

Inoculations de spirochètes et de protozoaires sur membrane chorio-allantoïdienne de poulet

PAR

J. RODHAIN et L. van den BERGHE.

Ainsi que l'un de nous l'a rappelé dans une note publiée dans les *Acta Biologica Belgica*, la première observation du développement d'un spirochète : *Borrelia gallinarum* sur embryon de poule remonte à 1907 (1). Depuis, jusqu'en 1938, aucune nouvelle tentative de cultiver des protozoaires sur membrane chorio-allantoïde de poulet ne fut faite. Mais, à partir de cette date, après l'essai positif de E. Biocca (2) qui réussit à infecter des embryons de poule du 8^e au 14^e jour, avec *Trypanosoma brucei*, les tentatives se multiplièrent. Nous les avons consignées dans le tableau ci-dessous, dans lequel nous avons aussi inscrit celles que personnellement nous avons faites en collaboration.

Pour la technique suivie nous avons employé celle simplifiée que L. van den Berghe a décrite dans la note sus-mentionnée. Nous ne croyons pas inutile de la reproduire ici.

L'œuf est lavé à l'alcool, puis au moyen d'une aiguille trépan on perfore le pôle arrondi au milieu de la poche d'air, puis le flanc de la coquille à hauteur de l'ombre que projette l'embryon. La poche d'air est ensuite déplacée vers le flanc supérieur de l'œuf couché, grâce à une suction exercée sur le pôle arrondi perforé.

Le diamètre de l'orifice permet le passage d'une aiguille du type intradermique n° 5, écourtée à 0,05 m. et montée sur une

TABLEAU I

Inoculations de protozoaires sur membrane chorio-allantoïdienne de poulet

Désignation des auteurs	Inoculations positives obtenues avec :	Inoculations négatives enregistrées avec :
Borrel et Levaditi 1907 (3) .	<i>Borrelia gallinarum</i>	—
Bessemans A. et de Meirsman A., 1938 (4).	—	<i>Treponema pallidum</i> (souche Gand)
Biocca E., 1938 (2)	<i>Trypanosoma brucei</i>	—
Morrow G., Syverton J. T., Stilles N.-W. et Berry G.- P., 1938 (5).	<i>Leptospira ictero-hemorra- giae</i>	—
Nelson P.-M., 1938 (6) . . .	<i>Trichomonas foetus</i>	—
Chabaud A., 1939 (7)	<i>Borrelia duttoni</i> <i>Leptospira ictero-hemor- ragiae</i> <i>Trypanosoma rhodesiense</i> <i>Trypanosoma brucei</i> <i>Trypanosoma equinum</i>	— — <i>Trypanosoma lewisi</i> — —
Hogue M.-J. 1939 (8)	<i>Trichomonas foetus</i>	—
Leyne N.-D., Brandly A., Graham R., 1939 (9).	<i>Trichomonas foetus</i> <i>Trichomonas muris</i>	— —
Longley J.-B., Clausen N.-M. et Tatum A.-G., 1939 (10) .	<i>Trypanosoma rhodesiense</i> <i>Trypanosoma equiperdum</i> <i>Trypanosoma brucei</i> <i>Trypanosoma evansi</i> <i>Trypanosoma hippicum</i>	<i>Trypanosoma lewisi</i> — — — —
Mitchell Ch.-A., Walker R.- V.-L., Heath L.-M. et Mc. Kercher D.-G., 1939 (11) .	<i>Trypanosoma equiperdum</i>	—
Roubaud E. et Romana J., 1939 (12).	<i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Trypanosoma gambiense</i> <i>Trypanosoma dimorphon</i>	— — —
Dubois A., 1940 (13)	<i>Spirillum minus</i>	—
Hallauer C. et Kuhn H., 1940 (14).	<i>Trypanosoma brucei</i>	—
van den Berghe L., 1941 (1).	<i>Trypanosoma evansi</i>	—
Rodhain J. et van den Berghe L., 1943.	<i>Borrelia duttoni</i> <i>Trichomonas foetus</i> <i>Leishmania infantum</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Trypanosoma brucei</i> <i>Trypanosoma evansi</i> <i>Trypanosoma gambiense</i>	<i>Treponema vesiculae</i> <i>Plasmodium gallinaceum</i> <i>Trypanosoma vesperilionis</i> <i>Trypanosoma pipistrelli</i> <i>Trypanosoma saimiri</i> <i>Trypanosoma rotatorium</i> <i>Trypanosoma fringillae</i> <i>Trypanosoma congolense</i>

seringue de 1 cc. graduée en 50 divisions. Cinq tours d'une virole calibrée sur le piston, soit 0,1 cc. du liquide infectant, dilué de moitié avec du liquide de Tyrode, sont injectés à la seringue au niveau de la poche d'air déplacée. Les deux perforations de la coquille sont alors oblitérées à la paraffine et les œufs remis à la couveuse entre 37° et 39°.

