

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

II. — Déchets des métabolismes protidique et glucidique Substances de détoxication.

par J. BALIS

Avec la collaboration technique de Madame FORT

RÉSUMÉ

Dans ce travail, l'auteur a étudié le comportement « in vitro » de *Trypanosoma evansi* en présence de 27 corps chimiques : déchets des métabolismes protidique et glucidique ainsi que des substances de détoxication présentes dans le sang circulant.

L'Hydroxylamine, la Colamine, l'Adénine et l'Acide benzoïque sont favorables à *Trypanosoma evansi*. Par contre les sels biliaires et l'anhydride carbonique sont toxiques.

Après une série de transformations enzymatiques, les grosses molécules protéiques et glucidiques sont finalement réduites à l'état de corps chimiques relativement simples. Ces derniers vont pouvoir traverser la barrière intestinale et constituer la matière première nécessaire aux multiples synthèses organiques dont les êtres vivants sont le siège.

Ces substances ne sont pas toujours directement assimilées mais, avant de faire partie intégrante des tissus, subissent des modifications profondes telles que désaminations, transaminations, décarboxylations, etc...

Les glucides sont le plus souvent utilisés comme source d'énergie ; cette dernière est libérée par paliers successifs avec chaque fois formation de corps chimiques plus simples mais moins énergétiques, aboutissant en fin de compte à de multiples déchets que le sang véhicule vers les voies naturelles d'élimination.

Cependant certains corps tels que l'ammoniac, sont dangereux et doivent au préalable subir des transformations destinées à les détoxifier. On attribue au foie un rôle prépondérant pour ce travail ; c'est ainsi qu'à son niveau ont lieu les synthèses de l'acide urique et de l'urée. Il y a cependant une exception : celle de l'acide hippurique, qui s'élabore principalement dans le rein et très accessoirement dans le foie.

Trypanosoma evansi, que l'on trouve dans le sang est ainsi en contact permanent avec ces substances et l'objet de notre travail est d'étudier l'action de quelques-unes d'entre elles ou de leurs dérivées sur la survie « in vitro » du parasite.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La technique utilisée et le mode opératoire ont été exposés en détails au cours d'une précédente publication (4). Nous nous bornerons

donc à rappeler que l'expérimentation a été effectuée sur milieux diphasiques, en tubes à essais, avec comme phase solide de la gélose à 2 p. 100 servant de support au corps étudié. La phase liquide contient 10 p. 100 de sang de cheval, du glucose, un mélange de phosphates de potassium destiné à maintenir le pH à 7,4 et enfin de l'eau distillée. Elle est toujoursensemencée en une seule fois puis répartie à raison de 2 ml environ par tube.

Après une incubation de vingt heures à 25°, on récolte le milieu liquide correspondant à la substance étudiée et on effectue une numération des trypanosomes, dont on compare le résultat à celui fourni par une série témoin.

Au total, nous avons expérimenté 27 corps chimiques que l'on peut classer de la façon suivante :

1° Déchets du métabolisme protidique et substances dérivées :

- Acide urique
- Adénine
- Alloxane
- Ammoniaque
- Chlorure d'ammonium
- Colamine
- Créatinine
- Guanine
- Hydroxylamine
- Sels biliaires
- Urate de sodium
- Xanthine

2° Substances intermédiaires du métabolisme glucidique :

- Acide alpha céroglutarique
 - citrique
 - fumarique
 - lactique
 - malique
 - oxalique
 - oxaloacétique
 - pyruvique
- Anhydride carbonique

3° Substances de détoxication et corps chimiques composants ou voisins :

- Acide benzoïque
 - hippurique
 - métaminobenzoïque
 - paraminobenzoïque

Benzoate de sodium
Urée

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats ne sont pas aussi nets que ceux obtenus au cours de travaux antérieurs et déjà exposés dans une précédente publication (4).

1° Déchets du métabolisme protidique et substances dérivées :

L'adénine est favorable à la dose de 0,1 mg par ml de milieu; mais à 1 mg par ml, une toxicité non négligeable apparaît. En effet, pour 15.000 parasites par millimètre cube en début d'expérience, nous avons obtenu après 20 heures les résultats suivants :

Témoin	3.400
1 mg/ml	2.400
0,1 mg/ml	6.900

BONÉ et STEINERT (5) ont montré que l'adénine libre était rapidement incorporée par *Trypanosoma mega* du crapaud africain *Bufo regularis*. Ce parasite est en effet incapable de réaliser la synthèse du noyau purine. Il n'y a donc rien d'étonnant à ce que *Trypanosoma evansi* utilise ce corps puisque son pouvoir général de synthèse est beaucoup plus faible que celui de *Trypanosoma mega*.

Enfin, d'après quelques auteurs, AGOSIN et von BRAND (1), HEWITT, GUMBLE, WALLACE et WILLIAMS (10), l'adénine peut interférer avec la puromycine et bloquer son action trypanocide.

La guanine, proche parente de l'adénine, s'est révélée par contre pratiquement inactive; tout au plus, peut-on noter une légère toxicité à la dose de 1 mg/ml. L'acide urique, que l'on peut considérer comme le terme de l'oxydation des dérivés puriques, n'a aucune influence sur la survie « in vitro » de *Trypanosoma evansi*. Les résultats n'ont pas été meilleurs en essayant d'en augmenter la solubilité par addition de phosphates mono et bipotassiques ou en utilisant son sel de sodium.

