

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

III. — Acides gras.

par J. BALIS

Avec la collaboration technique de Madame FORT

RÉSUMÉ

L'auteur a étudié le comportement de *Trypanosoma evansi* en présence de dix acides gras. Six d'entre eux se sont montrés toxiques, spécialement les acides linoléique et oléique. Au cours de ce travail, cinq milieux, dont trois synthétiques, ont été expérimentés. Deux favorisent nettement la survie de *Trypanosoma evansi*.

L'analyse immédiate permet de retrouver dans toutes les cellules vivantes, végétales ou animales, les mêmes substances et, l'eau mise à part, les éléments de base sont toujours les protides, les glucides et les lipides. Ces derniers sont des esters d'alcools et d'acides gras. Ils sont très variés et de structure chimique souvent fort complexe.

Les glycérides, les plus simples parmi les lipides ternaires, ont une grande importance car ils forment quantitativement la majorité des graisses animales. Ils ne diffèrent entre eux que par la molécule d'acide gras, généralement saturée mais pouvant aussi posséder des liaisons éthyléniques lui conférant des propriétés biologiques spéciales. C'est ainsi qu'à faible dose les acides oléique et linoléique sont des stimulants de la croissance cellulaire alors qu'à un taux plus élevé ils sont inhibiteurs.

Le rôle des acides gras n'est donc pas négligeable et dans le domaine de la culture des trypanosomes, BONE et PARENT lors d'un récent travail (4) ont mis en évidence l'influence très favorable de l'acide stéarique et à un moindre degré de l'acide béhénique, sur la croissance de *Trypanosoma cruzi*.

Venant en complément de deux précédentes publications (2-3) nous avons étudié l'action d'une dizaine d'acides gras sur la survie « *in vitro* » de *Trypanosoma evansi*.

Matériel et méthodes :

Ont été expérimentés les dix acides gras suivants :

1. — butyrique,
2. — caproïque,
3. — caprylique,
4. — linoléique,
5. — oléique,
6. — caprique,
7. — laurique,
8. — myristique,
9. — palmitique,
10. — stéarique,

Les cinq premiers sont liquides à la température ordinaire. Tous sont saturés sauf les acides linoléique et oléique.

N'étant pas hydrosolubles, ces corps sont saponifiés par une solution aqueuse de soude à N/10 diluée dans les proportions figurant au tableau n° 1.

TABLEAU N° I

N°	100 mg acide gras	masse moléculaire	soude caustique à N/10 (en ml)	eau distillée (en ml)
1	butyrique	88	11,5	38,5
2	caproïque	116	8,75	41,25
3	caprylique	144	7	43
4	linoléique	280	4	46
5	oléique	282	3,75	46,25
6	caprique	172	6	44
7	laurique	200	5	45
8	myristique	228	4,5	45,5
9	palmitique	256	4	46
10	stéarique	284	3,75	46,25

L'opération est conduite au bain marie bouillant pendant 15 à 20 minutes en agitant de temps en temps.

Cent milligrammes de chaque acide gras sont ainsi solubilisés dans 50 ml. Ce volume a été choisi afin d'obtenir une suspension liquide pour chacun d'eux. En effet les savons sont fortement dissociés et les anions se groupent pour former des micelles dont l'abondance est en rapport avec le poids moléculaire et le degré de saturation. Malgré cette dilution, les acides myristique, palmitique et stéarique, donnent des gels que l'on est forcé de liquéfier par un léger réchauffement au moment de l'emploi. Un millilitre de chaque préparation contient approximativement 2 mg de sel de sodium.