Les œufs ont été tous inoculés au 10^e jour d'incubation sauf certains au 14^e, et dans ce cas cette particularité est indiquée.

Avant de commenter les résultats de nos essais il nous faut les exposer avec quelques détails.

Nous commencerons par ceux qui ont été suivis de succès et dont certains constituent une confirmation des observations publiées par d'autres avant nous.

1) *Borrelia duttoni*. — Un premier ensemencement fait le 30-X-39 sur trois œufs, fut positif le 4-XI. A partir de l'œuf infecté nous avons réussi trois passages successifs, le 4^e, négatif, interrompit la série.

Un deuxième départ fait le 7-XI-39 permit deux passages positifs, le troisième fut négatif; enfin un troisième départ, commencé le 5-XII, donna lieu à quatre passages positifs comme suit :

5-XII sur trois œufs, positifs le 11-XII; 2^e passage positif le 15; 3^e passage positif le 20; 4^e passage positif le 23; 5^e passage négatif le 27, tous les embryons furent trouvés morts.

Dans l'ensemble, les trois départs réussissent et fournissent des succès, respectivement, un jusqu'au 2^e, un jusqu'au 3^e et un jusqu'au 4^e passage.

Les cultures obtenues sont extrêmement abondantes, formant un enchevêtrement de spirochètes réellement impressionnant.

2) *Trichomonas foetus*. — Les deux essais réalisés furent tous deux suivis de succès.

1^{re} essai, le 7-II-41 sur trois œufs. Le 11-II un embryon est trouvé mort; un négatif, le troisième positif. Le passage à partir de ce dernier sur 3 nouveaux œufs donna 2 positifs, un négatif, l'embryon ayant succombé. Au cours du 3^e passage deux embryons furent trouvés morts, un troisième vivant, tous négatifs.

2° *essai*, le 19-II-41 sur deux œufs. Tous les deux étaient positifs le 21. Au cours du 2° passage, le 21-II les deux embryons morts le 25 étaient parasités; le 3° passage à partir de l'un d'entre eux fut suivi d'insuccès, les trois embryons étaient morts le 28 et non infectés.

Au cours de ces deux essais nous avons inoculé les trichomonas de l'embryon dans le péritoine de trois jeunes poussins, dont deux avec l'œuf positif du 11-II et qui fournit un passage positif; et un avec des flagellates prélevés hors des œufs positifs le 21-II.

Toutes ces inoculations restèrent négatives, les poussins éclos se montrèrent réfractaires à l'infection (confirmation des essais de M. J. Hogue (6).

3) *Leishmania infantum*. — La culture qui a servi à ces expériences provenait de Palestine d'où elle nous avait été envoyée par le Professeur Adler. Nous avons effectué deux essais. Le premier, le 8-VIII-39 au moyen d'une culture sur NNNensemencée le 1-VIII-39 sur quatre œufs, fournit un résultat négatif; le deuxième effectué à la même date sur deux œufs mais avec une culture plus riche du 17-III-39 réussit. Le passage réalisé le 14-VII fut négatif, les embryons moururent.

4) *Trypanosoma cruzi*. — Trois essais ont été effectués au moyen de culture d'une souche conservée depuis plusieurs années à l'Institut de Médecine Tropicale et provenant de l'Institut Oswaldo Cruz de Rio de Janeiro. Le trypanosome avait passé par mallophage, la culture en était à son 110° passage sur NNN.

Le premier essai effectué le 15-XII-39 sur trois œufs donna le 17 un embryon mort, le 19 et le 21 des embryons vivants infectés. Un deuxième passage pratiqué au moyen du dernier embryon le 21-XII sur trois œufs fournit un embryon mort et un vivant le 29; tous deux négatifs. Le troisième œuf écloit le 2-I-40 donnant un poussin vivant indemne de trypanosomes.

