

Test *Xenopus* à Costermansville

PAR

P. H. VERCAMMEN-GRANDJEAN.

Le diagnostic précoce de la grossesse intéresse le médecin et l'a toujours intéressé au plus haut degré.

Les découvertes des réactions de Aschheim-Zondek (1) et de Friedman (2) avaient grandement facilité la tâche et, malgré une avalanche de procédés nouveaux, pour la détermination précoce de l'état de grossesse, ce sont encore les tests précités qui conservèrent le maximum de faveur.

Pourtant, dans certains cas qui relèvent de la chirurgie, tels que, par exemple, les grossesses extra-utérines et les môles hydatiques, il convient d'obtenir des résultats plus rapides encore que ceux fournis par les tests de Aschheim-Zondek ou de Friedman, lesquels demandent respectivement et au minimum : 96 et 36 heures.

Nous avons dit que, depuis la trouvaille de Aschheim et Zondek, il y a un peu plus de vingt ans, quantité de procédés nouveaux avaient été proposés (3). On les estime à plus de vingt, soit à raison d'un par année.

Parmi ces réactions, nous citerons l'étude du zoologue L. T. Hogben, laquelle, publiée en 1930, permit à C. W. Bellerby en Angleterre (1934) et à Shapiro et Zwarenstein en Afrique du Sud (1934), de préconiser le test sur le crapaud à griffes, appelé encore plus communément : test *Xenopus laevis* (4).

Cette méthode, considérée comme très précise, ramenait les temps du diagnostic entre 6 et 18 heures. Treize ans plus tard, C. Galli Maïnini en Amérique du Sud, inventa la réaction qui porte son nom et qui abaissa encore les limites du temps entre 2 et 4 heures (5).

Les deux méthodes précitées fournissaient désormais des résultats rapides et sûrs à raison de 98 et même 99 %, tels qu'ils sont exigés par la chirurgie et l'obstétrique. Les avantages comparatifs entre les méthodes de Aschheim-Zondek, Friedman et *Xenopus laevis* furent clairement énoncés par Weisman (6).

* * *

Principes endocrinologiques : Qu'il s'agisse de *Xenopus laevis* ou de *Bufo* de n'importe quelle espèce appropriée au test, le principe du test sur crapaud est actuellement bien connu et est basé sur la présence, dans les urines d'une femme fécondée depuis peu, de quantités importantes d'hormones gonadotropes.

Lorsqu'une petite quantité de ces urines est injectée à une grenouille (*), les hormones, ou gonadotropines chorioniques, agissent aussitôt très activement sur les ovaires ou les testicules de la bête, provoquant, dans un temps limité, soit oviposition (*Xenopus laevis*), soit spermatogénèse (*Bufo* divers).

Notons immédiatement, à propos de *Xenopus*, que la gonadotropine chorionique n'est pas seule à provoquer le phénomène précité et que des doses, assez fortes toutefois, de progestérone, de testostérone et de stéroïdes corticaux peuvent également amener l'oviposition (7).

Magnus Haines (8), résume, à propos de *Bufo*, les études endocrinologiques de Rugh (1937) lesquelles aidèrent Galli Mainini (1947) dans l'application pratique du test qui porte son nom. Le spermatozoïde se trouve normalement dans des grappes attachées aux cellules de Sertoli. L'effet de la gonadotropine détermine d'abord un gonflement des cellules de Sertoli, puis l'échappement d'un enchevêtrement de spermatozoïdes par les tubes séminifères. Ce phénomène est fort rapide et, en s'amorçant en quelques dix minutes, il est fréquemment intégral en une demi-heure. Les spermatozoïdes mûrs passent rapidement, par le canal déférent, dans les uretères d'où ils peuvent être soit expulsés soit conservés temporairement dans la vessie.

(*) Nous employons indifféremment les termes « grenouille » et « crapaud », ces deux noms ayant perdu le sens restreint qu'on leur prêtait dans le passé.

Remarquons ici que Galli Maïnini a démontré expérimentalement que, par la méthode qu'il a mise au point, les spermatozoïdes ne sont pas éjaculés par *Bufo* et que l'on peut, dès lors, les retrouver très aisément par sondage du cloaque. Cette heureuse circonstance est évidemment le facteur le plus important de la méthode.

