

Influence de quelques corps chimiques sur la survie *in vitro* de *Trypanosoma evansi*

I — Acides aminés et quelques-uns de leurs dérivés

par J. BALIS

RÉSUMÉ

L'auteur a étudié le comportement, *in vitro*, de *T. evansi* en présence de 23 acides aminés et de 13 de leurs dérivés. Le glutathion, la cystéine et les composés possédant un groupement S H dans leur molécule interviennent très activement dans les phénomènes d'oxydo-réduction. L'arginine, la sérine, la colamine, l'histidine et le tryptophane entraînent également, bien qu'à un moindre degré, une meilleure survie de *T. evansi*. L'arçaine possède par contre un très net pouvoir trypanocide.

Les trypanosomes, comme tous les organismes vivants, ont besoin de substances azotées pour leur croissance et leur multiplication.

Les espèces pathogènes atteignent parfois un très haut degré de parasitisme, caractérisé par une réduction manifeste de leur appareil enzymatique. C'est ainsi que *Trypanosoma evansi* est pratiquement dépourvu de diastases protéolytiques (10). Il lui est donc très difficile de dégrader les protéines et il est vraisemblable qu'il utilise surtout des composés azotés de bas poids moléculaire.

Certains auteurs ont insisté sur l'effet favorisant de mélanges d'acides aminés : hydrolysats de caséine (20) ou de lactalbumine (12) ; nous-mêmes (1), avons utilisé avec des résultats favorables, une autodigestion de poisson. JADIN et WERY (7) considèrent que le milieu 199 de PARKER améliore sensiblement le rendement des cultures et complète l'apport nutritif fourni par la gélose au sang.

D'autres mettent en valeur l'action d'un groupe d'acides aminés (8) (3) ou d'un oligopeptide tel

que le glutathion (17) ; ainsi THURSTON (16) et PESSAT (13) voient dans la glutamine, un facteur augmentant la consommation d'oxygène chez *Trypanosoma lewisi* et *Trypanosoma cruzi*. RYLEY (14) pense que l'asparagine et l'acide glutamique jouent également ce rôle ; ZELEDON (21), étudiant des cultures de *Leishmania enriettii* et de *Trypanosoma cruzi*, ajoute à la liste précédente l'acide aspartique et l'alanine. La créatine, la créatinine (5), la beta alanine et le glycolle (15), permettraient une croissance plus rapide de *Trypanosoma cruzi*.

Ce besoin en acides aminés est parfois inapparent, c'est ainsi que pour MARMUR et ses coll. (11), la lysine est fournie à *Strigomonas oncopelti* par un endosymbiote.

Les trypanosomes utilisés dans tous ces travaux, cultivent sur milieux artificiels, avec une relative facilité. Tel n'est pas le cas pour *Trypanosoma evansi*. On ne peut obtenir avec lui que des survies, en général assez courtes, et l'objet du présent travail est d'étudier, dans ces conditions, son comportement en présence de différents acides aminés et quelques-uns de leurs dérivés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expérimentations ont été effectuées en milieux diphasiques. La phase liquide est réalisée comme suit. :

Sang de cheval	10 ml
Liquoïde « Roche » en solution à 1 p.100	1 ml
Eau distillée	90 ml

Hémolyse à la température du laboratoire pendant une heure :

Phosphate bipotassique	1 gr
Glucose	2 gr
Chlorure de Magnésium traces (10 à 20 mg)	

Ajuster, si nécessaire, à pH 7,5 avec une solution de phosphate monopotassique à 10 p. 100.

Filtration plusieurs fois sur papier.

Filtration sur Seitz.

La phase solide est de la gélose physiologique à 2 p. 100 inclinée en tubes à essais, à laquelle on incorpore la substance à étudier (en général 100 mg pour 100 ml de gélose).

Chaque expérimentation porte sur quatre à cinq corps chimiques avec dix tubes pour chacun d'eux et une série témoin pour l'ensemble.