L'expérimentation en milieux diphasiques, précédemment utilisée (2-3), est ici impossible car la plupart des solutions ont une structure colloïdale qui ne leur permet pas de diffuser rapidement à partir de la gélose et les résultats que l'on obtient sont erronés. Il est donc nécessaire d'incorporer les différents savons au milieu liquide et nous avons adopté la technique suivante :

On répartit dans des fioles d'ERLENMEYER de 100 ml numérotées de 1 à 10 les différents sels d'acides gras en prenant soin d'utiliser chaque

fois une pipette propre. Le milieu liquide, ensemencé avec *Trypanosoma evansi*, est ensuite versé stérilement dans les fioles, à raison de 40 ml pour chacune d'elles, en agitant légèrement afin d'assurer l'homogénéité du mélange. Les numéros 8-9 et 10 font préalablement l'objet d'un léger chauffage afin de fluidifier les savons.

Le nombre de flagellés en début d'expérience a été chaque fois de 20.000 par millimètre cube. Pour obtenir cette valeur, une quantité connue de milieu est d'abord ensemencée avec du sang de rat parasité, de façon à obtenir un peu plus que 20.000 trypanosomes par millimètre cube. Après numération à l'hématimètre, on calcule la quantité de milieu vierge à ajouter pour avoir le taux désiré.

Chaque expérimentation a été réalisée dans onze fioles, la dernière étant un témoin. Les quantités de solutions savonneuses utilisées furent de 2 ml et 2/10 de ml, ce qui aboutit donc à une concentration d'à peu près 0,1 et 0,01 mg d'acide gras par ml de milieu.

Après une incubation de vingt heures à 25°C, on agite légèrement et on effectue une numération des trypanosomes sur le contenu de chaque fiole. Les résultats sont comparés à celui fourni par le témoin.

Quatre milieux différents ont été expérimentés ;

ils sont tous très fortement tamponnés et désignés chacun par un numéro. Leur formule a été établie en tenant compte des conclusions tirées des précédents travaux (2-3).

N° 7.

C'est le classique milieu au sang de cheval dont nous rappelons la composition :

10 ml de sang de cheval + 90 ml d'eau distillée.
Hémolyse pendant une heure à la température du laboratoire puis addition de :

Solution tampon : (mélange de phosphates mono et bipotassiques 50 g pour 100 ml d'eau distillée, de façon à obtenir pH 7,4) 2 ml

Glucose 2 g

Filtration sur papier.

Stérilisation par filtration sur SEITZ (la présence du sang hémolysé rend parfois cette opération assez longue).

Les trois milieux suivants sont entièrement synthétiques :

N° 39.

Glucose 2 g

Solution tampon 2 ml

Chlorure de sodium 200 mg

Eau distillée..... 100 ml

Stérilisation par filtration sur SEITZ.

N° 43.

Glucose 2 g

Solution tampon 2 ml

Glutathion réduit 50 mg

Histidine 25 mg

Arginine..... 25 mg

D^L-Tryptophane 25 mg

Sérine 25 mg

Sulfite de sodium 25 mg

Acide benzoïque 25 mg

Adénine 10 mg

Eau distillée..... 100 ml

Stérilisation par filtration sur SEITZ.

Pour préparer ce milieu, il faut d'abord dissoudre l'acide benzoïque, en chauffant si nécessaire, puis refroidir à la température du laboratoire et incorporer les autres substances en terminant par le glutathion réduit. On peut à la rigueur le remplacer par la cystéine (25 mg seu-

lement car elle est difficilement soluble), l'acide thiomalique et l'acide thioglycolique (10 mg).

N° 44.

Glucose 2 g

Solution tampon 2 ml

Chlorure de sodium 200 mg

Glutathion réduit 50 mg

Eau distillée..... 100 ml

Stérilisation par filtration sur SEITZ.

Le milieu de survie le plus intéressant est le n° 43. *Trypanosoma evansi* y conserve sa virulence à 25° pendant deux ou trois jours et des rats inoculés après ce délai contractent aisément la maladie. Il peut être utilisé comme milieu de transport à une température comprise entre 4° et 10°.

Résultats et discussion

Les résultats obtenus figurent dans le tableau n° 2 et chacun est la moyenne de plusieurs expériences.