Au cours du deuxième essai pratiqué le 19-I-40 sur quatre œufs, un seul embryon fut trouvé infecté le 24; les 3 autres œufs examinés le 26, fournirent deux morts; le 3° vivant et non

trypanosé. L'embryon trouvé positif le 24 fut fixé en vue de découvrir des formes de multiplication intracellulaires.

Un troisième essai pratiqué le 27-II-40 sur cinq œufs, dont deux de 14 jours d'incubation et trois de 10 jours (nous espérons obtenir des poussins vivants infectés), fut suivi d'insuccès. Quatre embryons morts furent trouvés négatifs, un poussin né le 5-III était indemne d'infection.

Dans leur unique essai positif, Roubaud et Romana (12) n'ont rencontré qu'un seul trypanosome vivant. Ils doutent qu'il se soit agi d'une infection au sens vrai du mot et croient à une simple survivance des parasites inoculés 7 jours auparavant et provenant de sang de cobaye infecté. Nous avons obtenu deux résultats positifs sur trois en partant de cultures. Il s'est aussi agi d'infections rares, mais cependant plus abondantes que ne le signalent les auteurs français.

Sachant que le *Trypanosoma cruzi* se développe dans les cultures de tissus d'embryon de poule et qu'il s'y multiplie sous forme aflagellée, nous avons, comme signalé plus haut, fixé l'embryon positif du 2^e essai afin de rechercher si dans les tissus nous ne rencontrerions pas les formes de multiplication. Nos recherches sont jusqu'ici restées infructueuses.

Nous ne pouvons donc pas non plus affirmer que nous avons obtenu des infections réelles, ce d'autant moins que nous n'avons pas réussi à transmettre le trypanosome par passage. Il faut dire pourtant que dans les cultures sur NNN les formes de multiplication crithidiennes ne sont pas rares et que chez l'embryon il n'est pas impossible qu'il se soit produit un développement analogue, différent de celui que l'on obtient chez les mammifères adultes.

5) *Trypanosoma brucei*. — Dans l'ensemble sept essais furent tentés au cours desquels 25 œufs furent inoculés de sang de souris riche en *Trypanosoma brucei*. La souche était originaire du Congo belge.

Trois de ces essais furent suivis de succès, nous les résumons brièvement :

3^e essai, le 18-VI-39 sur six œufs. Tous sont trouvés infectés

le 24-VII. Un deuxième passage fait le même jour sur trois œufs fournit un résultat positif le 28; le passage suivant pratiqué sur cinq œufs avorta, tous les embryons périrent.

4^e *essai*, le 2-I-40 sur quatre œufs. Un œuf est positif le 8-I-40. Un deuxième passage sur quatre œufs fut négatif.

Le 7^e *essai*, le 16-II-40 sur cinq œufs fournit un résultat positif le 23-II-40; le passage tenté sur quatre œufs resta négatif.

6) *Trypanosoma evansi*. — Nous ne rappellerons ici que pour mémoire les expériences relatées d'autre part, et réalisées par l'un de nous avec *Trypanosoma evansi* qui lui permirent d'obtenir à trois reprises un poussin vivant encore porteur de parasites dont il se débarrasse d'ailleurs en peu de jours.

7) *Trypanosoma gambiense*. — Au cours de cinq essais ayant porté sur un ensemble de dix-neuf œufs nous n'avons enregistré que deux succès. Un œuf sur quatre dans deux séries différentes montra l'un au 17^e jour, l'autre au 18^e jour, des trypanosomes assez nombreux.

Si nous considérons l'ensemble de nos expériences suivies de succès nous voyons que l'infection de l'embryon de poule réussit inégalement d'après les protozoaires; très facilement avec *Borrelia duttoni*, *Trichomonas foetus*, *Trypanosoma evansi* et *Trypanosoma brucei*; plus difficilement avec *Trypanosoma cruzi* et *Trypanosoma gambiense*.

Voici, d'autre part, les diverses tentatives que nous avons faites et qui furent suivies d'insuccès.

1) *Treponema vesiculæ* Dubois. — Ce parasite non pathogène, des vésicules séminales de souris, a fait l'objet d'une seule tentative suivie d'un résultat négatif.