Le milieu liquide estensemencé avec du sang de rat fortement parasité puis après une numération des trypanosomes, on le répartit en prenant chaque fois un tube d'une série différente et en conservant le même ordre.

Une fois ces opérations terminées, l'ensemble est mis à la température de 25°C pendant 20 heures.

Au bout de ce temps, on récolte séparément la phase liquide de chaque série et on effectue une numération des trypanosomes à l'hématimètre. La comparaison avec le témoin, permet d'apprécier l'action de la substance étudiée.

Un dosage systématique de l'acide pyruvique complète et contrôle les résultats.

Cette méthode permet d'obtenir facilement une répartition homogène dans les tubes ; de plus, le corps à étudier n'est pas brutalement mis en contact avec le trypanosome et agit d'une façon plus nuancée. Enfin la phase solide permet une élimination d'une partie des déchets provenant du métabolisme glucidique.

Toute la verrerie doit être minutieusement lavée. Nous avons procédé comme suit :

- a) Lavage à l'eau additionnée de détersif,
- b) Lavage à l'acide chlorhydrique à 1 p. 100 pendant 12 h.
- c) Lavage à l'eau courante pendant 12 h.
- d) Rinçage à l'eau distillée.
- e) Séchage.

De plus tous les tubes sont bouchés à l'aide de petits capuchons de verre, à la place de coton cardé, afin d'éviter la formation accidentelle de goudrons au cours de la stérilisation en chaleur sèche.

La souche de *Trypanosoma evansi* que nous avons utilisée a été obtenue en 1960 à partir d'un âne de Fort-Lamy. Elle a été conservée depuis par passages sur rats et cobayes.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les 23 acides aminés suivants ont fait l'objet de plusieurs expérimentations pour chacun d'eux :

A. — Série acyclique

- 1) Acides monoaminés monocarboxyliques.
 - Glycocolle
 - Alanine
 - Valine
 - Leucine
 - Isoleucine
- 2) Acides mono aminés dicarboxyliques.
 - Acide aspartique
 - Acide glutamique
- 3) Acides diaminés monocarboxyliques.
 - Asparagine
 - Créatine
 - Ornithine
 - Lysine
 - Glutamine
 - Arginine
- 4) Hydroxyacides aminés.
 - Sérine
 - Thréonine
- 5) Acides aminés renfermant du soufre.
 - Cysteine
 - Méthionine
 - Cystine

B. — Série cyclique

1) Série aromatique.

- Tyrosine
- Phénylalanine

3) Série hétérocyclique.

- Proline
- Histidine
- Tryptophane

Seuls les corps suivants permettent une survie plus importante de *Trypanosoma evansi* : Arginine, sérine, cystéine, histidine, et tryptophane.

1) Arginine

De multiples expériences nous ont amené à penser que l'arginine est favorable à *Trypanosoma evansi* quand ce dernier provient de rats maintenus dans un endroit frais. Par contre ce corps serait toxique si les animaux inoculés souffrent de la chaleur. Ces résultats assez curieux doivent cependant être contrôlés de très nombreuses fois avant d'être tenus pour définitifs.

Il semble que l'activité de l'arginine soit due au groupement guanidique. La vérification de cette hypothèse nous a amené aux résultats suivants :

Pour 30.000 flagellés au millimètre cube au temps 0, nous notions après 20 h à 25°C :

— Témoin	7500
— Guanidine	
1 mg/ml	1700
0,1 mg/ml	8300
— Méthylguanidine	
1 mg/ml	4800
0,1 mg/ml	6600
— Glycocyamine	
1 mg/ml	7500
— Agmatine	
1 mg/ml	10100
— Arcaïne	
1 mg/ml	70
0,1 mg/ml	500
0,01 mg/ml	6400
— Arginine	
1 mg/ml	13500

Il semblerait que la toxicité décroît en même temps que s'allonge la chaîne carbonée associée au groupement guanidique. L'arcaïne, cepen-

dant fait exception ; mais ce composé, qui est une diguanidine, possède comme la synthaline et quelques corps de structure analogue (6) un très net pouvoir trypanocide *in vivo*. En effet, des cobayes fortement parasités par *Trypanosoma evansi*, sont rendus temporairement négatifs en 24 h par une injection d'à peu près 50 mg (*).