On peut en déduire ce qui suit :

1. — Les acides butyrique, caproïque, caprylique et caprique, n'exercent pratiquement aucun effet sur *Trypanosoma evansi* aux doses de 0,1 et 0,01 mg par ml. Par contre, les acides linoléique, oléique, laurique, myristique, palmitique et stéarique sont nettement toxiques.

Les deux premiers provoquent une hémolyse totale immédiate et une destruction rapide des trypanosomes à la dose de 0,1 mg par ml. Le phénomène, bien que partiel, est encore net pour 0,01 mg par ml.

Le sérum agit comme détoxifiant et les valeurs obtenues avec le milieu n° 7, qui en contient, mettent bien en évidence cette action.

Les acides laurique, myristique, palmitique et stéarique, ont une influence défavorable accompagnée d'une hémolyse partielle lorsqu'on utilise les préparations synthétiques nos 39-44 et 43.

Si nous comparons ces résultats à ceux obtenus par BONE et PARENT avec *Trypanosoma cruzi* (tableau n° 3), nous constatons que les acides laurique, myristique, palmitique et oléique sont néfastes aux deux types de trypanosomes. Par contre, l'acide linoléique, très toxique pour *Trypanosoma evansi* est sans action sur *Trypanosoma cruzi* et pour ce dernier, l'acide stéarique est un véritable facteur de croissance à la dose

TABLEAU N° II

	2 ml - 0,1 mg/ml				2/10 ml - 0,01 mg/ml			
	N° 7	N° 39	N° 44	N° 43	N° 7	N° 39	N° 44	N° 43
I	10.900	8.800	7.900	12.500	14.300	8.300	10.700	12.600
2	9.200	7.900	9.300	10.900	14.500	8.800	11.800	12.400
3	12.800	7.400	9.600	10.700	13.200	6.800	7.800	11.700
4	7.600 HP	0 HTI	0 HTI	0 HTI	13.400	5.200 HP	9.900 HP	15.500 HP
5	6.200 HT	0 HTI	0 HTI	0 HTI	15.500	3.200 HP	5.900 HP	9.000 HP
6	5.600	9.500	8.600	10.300	14.400	8.600	9.900	13.600
7	7.800	6.100 HP	7.200 HP	5.300 HP	14.000	4.700	8.000	9.800
8	10.000	0 HT	0 HT	0 HT	15.600	3.200	7.600	9.600
9	9.600	1.400 HP	2.500 HP	4.500 HT	12.700	1.800	6.300	12.200
10	8.300	0 HP	0 HP	0 HT	13.200	2.000	5.900	14.700
T	12.900	8.200	9.400	11.000	14.000	6.200	10.500	15.500

HP = hémolyse partielle HT = hémolyse totale HTI = hémolyse totale immédiate

de 0.025 mg par ml alors qu'il est défavorable à *Trypanosoma evansi* à 0,01 mg par ml. Il y a donc de profondes différences biochimiques entre ces deux flagellés et il est probable que d'une façon générale, chaque type de trypanosome possède son métabolisme particulier. Nous avons d'ailleurs déjà observé ceci avec *Trypanosoma evansi* et *Trypanosoma brucei* (1).

L'effet antitoxique du sérum nous a amené à élaborer le milieu synthétique n° 48, dérivé du n° 43, Sa composition est la suivante :

Glucose	2 g
Solution tampon	2 ml
Glutathion réduit	50 mg
Histidine	25 mg
Arginine.....	25 mg
D-L Tryptophane	25 mg
Sérine	25 mg
Sulfite de sodium	25 mg
Acide benzoïque	25 mg
Adénine	10 mg
Sérum de cheval ou de veau	10 ml
Eau distillée.....	90 ml

Ce milieu dont la préparation est la même que celle du n° 43 s'est révélé un peu supérieur à ce dernier et peut être avantageusement utilisé comme milieu de survie ou de transport.

