

Koninklijke Academie voor Overzeese Wetenschappen  
Klasse voor Natuur- en Geneeskundige Wetenschappen-N.R. - XVII-4 - Brussel 1968

Le mécanisme intime de la  
virulence des Trypanosomes

PAR

Dominique LE RAY

Licencié en Sciences zoologiques

150 F

Académie royale des Sciences d'Outre-Mer  
Classe des Sciences naturelles et médicales - N.S. - XVII-4 - Bruxelles 1968





Koninklijke Academie voor Overzeese Wetenschappen  
Klasse voor Natuur- en Geneeskundige Wetenschappen-N.R. - XVII-4 - Brussel 1968

# Le mécanisme intime de la virulence des Trypanosomes

PAR

Dominique LE RAY

Licencié en Sciences zoologiques

Académie royale des Sciences d'Outre-Mer  
Classe des Sciences naturelles et médicales - N.S. - XVII-4 - Bruxelles 1968

---

Mémoire présenté à la Séance du 11 juillet 1967 en réponse à la 3<sup>e</sup> question du concours annuel 1967, à savoir: *On demande une étude sur le mécanisme intime de la virulence des Trypanosomes*. La Classe des Sciences naturelles et médicales a accordé à l'auteur une mention honorable (Rapporteurs: MM. J. JADIN, A. DUBOIS et F. EVENS).

---

## RESUME

La virulence d'un Trypanosome est la somme des caractères qui lui sont nécessaires pour maintenir l'existence de l'espèce. L'étude des variations de la virulence des Trypanosomes des groupes *Stercoraria* et *Salivaria* permet de constater le rôle régulateur de la transmission cyclique, la réduction rapide *in vitro* du pouvoir infectieux qui ne peut être restauré et l'importance de la constitution génétique des hôtes vertébrés successifs. Les caractères constituant la virulence paraissent être génétiques. Ils sont soumis à l'influence de la flore bactérienne de l'insecte vecteur.

## SAMENVATTING

De virulentie van een Trypanosoom is de som van de eigenschappen die nodig zijn om het bestaan van zijn soort in stand te houden. De studie der virulentievariatiën van de Trypanosomen der groepen *Stercoraria* en *Salivaria* laat toe de regulatiërrol van de cyclische overbrenging, de snelle reductie *in vitro* van het vermogen der infectie die niet kan hersteld worden en de belangrijkheid van de genetische constitutie van de opeenvolgende gewervelde gastheren vast te stellen. De karakteristieken die de virulentie uitmaken schijnen van genetische orde te zijn. Deze zijn onderhevig aan de bacteriologische flora van de insectenvectoren.



## INTRODUCTION

La grande diversité des Trypanosomidés jointe à un type d'organisation cellulaire relativement simple et le cycle souvent complexe qu'ils suivent dans la nature ont attiré l'attention des chercheurs et ont suscité de nombreux travaux depuis la fin du siècle dernier. Mais si leur recensement et leur description ont été rapidement établis, il n'en est pas de même des raisons intimes de leurs relations avec les différents milieux où ils évoluent. Chez le Mammifère comme chez l'Insecte vecteur, le cycle évolutif des Trypanosomidés présente encore de nombreux points obscurs.

Ces dernières années ont vu s'accroître nos connaissances biochimiques et biologiques des Hématozoaires. Les progrès de la biochimie ont permis une meilleure compréhension du mécanisme intime de la régulation cellulaire et ont valu aux Trypanosomidés une attention toute spéciale depuis que leur blépharoplaste, ou kinétoplaste, s'est montré composé d'acide désoxyribonucléique (BRESSLAU et SCREMIN, 1924) intimement associé à une mitochondrie (CLARK et WALLACE, 1960; STEINERT, 1960).

Par ailleurs, se basant sur les recherches de YOELI (1965) qui a montré que la sporogonie chez les *Plasmodium* des rongeurs dépend de la température, JADIN (1965, *et al.* 1966b) a établi le rôle joué par les germes du tube digestif des Anophèles. Après avoir isolé de façon répétée des bactéries du groupe des *Pseudomonas* chez des Anophèles où la sporogonie évolue normalement tandis que des coques divers sont isolés là où elle se trouve interrompue, il a pu montrer que ces bactéries favorisent directement la sporogonie des *Plasmodium* et que leurs éléments constitutifs s'incorporent aux sporozoïtes des oocystes et des glandes salivaires et participent au métabolisme général de l'insecte vecteur. Ces germes favorables appartiennent à un groupe de bactéries contenant un type nouveau d'hémoprotéine, le cytochromoïde, composé d'hèmes associés à des nucléotides et à différents acides aminés (KAMEN, 1963).



Ayant isolé les mêmes types de germes chez les Glossines sauvages, JADIN (*et al.* 1966a) attire l'attention sur le rôle éventuel de ces germes chez les vecteurs des Trypanosomidés.

En vue d'éclaircir le mécanisme intime de la virulence des Trypanosomes, nous avons d'abord étudié et comparé la virulence qu'ils manifestent au cours de leur cycle. Dans ce but nous avons inoculé des formes métacycliques, des formes de culture et des formes sanguicoles de différents trypanosomes en cherchant à distinguer les facteurs propres aux parasites et les facteurs dus à leur hôte. Nous avons ensuite examiné les germes du tube digestif de différents vecteurs et nous avons étudié l'action de certains d'entre eux sur la virulence de *Trypanosoma cruzi* et de *T. gambiense* en culture.

Après avoir interprété les résultats de cette expérimentation en relation avec les données de la littérature, nous en avons recherché l'explication intime dans les manifestations génétiques et les structures adéquates des trypanosomes et nous avons envisagé le rôle joué à cet égard par la flore bactérienne présente chez le vecteur.

Nous tenons à remercier de leur aide tous les membres du Service du Professeur JADIN sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé.

## I. EXPERIMENTATION

### 1. TRANSMISSION CYCLIQUE DE *T. CRUZI*

L'élevage de *Triatoma infestans* est maintenu à 25° C et à 80 % d'humidité. Des insectes de troisième âge sont mis à gorgier sur souris infectée depuis vingt jours ou sont nourris artificiellement selon la technique de RODHAIN *et al.* (1913) modifiée suivant P. NICOLLE (1941). Après quinze jours d'incubation, chaque individu est broyé dans un millilitre de liquide d'Alsever et son infestation est évaluée par numération des flagellates rencontrés dans 50 champs à l'examen au contraste de phase et à l'objectif 40. Les broyats de 10 insectes d'un même lot sont alors réunis, centrifugés et le culot est inoculé dans le péritoine de cinq souris femelles de 18-20 grammes. L'évolution des infections individuelles est contrôlée tous les deux jours par numération du nombre de trypanosomes rencontrés à frais dans le sang et l'exsudat péritonéal au cours de l'observation de 50 champs microscopiques au contraste de phase et à l'objectif 40. Le prélèvement de l'ascite est effectué au moyen d'une pipette Pasteur finement effilée. A chaque contrôle, la moyenne des cinq observations individuelles est reportée sur un graphique qui représente ainsi l'évolution générale de l'infection obtenue.

#### 1.1. *Infestation de Triatoma infestans*

Dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus, les triatomes effectuent leur repas sur des souris présentant une parasitémie modérée (moins de 1 trypanosome par champ microscopique). A l'examen individuel de 44 triatomes, nous observons des flagellates chez tous les insectes sans exception; la coloration au Giemsa montre des formes leishmaniennes peu nombreuses. L'intensité de l'infestation ne paraît pas dépendre étroitement du degré de parasitémie rencontré lors du repas. De même, 12 Triatomes se gorgent sur une souris au début de

son infection, alors que seules des formes fines se rencontrent dans le sang périphérique. Tous les insectes s'infectent avec la même intensité qu'après ingestion de formes trapues.

Enfin, 20 Triatomes se gorgent d'une culture de *T. cruzi* à son premier repiquage, âgée de 10 jours et renfermant 990 000 flagellates par ml. Tous les insectes prennent l'infection; néanmoins, celle-ci n'est pas plus intense que chez les insectes infectés par repas sanguin.

### 1.2. *Transmission cyclique*

Lors des passages cycliques, les premiers jours, aucun trypanosome ne se rencontre ni dans l'exsudat péritonéal, ni dans le sang; cet exsudat apparemment négatif fournit néanmoins une culture positive. Les premiers trypanosomes, fins et sinueux, apparaissent dans le liquide péritonéal; à ce moment l'hémoculture est négative. La parasitémie ne s'installe qu'un ou deux jours après l'apparition des trypanosomes péritonéaux.

La marche ultérieure de l'infection, lors d'un premier passage cyclique, est similaire dans le temps (*fig. 2*) à celle des infections mécaniques (*fig. 1*). Quantitativement, l'infestation péritonéale est moindre tandis que la parasitémie atteint une valeur double de celle observée lors des infections mécaniques. Les manifestations pathologiques au niveau du sang et des organes restent les mêmes. Les variations individuelles dans l'intensité de l'infection sont beaucoup moins marquées.

Au cours d'un second passage cyclique (*fig. 3*) l'infestation se développe plus lentement, la phase péritonéale est presque inexistante et l'acmé parasitémique est fortement réduit.

### 1.3. *Isolement d'une souche humaine*

Nous avons pu isoler une nouvelle souche de *Trypanosoma cruzi*, dite « J. », par xénodiagnostic sur une personne ayant vécu au Brésil. Après vingt jours d'incubation, quatre *Triatoma infestans* (une larve, deux nymphes et un adulte) sont broyés et quelques flagellates se retrouvent dans le culot de centrifugation qui est inoculé dans le péritoine de douze souris. Le sang et l'exsudat péritonéal sont examinés quotidiennement. Le quatrième jour, un flagellé, fin et sinueux, est vu dans l'ascite d'une