2) Sérine.

La survie obtenue avec ce corps, à la concentration de 1 mg/ml, est à peu près double de celle observée chez le témoin. Ce résultat est amélioré par addition de sulfite de sodium.

La sérine ne diffère de l'alanine que par le remplacement d'un hydrogène par un oxhydryle. L'alanine est inactive et cependant d'après WILLIAMSON et DESOWITZ (18), la plupart des flagellés contiennent des quantités relativement élevées de ce corps à l'état libre. Y a-t-il des rapports étroits entre ces deux acides aminés ou bien l'alanine libre n'est-elle que le résultat d'une transamination entre l'acide glutamique et l'acide pyruvique ? Cette dernière hypothèse ne semble pas valable en ce qui concerne *Trypanosoma evansi* mais elle expliquerait peut-être l'activité de l'acide glutamique signalée par RYLEY (14) et ZELEDON (21) chez *Trypanoma lewisi* et *Trypanosoma cruzi*. L'accroissement de la consommation d'oxygène serait alors en rapport avec une transformation de l'acide pyruvique en acide céto-glutarique moins toxique.

L'activité de la sérine semble tenir à son oxhydryle car la colamine qui en dérive par décarboxylation est favorable à une concentration de 0,1 mg/ml ; par contre, à 1 mg/ml elle manifeste une nette toxicité.

3) Cystéine :

A la dose de 0,1 mg/ml, elle nous a toujours donné des résultats remarquables. Cette activité tient à la présence du groupement SH dans la molécule. En effet la cystine, résultant de la combinaison de deux molécules de cystéine

* L'arcaïne est peu soluble dans l'eau ; une suspension à 1 p. 100 sédimente très rapidement dans la seringue et il est de ce fait difficile d'injecter une dose exactement connue.

reliées par un disulfure, est totalement inactive. Par contre les acides thioglycolique (0,1 mg/ml) thiomalique (0,5 mg/ml) et le glutathion réduit (0,25 mg/ml), ayant en commun le groupement SH, influencent favorablement la survie de *Trypanosoma evansi* comme le fait la cystéine.

Le glutathion présente un gros intérêt, du fait de son absence de toxicité, sa grande solubilité et sa présence constante dans les hématies, à l'état libre et sous forme oxydée ou réduite. Il déplace facilement l'oxygène en passant à l'état disulfure et revient à sa forme initiale sous l'influence d'un réducteur. Il est donc probable qu'il joue un rôle très actif dans les phénomènes d'oxydo-réduction chez *Trypanosoma evansi*. Nous avons d'ailleurs constaté, en utilisant une méthode calquée sur celle de la recherche des hydrolases (2) que le glutathion réduit accélère sensiblement la consommation d'oxygène. Von BRAND et ses coll. (4) ont de plus observé que la respiration des trypanosomes des groupes *evansi* et *brucei* est sensible aux inhibiteurs de la fonction SH.

Il est vraisemblable que l'ergothioneine, que l'on trouve à l'état réduit dans le sang, intervienne également dans les phénomènes respiratoires.

Il semble que le glutathion et l'arginine soient antagonistes ; en effet, dans l'expérience suivante, pour 20.000 flagellés au temps 0, nous avons obtenu après 20 h :

— Témoin	1880
— Arginine (0,5 mg/ml)	4800
— Glutathion (0,25 mg/ml)	6400
— Glutathion + arginine.....	5400

Enfin, signalons que les composés sulfhydrylés sont des activateurs des cathepsines, or *Trypanosoma evansi* en possède une (8) (9).

4) Histidine :

Cet acide aminé résulte de la combinaison du noyau imidazol et de l'alanine.