2) *Plasmodium gallinaceum* Brumpt. — Trois essais portant chacun sur quatre œufs inoculés avec du sang riche en parasites furent invariablement négatifs. Ces résultats correspondent aux tentatives infructueuses d'inoculation du plasmodium dans la culture de tissus d'embryon de poule faites par Chorine et Gavrilov indépendamment l'un de l'autre (15 et 16).

3) *Trypanosoma vespertilionis* Battaglia. — Les inoculations ont été toutes pratiquées au moyen de cultures de ce trypanosome sur milieu NNN ou sur bouillon de sang de lapin. Presque toutes montraient, à côté de nombreuses formes crithidiennes des trypanosomes métacycliques.

Un premier essai fait le 27-XII-40 porta sur quatre œufs. Les embryons vivants furent tous trouvés négatifs le 3-I-41. Un deuxième avec trois œufs commencé le 4-VII-41 fut également négatif ainsi que quatre autres suivant dans l'ordre; l'un le 8-VII, l'autre le 12-VII, le troisième le 19-VII et le quatrième le 22-VII, chacun portant sur deux œufs. Dans l'ensemble, au cours de six différents essais, quinze œufs furent inoculés avec un résultat uniformément négatif. Notons que le *T. vespertilionis*ensemencé en culture de tissus se multiplie avec une grande intensité au point d'inhiber la croissance des explants.

4) *Trypanosoma pipistrelli* Chatton et Courrier. — Ce Trypanosome qui partage avec *Trypanosoma cruzi* la particularité de se multiplier chez l'hôte vertébré sous forme aflagellée intracellulaire nous faisait espérer qu'il se comporterait aussi chez l'embryon de poule comme l'agent de la trypanosomiase américaine. Cet espoir fut déçu.

Des trois expériences réalisées, la première le fut le 12-IX-41 avec une culture sur NNN au 4^e passage inoculée à deux œufs au 14^e jour d'incubation. L'un examiné le 16 fournit un résultat négatif; l'autre donna le 18 un poussin vivant indemne de trypanosomes.

Au cours de la deuxième expérience, faite avec trois œufs, les embryons indemnes de parasites furent trouvés morts et l'essai ne fut donc pas concluant. La dernière et récente expérience comprit trois œufs inoculés le 5-III-43. Un œuf examiné le 9-III-43 fut trouvé négatif; un autre ponctionné le même jour fut également trouvé négatif, mais l'embryon de cet œuf fut trouvé mort le 12-III-43. Le troisième fut trouvé vivant et négatif le 12-III-43.

Le résultat est donc dûment négatif. Notons encore que *Try-*

panosoma pipistrelli ensemencé en culture de tissu se multiplie fort bien.

5) *Trypanosoma saimiri*. — Possédant une culture sur NNN de ce parasite très voisin de *Trypanosoma minasense* et provenant de *Chrysotrix sciurius*, nous avons inoculé le 22-XII-39 trois œufs. Examinés le 26 et le 29 ils furent trouvés négatifs. Remarquons que ce trypanosome ne se développe pas en culture de tissus.

6) *Trypanosoma fringillae*. — Une culture sur NNN de ce trypanosome du pinson fut inoculée à trois œufs le 17-VI-41. Le 28, un premier poussin éclot; il est négatif. Souffreteux, il est conservé en vie pendant trois jours. Son sang examiné chaque jour ne montre pas de parasites. Sacrifié, une culture de son sang sur milieu NNN ne donna aucun développement.

Un deuxième poussin éclos n'était pas non plus parasité; le troisième œuf fournit un embryon mort sans trypanosomes.

7) *Trypanosoma rotatorium*. — Ce parasite commun de la grenouille verte cultivé en bouillon avec sang de lapin fut inoculé à trois reprises chaque fois à trois œufs avec résultat uniformément négatif.

8) *Trypanosoma congolense*. — Ce parasite à virulence étendue fut inoculé à trois reprises, chaque fois à quatre œufs. Les trypanosomes fournis par le sang de cobaye et de souris infectés furent directement injectés dans les œufs incubés depuis 10 jours. Tous ces essais furent suivis d'insuccès.

Voulant confirmer ces résultats, nous avons au cours d'une nouvelle série d'essais inoculé seize œufs avec du sang de souris riche en trypanosomes. Cette fois encore les résultats furent uniformément négatifs.