* * *

A Costermansville (chef-lieu de la Province du Kivu), le Laboratoire Médical Provincial est équipé pour effectuer normalement les tests de Aschheim-Zondek et de Friedman. Cependant, ces systèmes de contrôle de la grossesse sont, comme nous l'avons dit déjà, longs et, de plus, assez onéreux. Et si, financièrement parlant, ils sont à la portée des Européens, il n'est néanmoins pas possible d'en user au profit des populations indigènes.

Il importait donc de recourir à un autre procédé moins coûteux.

Comme des crapauds du genre *Bufo* se trouvent facilement dans les rivières et collections naturelles d'eaux, voisines de la cité, c'est la réaction de Galli Maïnini qui fut adoptée. Des chasses périodiques furent organisées, afin de réunir et de maintenir le stock constant de matériel vivant nécessaire. Un jour, parmi les captures ainsi faites, nous rencontrâmes un crapaud d'un type tout différent et que nous reconnûmes bientôt comme étant du genre *Xenopus* et probablement d'une espèce très voisine du *X. laevis* Daudin d'Afrique du Sud, et dont E. Elkan donne une bonne description (4).

C'est cette constatation qui nous détermina à tenter des épreuves de grossesse sur notre nouveau pensionnaire et le résultat nous parut extrêmement satisfaisant.

* * *

Résultats : En six semaines, du 15 novembre au 30 décembre 1949, nous avons réuni les résultats expérimentaux de 46 essais sur 116 *Xenopus*, opérations contrôlées, d'autre part, à l'intervention du service routinier du Laboratoire Médical Provincial, au moyen d'épreuves sur *Bufo* par la manière de Galli Maïnini. En voici les résultats :

	Tests <i>Xenopus sp.</i>	Tests <i>Bufo sp.</i>
Cas négatifs	32	34
Cas positifs	11	12
Cas indéterminés... ..	3	—

Trois cas sont restés indéterminés, par suite de la mort prématurée des crapauds. Nous croyons en fait que ces morts sont dues à l'utilisation d'urines peu fraîches, devenues pathogènes pour les batraciens.

Pour le reste, sauf deux cas, il y eut concordance parfaite entre les résultats obtenus par l'une ou l'autre méthode.

Dans un des deux cas précités, nous avons enregistré un résultat positif là où le Galli Mainini révélait un essai négatif. Dans l'autre cas, ce fut l'inverse. Comme ces tests furent effectués pour le contrôle de grossesse de femmes indigènes et que celles-ci ne se sont pas représentées à l'hôpital depuis, il nous est impossible de dire laquelle des deux méthodes fit défaut dans chacun de ces cas.

* * *

Trois cas particuliers, relevant de la chirurgie, furent rencontrés au cours de nos études : une grossesse extra-utérine, une môle hydatique et un chorio-épithéliome.

Dans le cas de la môle, qui avait été diagnostiquée cliniquement, nous avons procédé intentionnellement à des injections d'urine en quantités variables, soit de 0,5, 1 et 1,5 cc. Voici les résultats :

0,5 cc. : pas d'oviposition.

1,0 cc. : oviposition très abondante.

1,5 cc. : oviposition, mais moins importante qu'avec 1 cc.

Deux *Xenopus* furent utilisés pour chacun des essais et les résultats furent identiques pour chaque couple.

En ce qui concerne le chorio-épithéliome, on pourrait évidemment arriver à le diagnostiquer par dosage des hormones dans les urines. Mais les méthodes de ces dosages sont compliquées et, en général, hors de la portée des praticiens coloniaux.

* * *

Technique : Toute simple et facile, elle est, à peu de choses près, celle du test *Xenopus laevis* et préconisée, entre autres, par E. Elkan (4), sans aucune concentration des urines. Le procédé par concentration alourdit considérablement la méthode et nécessite un prudent réajustement du pH. D'autre part, il peut conduire à certaines aberrations, ainsi que l'explique très bien E. Elkan (4).

Nous rappellerons le mode opératoire en quelques mots.

Les urines fraîches et du matin, si possible (nous les prélevons par sondage), sont filtrées systématiquement, afin d'écartier des impuretés éventuelles. On en prélève 2 cc. que l'on injecte dans les sacs lymphatiques dorsaux d'un *Xenopus*, juste au-dessus des papilles anales, lesquelles sont un des caractères différentiels principaux de la femelle (*). On peut procéder sur 2, 4 ou même 6 crapauds, mais 4 est, à notre avis et de celui de certains auteurs, bien suffisant.