De nombreux essais ont régulièrement montré que sa présence entraînait une meilleure survie de *Trypanosoma evansi*. Cette activité ne tient ni à l'aniline, ni au noyau imidazol mais à la molécule entière. En effet pour 15.000 trypanosomes au temps 0 nous avons noté après 20 h les résultats suivants :

— Témoin	5800
— Imidazol (1 mg/ml)	6200
— Histidine (1 mg/ml).....	8200

De plus l'histamine qui en dérive par décarboxylation est également inefficace.

L'ergothioneine et la thiolhistidine n'ont donné aucun résultat ; ceci tient probablement au fait que les échantillons utilisés étaient sous forme disulfure (aucune coloration avec le nitroprusiate de sodium). Signalons enfin que la parasitémie n'est pas modifiée chez le rat par une injection sous-cutanée de 40 mg d'histidine et qu'il semble exister *in vitro* un léger antagonisme entre cette substance et celles possédant un groupement SH dans leur molécule.

5) Tryptophane :

Les résultats sont comparables à ceux obtenus avec l'histidine, cependant le noyau indole est très toxique « *in vitro* » pour *Trypanosoma evansi* aux doses de 0,1 et 0,01 mg/ml. Par contre « *in vivo* » une injection de 10 mg n'a pas modifié le cours de la maladie chez le cobaye.

CONCLUSIONS

Les essais effectués dans ce travail ont porté sur 23 acides aminés et 13 de leurs dérivés.

Un certain nombre de corps chimiques influencent favorablement la survie de *Trypanosoma evansi*.

Par ordre d'importance nous avons trouvé : le glutathion, la cystéine et en général tous les composés possédant un groupement SH dans leur molécule. Ces substances interviennent très activement dans les phénomènes d'oxydo-réduction. Puis viennent l'arginine, la sérine, la colamine, l'histidine et le tryptophane pour lesquels il n'a pas été possible de déterminer avec certitude le groupement actif ni le mode d'action. Enfin l'arcanine qui est une diguanidine possède un très net pouvoir trypanocide.

Institut d'Élevage et de Médecine
vétérinaire des Pays tropicaux
Laboratoire de Farcha-Fort-Lamy

SUMMARY

Influence of certain chemical substances on the survival « *in vitro* » of *Trypanosoma evansi*

1) Amino-acids and some of their derivatives

The author has studied the behaviour, *in vitro*, of *T. evansi* in the presence of 23 different amino acids and 13 of their derivatives. Glutathione, cysteine and the compounds containing an SH group in their molecule intervene very actively in the oxidation-reduction phenomena.

Arginine, serine, colamine, histidine and tryptophan also cause, although to a lesser degree, an improvement in the survival of *T. evansi*. On the other hand arcaine possesses a very definite trypanocidal capacity.

RESUMEN

Influencia de algunos cuerpos químicos en la sobrevivida « *in vitro* » de *Trypanosoma evansi*. I. Acidos aminados y algunos de sus derivados

El autor estudió el comportamiento, *in vitro*, de *T. evansi* con 23 acidos aminados y 13 de sus derivados. El glutation, la cisteína y los compuestos teniendo un grupo SH en su molécula intervienen muy activamente en los fenómenos de oxido-reducción.

La arginina, la serina, la colamina, la istidina y el triptofano acarrear también, aunque en menor grado, una mejor sobrevivida de *T. evansi*. En cambio la arcaina tiene un neto poder tripanocido.