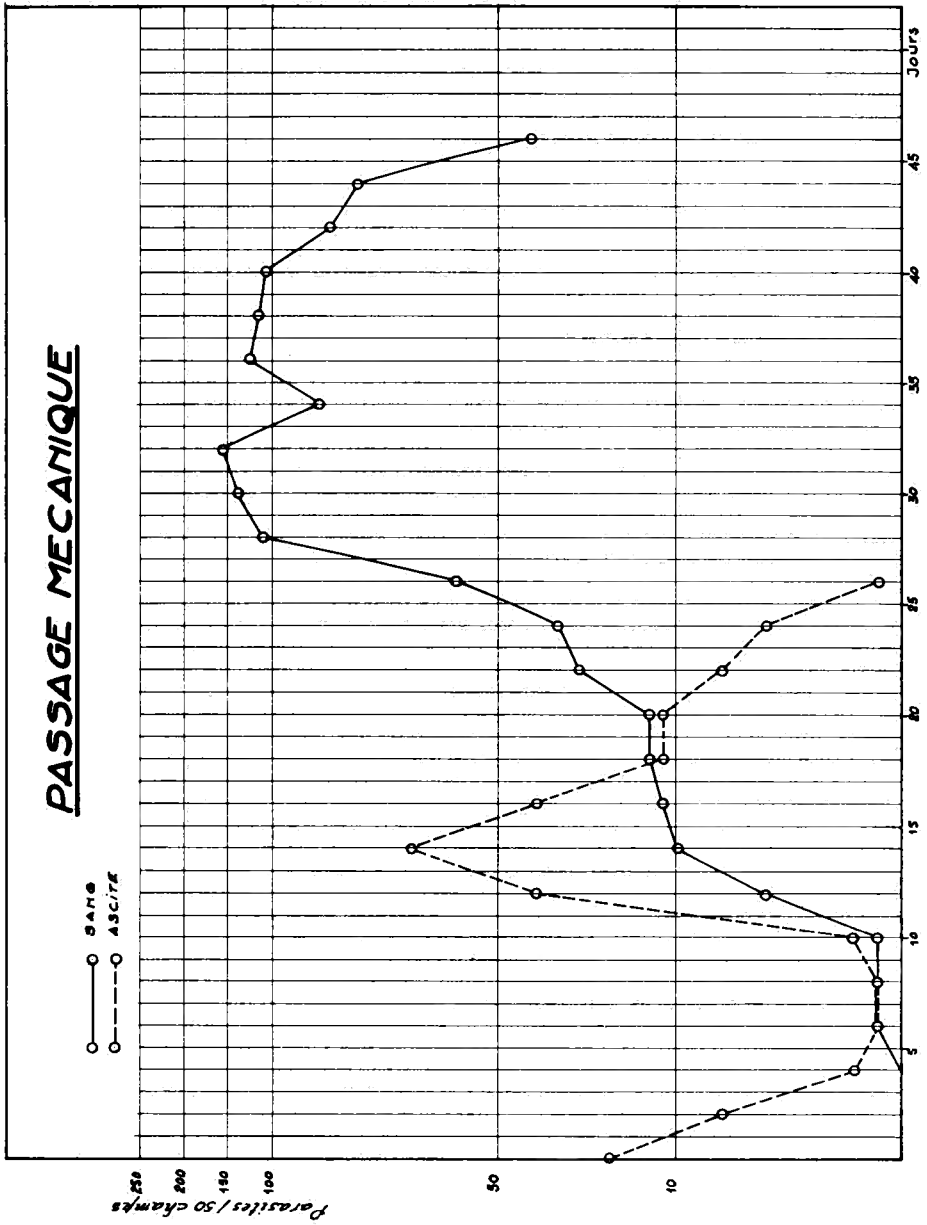


Fig. 1. — Passage mécanique

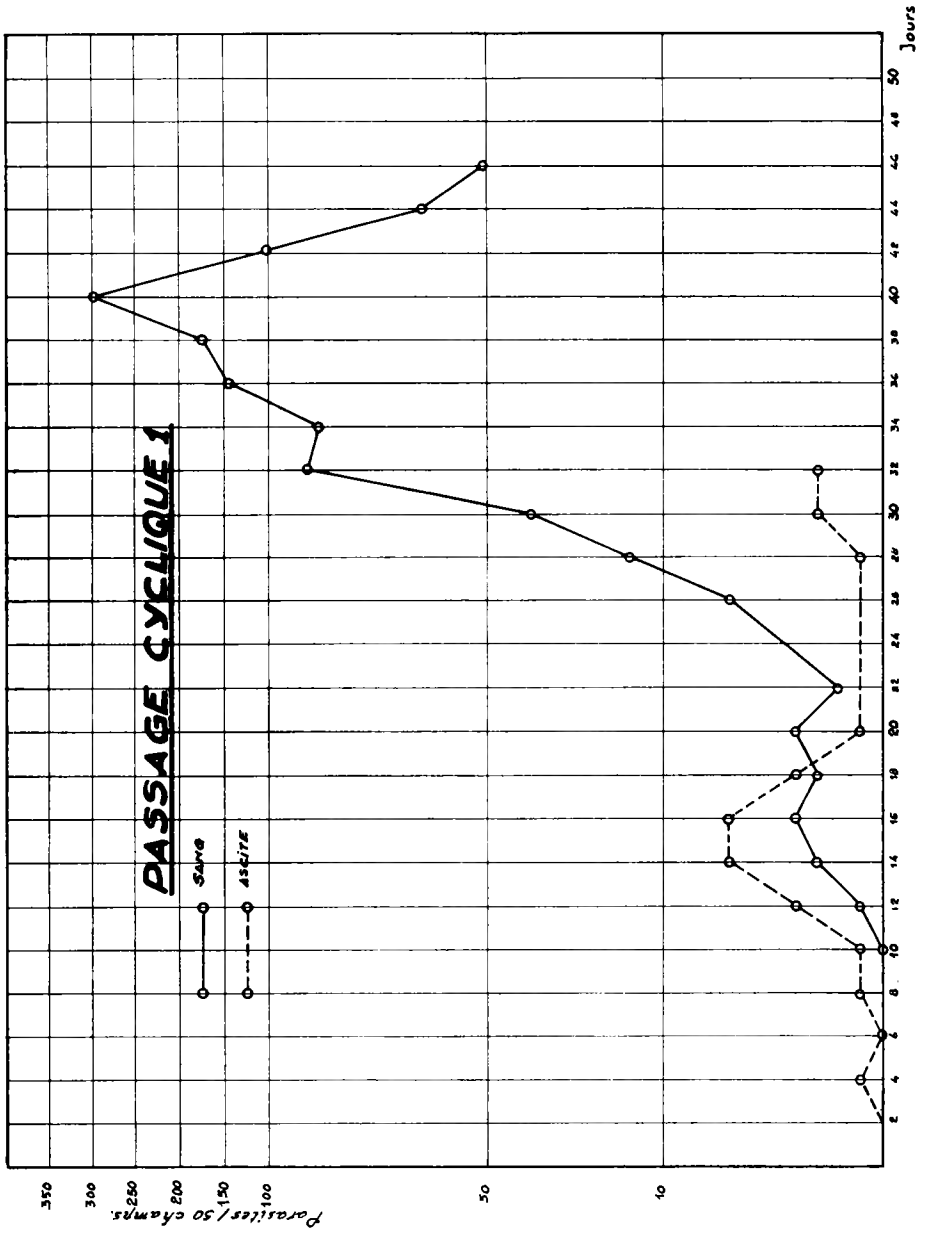


Fig. 2. — Premier passage cyclique

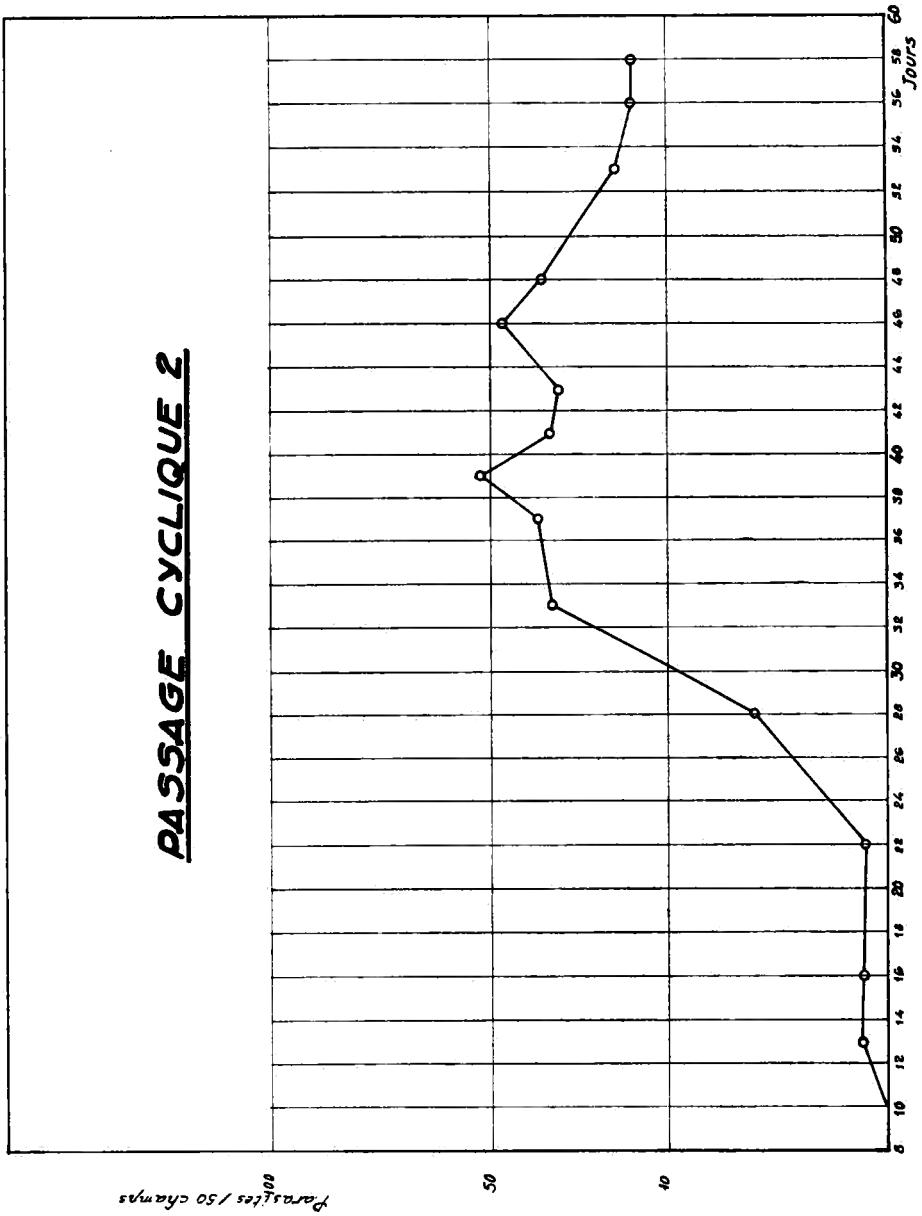


Fig. 3. — Deuxième passage cyclique

souris sur quatre, et le lendemain chez cinq souris sur les six examinées. Le Giemsa montre des trypanosomes *cruzi*. Il faut attendre le huitième jour pour observer les premiers trypanosomes sanguins chez une des souris. Le dixième jour, la parasitémie s'est installée chez tous les animaux; durant les trente jours de l'observation, elle reste faible, de l'ordre d'un trypanosome tous les dix champs.

Dès les premiers jours suivant l'inoculation, les souris sont œdémateuses, peu actives et ont le poil hérissé. Un premier animal meurt au onzième jour et trois autres aux quinzième, seizième et vingt-deuxième jour. Les autres animaux sont sacrifiés entre le onzième et le trente et unième jour. L'hémoculture sur bouillon au sang est bactériologiquement stérile et fournit un développement abondant de formes leishmaniennes. Les empreintes d'organes montrent quelques formes leishmaniennes dans la rate. Le sang est peu altéré, on peut observer de la polychromatophilie et des corps de Jolly. Au cours des passages mécaniques ultérieurs, les manifestations pathologiques disparaissent rapidement et une seule souris meurt au vingtième jour lors du premier passage; la parasitémie augmente au cours des passages.

## 2. INOCULATION DE CULTURES

### 2.1. *T. cruzi*

Les cultures sont repiquées tous les sept jours sur milieu de Hanks, tous les dix jours sur bouillon au sang de lapin et sont maintenues à 28° C.

Afin d'évaluer la diminution de l'infectivité en culture, nous avons inoculé des cultures d'isolement récent et ancien. Nous avons ensuite cherché à réexalter la virulence des cultures anciennes.

a) *Primoculture*: le sang du cœur d'une souris infectée mécaniquement par la souche Tehuantepec est mis en culture sur bouillon au sang. Le surnageant d'un premier repiquage âgé de dix jours et composé de formes flagellées est inoculé dans le péritoine de cinq souris femelles de 18-20 grammes; il sert égale-

ment à gorger des triatomes. Chaque souris reçoit 350 000 flagellates. Contrôles et graphique sont effectués comme précédemment. Six heures après l'inoculation, on n'observe plus de formes libres au lieu d'injection; en coloration au Giemsa de l'exsudat, les cellules péritonéales montrent des inclusions de chromatine pycnotique et quelques formes leishmaniennes isolées, à noyau diffus et à blépharoplaste allongé, épais, intensément coloré. Les jours suivants, l'ascite devient plus marquée et les cellules parasitées sont fréquentes. Les formes leishmaniennes s'y multiplient activement et certains macrophages renferment jusqu'à douze et vingt-quatre parasites au cinquième jour. A ce moment, les premiers trypanosomes sont libérés dans l'ascite et apparaissent dans le sang au onzième jour (*fig. 4*). On ne rencontre plus, dès lors, de formes leishmaniennes dans les cellules péritonéales. Pourtant, il ne se produit pas de libération massive de trypanosomes. L'infection reste très faible durant le mois suivant l'inoculation, puis la parasitémie augmente pour bientôt régesser, et est bien inférieure à celle observée lors des passages mécaniques et cycliques.

b) *Cultures anciennes*: nous avons inoculé des cultures de la même souche entretenue sur Hanks depuis six ans à des souris de trois semaines et de trois mois, à la fois dans le péritoine et sous la peau. Dans chaque lot, une seule souris sur cinq présente épisodiquement un trypanosome par 100 champs dans le sang périphérique comme dans l'ascite. Des rats adultes inoculés de la même manière ne s'infectent pas davantage, de même que des souris sauvages capturées dans la nature.

c) *Réexaltation*: l'inoculation de ces cultures à des ratons et souriceaux âgés de 1 ou 2 jours entraîne l'apparition d'une parasitémie permanente évoluant en 30 à 40 jours et atteignant plus d'un trypanosome par champ chez les individus les plus réceptifs. Dans l'ensemble, les ratons s'infectent plus intensément que les souriceaux et l'inoculation intrapéritonéale se montre plus effective que la voie intraveineuse et surtout que la voie sous-cutanée.