La souche avec laquelle nous avons opéré provient de l'Institut Robert Koch à Berlin. Nous ignorons depuis combien de temps elle était entretenue dans les laboratoires de cet Institut.

Contrairement à nous, Roubaud et Romana (12) ont eu un succès facile avec *T. dimorphon* qui n'est qu'une variété de *Trypanosoma congolense*.

DISCUSSION.

L'examen de l'ensemble des résultats obtenus par les auteurs qui nous ont précédé et par nous-mêmes autorise certaines considérations d'ordre général que nous ne croyons pas dénuées d'intérêt.

Constatons en premier lieu que tous les organismes qui se développent sur embryon de poule appartiennent à des espèces pathogènes. Il y a deux exceptions, elles concernent la souche de *Trypanosoma congolense* qui a servi à nos expériences et le *Plasmodium gallinaceum*. D'un autre côté, tous les parasites non pathogènes se sont montrés inaptes à se développer sur l'embryon de poule, Il n'y a pas ici d'exception.

Remarquons ensuite que parmi les organismes qui se multiplient dans l'œuf embryonné il n'y en a qu'un seul qui soit capable d'infecter d'une manière durable la poule adulte, il s'agit de *Borrelia gallinarum*. Relevons aussi le fait paradoxal que *Plasmodium gallinaceum* hautement virulent pour les poulets éclos se montre incapable de prospérer dans l'embryon avant son éclosion.

Le comportement de certains trichomonas, trypanosomes et du *Plasmodium gallinaceum* en présence de culture de tissus a été étudié par différents auteurs et peut aussi faire l'objet de comparaison.

M. J. Hogue (7) a constaté que *Trichomonas foetus* se développant dans le plasma baignant les cultures de tissu embryonnaire de poulet, élaborait une substance toxique déterminant la dégénérescence des explants.

W. Gavrilov, Lesneret et Cowez (17), après Kofoïd, C. A., Wood, F. D. et Mc. Neil, E. (18), ont montré que le *Trypanosoma cruzi* en présence de culture de tissus reproduit le cycle évolutif qu'il subit chez le vertébré, qu'il pénètre dans les cellules et s'y multiplie sous forme aflagellée. Il ne semble pas que dans l'embryon de poule il se produise une invasion cellulaire, quoique à notre avis de nouveaux essais seraient nécessaires pour assurer ce point.

Le *Plasmodium gallinaceum* lui ne se développe pas en présence de culture de tissu embryonnaire où il ne manque pas d'érythrocytes. Néanmoins, l'échec de son évolution dans l'embryon vivant est pour le moins surprenant.

D'un autre côté, *Trypanosoma vespertilionis*, comme aussi *Trypanosoma pipistrelli* (*), trouvent dans le plasma qui entoure les explants en croissance de tissus embryonnaire de souris et de rat, un excellent milieu de culture. Or, toutes les tentatives d'infecter au moyen de l'un ou de l'autre de ces trypanosomes des rats ou des souris même nouveau-nés ont échoué.

Placés dans les mêmes conditions de culture, les *Trypanosoma brucei* et *rhodesiense* si hautement virulents pour les petits mammifères, ne se développent point.

Ici encore nous nous trouvons devant des comportements dont le caractère paradoxal est frappant.

Si nous considérons enfin la faculté de se développer en culture *in vitro* des divers organismes qui ont fait l'objet des essais d'inoculation à l'embryon de poule, nous voyons qu'à côté de certains qui sont facilement cultivables, il en est d'autres qui exigent pour leur multiplication en dehors du corps, des conditions de milieu très spéciales.

Les *Borrelia gallinaceum* et *duttoni*, les *Leptospira* sont d'une culture relativement facile en présence de sérum et de globules rouges de mammifères et on peut en dire autant des trypanosomes non pathogènes : *Trypanosoma rotatorium*, *lewisi*, *saimiri*, *vespertilionis* et *pipistrelli*. Quant aux trypanosomes pathogènes, le *Trypanosoma cruzi*, excepté, ils sont d'une culture *in vitro* très délicate.

Le *Spirillum minus*, lui, occupe une place toute spéciale ; à ce jour sa culture n'a pas été réussie.

