

NOTES ET INFORMATIONS

METHODE SIMPLE POUR L'ISOLEMENT D'ŒUFS DE *SCHISTOSOMA MANSONI* ASEPTIQUES ET INFECTIEUX

par E. JACQUELINE et J. BIGUET.

*Laboratoire de Parasitologie de l'U.E.R. de Pharmacie
et unité I.N.S.E.R.M. d'Immunochimie parasitaire,
Faculté de Médecine et de Pharmacie, place de Verdun, F 59000 Lille*

Un certain nombre de recherches *in vitro* sur la bilharziose nécessitent que l'on dispose d'œufs de *Schistosoma mansoni* aseptiques ; par ailleurs, ces œufs doivent rester vivants et infectieux vis-à-vis du mollusque hôte intermédiaire *Biomphalaria glabrata*. Coker et Lichtenberg ont proposé, en 1956, une méthode pour isoler les œufs propres à partir du foie de hamster parasité, mais elle présente deux inconvénients : les œufs embolisés dans le parenchyme hépatique du hamster sont relativement peu nombreux et nous avons eu de grandes difficultés pour les débarrasser des fragments tissulaires qui les souillent. Aussi avons-nous tenté de mettre au point une technique utilisant la muqueuse intestinale du rongeur ; les œufs y sont beaucoup plus nombreux que dans le foie et ils nous ont paru plus aisément séparables des débris tissulaires, peut-être pour des raisons de densité relative et de texture histologique.

L'intestin grêle d'un hamster, infesté 45 jours auparavant par 500 furcocercaires, est prélevé, puis sectionné longitudinalement aux ciseaux et à la pince recourbée. Les résidus alimentaires et les mucosités sont éliminés par un léger grattage à la lame de verre ; la muqueuse intestinale est lavée au sérum physiologique. L'intestin grêle est alors placé dans du liquide de Hanks stérile contenant des antibiotiques (pour 5 litres : Pénicilline 1.000.000 U. et Streptomycine 0,5 g) ; le flacon bien fermé est laissé en chambre froide (5 °C) une nuit ce qui permet aux antibiotiques d'agir sur les bactéries présentes ; par ailleurs, la muqueuse intestinale subit ainsi un ramollissement qui facilite sa dissociation ultérieure.

Les manipulations qui suivent doivent avoir lieu de préférence dans une enceinte stérile, les milieux et matériels utilisés étant stérilisés au préalable.

Les parois intestinales sont immergées au fond d'une boîte de Pétri (muqueuse au-dessus) contenant de la solution de Hanks et grattées à l'aide du tranchant d'une lame de verre.

Le broyat obtenu est filtré sur une trame métallique (tamis de Laboratoire Médi-Sciences, diamètre des pores : 200 μm) dont les pores laissent passer les œufs de *Schistosoma mansoni* libérés, mais retiennent les fragments de muqueuse les plus volumineux. Le filtrat est alors versé dans des pots coniques en pyrex (15 ml) et centrifugé 2 mn à 1 500 t/mn ; le surnageant est jeté et remplacé par du liquide de Hanks propre contenant les antibiotiques précités. On répète ce lavage deux fois pour bien nettoyer les œufs et les fragments de paroi intestinale qui subsistent.

Il faut alors débarrasser progressivement les œufs de ces débris tissulaires. Comme ceux-ci décanent d'autant plus lentement qu'ils sont plus petits, on s'efforce de les fragmenter au maximum ; pour ce faire, on reprend le dernier culot par du Hanks propre et on aspire le tout dans une seringue de 10 ml munie d'une aiguille de 8/10^e de mm de diamètre ; le jus est refoulé vigoureusement et l'opération répétée trois fois, ce qui a pour conséquences de pulvériser les fragments de paroi intestinale tout en conservant l'intégrité des œufs.

Après une nouvelle centrifugation, le surnageant qui contient alors des petits débris tissulaires est rejeté ; de 5 à 8 centrifugations (1 000 t/mn, 1 mn) sont nécessaires pour obtenir un surnageant limpide et un culot blanchâtre homogène qui n'est constitué que par des œufs exempts pratiquement de débris visibles au microscope. On peut ainsi préparer, à partir de deux ou trois intestins grêles de hamsters, plusieurs milliers d'œufs propres, aseptiques et infectieux.

Ces œufs peuvent être maintenus vivants et stériles sur un milieu complet type 199 pendant 8 à 15 jours. Une comparaison entre le pouvoir infectieux d'œufs témoins, récoltés sur un intestin grêle non traité, et d'œufs ayant subi les lavages stérilisants, montre que les pourcentages d'éclosion restent les mêmes et que le pouvoir infectieux est parfaitement conservé.