A cette occasion, le contrôle de l'exsudat péritonéal montre que les trypanosomes y apparaissent en premier lieu lorsque l'inoculation est faite intrapéritonéalement, tandis qu'ils n'y



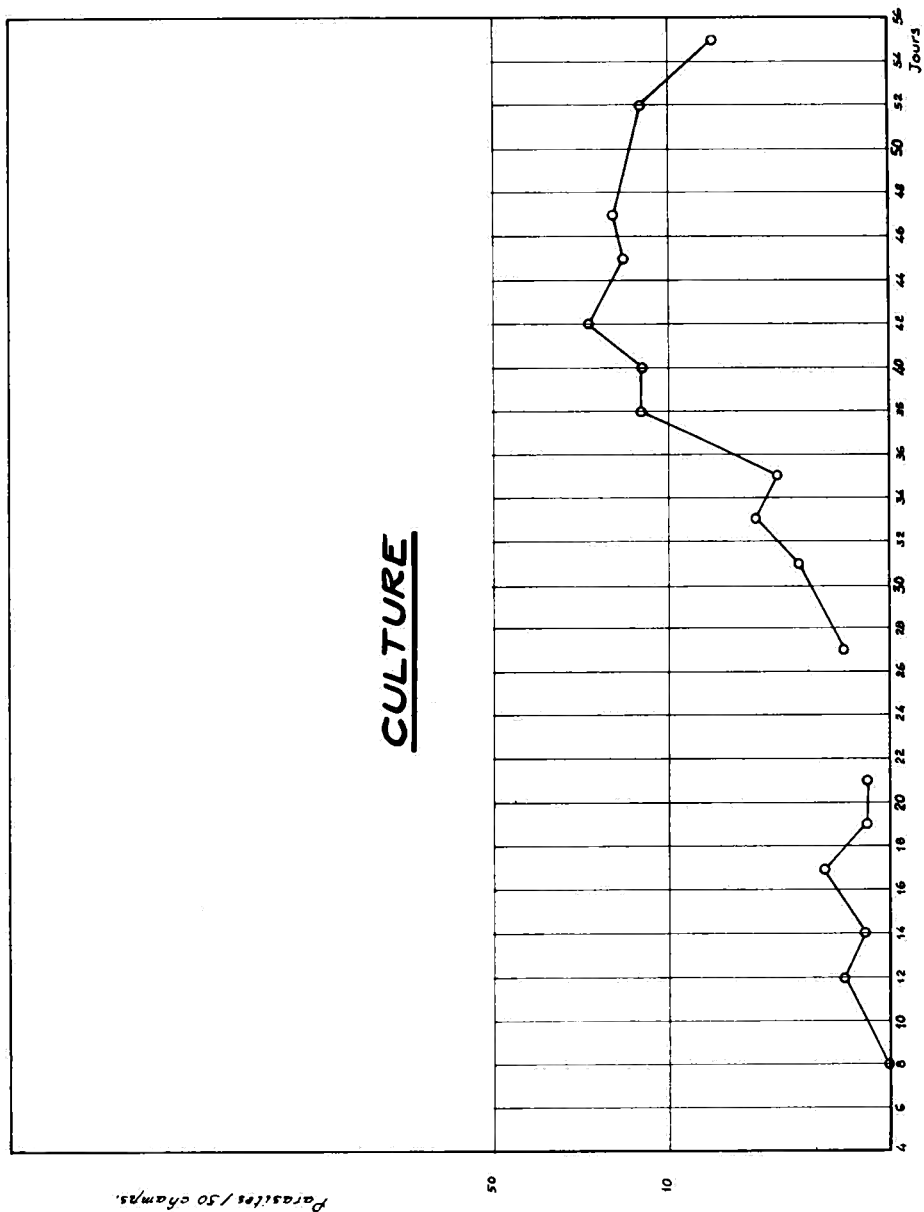


Fig. 4. — Culture (premier repiquage)

apparaissent que secondairement à la parasitémie lorsque l'inoculation a lieu par voie sous-cutanée ou intraveineuse. Le parasitisme péritonéal est alors moins intense.

Des triatomes nourris sur ratons s'infestent mais leur broyat inoculé à des rats adultes ne détermine pas de parasitémie visible chez ceux-ci.

Au moment de la régression de leur parasitémie, 4 ratons reçoivent par voie intrapéritonéale 0,4 ml (0,5 mg/ml) de cortisone durant quatre jours consécutifs, sans que soit modifiée la chute de la parasitémie.

La subinoculation du sang au maximum de l'infection à des rats et des souris adultes n'entraîne qu'une parasitémie épisodique chez la moitié des 12 animaux inoculés, les autres restant négatifs quarante jours après l'inoculation.

La même subinoculation est faite à 7 ratons et 4 rats qui reçoivent 0,3 ml de cortisone aux 2<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> jour suivant l'injection. L'infection développée n'est pas supérieure à celle des animaux témoins.

Dans le but d'obtenir une augmentation définitive de la virulence, nous avons alors effectué une série de passages sur ratons. Dans ce but, le sang du cœur est prélevé sur citrate à l'acmé de l'infection et subinoculé à raison de 0,1-0,2 ml dans le péritoine d'une nouvelle nichée.

L'infection développée va en s'intensifiant au cours des passages. Au troisième passage, les formes leishmaniennes se retrouvent aisément dans la rate, le foie, les muscles, les ganglions et le myocarde, isolément et en nids.

Au quatrième passage, les trypanosomes se rencontrent dans le sang dès le deuxième jour et la parasitémie atteint cinq trypanosomes par champ au seizième jour.

Un cinquième passage est effectué sur ratons et sur souris adultes. Les ratons meurent durant la troisième semaine de l'infection; leur taille est réduite, le sang renferme en majorité des érythroblastes et des polychromatophiles, les formes leishmaniennes sont nombreuses dans tout l'organisme. L'ensemble des souris adultes s'infecte et développe cette fois une parasitémie comparable à celle de la lignée mécanique décrite précédemment. Cette virulence se maintiendra inchangée durant huit passages ultérieurs sur souris adultes.

### 2.2 *T. lewisi*

Cette souche, isolée en culture en janvier 1966 à partir d'un *Rattus norvegicus* capturé dans la région d'Anvers, a été entretenue par repiquage bimensuel successivement sur N.N.N. puis sur bouillon au sang de rat. Les 30<sup>e</sup>, 31<sup>e</sup> et 32<sup>e</sup> repiquages, âgés respectivement de 37, 29 et 13 jours, sont inoculés intrapéritonéalement à trois nichées de rats nouveau-nés. Les contrôles sont effectués quotidiennement dans les conditions décrites pour *T. cruzi*. Tous les animaux s'infectent entre le deuxième et le cinquième jour; au huitième jour, la parasitémie est massive et on observe de nombreuses somatelles; tous les rats meurent le dix-septième ou le dix-huitième jour en état de cachexie marquée. Chez quatre rats adultes inoculés parallèlement avec le 32<sup>e</sup> repiquage, la parasitémie apparaît entre le quatrième et le septième jour et atteint une intensité nettement inférieure à celle observée chez les rats; une seule rechute est enregistrée entre les trentième et quarante-quatrième jours.

Quatre mois plus tard, un mélange des 39<sup>e</sup> et 40<sup>e</sup> repiquages est inoculé à 2 rats et 4 rats sans entraîner de parasitémie visible. Aussi, un 41<sup>e</sup> repiquage âgé de 20 jours est injecté dans le péritoine de quatre rats de 60 grammes et de quatre rats nouveaux-nés. Suivant la numération à la chambre de Burker, chaque rat adulte reçoit ainsi environ 4 250 000 flagellates, chaque raton en reçoit 2 125 000. Aucun animal ne développe de parasitémie durant les trente jours de l'observation, bien que deux ou trois trypanosomes par 50 champs se retrouvent dans l'ascite de deux rats le lendemain de l'inoculation et qu'un troisième raton montre 1 trypanosome par 50 champs dans l'ascite et dans le sang au quatrième jour. Colorées au Giemsa, ces formes sont similaires aux formes d'aspect métacyclique présentes dans l'inoculum.

### 2.3. *Trypanosoma rangeli*

La souche utilisée provient de l'Institut Tropical Suisse où, après quatre ans d'entretien, elle infectait encore la souris (HERBIG-SANDREUTER, 1957). Nous avons inoculé une culture massive âgée de 28 jours dans le péritoine d'une nichée de rats. Ici encore, le lendemain de l'injection, des trypanosomes bien

mobiles se retrouvent dans l'exsudat péritonéal de plusieurs animaux. Par la suite, aucun flagellate n'est rencontré dans l'ascite ou le sang des rats pendant un mois d'observation.

#### 2.4. *T. gambiense*

La souche étudiée est la souche « Eliane » isolée par VAUCEL et établie en culture par COLAS-BELCOUR vers 1952. Elle est entretenue par passages bi-hebdomadaires sur les milieux de Hanks et de Tobie et est maintenue ordinairement à 28° C. Cette culture a fait l'objet de nombreux essais en vue de lui restituer son infectivité. Les résultats en ont été discutés par JADIN, WÉRY, LE RAY et GATTI (1966). Nous en rappellerons ici quelques détails expérimentaux.

En trois ans, 35 cobayes, 32 rats, 137 rats, 74 souris, 52 souriceaux et 2 cercopithèques ont été inoculés. Des cultures d'âge différent soumises à différentes conditions de température ou d'oxygénation ont été inoculées sous la peau, dans le cœur, dans le péritoine ou dans le muscle. Des cultures maintenues 18 jours en anaérobiose ont été inoculées dans la veine de la fontanelle de deux nichées de rats recevant depuis 2 jours 6 à 10 mg d'Imuran par kilo; ce traitement a été poursuivi pendant 15 jours au cours desquels deux nouvelles injections de cultures en anaérobiose ont été effectuées sous la peau des animaux.

La souche a également été cultivée en présence d'explants de glandes salivaires de glossines et inoculée à 2 singes, des souris et des cobayes. Toutes ces tentatives d'infection sont restées sans résultat.

### 3. ENTRETIEN MÉCANIQUE

#### 3.1. *T. cruzi*

Nous avons étudié la souche mexicaine « Tehuantepec », provenant du Service de Parasitologie de l'Institut Pasteur de Paris, et nous l'avons entretenue sur souris NMRI. Des rats blancs de 150 grammes, des rats âgés de 1 à 2 jours et des cobayes ont également été infectés. Durant trente mois, nous avons effectué tous les trente jours un passage mécanique en

inoculant dans le péritoine de chaque souris 3 gouttes de sang infecté prélevé à la queue. Nous avons ensuite précisé les conditions d'expérience en infectant des lots de 5 souris par inoculation intrapéritonéale de 0,1 ml de sang prélevé sur citrate par ponction cardiaque au vingtième jour de l'infection. Afin de pouvoir comparer les infections produites par les inoculums mécaniques, cycliques et de culture, nous avons employé dans ces différents cas des lots de 5 souris femelles de 18 à 20 grammes. Le contrôle des infections et les graphiques sont réalisés comme lors de la transmission cyclique.

Durant trente mois d'entretien mécanique, la souche Tehuantepec s'est montrée peu pathogène vis-à-vis des souris. En période aiguë, elle n'entraîne qu'une polychromatophilie et une splénomégalie légères; les formes profondes sont rares et se localisent principalement dans la rate. L'infection devient chronique après deux mois. Aucun décès ne survient chez les animaux observés jusqu'à six mois après le début de l'infection. L'examen suivi de la parasitémie permet d'y distinguer deux phases d'augmentation séparées par une phase stationnaire (*fig. 1*).

L'examen de l'exsudat péritonéal explique la première augmentation de la parasitémie. Quelques jours après l'injection, apparaissent dans l'ascite des trypanosomes filiformes et sinueux capables de traverser rapidement le champ d'observation. Leur nombre augmente rapidement vers le dixième jour, entraînant avec un certain retard l'ascension de la parasitémie. Celle-ci se maintient lorsque diminue, de façon définitive, le nombre des trypanosomes péritonéaux, puis augmente à nouveau.

Des frottis précoces de l'exsudat péritonéal permettent d'observer parfois des formes leishmaniennes en multiplication dans des macrophages et des monocytes.

Les trypanosomes fins et sinueux peuvent être observés dans le sang durant toute l'évolution de la parasitémie bien que leur proportion y devienne minime durant sa régression.

Enfin l'intensité de l'infection est très variable selon les individus d'un même lot, une ou deux souris sur cinq développant une parasitémie nettement plus marquée. A cinq reprises, nous avons effectué la subinoculation à partir de ces animaux plus parasités. Chaque fois, la parasitémie moyenne est restée la même, avec le même étalement des réponses individuelles. Cette

variation au cours des passages mécaniques a été observée chez tous les animaux inoculés, adultes et nouveau-nés, et se marque surtout chez les rats et les cobayes qui, contrairement aux souris, ne proviennent pas d'un élevage génétiquement sélectionné.

