatides sont constituées par des substances très voisines de la chitine sinon par de la chitine elle-même.

RÔLE TROPHIQUE DE LA CAPSULE PROLIFÈRE DANS L'ÉVOLUTION DES SCOLEX. ORTHOSCOLEX ET MÉTASCOLEX. — F. Dévé avait distingué deux variétés de scolex pouvant d'ailleurs se rencontrer dans une même capsule prolifère: des orthoscolex (fig. 1, B x), de 160 μ sur 115 μ , clairs, réfringents, à cuticule nette et brillante, pourvus de 38 crochets en moyenne, glycogénés et souvent rattachés en grappes aux débris de leur capsule prolifère; des métascolex (fig. 1, B y), en forme de coing, de 100 μ sur 86 μ , détachés, à contour peu net et privés de glycogène. Les premiers conservent leur vitalité, les seconds ne tardent pas à dégénérer. Nous avons eu bien des fois l'occasion d'observer ces deux variétés de scolex et nous nous sommes demandé de quoi dépendaient cette différenciation morphologique et cette évolution différente. Au cours des nombreux examens que nous avons pratiqués sur le vivant, il nous a paru, d'une façon générale, que seuls se développaient rapidement et conservaient longtemps leur vitalité, les scolex qui demeuraient rattachés par leur pédicule à tout ou partie de leur capsule prolifère retournée et reconstituée; il semble que cette substance plasmodiale vivante, qui constitue la membrane germinative et les capsules prolifères qui en dérivent, soit le centre trophique où se font les échanges nutritifs osmotiques nécessaires, du moins pour un temps, à la vie des scolex: ce tissu plasmodial constitue un véritable placenta pour le scolex; il vit d'ailleurs d'une vie qui lui est propre et nous avons observé à son niveau des mouvements de contraction: là encore, des coupes histologiques s'imposent. Pour nous, les métascolex de Dévé sont des scolex accidentellement et trop tôt séparés de leur capsule prolifère;

ils ne constituent pas un type à part de scolex ; tous les scolex ne se forment pas en même temps dans la capsule proligère et ils s'y développent plus ou moins vite ; les plus vieux, qui ont atteint leur pleine maturité, pourront survivre et devenir vésiculeux si, la capsule se rompant, ils s'en trouvent détachés, et on observe de pareils scolex libres et vésiculeux (fig. 1, C x, E y) ; les plus jeunes scolex trop tôt détachés de la capsule proligère, constitueront les métascolex, sans vitalité, à moins que, restant attachés à un fragment de plasmode proligère, ils puissent achever leur développement et leur évolution. On peut d'ailleurs observer des scolex intermédiaires entre les méta et les orthoscolex de Dévé.

CONCLUSIONS

1° L'évolution vésiculaire des scolex échinococciques et la culture d'hydatides-filles *in vitro* sont réalisables en aérobiose et en anaérobiose relative sous huile de vaseline.

2° Nous avons conservé pendant 31 jours des scolex très vésiculeux ; cultivés dans des milieux constitués par du liquide hydatique-sérum ascite et du liquide hydatique-extrait globulaire, ils y ont atteint de 25 à 30 fois leur volume primitif.

3° Nous avons gardé vivantes, pendant 7 jours, trois hydatides-filles ; elles avaient été mises en culture dans du liquide hydatique-sérum de cheval frais non chauffé. Une quatrième hydatide-fille s'est développée pendant 12 jours dans un milieu constitué par de l'eau peptonée, du liquide hydatique et du sérum de cheval frais non chauffé.

4° Le liquide hydatique, à la ponction, est légèrement alcalin ; son pH moyen est de 7,4. Les scolex échinococciques ne paraissent pas se développer en milieu acide.

5° Les scolex résistent à des températures inférieures à 0°. Quiescents à de basses températures, leur vitalité et leur mobilité croît à mesure que la température s'élève. La température optimale, pour les cultures, paraît varier entre 37° et 39°. Ils ne tardent pas à succomber à des températures qui dépassent 42°.

6° Les scolex manifestent leur sensibilité à la lumière par une succession rapide de contractions, d'évaginations et d'invaginations.

7° La décompression paraît jouer un rôle important dans l'évagination première des scolex échinococciques et dans leur vésiculation ultérieure. Les pressions intrakystiques paraissent croître

avec la fertilité des kystes considérés ; elles ne sont pas en rapport obligé avec le volume des kystes.

8° Les scolex résistent mal dans les milieux de culture très infectés. Le sublimé à 1 p. 1.000 et le formol à 5 p. 1.000 détruisent leur vitalité après 2 à 3 minutes de contact.