2. — La toxicité est en relation avec la masse moléculaire et la présence de liaisons éthyléniques. C'est en effet à partir de 200 que l'on observe une action défavorable et l'acide linoléique (deux liaisons éthyléniques) est nettement plus toxique que l'acide oléique (une liaison éthylénique). Cette différence devient apparente quand on utilise ces derniers corps à la dose de 0.01 mg par ml dans les trois milieux synthétiques.

3. — Les résultats fournis par les témoins dans le tableau n° 2 font ressortir la nette supériorité de la préparation n° 43 qui permet la meilleure survie.

Conclusions

Au cours de ce travail inspiré par une récente publication de BONE et PARENT (4), nous avons recherché qu'elle pouvait être l'influence de 10 acides gras sur la survie *in vitro* de *Trypa-*

TABLEAU N° III

Acide	Masse moléculaire	<i>Trypanosoma evansi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
butyrique	88	0	non essayé
caproïque	116	0	non essayé
caprylique	144	0	non essayé
caprique	172	0	non essayé
laurique	200	-	-
myristique	228	-	-
palmitoleïque	254	non essayé	-
palmitique	256	-	-
linoléique	278	non essayé	-
oléique	282	-	0
stéarique	284	-	++
arachidonique	304	non essayé	-
arachidique	312	non essayé	0
behenique	326	non essayé	+

0 = sans action

+ = favorable

- = défavorable

Trypanosoma evansi et nous sommes arrivés aux conclusions suivantes :

Les acides butyrique, caproïque, caprylique et caprique sont sans action. Les acides linoléique, oléique, laurique, myristique, palmitique et stéarique sont nettement toxiques, spécialement les deux premiers qui provoquent une hémo-

lyse ainsi qu'une destruction rapide des trypanosomes.

La toxicité est en rapport avec la masse moléculaire et la présence de liaisons éthyléniques.

Cinq milieux différents dont trois synthétiques ont été utilisés. Deux d'entre eux, les n°s 43 et 48 nous ont donné des résultats intéressants.

SUMMARY

Action of some chemical substances on the survival of *Trypanosoma evansi* in vitro. III. Fatty acids

The behaviour of *Trypanosoma evansi* in the presence of 10 fatty acids was studied. Six of these acids specially linoleic and oleic acids were shown to be toxic.

During the research work, five media, three of which being synthetic, were experimented. Two of these increased distinctly the survival of *T. evansi*.

RESUMEN

Influencia de algunos cuerpos químicos en la sobrevivida *in vitro* de *Trypanosoma evansi*. III. Acidos grasos

El autor estudió el comportamiento de *Trypanosoma evansi* con diez ácidos grasos. Seis de ellos, sobre todo los ácidos linoléico y oléico, se encontraron tóxicos. Se experimentaron cinco medios de los cuales tres sintéticos durante este trabajo. Claramente, dos de ellos favorecen la sobrevivida de *Trypanosoma evansi*.

BIBLIOGRAPHIE

1. BALIS (J.). — Utilisation des glucides et de leurs produits de métabolisme par *Trypanosoma evansi* et *Trypanosoma brucei*. *Rev. Elev. Méd. Pays Trop.*, 1964, XVII (n° 3), p. 361-368.
2. BALIS (J.). — Influence de quelques corps chimiques sur la survie « in vitro » de *Trypanosoma evansi* : I. Acides aminés et quelques-uns de leurs dérivés. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 1965, XVIII (n° 1) p. 95-100.
3. BALIS (J.). — Influence de quelques corps chimiques sur la survie « in vitro » de *Trypanosoma evansi* : II. Déchets des métabolismes protidique et glucidique ; substances de détoxication. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 1966, 19 (n° 2), p. 163-167.
4. BONE (G. J.) et PARENT (G.). — Stearic acid, an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. *J. gen. Microbiol.*, 1963, 31, p. 261-266.