### 3.2. *Les Salivaria*

Durant trois ans, nous avons entretenu sur cobaye et temporairement sur souris différentes souches de *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense*, *T. gambiense*, *T. equiperdum* et *T. congolense*. Les passages sont effectués par inoculation intrapéritonéale de sang massivement infecté et dilué au vingtième à un lot de deux cobayes ou de cinq souris de poids comparables. Les passages sur souris sont effectués tous les quatre jours.

Dans le groupe *Brucei*, le temps de survie des cobayes infectés par une même souche est extrêmement variable et va de deux semaines à trois mois et plus, même chez des animaux de même poids ayant reçu le même inoculum. Chez ceux-ci, la parasitémie n'apparaît et n'évolue de façon synchrone qu'exceptionnellement. La guérison spontanée de certains cobayes n'a été observée que chez l'espèce *brucei* (deux souches). Avec toutes les souches, excepté *T. gambiense* «P.», les souris se sont infectées massivement et simultanément, et sont mortes en moins d'une semaine.

Nous avons étudié plus particulièrement les souches dont l'historique nous était connu.

Nous avons comparé l'évolution de *T. gambiense* «Eliane», isolé par VAUCEL en 1952, et celle de *T. gambiense* «P.», isolé par LIMBOS et JADIN en 1960 à partir d'un porteur asymptomatique. La souche «Eliane» infecte cobayes, souris et rats de manière rapide et massive; elle se comporte comme les autres souches du groupe *Brucei* étudiées ci-dessus. Chez la souche «P.», les trois premières années d'entretien n'ont pu exalter la virulence de cette souche pour les animaux de laboratoire. Au départ, un seul singe sur deux présente une parasitémie 35 jours après l'inoculation. Au cours des passages ultérieurs sur cobaye, les animaux présentent des infections inconstantes et faibles, de même que les rats et les souris (LIMBOS et JADIN, 1963).

Nous avons pu reprendre cette souche quatre ans après son isolement et nous avons effectué 32 passages sur cobayes durant

trois ans et demi, au cours desquels nous avons vu l'infectivité de la souche augmenter progressivement pour son hôte habituel. Les maxima parasitémiques deviennent précoces, massifs et constants. Le temps moyen de survie des cobayes passe de 101 à 46 jours. Deux cercopithèques callitriches, inoculés par voie intramusculaire durant la cinquième années d'entretien de la souche, sont parasités 38 jours plus tard. Après plusieurs accès parasitémiques, ils meurent en 349 et 380 jours en état de cachexie et en marasme complet. Le cerveau de l'un des singes est inoculé à deux cobayes. Un seul s'infecte faiblement, et meurt 144 jours plus tard.

Des rats inoculés avec le sang d'un cobaye massivement parasité font plusieurs accès parasitémiques marqués puis guérissent. L'infection s'atténue rapidement dès la première subinoculation. Chez les souris inoculées à partir d'un cobaye, une partie seulement présente de temps à autre un parasite sanguin; après quatre passages, on n'observe plus de parasitémie.

Nous avons également comparé l'évolution de *T. congolense* « I.P. », la vieille souche de l'Institut Pasteur de Paris, et de *T. congolense* « Chien » isolé par COLAS-BELCOUR et VIRAT en décembre 1961. Sur cobaye, la première crise parasitémique est plus précoce, plus intense et plus longue chez la souche « I.P. » que chez la souche « Chien ». Le temps de survie est en moyenne de 14 jours et au maximum de 5 semaines pour la souche « I.P. » contre une moyenne de 23 jours et un maximum de 8 semaines pour la souche « Chien ». Sur souris, la souche « I.P. » produit une infection massive et simultanée et les animaux meurent en 5 à 7 jours. La souche « Chien » entraîne par contre une parasitémie plus lente et moins massive variant nettement d'animal à l'autre. Certaines souris meurent au cours de la seconde semaine, la plupart présentent une rémission de la parasitémie pouvant aller jusqu'à la négatification apparente du sang, puis meurent lors d'une des rechutes ultérieures.

#### 4. LES GERMES CYTOCHROME-OXYDASE POSITIFS

Dans le but d'isoler les germes du tube digestif des vecteurs de trypanosomes, les insectes sont préalablement désinfectés super-

ficiellement par un séjour de deux minutes dans l'alcool à 80° ou de dix minutes dans une solution de merthiolate au dix-millième. Après un double lavage, chaque insecte est broyé en eau physiologique stérile et une goutte du broyat est ensemencée sur gélose BHI Difco en boîte de Pétri. Celle-ci est incubée 48 heures à 37° C, l'expérience ayant montré que fréquemment le développement bactérien demandait plus de 24 heures.

Différentes colonies sont isolées, puis la boîte de Pétri et les isolements sont testés avec les réactifs spécifiques de la cytochrome-oxydase, les germes du groupe des *Pseudomonas* présentant une réaction positive.

Les vecteurs étudiés sont des *Triatoma infestans* de troisième âge prélevés dans notre élevage, des *Xenopsylla cheopis* entretenues sur hamster depuis plusieurs années et des puces non déterminées recueillies lors de la capture d'un *Rattus norvegicus* dans la région d'Anvers et dues à l'obligeance du Professeur R. VANBREUSEGHEM.

#### 4.1. *Présence chez les vecteurs*

Chez *Triatoma infestans*, 23 individus sur 32 ont permis l'isolement de germes cytochrome-oxydase positifs. Il s'agit en grande majorité de coques Gram négatifs; un *Flavobacterium* et un coque Gram positif ont également présenté une réaction positive. Chez les insectes ayant effectué un repas infectant, nous n'avons pas observé de relation entre la présence ou l'absence de ces germes et l'intensité de l'infestation par *T. cruzi*. Chez *Xenopsylla cheopis*, 9 puces sur les 30 examinées renferment des germes cytochrome-oxydase positifs, pour la plupart des bacilles mobiles Gram négatifs. Des 2 puces recueillies sur *R. norvegicus*, l'une fournit entre autres germes une vingtaine de colonies rosées dues à un bacille mobile Gram négatif et fortement cytochrome-oxydase positif (souche 273 RN).

#### 4.2. *Action chez Triatoma infestans*

Nous avons réuni chez *T. infestans* des germes cytochrome-oxydase positifs et des formes sanguicoles ou de culture de *Trypanosoma cruzi* « T. »

Une première série d'insectes ingère le bacille 273 RN, la seconde série ingère le coque Gram négatif 276 TI isolé chez les



triatomes. Un lot de chaque série absorbe également une culture de *T. cruzi* à son premier repiquage (voir pp. 12-13), tandis que le second lot est nourri trois jours plus tard sur une souris infectée mécaniquement. Des lots témoins n'ayant pas ingéré de germes sont préparés parallèlement.

Après quinze jours d'incubation, les différents lots de triatomes sont broyés et examinés quant à la présence de germes et de flagellates. Les germes ingérés se sont maintenus dans les triatomes. L'infestation par *T. cruzi* est de même intensité dans tous les lots, à l'exception du lot réunissant le germe 276 TI et la culture de *T. cruzi*. Ce dernier lot est nettement moins infesté.

#### 4.3. Action sur les cultures

Afin d'étudier l'action des germes sur les trypanosomes, nous avons ensemencé le bacille 273 RN et le coque 276 TI sur bouillon BHI Difco.

Nous avons cherché à distinguer l'action des métabolites libérés par ces germes de l'action de leurs constituants. Après quatre jours d'incubation à 37° C, la culture bactérienne est centrifugée. Le surnageant est filtré sur Seitz et conservé à -30° C. Le culot est soumis à quatre reprises à une congélation à -30° C suivie d'un broyage au désintégateur (Waring Blender) en évitant tout échauffement; le broyat obtenu est additionné de quatre volumes de bouillon frais, est filtré et est conservé à -30° C.

a) *T. cruzi*. Le surnageant et le broyat des deux germes ainsi que des bouillons témoins sont additionnés de quelques gouttes de sang de rat défibriné. Après une nuit à 37° C, ils sont ensemencés par la primoculture de *T. cruzi* « T. » décrite (voir p. 12). Dix jours plus tard, les développements sont comparés à la chambre de Burker:

	flagellates par mm <sup>3</sup>
culture témoin	900
273 RN surnageant	450
broyat du culot	640
276 TI surnageant	840
broyat du culot	540

On observe donc une réduction de la croissance de *T. cruzi* en présence des métabolites comme des constituants bactériens, ce qui est confirmé par le moins grand nombre de formes en division rencontrés dans les contrôles colorés au Giemsa. Dans les surnageants, le milieu offert au trypanosome est appauvri par le développement bactérien préalable. Ceci n'est plus le cas pour les broyats, qui ont été resuspendus dans du milieu frais. Il y a donc bien action directe des germes freinant le développement du trypanosome. Chaque culture est ensuite inoculée intrapéritonéalement à cinq souris femelles de 18-20 grammes de façon à ce que chaque souris reçoive environ 350.000 flagellates. Contrôles et graphiques sont effectués comme précédemment.

L'infectivité conservée par le trypanosome dans la culture témoin a été décrite (*fig. 4*): la parasitémie apparaît 10 jours après l'inoculation et se maintient durant un mois à un niveau très faible avant d'évoluer et d'atteindre un maximum six fois moindre que celui atteint lors des passages mécaniques. La culture menée en présence du surnageant du coque 276 TI ne produit pas de parasitémie visible chez aucune des cinq souris observées durant 50 jours. La culture en présence du broyat de ce germe entraîne une parasitémie visible après 10 jours, évoluant parallèlement à celle du lot témoin et atteignant un maximum un peu supérieur (3 trypanosomes tous les deux champs). Par contre, les cultures en présence du surnageant et du culot du bacille 273 RN entraînent toutes deux, en 6 jours, une parasitémie visible qui s'élève dès la troisième semaine et atteint un maximum (*fig. 5*) comparable au maximum rencontré lors des passages mécaniques. Dans le cas du surnageant, le maximum atteint est de 4 trypanosomes par champ; il est de presque 3 trypanosomes par champ dans le cas du culot.

b) *T. gambiense*. Un volume du broyat du bacille 273 RN a été ajouté à 5 volumes de milieu de Hanks. Une série de tubes contenant ce mélange estensemencée avec la culture de la souche « Eliane ». Six jours plus tard, les développements sont nettement plus faibles que dans les tubes témoins. L'inoculation de ces cultures à 5 rats et à 2 jeunes cobayes n'entraîne aucune parasitémie.

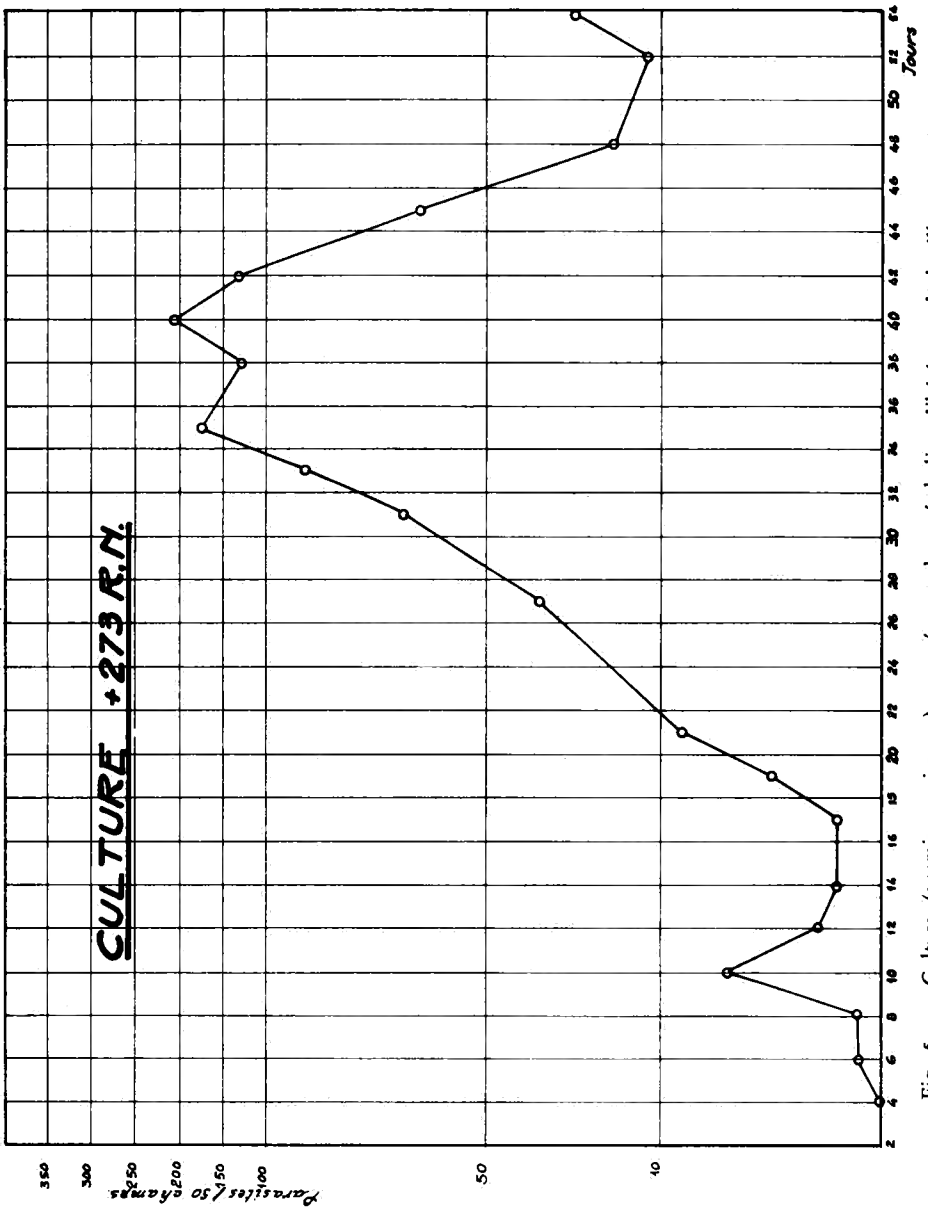


Fig. 5. — Culture (premier repiquage) en présence des métabolites libérés par le bacille 273 RN

## DISCUSSION

1.