L'animal est placé dans un bocal blanc, de $8 \times 8 \times 20$ cm. environ, au fond duquel un treillis, à mailles de 3 ou 4 mm. et surélevé de 1 à 2 cm., est posé. Ceci, afin qu'au moment de la ponte, les œufs, en tombant au fond du récipient, à travers le tamis, soient automatiquement mis hors de portée du crapaud qui aurait, paraît-il (nous ne l'avons jamais constaté), la fâcheuse habitude de dévorer son propre frai.

Pratiquement, il est recommandable de maintenir la bête immobile au moment de l'injection, à l'aide d'un linge bien sec. L'épiderme de *Xenopus* est, en effet, très lisse et très gluant.

L'aiguille à injection doit être aussi fine que possible et longue de 1 à 1,5 cm.

Il y a lieu d'éviter de piquer dans les tissus profonds, sous peine de toucher grièvement l'animal et de provoquer sa mort. On fait pénétrer l'aiguille à 5 ou 6 cm. sous la peau et l'on constate aisément que l'on est dans les sacs lymphatiques par le fait que l'extrémité de l'aiguille peut voyager librement latéralement sans rencontrer de résistance.

(*) La distinction entre mâles et femelles est aisée. La femelle possède deux petites papilles anales très caractéristiques et bien développées. Le mâle en possède aussi, mais si petites qu'elles sont à peine apparentes. La femelle est également plus grosse que le mâle.

Au moment de l'injection lente des 2 cc. d'urine, la peau du batracien se décolle visiblement sur une superficie de 2 à 3 cm².

Dans le flacon où la grenouille est introduite, on aura pris la précaution de verser une quantité d'eau propre, de quoi recouvrir l'animal, pas plus. Le bocal est recouvert d'un treillis moustiquaire ajusté au récipient.

Au bout de 6 heures, si le test est positif, le *Xenopus* commencera à pondre. S'il n'a pas pondu après 16 à 18 heures, le test est à considérer comme négatif (7). Si certaines des grenouilles qui constituent un même test ne pondent pas, le résultat doit tout de même être considéré comme positif.

Nous avons pu observer exceptionnellement un cas de ponte en 4 h. 45 m.

Après l'expérience, les grenouilles ayant offert un résultat positif sont mises en repos pendant un mois, dans un réservoir distinct, avant réemploi. Celles qui n'ont pas pondu sont mises dans un autre réservoir pendant une semaine. Il convient donc de disposer de quatre réservoirs pour assurer un cycle convenable de repos à toute grenouille employée.

* * *

Conservation et élevage : Pour s'y livrer, il faut disposer d'au moins trois réservoirs. Un pour la conservation, un pour la reproduction et un pour l'élevage des jeunes têtards.

Le problème de l'alimentation a été résolu comme suit : ne disposant pas aisément de la viande fraîche dont se nourrissent ordinairement les *Xenopus* de laboratoire (4), nous leur fournissons des larves de muscides de genres divers et entre autres de *Chrysomyia*, qui pullulent en certains endroits des agglomérations indigènes. Les *Xenopus sp.* en sont très friands et nous avons pu constater, lors de la régurgitation spontanée du contenu stomacal, au cours de certains essais, que des crapauds remettent plus de trente larves encore non digérées et parfois vivantes.

Les repas se donnent, deux ou trois fois par semaine, copieusement, et deux heures après cette opération, l'eau des réservoirs est changée complètement.

Par ailleurs, nos réservoirs sont disposés en cascades et alimentés en eau courante.

* * *

Comparaison entre tests Bufo sp. et Xenopus sp. : Nous croyons qu'il peut être intéressant de donner les raisons pour lesquelles nous préférons la méthode *Xenopus sp.* à celle du *Bufo sp.* Sur le tableau ci-dessous nous mettons en évidence les avantages et inconvénients de chacune des méthodes.

Test *Bufo sp.*

- 1) Résultats en 2 à 4 heures.
- 2) La constitution d'un stock de *Bufo* ne peut se faire en laboratoire vu les qualités mi-terrestres mi-aquatiques de *Bufo*.
- 3) *Bufo* mâle peut, à certaines époques, détenir des spermatozoïdes et provoquer des plus volumineuses erreurs.
- 4) L'injection de 5 cc. d'urine, telle qu'elle est pratiquée à Costermansville, rend l'existence de *Bufo* fort précaire après le test.
- 5) Certaines jeunes femelles *Bufo* ressemblent à des mâles, d'où obtention de résultats tronqués.
- 6) *Bufo* répugne à se nourrir en captivité; du moins n'y sommes-nous pas parvenus.
- 7) Le test *Bufo* demande l'opération finale du sondage cloacal et la recherche au microscope de spermatozoïdes éventuels.
- 8) Toutes les opérations ne peuvent être confiées à n'importe quel assistant noir. Il faut un microscopiste.

