

CULTURE ET ISOLEMENT DE *LEISHMANIA TROPICA*,
LEISHMANISATION PROPHYLACTIQUE.

par M. N. Ansari.

Les premières tentatives de culture de *Leishmania* ont été faites par Rogers en 1904. Cet auteur a simplement recueilli le sang de la pulpe splénique de malades atteints de Kala Azar, dans une solution de citrate de soude pour empêcher la coagulation. Par ce procédé, il n'a réussi la culture que dix fois sur soixante, et malgré les améliorations qu'il a apportées à sa méthode, les résultats n'ont pas été satisfaisants.

En 1908, Nicolle a cultivé pour la première fois *Leishmania tropica* dans l'eau de condensation des milieux à la gélose au sang préconisés par Novy et Mc Neal pour les trypanosomes. Il a trouvé que si l'on simplifiait le milieu de culture en supprimant la viande et la peptone, les *Leishmania* se développaient mieux. C'est le milieu N.N.N. Successivement, Row et Marzinowsky (1909) Wenyon (1911) ont cultivé *Leishmania tropica* dans le milieu N.N.N. ou dans d'autres milieux. Les milieux liquides ou solides employés pour la culture des *Leishmania* sont très nombreux et contiennent tous comme facteurs essentiels le sang. Lwoff a montré que la substance du sang nécessaire est l'hématine, qui agit surtout par sa fonction peroxydasique. L'hématine doit être associée à la peptone qui apporte l'Azote. Il faut assurer une humidité suffisante dans les milieux de culture solides pour que l'oxyhémoglobine ne se transforme pas en metaoxyhémoglobine. La concentration en chlorure de sodium doit rester comprise entre 5 et 9 pour 1000, afin d'éviter l'hémolyse rapide des hématies qui sont nécessaires comme aliments de réserve.

Les *Leishmania* se développent entre 16 et 28° et la température optima est 22°. A 28°, la multiplication se fait encore, mais la longévité des flagellés est nettement diminuée. A 37° ils disparaissent très rapidement. A 45° ils sont tués. La lumière n'a pas d'action sur

les cultures, tandis que les rayons ultra violets les tuent après 40 minutes d'exposition.

L'influence favorable des glucides a été démontrée par Gaillard. Dubois (1936) a étudié l'action de nombreux sucres et a trouvé que glucose, lévulose, mannose, galactose, saccharose, raffinose, inuline, prolongent la vie des *Leishmania*.

Enfin, parmi les facteurs de croissance, on peut citer l'acide ascorbique. Le *pH* optimum est compris entre 7,1 et 7,4.

Rogers a signalé déjà dans ses premières cultures l'action destructive des bactéries sur les *Leishmania*, depuis lors, d'autres observateurs ont confirmé l'action empêchante des bactéries de la peau, du bacille d'Eberth, des salmonella, du colibacille, du vibron cholérique et des bacilles dysentériques.

RECHERCHES PERSONNELLES.

En 1941, en vue de la leishmanisation prophylactique, nous avons tenté des cultures de *Leishmania tropica*. Après quelques essais infructueux, nous avons pu obtenir une souche souillée, que nous avons purifiée et conservée pendant deux ans.

Nos expériences ont mis en évidence les difficultés d'isolement d'une souche pure et de sa conservation. Il faut essayer de partir d'un bouton non ulcéré. Après nettoyage de la peau et application de teinture d'iode, il faut ponctionner vers le centre du nodule à l'aide d'une seringue et ensemercer quelques gouttes de sérosité dans l'eau de condensation de milieu N. N. N. En pratique, malgré toutes les précautions prises, on arrive rarement à avoir d'emblée une culture pure. Presque toujours, celle-ci est souillée par les microbes saprophytes de la peau. Pour que les réensemencements soient possibles, il faut se débarrasser de ces bactéries.

Généralement, nous avons eu des cultures qui résistaient à l'action des bactéries pendant une semaine, et ce sursis est très appréciable pour avoir le temps de procéder à l'isolement. En profitant du décalage de la température favorable au développement des bactéries et des *Leishmania*, nous sommes arrivés à avoir des cultures pures dès le deuxième repiquage. En effet, les bactéries qui accom-

pagnent les cultures souillées se développent mal à la température de 15°, tandis que les *Leishmania* se développent assez bien. En général, après l'ensemencement, nous laissons les tubes de culture à la température de 15° environ et, au bout du troisième jour, nous faisons de multiples réensemencements. Ainsi, on peut arriver à obtenir une culture pure après quelques passages. Le grand obstacle au point de départ des cultures étant la contamination microbienne, nous avons pensé utiliser des substances bactériostatiques pour obtenir d'emblée des cultures pures. Les quelques produits dont nous disposons nous ont donné les résultats suivants:

Bleu de méthylène: Les dilutions de 1 p. 1000 à 1 p. 5000 n'empêchent pas le développement microbien. Elles arrêtent la multiplication des *leptomonas*, sans les tuer.