L'étude du rôle joué par la *transmission cyclique* dans la virulence de *T. cruzi* nous a permis de constater que son pouvoir d'être transmis par le vecteur peut être absolu et qu'il n'est pas modifié par l'entretien mécanique. Nous avons observé que la transmission cyclique réduit la virulence et régularise les caractères de la souche ainsi transmise. Cette étude nous a également permis de préciser le primodéveloppement de *T. cruzi* chez l'hôte vertébré.

Le pouvoir de transmission de *T. cruzi* par *Triatoma infestans* est total dans nos conditions expérimentales. Tous les insectes gorgés sur des souris modérément parasitées s'infestent après un seul repas infectant. Dans la nature, les pourcentages d'infestation sont moins élevés mais dépendent de la fréquence de l'infection animale. Ils peuvent varier de 2,28 % (CORREA et FERREIRA, 1959) à 90 % (FLOCH et ABONNENC, 1945) selon les endroits. Néanmoins, des variations dans le pouvoir de transmission et l'existence d'une sélection adaptative de celui-ci ont été démontrées. DIAS (1939) infecte expérimentalement plusieurs espèces de vecteurs d'origine différente avec une souche brésilienne de *T. cruzi*. Il obtient de 80 % à 90 % d'infection chez les vecteurs brésiliens alors que le vecteur vénézuélien le plus fréquent ne prend l'infection que dans 54,7 % des cas.

Le pouvoir de transmission cyclique de *T. cruzi* n'est pas modifié par l'entretien mécanique. Nous avons obtenu 100 % d'infestation des triatomés par une souche entretenue mécaniquement depuis cinq ans.

La transmission cyclique réduit la virulence des lignées mécaniques. A partir des mêmes trypanosomes sanguins, nous avons effectué une série de passages mécaniques et cycliques. Après une augmentation lors du premier passage cyclique, le pouvoir infectieux se réduit et devient nettement inférieur à celui de la lignée mécanique, tandis que le pouvoir pathogène ne subit pas de modifications. En même temps, nous constatons que les variations individuelles dans l'infection des souris sont beaucoup moins marquées dans les passages cycliques que dans les pas-

sages mécaniques. Ce rôle régulateur de la transmission cyclique sur la virulence de *T. cruzi* a également été observé par BRUMPT (1913).

L'examen de l'ascite des animaux inoculés intrapéritonéalement nous a permis de suivre leur infection dès son début. Immédiatement après l'inoculation intrapéritonéale de formes métacycliques de *T. cruzi*, nous ne voyons aucun parasite dans le sang ni dans l'exsudat péritonéal. Leur mise en culture montre néanmoins la présence de parasites au seul niveau péritonéal. Les premiers trypanosomes apparaissent dans l'exsudat péritonéal alors que l'hémoculture est encore négative. La même évolution se produit lors de l'inoculation de formes de culture. Dans ce cas, où l'inoculum est massif, nous observons une multiplication leishmanienne importante dans les cellules histiocytaires péritonéales. Ceci montre que les formes métacycliques pénètrent immédiatement dans les cellules histiocytaires de l'hôte vertébré, s'y transforment en leishmanies et s'y multiplient. Après trois jours en moyenne, ces leishmanies se transforment en trypanosomes qui sont libérés dans l'ascite. Ce tropisme péritonéal est commun aux souches que nous avons étudiées. Il constitue en soi un caractère mineur de *T. cruzi* dont nous avons souligné ailleurs (LE RAY, 1967) l'intérêt pour un diagnostic précoce. Comme nous l'observons au cours des passages mécaniques, il peut être exalté par inoculation intrapéritonéale. Ce tropisme est même devenu spontanément exclusif chez une souche étudiée par GALLIARD (1952).

Les premiers trypanosomes libérés présentent un aspect filiforme totalement différent de l'aspect trapu classique des formes sanguicoles. Nous avons vu que la proportion des formes fines, dans le sang comme dans l'ascite, se réduit progressivement durant l'infection. Il en subsiste pourtant toujours quelques-unes. Ceci doit tenir à l'origine intracellulaire des formes fines, qui deviendraient trapues sous l'influence des anticorps de l'hôte comme l'a suggéré GALLIARD (1952). Ce polymorphisme ne semble pas en rapport avec le pouvoir de transmission cyclique car nous avons pu infecter des triatomes par des formes fines avec la même intensité qu'avec des formes trapues. La proportion des formes fines est caractéristique des souches de *T. cruzi*

(DA SILVA, 1959) et est due à leur réticulotropisme plus ou moins marqué (REGO, 1956).

Ces faits sont confirmés par notre étude des souches « Téhuan-tepec » et « J. » où la localisation leishmanienne la plus fréquente est histiocytaire et splénique et où l'évolution en trypanosomes débute exclusivement par la libération de formes fines.

La comparaison de nos résultats chez *T. cruzi* avec ceux obtenus par ailleurs chez les *Salivaria* montre la fixité nettement moins grande des caractères de ces derniers et confirme le rôle régulateur de la transmission cyclique.

Leur pouvoir de transmission est faible. Dans les meilleures conditions expérimentales, 20 % des trypanosomes *brucei* atteignent les glandes salivaires de *G. morsitans* (MURGATROYD et YORKE, 1937b).

Leur pouvoir de transmission est peu stable et est éliminé par l'entretien mécanique. Cette disparition s'effectue progressivement: les souches de *T. gambiense* perdent d'abord le pouvoir de passer du proventricule aux glandes salivaires, puis celui de remonter de l'espace péritrophique dans le proventricule; ensuite, elles ne réussissent plus à envahir l'espace extrapéritrophique et finalement la souche ne s'établit plus chez la mouche (MURGATROYD et YORKE, 1937b; ROUBAUD et COLAS-BELCOUR, 1948). Cela suggère que le pouvoir de transmission est constitué par la somme d'une série de petits caractères qui sont ici successivement éliminés.

Cette élimination dépend de la constitution génétique des hôtes successifs et se produit d'autant plus rapidement que celle-ci est plus constante. MURGATROYD et YORKE (1937a) ont montré qu'elle survient beaucoup plus rapidement sur souris que sur cobaye, et que chaque transmission cyclique réduit le pouvoir pathogène augmenté par passages mécaniques.

2.

Notre étude de la virulence des trypanosomes *en culture* a principalement porté sur l'évolution de leur pouvoir infectieux.

Chez *T. cruzi*, l'inoculation de la première subculture produit une multiplication leishmanienne intense dans les cellules histiocytaires péritonéales mais la parasitémie ultérieure est bien infé-

rieure à celle qui est observée dans les passages mécanique et cyclique menés parallèlement. Nous voyons donc que la mise en culture provoque une réduction du pouvoir infectieux mais que cette réduction ne se marque qu'après le stade intracellulaire leishmanien.

L'inoculation de la même souche cultivée depuis six ans entraîne une parasitémie transitoire chez une partie seulement des animaux adultes. Par contre, les animaux nouveau-nés s'infectent tous et leur parasitémie est permanente, en particulier chez les rats de deux jours inoculés intrapéritonéalement.

L'utilisation d'animaux nouveau-nés permet donc de mieux évaluer le pouvoir infectieux d'un trypanosome en culture. Elle nous permet de constater la disparition totale du pouvoir infectieux de *T. lewisi* après vingt mois d'entretien en culture.

De même, tous les essais réalisés pour restituer son pouvoir infectieux à *T. gambiense* « Eliane » restent infructueux, quelles que soient les conditions de culture ou la neutralisation de la résistance des animaux.

Nous observons donc en culture l'atténuation et le maintien du pouvoir infectieux chez *T. cruzi*, sa disparition lente et totale chez *T. lewisi* et l'impossibilité de sa restitution chez *T. gambiense*.

Ici encore, *T. cruzi* se caractérise par la stabilité plus grande de ses caractères. La réduction de l'infectivité en culture n'est d'ailleurs pas la règle chez ce trypanosome et varie d'une souche à l'autre (DEANE, DE BRITO et DEANE, 1963). Parfois même, seule la culture permet de maintenir la virulence de *T. cruzi* alors qu'elle se perd par passages mécaniques ou cycliques (GALLIARD, 1952).

Chez les *Salivaria*, la perte de l'infectivité peut survenir endéans les vingt-quatre premières heures de culture (HENRARD et PEEL, 1950). Mais parfois, l'infectivité peut se maintenir pendant plusieurs subcultures (WEINMAN, 1957; TRAGER, 1959; JADIN et WÉRY, 1963). AMREIN, GEIGY et KAUFFMANN (1965) obtiennent des infections après vingt-quatre repiquages. Mais comme le font observer JADIN, WÉRY, LE RAY et GATTI (1966), il s'agit là de souches récemment isolées sur animal puis en culture; il y a moins restauration de virulence que sélection de certaines lignées ayant gardé ce caractère de virulence.

De façon générale, nous voyons que dans un milieu particulièrement constant comme l'est un milieu de culture, les caractères des trypanosomes se modifient rapidement. En particulier, le pouvoir d'infectivité, devenu non fonctionnel, diminue. Il disparaît toujours chez les *Salivaria* et peut disparaître chez un *Stercoraria*, *T. lewisi*.

De plus, ce pouvoir d'infectivité des formes de culture est indépendant de leur capacité physiologique de vivre chez un organisme homéotherme. Suite à l'inoculation de cultures de *T. lewisi* renfermant des formes morphologiquement métacycliques, celles-ci se maintiennent chez l'hôte vertébré. Nous les retrouvons dans l'ascite et même dans le sang de l'animal jusqu'au quatrième jour suivant l'inoculation sans qu'elles entraînent le développement d'une infection. De même, des trypanosomes *rangeli* bien actifs se retrouvent dans l'exsudat péritonéal vingt-quatre heures après l'inoculation de cultures sans qu'une parasitémie s'ensuive. Chez *T. gambiense* « Eliane », les formes métacycliques en culture ne sont pas rares. Ceci montre bien que le pouvoir d'infectivité est un caractère réel et autonome des trypanosomes, indépendant de leur morphologie.

Les formes de culture sont généralement assimilées aux formes de l'hôte invertébré sur la base de leur morphologie et des conditions thermiques. Cette comparaison est quelque peu artificielle, comme le montre déjà la disparition du pouvoir infectieux en culture. Cela est confirmé par le fait que des triatomes absorbant plusieurs centaines de milliers de formes de culture ne s'infestent pas davantage que les triatomes absorbant quelques centaines de formes sanguines.

### 3.

L'étude des mécanismes de la virulence des trypanosomes au cours de leur *entretien mécanique* nous amène à distinguer dans la notion de virulence le pouvoir infectieux, le pouvoir pathogène et le pouvoir de résistance à la défense de l'organisme infecté.