Test *Xenopus sp.*

- 1) Résultat en 6 à 18 heures.
- 2) *Xenopus* se conserve très bien en aquarium.
- 3) *Xenopus* femelle ne pond pas en captivité; il n'y a accolement avec le mâle que si elle a subi une injection de gonadotropines.
- 4) Les 2 cc. d'urine injectée à *Xenopus* ne le tue pas et il peut être réutilisé économiquement après un repos convenable.
- 5) Les femelles, plus volumineuses se distinguent aisément des mâles grâce à l'existence chez elle de deux papilles anales bien apparentes tandis qu'elles sont quasi invisibles chez le mâle.
- 6) *Xenopus sp.* se nourrit très facilement et économiquement.
- 7) Le test *Xenopus sp.* donne un résultat macroscopique net et définitif.
- 8) Toutes les opérations peuvent être confiées à un noir, à salaire peu élevé, après une courte instruction.

Il est évident que ces diverses considérations ne visent que les batraciens *Bufo sp.* et *Xenopus sp.* locaux et utilisés ici, à

Costermansville. Remarquons, par exemple, que les *Bufo sp.* ne supportent pas les 10 cc. d'urine proposés par Galli Mainini et qu'il a fallu réduire l'injection à 5 cc.

Nous avons eu la chance de trouver des *Xenopus* locaux propres à la réaction et estimons simplement que, étant données les qualités du test *Xenopus*, nous devons lui donner la préférence.

* * *

Conclusions : Il paraît bien, en définitive, que nous puissions arriver assez facilement et rapidement à appliquer au test *Xenopus sp.* une routine opératoire telle qu'elle assure le maximum d'effcience et de précision. Nous donnerons ultérieurement un complément d'information en ce qui touche l'exactitude des résultats et les techniques opératoire et d'élevage.

Il nous est un devoir très agréable de remercier pour leur aide, appui, contribution et conseils précieux dans le présent travail, M. le docteur A. Duren, Inspecteur Général de l'Hygiène du Ministère des Colonies, M. le professeur docteur J. P. Bouckaert, de l'U. C. L., M. le docteur J. Delhaye, Médecin à l'Hôpital des Noirs à Costermansville, M. Legros, Aux. Médical au Laboratoire Médical Provincial de Costermansville, M. Laurant, Dr. Sc., de l'I. R. S. A. C. à Uvira, et spécialement, pour leur appui direct et leurs encouragements, M. le docteur R. Devignat, Médecin-Directeur du Laboratoire Médical Provincial de Costermansville et M. le docteur L. Bienfait, Médecin-Directeur de l'Hôpital des Noirs de Costermansville. Enfin, nous remercions pour le bienveillant intérêt qu'il nous a témoigné, M. le médecin provincial du Kivu, Dr. L. Hoebeke.

Laboratoire Médical de Costermansville.

Samenvatting. — In de omgeving van Costermansstad woont een *Xenopus* soort, verwant aan *Xenopus laevis*, welke zoals deze laatste kan aangewend voor de test van zwangerschap.

Het dier kan zonder bijzondere moeilijkheid langdurig in het laboratorium behouden worden. Het voed zich gewillig in gevangenschap.

Auteur geeft de voorkeur aan den *Xenopus* test tegenover de

Bufo test en steunt zijn mening met een vergelijking in tabellevorm der nadelen en voordelen der twee technieken.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Aschheim-Zondek. *Klin. Wschr.*, 1928, 7, 8.
 2. Friedman, M. H. — *Amer. J. Physiol.*, 1929, 90, 617.
 3. *The Lancet*, 1948, 977.
 4. Elkan, E. — *Pr. Méd.*, 1939, 16, 308.
 5. L. de Gennes. — *Pr. Méd.*, 1947, 63, 728.
 6. Weisman, A. I. et al. — *Am. J. Obst. & Gynec.*, 1942, 43, 135.
 7. Hamblen, E. C. — *Endochr. of Wom. Thomas Publ. Springf.*, 1947, 254.
 8. Magnus Haines. — *The Lancet*, 1948, 923.
-