Vert brillant: Les dilutions à 1 p. 10000 et à 1 p. 50.000 arrêtent le développement microbien, mais les *leptomonas* ne poussent pas. Avec les dilutions à 1 p. 100000, quelques *leptomonas* restent vivants pendant 48 heures, mais à cette dilution, le développement microbien n'est pas entièrement empêché et l'effet désiré n'est pas obtenu.

Violet de gentiane: Employé aux mêmes taux que le vert brillant avec des résultats superposables.

Penicilline: Fleming, qui a découvert cette substance, a surtout utilisé ses propriétés bactériostatiques pour la constitution de milieux sélectifs. La pénicilline ajoutée à un milieu ne tue pas les microbes existants, mais empêche leur développement. L'adjonction de pénicilline au milieu N.N.N. à une concentration de 2,500 à 5.000 unités par centicube., empêche le développement microbien, mais à ce taux, la multiplication des *leptomonas* est inhibée et le réensemencement reste négatif.

En réduisant la concentration à 1.250 unités par centicube, le développement des microbes est insignifiant, alors que les *leptomonas* se multiplient normalement, et après deux ou trois ensemencements

sur milieux N.N.N. pénicillinés, on obtient une culture pure et très riche en *leptomonas*.

LEISHMANISATION

Les conséquences les plus redoutées du Bouton d'Orient, sont les cicatrices déformantes qu'il détermine au niveau du visage. L'évolution d'un Bouton, créant une immunité qui empêche les réinfections, on a depuis longtemps eu l'idée d'éviter les défigurations en faisant évoluer la lésion en un point choisi, par inoculation. Cette méthode n'apporta pas toujours les résultats escomptés. Les échecs furent nombreux. On procédait en effet comme pour la variolisation, en utilisant la croûte d'un Bouton, que l'on gardait quelque temps avant l'inoculation. Connaissant aujourd'hui la fragilité des *Leishmania* et sachant qu'elles ne se trouvent pas dans la croûte, mais sur les bords congestionnés de l'ulcération, on comprend la raison des échecs fréquemment rencontrés. Cette méthode comporte d'ailleurs d'autres inconvénients : d'une part on risque toujours d'inoculer des microbes pyogènes ou d'autres agents pathogènes se trouvant accidentellement chez le porteur du Bouton. D'autre part, on ne dispose pas toujours de malades présentant des boutons au stade requis, ce qui empêche de pratiquer la méthode d'une façon systématique. Ces inconvénients sont supprimés si l'on dispose de cultures de *Leishmania*.

En partant de cultures, nous avons fait des inoculations par scarification et par voie intradermique. C'est ce dernier procédé qui nous a donné les meilleurs résultats. Nous avons inoculé en tout 120 personnes et obtenu 108 lésions évolutives, c'est-à-dire 90% de résultats positifs, alors que dans nos propres expériences portant sur 15 personnes, les résultats obtenus avec l'inoculation de sérosité de Bouton d'Orient ont été beaucoup moins concluants: 3 cas positifs par scarification et 5 par inoculation intradermique. L'incubation a duré de 20 jours à 7 mois. L'évolution des lésions est sensiblement identique à celle obtenue par inoculation de sérosité de Bouton d'Orient.

Des expériences semblables aux nôtres ont été faites par Lawrow et Dubowsky, au Turkestan russe, à partir de *Leishmania tropica* avec 85% de cas positifs.

Les insuccès sont plus fréquents chez les adultes ou chez les grands enfants, mais nous ne pouvons donner dès maintenant un relevé des échecs par rapport à l'âge. D'autre part, en considérant que, d'après nos statistiques, 85% des personnes sont infectées avant leur dixième année, il est logique de pratiquer la leishmanisation préventive avant cet âge. Ceci ne s'applique pas aux personnes provenant d'un pays où la *Leishmaniose* n'existe pas. Dans certains cas, où la leishmanisation est restée négative, des inoculations ultérieures et répétées n'ont rien changé à ce résultat. Il faut donc admettre que ces sujets présentaient une résistance congénitale, ce qui expliquerait l'immunité naturelle de certaines personnes vivant dans des régions fortement infestées, comme Téhéran et Ispahan.

*Service de parasitologie de la Faculté de
Médecine de Téhéran.*