Isolant une souche humaine de *Trypanosoma cruzi*, nous la voyons produire en première inoculation une parasitémie faible et des effets pathologiques marqués. Durant les premiers passa-



ges sur souris, la parasitémie augmente puis se maintient constante au cours des passages ultérieurs.

La même évolution du pouvoir infectieux se produit chez *T. gambiense* « P. » constamment entretenu sur cobaye. Au cours des passages, la parasitémie augmente en intensité et la souche s'adapte progressivement à son espèce hôte habituelle. De même chez *T. congolense*, la souche d'isolement le plus ancien provoque une parasitémie plus précoce, plus intense et plus longue chez le cobaye et plus massive chez la souris que la souche moins longuement entretenue sur ces animaux.

Inversément toute modification dans l'espèce de l'hôte entraîne une réduction du pouvoir infectieux du trypanosome. Ainsi nous voyons que le passage sur singe de *T. gambiense* « P. » exalté sur cobaye réduit fortement son pouvoir infectieux pour ce dernier.

En ce qui concerne le pouvoir pathogène, celui-ci s'atténue rapidement au cours de l'entretien mécanique de *T. cruzi* « J. » et rejoint celui manifesté sans modification par la souche « T. » durant trente passages mécaniques mensuels.

L'évolution inverse paraît à première vue se constater dans l'ensemble des *Salivaria*. A mesure que l'entretien mécanique se poursuit, nous voyons se réduire le temps de survie des animaux infectés. Il passe de 101 jours à 45 jours chez *T. gambiense* « P. » et rejoint ainsi celui observé chez les souches les plus anciennement entretenues. Mais si on considère le nombre de trypanosomes incomparablement plus élevé qu'au moment de l'isolement, il s'agit là en fait d'une diminution du pouvoir pathogène au cours de l'entretien mécanique. Cela s'observe fort bien chez la souche *T. gambiense* « P. »: à l'isolement, un cercopithèque inoculé ne manifeste de parasitémie qu'un seul jour et présente des signes cliniques six mois après l'inoculation; inoculée à deux cercopithèques après quatre ans d'entretien sur cobaye, la souche provoque eux des crises parasitémiques marquées et répétées mais n'entraîne la mort qu'au douzième mois.

L'atténuation et même la disparition du pouvoir pathogène au cours d'un entretien mécanique prolongé ne contredisent pas la notion classique de l'exaltation de la virulence par cet entretien. En effet, au cours de l'adaptation d'une souche à son hôte habituel, la réduction du pouvoir pathogène individuel du trypano-

some peut d'abord être compensée par l'augmentation numérique des parasites. Sa disparition chez une souche totalement exaltée n'est pas en contradiction avec le raccourcissement de la période de survie des animaux infectés, car alors l'intensité de la multiplication parasitaire est devenue suffisante pour entraîner la mort de l'hôte de manière indirecte, par exemple par des perturbations métaboliques ou circulatoires. Des faits analogues se constatent chez les souches exaltées de *Toxoplasma* ou de *Plasmodium*, où sont parasités tous les éléments susceptibles de l'être. Mais ce caractère pathogène est d'ordre quantitatif et est dû à un hyperparasitisme provoqué artificiellement. Il ne renseigne pas sur le caractère pathogène naturel de la souche, caractère qui est direct, d'ordre toxique et caractéristique de la souche.

De même que le pouvoir pathogène, le pouvoir de résistance des trypanosomes à la défense de l'hôte est progressivement réduit par l'entretien mécanique. Cela permet la guérison spontanée d'animaux massivement infectés comme le sont les cobayes inoculés avec *T. brucei*. L'entretien mécanique non seulement fait disparaître les distinctions antigéniques entre les espèces du groupe *Brucei* (DESOWITZ, 1960) mais il diminue le pouvoir de variation antigénique du trypanosome (ASHCROFT, 1960), réduisant ainsi ses possibilités d'éviter les défenses de l'organisme.

Cette évolution des caractères de la virulence des trypanosomes nous paraît principalement due à la plus grande constance génétique des hôtes successifs assurée par l'entretien mécanique.

La constitution génétique de l'hôte joue d'ailleurs un rôle dans sa résistance individuelle à l'infection.

Un même inoculum de *T. cruzi* à des animaux génétiquement plus homogènes, comme le sont les souris NMRI, entraîne chez eux des parasitémies plus semblables que chez des animaux moins sélectionnés comme les cobayes; la différence dans les infections individuelles d'un même lot est indépendante du trypanosome puisque les subinoculations à partir de souris plus parasitées n'exaltent pas la parasitémie. Nous effectuons les mêmes observations dans les groupes *Brucei* et *Congolense*.

Par ailleurs, la résistance de l'hôte n'est pas uniquement due à des phénomènes immunitaires. Le traitement par la cortisone

ne relance pas une parasitémie déclinante ni n'augmente la réceptivité des animaux à l'infection par *T. cruzi*. Ceci est confirmé par LAPIERRE et COSTE (1963) adaptant une souche asymptomatique de *T. gambiense* aux animaux de laboratoire. La cortisone seule ou conjuguée avec la splénectomie et le blocage du système réticuloendothélial n'augmentent pas l'infection ni ne multiplient les rechutes.

L'âge de l'hôte joue également un rôle dans sa résistance à l'infection: des rats ou des souris nouveaux-nés développent une infection par *T. cruzi* ou *T. lewisi* alors que les adultes ne s'infectent pas ou peu. Des passages en série sur ces animaux doués d'une résistance moindre augmentent le pouvoir infectieux de la souche et permettent finalement d'obtenir une infection marquée chez les animaux adultes. Cela suggère qu'en présence d'une défense atténuée de l'hôte, non seulement le pouvoir infectieux s'exprime librement mais il augmente, comme s'il se produisait chez le parasite une série de petites mutations normalement éliminées par la défense de l'hôte adulte et qui s'additionnent ici pour aboutir à une véritable restitution de virulence du parasite, lui permettant alors de dominer la résistance plus marquée de l'hôte adulte.

L'existence de mutations chez les trypanosomes est connue pour d'autres caractères. LEVADITI et MUTERMILCH (1909) ont montré que des contacts répétés avec les anticorps élèvent le niveau de résistance dans une population de trypanosomes. Les phénomènes de mutation sont particulièrement fréquents au niveau du pattern antigénique des trypanosomes. Chez un même animal, chaque rechute est due à une variante antigénique (WIJERS, 1959; ASHCROFT, 1960).

#### 4.

En ce qui concerne la flore bactérienne associée aux vecteurs des Trypanosomidés, nous avons pu constater dans nos élevages qu'environ 60 % des vecteurs de *T. cruzi* et 30 % des vecteurs de *T. lewisi* contiennent des germes cytochrome-oxydase positifs.

Chez *Glossina palpalis* à l'état sauvage, JADIN, WÉRY, Le RAY et GATTI (1966) isolent des germes du groupe des *Pseudomonas* chez 12 % des 289 insectes examinés. En 1946, BURTT

avait observé des bactéries dans la salive de 26 *G. morsitans* sur 3 856 glossines examinées et constatait une proportion hautement significative de mouches avec bactéries dans la salive parmi les mouches infectées par des trypanosomes.

Il ressort de ces résultats que les vecteurs les plus efficaces sont aussi ceux qui contiennent le plus souvent des germes cytochrome-oxydase positifs.

Les germes que nous avons isolés ne modifient pas la réceptivité, totale, de *Triatoma infestans* à *T. cruzi*.

Ces germes exercent une action directe sur les cultures de *T. cruzi* tant par leurs métabolites libérés que par leurs constituants. Cette action se traduit par une réduction de la multiplication et surtout par une modification du pouvoir infectieux des cultures. En particulier, le pseudomonas isolé chez une puce sauvage a permis, au moins durant les premiers repiquages, la conservation totale de l'infectivité d'une culture de *T. cruzi* alors que cette infectivité s'est réduite dans les cultures témoins et s'est annulée en présence d'autres extraits bactériens.

Un contact limité avec ce pseudomonas n'a pu restaurer l'infectivité d'une culture de *T. gambiense*, confirmant ainsi la disparition totale de ce caractère.

Nos observations rejoignent et confirment les conclusions de JADIN (1966a) suivant lesquelles les germes du tractus digestif du vecteur non seulement peuvent influencer l'évolution du trypanosome chez l'insecte mais peuvent également agir sur ses caractères héréditaires.

Notre étude de la virulence met donc en évidence la grande faculté d'adaptation des trypanosomes à un milieu déterminé qui sélectionne les parasites et leurs caractères favorables au développement dans ce milieu et élimine les caractères n'ayant plus de rôle à jouer. Chez l'hôte vertébré, cette adaptation se traduit en particulier par une augmentation du pouvoir infectieux et par une réduction du pouvoir pathogène pour l'hôte habituel. Simultanément se marquent une réduction du pouvoir infectieux et une accentuation du pouvoir pathogène pour les autres espèces animales. Cette adaptation est due à la constance génétique des hôtes successifs, qui entraîne à la longue la formation de souches spécialisées et restreintes dans leur propriétés générales.

Ces constatations sont confirmées par l'étude des réservoirs naturels des trypanosomes. *T. cruzi* évoluant chez les animaux sauvages se multiplie plus difficilement chez les animaux de laboratoire que les souches isolées de cas humains (DEANE *et al.*, 1963). Celles-ci ont dû passer par des hôtes vertébrés plus spécifiquement éloignés, comme dans la chaîne rongeur sauvage — chien — homme décrite par DIAZ-UNGRIA (1966). A l'extrême, *T. cruzi* maintenu en circuit fermé chez la Chauve-souris devient incapable d'infecter d'autres animaux (DEANE *et al.*, *op. cit.*).

Nous observons une évolution analogue dans le groupe *Lewisi*. Les souches typiques isolées chez *Rattus* sauvage infectent massivement et exclusivement les rats d'élevage sans produire d'effet pathogène et les rats guérissent spontanément. Par ailleurs, JADIN *et al.* (1960) décrivent l'isolement d'une souche morphologiquement identique à *T. lewisi* chez un Muridé congolais *Tatera sp.* Cette souche inoculée à d'autres espèces murines les tue en neuf jours alors que les *Tatera* sont indifférents à l'infection; chez tous les animaux, la parasitémie est intense. Inoculée à des rats blancs, cette souche provoque la mort de quelques individus au début de l'entretien mécanique. Par la suite, aucun décès n'est enregistré même après splénectomie préalable et traitement massif à la cortisone. Suivant les auteurs, les caractères biologiques (inocuité pour l'hôte d'origine, courbe de parasitémie, durée de l'infection) et sérologiques de cette souche la distinguent de *T. lewisi* et plaident en faveur d'une espèce différente appartenant au groupe *Lewisi*.

Nous voyons donc que, dans la nature, *T. lewisi* adapté depuis longtemps à *Rattus* s'y multiplie intensément et sans dommage puis est éliminé. Lorsque les circonstances écologiques l'introduisent et le maintiennent chez un autre Muridé, *Tatera*, il se produit une adaptation progressive du trypanosome à son nouvel hôte. Au début de cette véritable spéciation, la souche peut encore infecter son réservoir d'origine, *Rattus*, mais devient pathogène pour lui. Elle perd ensuite jusqu'à son pouvoir infectieux pour le Rat et devient une espèce biologique nouvelle tout en gardant la morphologie propre au groupe. Tel est le cas de *T. nabiasi* du Lapin (GREWAL, 1957) et des autres trypanosomes des rongeurs.

Nous retrouvons chez les *Salivaria* les mêmes phénomènes. Ils soulignent l'importance de la constitution génétique de l'hôte vertébré comme facteur sélectif des caractères des trypanosomes.

Dans le groupe *Brucei*, *T. brucei* n'infecte que les animaux sauvages, *T. rhodesiense* évolue dans un réservoir animal et se montre très pathogène pour l'homme tandis que *T. gambiense*, transmis régulièrement d'homme à homme, provoque une affection d'évolution plus lente qui devient même totalement inapparente chez certaines souches. A cette comparaison des pouvoirs pathogènes peut s'ajouter celle des modifications morphologiques. *T. brucei* et *T. rhodesiense* présentent dans la nature un polymorphisme beaucoup plus marqué que celui de *T. gambiense*.

Le rôle régulateur de la transmission cyclique ne modifie pas l'évolution générale des pouvoirs infectieux et pathogène que nous avons décrite. Au cours de l'expérience Tinde, après dix ans d'entretien cyclique de *T. rhodesiense* sur mouton (FAIRBAIRN et BURRT, 1946), sa virulence pour le mouton et pour le rat a diminué; la période d'incubation chez l'homme s'est accrue et la maladie clinique est moins sévère; les trypanosomes provenant de l'homme infectent moins de la moitié des rats inoculés et chez ceux-ci on retrouve peu de formes postéro-nucléaires.