Trichomonas foetus est de culture relativement facile, il se multiplie dans les explants de tissu et prospère dans l'embryon de poule ; *Plasmodium gallinaceum* ne se laisse pas cultiver et ne se développe pas dans l'œuf embryonné.

Avant d'épiloguer sur l'interprétation à donner de ces com-

(*) Note encore inédite.

paraisons, résumons encore dans leurs grandes lignes, leurs principales données.

Les trypanosomes pathogènes difficilement cultivables *in vitro*, ne se développent pas en présence de cultures de tissus, et infectent l'embryon de poule alors qu'ils sont incapables de produire des infections durables chez la poule adulte. Le *Trypanosoma cruzi* fait exception en ce sens qu'il est de culture aisée. Une souche de *Trypanosoma congolense* s'est montrée incapable d'infecter l'embryon de poule.

Les trypanosomes non pathogènes, de culture facile, et dont certains se développent abondamment en présence de cultures de tissu n'infectent pas l'embryon de poule.

Trichomonas foetus incapable de parasiter la poule adulte, infecte l'embryon. Il se multiplie dans le plasma entourant les cultures de tissu et aussi *in vitro*. *Plasmodium gallinaceum* ne se cultive ni *in vitro* ni en présence de culture de tissus ni dans l'embryon de poule, mais est hautement pathogène pour la poule adulte.

Borrelia gallinarum de culture *in vitro* relativement facile infecte et l'embryon et la poule adulte; *Borrelia duttoni* et *Leptospira icterohaemorrhagiae* n'infectent que l'embryon. *Spirillum minus* infecte l'embryon de poule, non l'adulte et ne se cultive pas *in vitro*.

*
**

Le fait que la poule adulte soit réfractaire à toute une série de parasites trouve, sans doute, son explication naturelle dans les phénomènes de l'immunité; propriété des humeurs et des tissus. D'autre part, on peut penser que l'embryon en évolution ne dispose pas encore des moyens de défense de l'adulte et de ce fait est susceptible d'infections auxquelles une fois éclos il résistera.

Ainsi s'expliquent le fait de l'infection de l'embryon par les trypanosomes *pathogènes* et dont certains peuvent se maintenir durant un certain temps chez la poule adulte et y déterminer un parasitisme inapparent. L'un de nous a même obtenu des poulets avec septicémie massive de *Trypanosoma evansi* issus

d'embryons inoculés à 10 jours d'incubation. Mais ce parasitisme a disparu après 7 à 9 jours. Dans ce cas de *Trypanosoma evansi*, il semble bien que c'est surtout par inhibition du pouvoir de multiplication des flagellés que l'infection s'arrête chez le poussin éclos.

Des recherches ultérieures sont pourtant nécessaires pour fixer ce point, car l'intervention d'autres facteurs de destruction des parasites ne peut être exclue (19).

Quant aux trypanosomes *non pathogènes* et qui pullulent dans le plasma baignant les cultures de tissu, on aurait pu s'attendre à un certain développement chez l'embryon. En réalité il n'en fut rien. A quoi faut-il attribuer la défense efficace de l'embryon vivant ?

La seule expérience que nous ayons tentée en vue de découvrir si dans les tissus de l'embryon existait une substance trypanocide a donné un résultat négatif. A des tubes NNN avec une partie liquide de 2 cc. de Ringer nous avons ajouté des fragments d'embryon de poulet au 12^e jour. Ensemencés ensuite de *Trypanosoma vespertilionis*, ces tubes ont fourni des cultures normales.

Sans doute faudrait-il répéter l'essai en s'abstenant par exemple de délayer le plasma avant de conclure, mais telle quelle l'expérience fait penser que si des substances trypanocides interviennent, il y a d'autres facteurs qui empêchent la culture des trypanosomes non pathogènes dans l'embryon de poule.

Et si l'on réfléchit au comportement si hautement paradoxal du *Plasmodium gallinaceum*, il semble difficile d'admettre que seules les lois ordinaires de l'immunité le déterminent. Ainsi que l'un de nous l'a déjà fait remarquer, les conditions physiologiques dans lesquelles l'embryon se développe dans l'œuf, en dehors du corps maternel, diffèrent fortement de celles qui s'imposent au poussin dès son éclosion. Les défenses tissulaires de l'embryon de poule ne peuvent avoir acquis la puissance que nous leur connaissons chez l'adulte, mais les tissus embryonnaires en pleine évolution peuvent posséder vis-à-vis des protozoaires des propriétés que nous ignorons. L'embryon dans l'œuf se trouve dans des conditions entièrement différentes du

foetus des mammifères. Il y a là certes encore d'intéressantes recherches à faire.