BIBLIOGRAPHIE

1. BALIS (J.). — Recherches sur les facteurs nécessaires à la culture *in vitro* de *Trypanosoma evansi*. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 1963, 16 (2) : 151.
2. BALIS (J.). — Utilisation de *Trypanosoma evansi* pour la recherche des hydrolases sanguines responsables de la formation de glucose à partir de différents diholosides et du glyco-gène. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 1964, 17 (2).
3. BENEDETTO (A.) et MELE (G.). — Comportamento del glutatione ematico e tessutale nella tripanosomiasi sperimentale della cavia da *Trypanosoma Brucei*. *Arch. ital. Sci. Méd. Trop.* 1960, 41 : 439-449.
4. BRAND (Von) (Th.), TOBIE (E. J.) et MEHLMAN (B.). — The influence of some sulphhydryl inhibitors and of fluoroacetate on the oxygen consumption of some trypanosomes. *J. cell. Comp. Physiol.* 1950, 35 : 273-300.
5. CITRI (N.) et GROSSOWICZ (N.). — A partially defined culture medium for *Trypanosoma cruzi* and some other haemoflagellates. *J. gen. microbiol.* 1955, 13 : 273-278.
6. HEWITT (R. I.), GUMBLE (A.), KUSHNER (S.), SAFIR (S. R.), BRANCONI (J. M.), et SUBBAROW (Y.). — I. — Effect of the p-phenylene diguanidine and related compounds against experimental infections with *Trypanosoma equiperdum*. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1949, 96 : 305-314.
7. JADIN (J.) et WERY (M.). — La culture des trypanosomidés. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 1963 (5) : 831-842.
8. KRIJGSMAN (B. J.). — Vergleichend physiologische Untersuchungen über den Stoffwechsel von *Trypanosoma evansi* in Zusammenhang mit der Anpassung an Wirtstier. *Zeitschr. f. vergleich. Physiologie* 1936, 23 : 663.

9. LWOFF (M.). — Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomides 1940, Masson et Cie édit.
10. MANNOZZI-TORINI (M.). — Studio di un fermento proteolitico nel tripanosoma della Surra (*evansi*). *Boll. Ist. Sieroter.* Milan 1938, 17 : 824.
11. MARMUR (J.), CAHOON (M. E.), SHIMURA (Y.) et VOGEL (H. J.). — Desoxyribonucleic acid type attributable to a bacterial endosymbiote in the protozoon *Crithidia (Strigomonas) oncopelti*. *Nature* 1963, 197 : 1228-1229.
12. NICOLI (J.). — Etudes préliminaires sur les conditions de culture de *Trypanosoma gambiense*. *Bull. Soc. Path. exot.* 1961, 51 : 77-83.
13. PESSAT (O. A. N.). — Milieu diphasique pour la culture de *Trypanosoma cruzi*. *Bull. Soc. Path. exot.* 1961, 54 : 16-19.
14. RYLEY (J. F.). — Studies on the metabolism of the Protozoa I. Metabolism of the parasitic flagellate *Trypanosoma lewisi*. *Biochem. J.*, 1951, 49 : 557-585.
15. SAMPATH (A.) et LITTLE (P.). — Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in liquid media. *J. Bact.* 1949, 57 : 265.
16. THURSTON (J. P.). — The oxygen uptake of *Trypanosoma lewisi* and *Trypanosoma equiperdum* with especial reference to oxygen consumption in the presence of amino-acids. *Parasitology* 1958, 48 : 149-164.
17. TRAGER (W.). — Development of « *Trypanosoma vivax* » to the infective stage in tse-tse fly tissue culture. *Nature* 1959, 184 : 30-31.
18. WILLIAMSON (J.) et DESOWITZ (R. S.). — The chemical composition of trypanosomes I. Protein, amino-acid and sugar analysis. *Exp. Parasit.*, 1961, 11 : 161-175.
19. WILLIAMSON (J.) et LOURIE (E. M.). — Interference with the trypanocidal action of gamma (p-arsenophenyl) butyric acid by p-aminobenzoïc acid. *Ann. trop. Med. Parasit.* 1946, 40 : 255-264.
20. WILLIAMSON (J.) et ROLLO (I. M.). — Stimulating effect of amino-acids on the survival at 37° c of *Trypanosoma rhodesiense* in a serum-free synthetic medium. *Nature* 1952, 170 : 376-377.
21. ZELEDON (R.). — Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. II. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds on the respiration. *The Journal of Parasitology*, 1960, 46 (5) : 541-551.