By the accepted criteria for differentiating *T. rhodesiense* and *T. gambiense* it would appear as if this line of a known *T. rhodesiense*, maintained in sheep, were approaching a *gambiense* type.

Neuf ans d'entretien sur antilope et cinq ans d'entretien sur singe n'entraînent pas d'altération de ces caractères.

Vingt-trois ans plus tard (ASHCROFT, 1959), la baisse de virulence pour l'homme de la lignée sur mouton se confirme tandis que cette virulence s'est accrue par transmission sur antilope et sur singe. La constance génétique de l'hôte réservoir est donc bien le principal facteur d'une réduction de la virulence. Les animaux sauvages constituent pour le trypanosome un milieu génétiquement très hétérogène en comparaison de celui d'une race domestique.

Cette hétérogénéité empêche la sélection d'une population de trypanosomes spécialisée, génétiquement homogène. Ainsi, HAWKING et WALKER (1966) ont montré que des souches de *T. rhodesiense* et de *T. brucei* récemment isolées acquièrent

rapidement une arséno-résistance élevée alors qu'une vieille souche de laboratoire ne devient résistante que tardivement et faiblement. Pour ces auteurs, la souche récente était génétiquement hétérogène et le contact avec la tryparsamide a sélectionné les individus résistants tandis que la souche ancienne, homogène, ne renfermait plus d'individus résistants et ceux-ci sont apparus par mutation.

Nous voyons donc que les différents caractères des trypanosomes et en particulier ceux qui constituent leur virulence sont des caractères génétiques. Ceci rejoint l'opinion de HOARE (1943) concluant à l'existence chez les protozoaires parasites

(...) de races biologiques (...) indistinguables morphologiquement mais présentant des différences spécifiques d'ordre sérologique, de localisation dans les organes ou les tissus, dans leurs rapports avec l'hôte ou chez le vecteur (...) qui sont apparemment une partie de leur constitution génétique héréditairement fixée.

Ces caractères, beaucoup moins stables chez les *Salivaria* que chez les *Stercoraria*, sont soumis à une sélection d'autant plus marquée que la multiplication est plus élevée, comme c'est le cas lors de l'entretien mécanique ou en culture. De plus, ils sont sujets à une grande fréquence de mutations.

Si nous recherchons les structures génétiques responsables, le rôle du noyau ne paraît pas absolu. La reproduction sexuée n'a pu être mise en évidence ni chez l'hôte vertébré (VON BRANDT et TOBIE, 1960) ni chez le vecteur (AMREIN, 1965). Par contre, les Trypanosomidés sont caractérisés par la présence intracytoplasmique d'acide désoxyribonucléique localisé au niveau du kinétoplaste. Or, un taux élevé de mutations spontanées est caractéristique des systèmes génétiques cytoplasmiques (GIBOR et GRANICK, 1964). Le kinétoplaste paraît donc bien placé pour jouer un rôle important dans l'information génétique requise par le trypanosome. De plus, le kinétoplaste est en association constante avec le chondriome des Trypanosomidés (CLARK et WALLACE, 1960; STEINERT, 1960). Au microscope électronique (*fig. 6\**), la mitochondrie se constitue d'une double membrane aux replis

---

\* Due à l'obligeance de J.M. JADIN et J. CREEMERS, Laboratoire de Microscopie Electronique, Faculté de Médecine, Louvain.

internes plus ou moins nombreux dans laquelle s'encastre le kinétoplaste, disque composé de filaments d'ADN enroulés en spirales serrées. Cela permet au kinétoplaste de fournir l'information nécessaire à la synthèse des protéines mitochondriennes et en particulier des enzymes respiratoires (STEINERT, 1960).

VICKERMAN (1965) étudiant le groupe *Brucei* constate que les formes sanguicoles longues possèdent une mitochondrie réduite et non fonctionnelle dépourvue d'hémoprotéines cytochromiques et des enzymes du cycle de Krebs. Par contre, la mitochondrie est bien développée chez les formes sanguicoles courtes, destinées à évoluer chez la glossine, de même que chez les formes de culture. Une évolution mitochondrienne semblable a été observée chez *Leishmania* (RUDZINSKA, D'ALESSANDRO et TRAGER, 1964). Pour ces motifs, les souches *Brucei* monomorphes et les souches akinétoplastiques sont incapables d'évoluer chez l'insecte vecteur (VICKERMAN, 1962) ou de se multiplier en culture (TRAGER et RUDZINSKA, 1964).

Le kinétoplaste joue donc un rôle déterminant dans la transmission cyclique des Trypanosomidés en leur permettant de produire le mode respiratoire requis. Le pouvoir d'être transmis cycliquement constitue néanmoins un caractère génétique propre. Il est susceptible d'être éliminé malgré la persistance du polymorphisme et de l'ADN kinétoplastique, comme HOARE (1956) l'a observé chez *T. evansi*.

Ces faits permettent de comprendre l'importance du rôle joué par la flore bactérienne associée aux vecteurs des Trypanosomidés et en particulier par les germes du groupe des *Pseudomonas*.

Ces germes sont particulièrement riches en hémoprotéines (KAMEN, 1963). Or les travaux de LWOFF (1940) ont montré l'exigence en hématine des formes de culture des Trypanosomidés. Seul, *S. oncopelti* n'exige aucun apport en hématine (GUTTMAN, 1963) grâce à la présence d'une bactérie symbiote (PYNE, 1961; GILL et VOGEL, 1962).

Cette exigence en hémoprotéines est nettement plus marquée chez les *Salivaria* que chez les *Stercoraria*, en particulier dans le groupe *Brucei*. Chez ce dernier, HOARE (1956) souligne que le kinétoplaste y est le plus petit de ceux des *Salivaria* et qu'il est



fréquemment absent (*T. evansi*) ou même totalement disparu (*T. equinum*). Ce que STEINERT (communication verbale) traduit en termes biochimiques en constatant dans ce groupe la grande labilité des constituants mitochondriens, en particulier les cytochromes, et la nécessité de leur renouvellement constant par un apport extérieur.

Les germes du groupe des *Pseudomonas* sont donc particulièrement aptes à favoriser l'établissement et l'évolution des Trypanosomidés chez l'insecte vecteur en fournissant les hémoprotéines nécessaires au chondriome. Nous avons montré que leur présence chez différents vecteurs est d'autant plus fréquente que ces vecteurs sont meilleurs transmetteurs.

L'apport bactérien ne se limite vraisemblablement pas aux seules hémoprotéines. JADIN *et al.* (1966 b) ont montré que les acides aminés de ces germes interviennent dans la sporogonie de *Plasmodium* chez l'Anophèle. Un apport en acides nucléiques est également possible. *Entamoeba histolytica* utilise l'ADN des bactéries associées pour une partie au moins de la biosynthèse de son ADN nucléaire (ALBACH, SCHAFFER et WATSON, 1966).

Nos expériences ont prouvé que les germes du groupe des *Pseudomonas* sont capables d'agir sur les caractères génétiques des Trypanosomidés et en particulier sur leur virulence pour l'hôte vertébré.

Ici également, cette influence doit être la plus marquée chez les trypanosomes où les caractères génétiques sont les moins stables c'est-à-dire, comme nous l'avons montré, chez les *Salivaria* et en particulier dans le groupe *Brucei*.

Enfin, l'intervention de ces germes dans le métabolisme de l'insecte vecteur, déjà démontrée chez les Culicidés (JADIN *et al.*, 1966 b; BISOUX, 1966) leur permettrait de jouer un rôle important dans la dispersion des trypanosomiases.

## CONCLUSIONS

Nous avons tenté de dégager les principaux mécanismes de la virulence des Trypanosomes. Pour les comprendre, il faut envisager la virulence dans son sens le plus large et la considérer comme étant la somme ou l'ensemble des caractères manifestés par un Trypanosome et qui lui sont nécessaires pour se multiplier et maintenir l'existence de l'espèce à travers les différents milieux rencontrés.

La virulence dépend des relations existant entre les caractères des trypanosomes et les conditions du milieu où ils évoluent. Ces caractères sont soumis à une sélection d'autant plus marquée que les conditions de milieu sont plus constantes. Il s'ensuit la constitution de souches et d'espèces hautement spécialisées.

Chez l'hôte vertébré en particulier, la virulence se compose de trois caractères principaux: le pouvoir infectieux, le pouvoir pathogène et le pouvoir de résistance à la défense de l'organisme. L'adaptation à un vertébré déterminé se marque initialement par une augmentation du pouvoir infectieux et par une réduction du pouvoir pathogène pour cet hôte tandis que se réduit le pouvoir infectieux et qu'augmente le pouvoir pathogène pour les autres espèces animales. A la fin de la spéciation du Trypanosome, la réduction de son pouvoir de résistance à la défense de l'organisme peut limiter son pouvoir infectieux et entraîne la guérison spontanée de l'hôte. La transmission cyclique régularise cette évolution sans s'y opposer.

La virulence des trypanosomes pour l'hôte vertébré dépend donc principalement de la constitution génétique des hôtes successivement rencontrés qui modèle l'intensité exprimée par ces différents caractères et qui détermine l'avenir de la souche comme celui de son hôte.

Les caractères de la virulence sont beaucoup moins stables chez les *Salivaria*, en particulier dans le groupe *Brucei*, que chez les *Stercoraria*, en particulier chez *T. cruzi*.

Chez tous les trypanosomes, ces caractères sont capables d'une grande fréquence de mutations suggérant l'existence d'une hérédité cytoplasmique dont la possibilité est confirmée par la présence d'acide désoxyribonucléique au sein du kinétoplaste.

La relation étroite existant entre ce kinétoplaste et une mitochondrie fonctionnelle chez l'hôte vecteur souligne l'importance de toute action à ce niveau, et permet de comprendre le rôle de la flore bactérienne associée au tractus digestif du vecteur.

Les germes du groupe des *Pseudomonas* en particulier peuvent fournir les hémoprotéines exigées par la mitochondrie; ils exercent une action sur les caractères génétiques des Trypanosomes et ils peuvent intervenir dans le métabolisme de l'hôte vecteur.

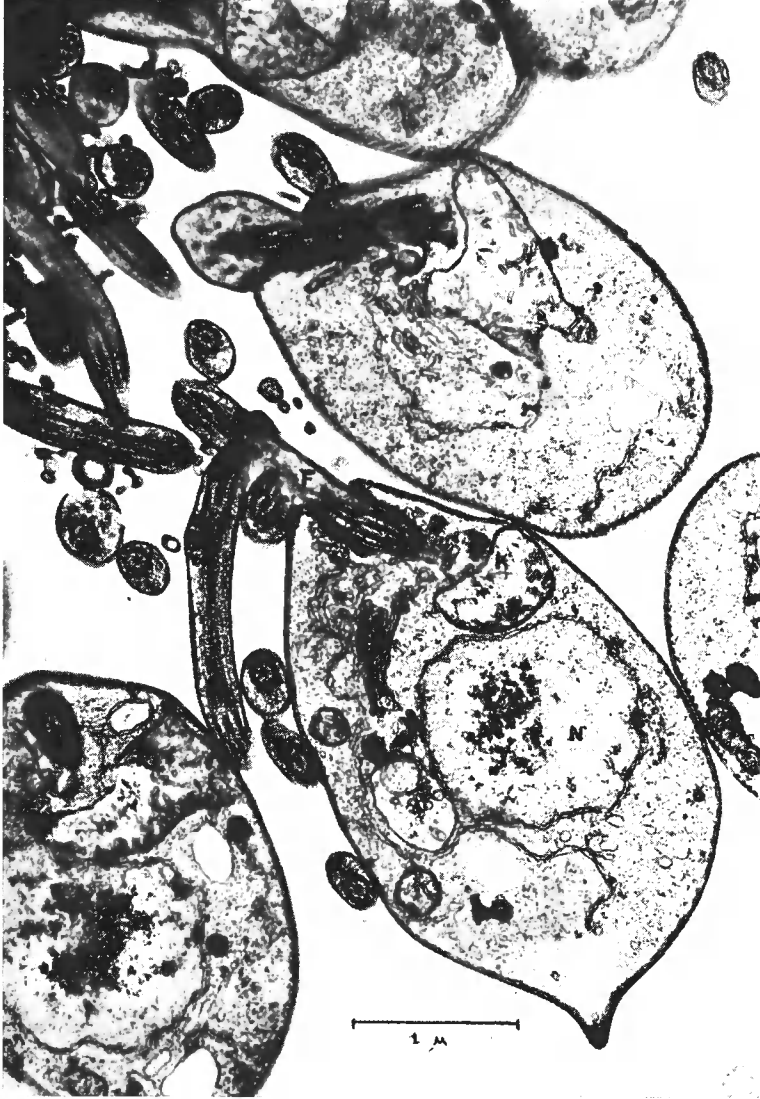


Fig. 6

*Leishmania tropica*, forme de culture

F: flagelle; K: kinéplaste et mitochondrie associée; N: noyau.