*
**

Il nous faut, en terminant, insister sur le fait que, contrairement à Roubaud et Romana (12), nous ne sommes pas parvenus à infecter l'embryon de poule par une souche de *Trypanosoma congolense*, alors que les auteurs français ont réussi d'emblée au moyen d'une souche de *dimorphon*. D'après cela on peut s'attendre à rencontrer d'autres divergences entre les variétés et même les souches différentes. Le résultat médiocre que nous avons enregistré avec notre souche de *Trypanosoma gambiense* appuie cette opinion. Tandis que sur dix-neuf œufs inoculés, deux embryons seulement s'infectèrent, E. Roubaud et J. Romana (12) ont obtenu d'emblée au cours d'un unique essai une culture de *Trypanosoma gambiense*. Il s'agissait de souches différentes. Ces constatations doivent inciter à une grande prudence avant que de tirer des conclusions ayant une portée générale.

*
**

CONCLUSIONS.

1° En général, les trypanosomes pathogènes sont susceptibles d'infecter l'embryon de poule, alors même qu'ils sont incapables de parasiter d'une manière quelque peu durable la poule adulte. Il en est de même de *Borrelia duttoni*, de *Trichomonas foetus* et de *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

Une souche de *Trypanosoma congolense* fait exception à cette règle et il est possible que parmi les trypanosomes pathogènes appartenant à d'autres types morphologiques se rencontreront des différences de comportement en rapport avec des variétés ou des souches.

2° En général les trypanosomes non pathogènes sont incapables d'infecter l'embryon de poulet, quoique certains d'entre eux prospèrent dans le plasma baignant les cultures de tissus.

3° *Plasmodium gallinaceum*, hautement virulent pour la poule adulte, n'infecte pas l'embryon de poulet.

4° Des recherches ultérieures sont nécessaires pour établir comment peuvent s'expliquer les faits paradoxaux que les essais d'infection d'embryons de poulet par divers protozoaires mettent à jour.

Remarque. — Notre travail était à l'impression lorsque nous avons pu prendre connaissance dans le *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde* (Referate), n^{os} 13/14 du 4 juin 1943, de l'article de Hallauer, C. et Kuhn, H. « Dauer passagen von *Leptospira icterogenes* und *Spirochaeta pallida* (Truffi) im hühnerembryo », paru dans le *Z. f. Hygiene*, t. 124, 1942.

Ces auteurs, contrairement à Bessemans et de Meirsmans (4), ont réussi à infecter l'embryon de poulet par le *Treponema pallidum*. La souche « Truffi » dont ils se sont servis étant différente de celle employée par les auteurs belges, leurs résultats sont conformes à nos conclusions.

Samenvatting. — Schrijvers geven een algemeen overzicht van alle de proeven gedaan om het kippen embryo in het bebroede ei te besmetten door verschillende spirochetes en protozoen. Zelf hebben ze eene reeks parasieten soorten aangevend voor persoonlijke opzoekingen, namelijk: *Borrelia duttoni* en *Treponema vesiculae*, *Leishmania infantum*, *Trichomonas foetus*, *Plasmodium gallinaceum*, *Trypanosoma evansi*, *Tr. gambiense*, *Tr. congolense*, *Tr. cruzi*, *Tr. lewisi*, *Tr. vespertilionis*, *Tr. pipistrelli*, *Tr. saimiri*, *Tr. fringillae* en *Tr. rotatorium*.

Hun slotbesluiten luiden als volgt:

1° In het algemeen besmetten de pathogene trypanosomensoorten het kippen embryo, niettegenstaande ze niet in stande zijn bij de kip zelf een duurzame infectie te verwekken.

Dit geldt ook voor *Borrelia duttoni*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* en *Trichomonas foetus*.

Een stam *Trypanosoma congolense* maakt een uitzondering. Het is dus wel mogelijk dat tusschen verschillende stammen

pathogene trypanosomen van andere tijpen, ook afwijkingen zullen worden gevonden ten opzichte van hun behoud tegenover het kippen embryo.