Pour le démontrer nous avons pris 2 lots de 100 œufs : 1 lot d'œufs traités (lot 1) et 1 lot d'œufs témoins (lot 2) que nous avons mis à éclore.

— *Pouvoir d'éclosion des œufs :*

les 100 œufs traités ont donné 92 miracidiums (lot 1) ;

les 100 œufs témoins ont donné 93 miracidiums (lot 2).

— *Pouvoir infectieux des miracidiums :*

Les 92 miracidiums issus d'œufs traités ont été mis en contact avec 9 jeunes mollusques *Biomphalaria glabrata* (diamètre 0,6-0,7 cm) (lot 1) ; 83 d'entre eux les ont pénétrés.

Les 93 miracidiums témoins ont été mis en contact avec 9 autres mollusques (lot 2) ; 83 d'entre eux les ont pénétrés.

— *Multiplication larvaire :*

Les deux lots précédents de mollusques sont placés dans deux aquariums à 27 °C ; au bout de 25 jours, ils sont prélevés, chaque jour, et disposés séparément dans des boîtes de Pétri près d'une source lumineuse qui accélère la sortie des furcocercaires. Le tableau ci-joint donne le nombre de furcocercaires obtenues à partir du lot 1 et du lot 2.



FIG. 1. — Œufs et fragments de muqueuse intestinale avant les centrifugations

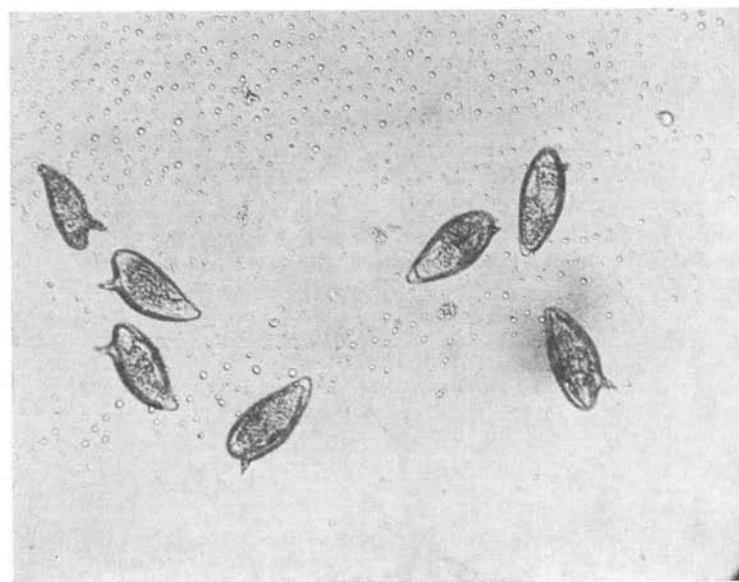


FIG. 2. — Œufs propres et stériles après les centrifugations

		30° jour	31°	32°	33°	37°	38°
Lot 1	Nombre de mollusques ayant émis	5	5	4	7	8	8
	Nombre de furcocercaires	148	184	310	525	8 024	5 567
Lot 2	Nombre de mollusques ayant émis	4	4	5	5	5	5
	Nombre de furcocercaires	401	323	499	626	5 825	6 031

Nombre de furcocercaires émises par des mollusques infestés par des miracidiums issus soit d'œufs témoins (lot 2) soit d'œufs traités (lot 1).

On notera que le nombre de mollusques ayant émis des furcocercaires a été supérieur dans le lot 1 dont les miracidiums infestants avaient été produits par des œufs traités (8 au lieu de 5) ; le nombre total des furcocercaires émises est par ailleurs sensiblement identique dans les 2 lots (14 758 pour le lot 1 et 13 732 pour le lot 2). En définitive, on peut conclure que la technique respecte la vitalité et le pouvoir infectieux des miracidiums des œufs traités. Elle présente sur les techniques antérieurement décrites l'avantage d'être plus simple et plus rapide.

Bibliographie

- BROXNE (H. G.) et THOMAS (J. I.), 1953. — A method for isolating pure, viable schistosome eggs from host tissues. *J. Parasit.*, 49, 371.
- COKER (C. M.) et von LICHTENBERG (F.), 1956. — A revised method for isolation of *Schistosoma mansoni* eggs for biological experimentation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 92, 780.