## BIBLIOGRAPHIE

1. ALBACH R.A., SCHAFFER J.G. & WATSON R.H., 1966: Autoradiographic studies of H<sub>3</sub>-Thymidine uptake in *Entamoeba histolytica* in CLG medium. *J. Protozool.* 13: 349-355.
2. AMREIN Y.U., 1965a: Genetic transfer in Trypanosomes. I. Syngamy in *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Paras.* 17: 261-263.
3. AMREIN Y.U., 1965b: Genetic transfer in Trypanosomes. II. Genetic transformation in *Trypanosoma equiperdum*. *Exp. Paras.* 17: 264-267.
4. AMREIN Y.U., GEIGY R. et KAUFFMANN M., 1965: On the reacquisition of virulence in trypanosomes of the *Brucei*-group. *Acta tropica* 22: 193-203.
5. ASHCROFT M.T., 1959: The Tinde experiment: a further study of the long-term cyclical transmission of *Trypanosoma rhodesiense*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 53: 137-146.
6. —, 1960: A comparison between a syringe-passaged and a tse-tse-fly transmitted line of a strain of *Trypanosoma rhodesiense*. *Ann. Trop. Med. Paras.* 54: 44-53.
7. BRESSLAU E.L. et SCREMIN L., 1924: Die Kerne der Trypanosomen und ihr Verhalten zur Nuclealreaktion. *Arch. J. Protistenk.* 48: 509.
8. BRUMPT E., 1913: Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundatus*. Rôle régulateur des hôtes intermédiaires. Passage à travers la peau. *Bull. Soc. Path. Exot.* 6: 172.
9. BURTT E., 1946: Salivation by *Glossina morsitans* on to glass slides: a technique for isolating infected flies. *Ann. Trop. Med. Paras.* 40: 141-144.
10. CLARK T.B. et WALLACE F.G., 1960: *J. Protozool.* 7: 115.
11. CORREA R.R. et FERREIRA O.A., 1959: Distribuição geographica, habitats e infecção de *Triatoma sordida* (Hemiptera, Reduviidae) no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1: 207-213.
12. DEANE M.P., DE BRITO T. et DEANE L.M., 1963: Pathogenicity to mice of some strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild animals of Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 5: 225-235.
13. DESOWITZ R.S., 1960: The antigenic relationship between polymorphic and monomorphic strains of the *Brucei* group Trypanosomes. *J. Protozool.* 7 (suppl.) Abstract 9a) p. 7.
14. DIAS E., 1939: Chagas disease: a comparative study of the susceptibility of four natural vectors to the experimental development of *Schizotrypanum cruzi*. Third International Congress for Microbiology, New York 1939 — Report of Proceedings 1940; 421-422.

15. DIAZ-UNGRIA, 1966: Transmission du *Trypanosoma cruzi* chez les Mammifères. *Ann. Parasit. hum. comp.* 41: 549-571.
16. FAIRBAIRN H. et BURTT E., 1946: The infectivity to man of a strain of *Trypanosoma rhodesiense* transmitted cyclically by *Glossina morsitans* through sheep and antelope: evidence that man requires a minimum infective dose of metacyclic trypanosomes. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 40: 270-313.
17. FLOCH et ABONNENC, 1945: cités par BRUMPT, Précis de Parasitologie, Paris, Masson, 1949, p. 327.
18. GALLIARD M., 1952: Recherches sur le cycle évolutif de *Trypanosoma cruzi* Chagas à propos de l'infestation péritonéale exclusive chez la souris. *Ann. Parasit. hum. et comp.* 27: 63-85.
19. GIBOR A. et GRANICK S., 1964: *Science*, 145: 890.
20. GILL J.W. et VOGEL H.J., 1963: *J. Protozool.* 10: 48.
21. GREWAL M.S., 1957: The life cycle of the British rabbit trypanosome, *Trypanosoma nabiasi* Railliet, 1895. *Parasitology* 47: 100-118.
22. GUTTMAN H.N., 1963: Experimental Glimpses at the Lower Trypanosomatidae. *Exp. Paras.* 14: 129-142.
23. HAWKING F. et WALKER P.J., 1966: Analysis of the development of arsenical resistance in Trypanosomes *in vivo*. *Exp. Parasit.* 18: 63-86.
24. HENRARD C. et PEEL E., 1950: L'hémoculture, moyen de diagnostic de la trypanosomiase. *Int. Sci. Comm. Tryp. Res.* 191: 254-256.
25. HERBIG-SANDREUTER A., 1957: Further studies on *Trypanosoma rangeli* 1920. *Acta tropica* 14: 193-207.
26. HOARE C.A., 1943: Biological races in parasitic protozoa. *Biol. Rev.* 18: 137.
27. —, 1956: Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. VIII. Revision of *Trypanosoma evansi*. *Parasitology* 46: 130-172.
28. JADIN J., CHANTRAINE J., PIERREUX G. et VAN BRAECKEL, G., 1960: Etude d'une souche congolaise de *Trypanosoma lewisi*. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 40: 907-914.
29. JADIN J. et WERY M., 1963: La culture des Trypanosomatidae. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 5: 831-842.
30. JADIN J., 1965: Les bactéries photosynthétiques pourpres peuvent-elles jouer un rôle dans la sporogonie des plasmodium? *Bull. Acad. Méd. Paris*, 149: 470-472.
31. JADIN J., WERY M., LE RAY D., et GATTI M., 1966a: Au sujet de la transmission de certains caractères biologiques chez les Trypanosomatidae. *Bull. Acad. R. Sc. Outre-Mer.* 453-465.
32. JADIN J., VINCKE I.H., DUNJIC A., DELVILLE J.P., WERY M., BAFORT J. et SCHEEPERS-BIVA M., avec la collaboration technique de WILLAERT E., 1966b: Rôle des *Pseudomonas* dans la sporogonie.

- nie de l'hématozoaire du paludisme chez le moustique. *Bull. Soc. Path. Exot.* 59: 514-525.
33. KAMEN M.D., 1963: On bacterial « cytochromoïds ». *Acta Chem. Scand.* 17 S 14,S 46.
34. LAPIERRE J. et COSTE M., 1963: Contribution à l'étude d'une souche de *Trypanosoma gambiense* (Féo) isolée d'un cas humain caractérisé par une durée de plus de 20 ans de parasitémie cliniquement inappréciable. *Ann. Parasit.* 38: 757-782.
35. LE RAY D., 1967: Intérêt de l'examen de l'ascite dans les infections expérimentales à Trypanosomidés. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* (sous presse).
36. LEVADITI C. et MUTERMILCH St., 1909: Le mécanisme de la création des variétés de trypanosomes résistant aux anticorps. *C.R.Soc. Biol.* 67: 49-51.
37. LIMBOS P. et JADIN J., 1963: Etude d'une souche peu virulente de *T. gambiense* isolée chez un Européen dans l'ex-Congo Belge. *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 5: 739-746.
38. LWOFF M., 1940: Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomidés. Monographies Institut Pasteur, 213 p.
39. MURGATROYD F. et YORKE W., 1937: Studies in chemotherapy. XIII. The changes observed in *T. brucei* during five years maintenance in the laboratory. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 31: 145-160.
40. — et —, 1937b: Studies in chemotherapy. XV. Observations on the loss of transmissibility by *Glossina morsitans* of *T. brucei* maintained in a European laboratory. *Ann. Trop. Med. Paras.* 31: 173-194.
41. NICOLLE P. et MATHIS M., 1941: Le thermotropisme, facteur déterminant primordial pour la piqûre des Réduvidés hématophages. *C.R.Soc. Biol.* 135: 25.-27.
42. PYNE C.K., 1961: Etude de la structure infra-microscopique de *Strigomonas oncopelli*. Abstracts of the 1st Internat. Confer. of Protozoology, 172.
43. REGO S.F.M., 1956: Sobre o encontro de formas tissulares do *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909 no sangue circulante de camundongo branco (*Mus musculus*) *Folio clin. et biol.*, 26: 17-46.
44. RODHAIN J., PONS J., VAN DEN BRANDEN F., et BEQUAERT J.: Rapport sur les travaux de la Mission scientifique du Katanga. Bruxelles, Hayer, 1913.
45. ROUBAUD E. et COLAS-BELCOUR J., 1948: Epreuve sur glossines de la non-transmissibilité cyclique de souches de *Trypanosoma gambiense* entretenues au laboratoire. *Bull. Soc. Path. Exot.* 41: 343.
46. ROUDSKY D., 1910a: Sur l'inoculation de cultures de *Trypanosoma lewisi* Kent au rat blanc et sur la réceptivité de la souris blanche à ce trypanosome. *C.R. Soc. Biol* 68: 421-422.



47. —, 1910b: Sur la réceptivité de la souris blanche à *Trypanosoma lewisi* Kent. *C.R. Soc. Biol.* 68: 458-460.
48. RUDZINSKA M.A., D'ALESSANDRO P.A. et TRAGER W., 1964: The fine structure of *Leishmania donovani* and the role of the kinetoplast in the Leishmania-Leptomonad transformation. *J. Protozool.* 11: 166-191.
49. SILVA L.H.P. da 1959: Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 1: 99-118.
50. STEINERT M., 1960: Mitochondria associated with the kinetoplast of *Trypanosoma mega*. *J. Bioph. Biochem. Cytol.* 8: 542-546.
51. TRAGER W., 1959: Tse-tse-fly tissue culture and the Development of Trypanosomes to the infective Stage. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 53: 473-491.
52. TRAGER W. et RUDZINSKA M.A., 1964: The riboflavin requirement and the effects of acriflavin on the fine structure of the kinetoplast of *Leishmania tarentolae*. *J. Protozool.*, 11: 133-145.
53. VICKERMAN K., 1962: *Trans Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 56: 487.
54. —, 1965: Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes. *Nature* 208: 762-766.
55. VON BRAND T. et TOBIE E.J., 1960: The mechanism of elimination of certain strains or species of trypanosomes when mixed in experimental infection. *J. Parasit.*, 46: 129-136.
56. WEINMAN D., 1957: Cultivation of Trypanosomes. *Trans R. Soc. Trop. med. Hyg.*, 15: 153.
57. WIJERS D.J.B., 1959: Polymorphism in *Trypanosoma gambiense* and *T. rhodesiense* and the significance of the intermediate forms. *Ann. Trop. Med. Paras.* 53: 59-68.
58. YOELI M., MOST M. et BONE G., 1965: The natural history of *Plasmodium berghei* in the field and under experimental condition. *Ann. Soc. belge Med. Trop.* 45: 267-274.

## TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ . . . . .	3
SAMENVATTING . . . . .	3
I. INTRODUCTION . . . . .	5
II. EXPÉRIMENTATION: . . . . .	7
1. Transmission cyclique de <i>T. cruzi</i> . . . . .	7
1.1. Infestation de <i>Triatoma infestans</i> . . . . .	7
1.2. Transmission cyclique . . . . .	8
1.3. Isolement d'une souche humaine . . . . .	8
2. Inoculation de cultures . . . . .	12
2.1. <i>T. cruzi</i> . . . . .	12
2.2. <i>T. lewisi</i> . . . . .	16
2.3. <i>T. rangeli</i> . . . . .	16
2.4. <i>T. gambiense</i> . . . . .	17
3. Entretien mécanique . . . . .	17
3.1. <i>T. cruzi</i> . . . . .	17
3.2. Les <i>Sa'ivaria</i> . . . . .	19
4. Les germes cytochrome-oxydase positifs . . . . .	20
4.1. Présence chez le vecteur . . . . .	21
4.2. Action chez <i>T. infestans</i> . . . . .	21
4.3. Action sur les cultures . . . . .	22
III. DISCUSSION . . . . .	25
IV. CONCLUSIONS . . . . .	39
V. BIBLIOGRAPHIE . . . . .	41
TABLE DES MATIÈRES . . . . .	45





---

Achévé d'imprimer le 23 août 1968  
par l'Imprimerie SNOECK-DUCAJU et Fils, S.A., Gand-Bruxelles