9° Le nombre des scolex qui deviennent complètement vésiculeux est très limité; le chiffre de 1 p. 50 est approximatif. Nous n'avons pas encore observé de stratification de la cuticule.

10° Nous avons observé dans nos cultures des scolex à sphérules bulleuses, des scolex encapsulés, des capsules prolifères reconstituées après rupture et retournement, les scolex étant devenus externes.

11° Le plasmode prolifère, qui a une vie propre, paraît jouer un rôle important dans la croissance et l'évolution vésiculaire des scolex.

12° En colorant des coupes de kystes hydatiques par la méthode de Curtis, nous avons mis en évidence la pellicule cuticulaire qui tapisse intérieurement les capsules prolifères et se continue avec la cuticule propre des scolex. Cette cuticule interne des capsules prolifères, décrite par les anciens auteurs, n'est pas admise par tous les auteurs modernes.

BIBLIOGRAPHIE

- BEST. — Ueber Glykogen. *Ztschr. f. wiss. Mikr.*, XXIII, 1906, p. 319.
- BRUMPT (E.). — *Précis de Parasitologie*, 3^e éd. Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris, 1922.
- L'étuve à microscope de N. Foot. *Ann. de Parasitologie*, III, 1925, p. 252.
- BRUMPT (E.) et JOYEUX (Ch.). — Description d'un nouvel échinocoque : *Echinococcus cruzi* n. sp. *Ann. de Parasitologie*, II, 1924, p. 226.
- CLARK (W.-M. M.). — *Color chart of indicators reprinted from the Determination of hydrogen ions*. Baltimore.
- CURTIS (F.). — Méthode de coloration élective du tissu conjonctif. *C. R. Soc. de biol.*, LVII, 1905, p. 1038-1040.
- DÉVÉ (F.). — Sur la transformation des scolex en kystes échinococciques. *C. R. Soc. de biol.*, LIII, 1901, p. 298.
- *De l'échinococcose secondaire*. Thèse de Médecine, Paris, 1901.
- De l'action parasiticide du sublimé et du formol sur les germes hydatiques. *C. R. Soc. de biol.*, LIV, 1902, p. 561.
- Sur l'évolution kystique du scolex échinococcique. *Archives de Parasitologie*, VI, 1902, p. 54-81, 2 fig.
- De l'action parasiticide du sublimé et du formol sur les germes hydatiques (2^e note). *C. R. Soc. de biol.*, LV, 1903, p. 77.
- Les deux scolex échinococciques. *C. R. Soc. de biol.*, LX, 1906, p. 986.

- DÉVÉ (F.). — L'histogénèse du kyste hydatique. *Arch. méd. expérim. et d'anat. path.*, XXVII, mai 1916.
- Le kyste hydatique multivésiculaire du foie. *Revista de la asociacion medica argentina*, mars 1917, 28 p.
- Les vésicules hydatiques filles. Leurs origines. Leurs conditions pathogéniques. *Presse médicale*, n° 45, 8 août 1918.
- Evolution vésiculaire du scolex échinococcique obtenue *in vitro*. La culture artificielle du kyste hydatique. *C. R. Soc. de biol.*, XCIV, 1926, p. 440.
- FELTON (L.-D.). — A colorimetric method for determining the hydrogen ion concentration of small amounts of fluid. *Journal of biol. chemistry*, XLVI, 1921, p. 279 à 305.
- JOHNS et QUERENS. — Further note on the growth of filarial embryos *in vitro*. *The American Journ. of trop. diseases and prev. med.*, I, 1914, p. 620-625.
- JOYEUX (Ch.). — Cycle évolutif de quelques cestodes, recherches expérimentales. *Suppl. au Bull. biol. de France et de Belgique*, 1920, p. 108 à 110.
- LANGERON (M.). — *Précis de microscopie*, 4^e éd. Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris, 1925.
- LEGROUX. — *Travaux pratiques du cours de Microbiologie de l'Institut Pasteur*, 1926.
- MEDALIA (L.-S.). — Color standards for the colorimetric measurement of H-ion concentration pH 1,2 to pH 9,8. *Journal of bacteriology*, V, 1920, p. 441-468.
- TAKESHITA (Sh.) et OKUDA (M.). — On the cultivation of Bancroft's filarial larvae and animal inoculation experiments. *Igaku Chuo Zasshi (Central J. of med.)*, XXIII, n° 3. Analyse dans *Japan med. World*, V, 1925, p. 296.
- WELLMAN (C.) et JOHNS (F.-M.). — The artificial culture of filarial embryos (a preliminary note). *Journ. amer. med. assoc.*, LIX, 1912, p. 1531.

Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de médecine de Paris.