2° In het algemeen besmetten de niet pathogene Trypanosomen soorten het kippen embryo niet, niettegenstaande sommigen van hun zich ontwikkelen in het plasma der weefselkulturen.

3° *Plasmodium gallinaceum* hoogst virulent voor de volwasene kip, besmet het kippen embryo niet.

4° Verdere opzoekingen zijn noodig voor vast te stellen door welk mechanismus de wederstrijdige feiten in het licht gesteld door deze verschillende proeven kunnen verklaard.

BIBLIOGRAPHIE.

1. — van den Berghe, L. : Trypanosomose d'un poussin éclos après inoculation chorio-allantoïdienne du *Trypanosoma evansi*. *Acta Biol. Belgica*, 1941, t. 1, p. 146.
2. — Biocca, E. : Studi sull infezione sperimentali di embrioni di pollo et di polli adulti con *Trypanosoma brucei*. *Ann. d'Igiene*, 1938, t. 48, p. 532.
3. — Borrel et Levaditi : Cités par Chabaud. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1939, t. 32, p. 483.
4. — Bessemans, A. et de Meirsman, E. : Tentatives de culture de *Trepomena pallidum* sur le membrane chorio-allantoïde de l'embryon de poulet vivant. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, t. CXXXVII, p. 847.
5. — Morrow, G., Syverton, J. T., Stiles, W. W. et Berry, G. P. : *Science*, 1938, t. 88, pp. 483-485.
6. — Nelson, P. M. : Cultivation of *Trichomonas foetus* in the chick embryo. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Medic.*, 1938, t. 3, p. 358.
7. — Chabaud, A. : Infection de l'embryon de poule par quelques trypanosomes pathogènes. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1939, t. 32, p. 483 et p. 489.
8. — Hogue, M. J. : Infections of *Trichomonas foetus* in chick embryos and young chicks. *Am. J. of Hyg.*, 1939, t. 30, pp. 65-67.
9. — Levine, N. D., Brandy, C. A., Graham, R. : The cultivation of *Trichomonas foetus* in developping chicken eggs. *Science*, 1939, t. 89, pp. 161-162.
10. — Longley, B. J., Clausen, N. M., Tatum, A. L. : Cultivation of various species of Trypanosomes in the developping chick embryo. *Proc. Soc. for Experiment. Biol. and Medicine*, 1939, t. 41, p. 365.
11. — Mitchell, Ch. A., Walker, R. V. L., Heath, L. M. et Mc. Kercher,

- D. G. : Preliminary note on the growth of *Trypanosoma equiperdum* in the developing chick embryo. *Canadian Jl Compar. Med.*, 1939, t. 3, n^o 8, p. 223.
12. — Roubaud, E. et Romana, J. : Infection de l'embryon de poule par *Schizotrypanum cruzi*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1939, t. 32, p. 874.
 13. — Dubois, A. : Inoculation du Sodoku à la poule et à l'embryon de poule. *C. R. Soc. Biol.*, 1940, t. 133, p. 100.
 14. — Hallauer, C. et Kuhn, H. : Ueber die Dauerzucht von Nagana Trypanosomen und Buckfallfieberspirochaeten in befruchteten hünerei. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 1940, t. 222, pp. 406-411.
 15. — Chorine, V. : Résistance de l'embryon de poulet à l'infection due au *Plasmodium gallinaceum*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, t. LXI, p. 829.
 16. — Gavrilov, W., Bobkoff, G. et Mme Laurencin, S. : Essai de culture en tissus de *Plasmodium gallinaceum* Brumpt. *Ann. Soc. Belge de Méd. Trop.*, 1938, t. XVIII, p. 429.
 17. — Gavrilov, W., Lesneret, S. et Cowez, S. : Emploi de la méthode des cultures de tissu dans l'étude des protozoaires. Les Trypanosomes. *Rivis. Paras.*, 1940, t. IV, p. 147.
 18. — Kofoid, C. A., Wood, F. D. et Mc. Neil, E. : The cycle of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture of embryonic heartmuscle. *University of California Publications. Zoology*, 1941, pp. 23-24.
 19. — van den Berghe, L. : La trypanosomose de poussins éclos après inoculation chorio-allantoïdienne. *Ann. Soc. Belge de Méd. Trop.*, 1943, t. XXIII, p. 111.
-