La xanthine, très voisine chimiquement de l'acide urique, puisqu'elle n'en diffère que par l'absence d'un oxydriole, est également inactive.

L'ammoniaque paraît être légèrement favorable à des doses inférieures à 0,1 mg/ml mais il

est par contre franchement toxique dès que l'on atteint 1 mg/ml. Ceci est à rapprocher de l'effet de la colamine (4) et de l'hydroxylamine (3) bien que pour cette dernière substance, l'action favorable provient surtout à notre avis, d'une élimination de l'acide pyruvique par combinaison chimique. La colamine ne s'y combine pas mais, provenant de la sérine par décarboxylation, possède également un groupement NH_2 qui lui confère de fortes propriétés basiques.

Il est assez curieux que le chlorure d'ammonium se soit révélé sans intérêt dans nos expérimentations et il semble que l'activité des groupements azotés décroisse en même temps qu'augmente le nombre d'atomes d'hydrogène rattachés à l'azote. Les résultats obtenus avec la créatinine furent inconstants et, bien qu'en moyenne légèrement favorables, ne peuvent être pris en considération.

Signalons enfin que les sels biliaires (mélange de taurocholate et glycocholate de sodium) sont nettement toxiques aux concentrations de 1 mg et 0,1 mg par ml de milieu.

2° Substances intermédiaires du métabolisme glucidique :

L'influence de la plupart de ces corps a déjà été étudiée (2). Rappelons qu'ils sont presque tous toxiques et dans l'ordre décroissant suivant : acides pyruvique, alpha cétooglutarique, oxaloacétique, lactique, malique, succinique, fumarique, citrique et oxalique. L'influence défavorable des deux derniers est très faible et leurs sels de sodium peuvent être employés comme anticoagulants, spécialement l'oxalate.

Une place spéciale doit être faite à l'anhydride carbonique qui est avec l'eau, le terme du métabolisme glucidique. Ce gaz, assez soluble dans les liquides biologiques, provient également de la décarboxylation de divers acides aminés et de la combustion des lipides.

C'est accidentellement, en préparant de l'hydroxylamine, que nous avons été amenés à penser que l'anhydride carbonique était toxique pour *Trypanosoma evansi*. En effet, afin d'éliminer l'ion SO_4 du sulfate d'hydroxylamine, nous avons traité ce corps par du carbonate de baryum en excès. Après 24 heures de contact, le liquide filtré était dépourvu d'ion SO_4 . C'est alors que l'expérimentation nous a montré qu'il était toxique aux doses pour lesquelles il devait être

favorable. Or un simple traitement par le vide détoxifiait la solution. Il suffisait de 0,03 mg de gaz carbonique par ml de milieu pour tuer rapidement *Trypanosoma evansi*. Ces résultats, bien que plusieurs fois contrôlés, paraissent surprenants car le sang circulant contient une notable proportion d'anhydride carbonique non combiné. D'autre part, dans des expériences antérieures non publiées, le mélange bicarbonate de sodium + acide tartrique ne s'était pas montré spécialement défavorable.

3° Substances de détoxication et corps chimiques composants ou voisins :

L'acide hippurique, dont la synthèse s'effectue surtout au niveau du rein, est un corps très peu soluble dans l'eau. Il permet l'élimination de l'acide benzoïque par combinaison avec le glycolle.

Son activité douteuse sur *Trypanosoma evansi* nous a amenés à essayer ses composants et spécialement l'acide benzoïque. Ce corps assez peu soluble dans l'eau, s'est révélé intéressant par son action favorable et remarquablement constante. La dose de 1 mg par ml est la meilleure et elle nous a procuré dans presque toutes nos expériences une survie double de celle observée dans les tubes témoins.

Le benzoate de sodium donne également de nets résultats mais sensiblement inférieurs.

HARVEY (9) pense qu'il existe dans le plasma un acide faible, dialysable, n'appartenant pas au cycle de l'acide tricarboxylique et qui serait responsable d'une augmentation du quotient respiratoire de *Trypanosoma hippicum*. Il y a peut-être un rapprochement à établir avec l'acide benzoïque.

Nous devons signaler également que Made-moiselle FROMENTIN (7) (8) a constaté qu'*in vivo*, l'acide salicylique, ne différant de l'acide benzoïque que par un oxydride supplémentaire, exalte la parasitémie à *Trypanosoma gambiense* chez le rat blanc.

Les acides para et méta aminobenzoïques ne nous ont donné aucun résultat intéressant. La simple présence d'un groupement aminé suffit donc à retirer toute activité à l'acide benzoïque.

WILLIAMSON et LOURIÉ (15) ont cependant observé que l'acide para aminobenzoïque pouvait interférer « *in vitro* » et « *in vivo* » avec

l'activité trypanocide de l'acide gamma (p. arsénophényl) butyrique. Par contre, pour SEN, DUTTA et RAY (11), l'acide para aminobenzoïque, n'influence nullement la parasitémie à *Trypanosoma evansi* chez le rat.

L'urée a fait l'objet de plusieurs travaux : FRENCH (6) signala en 1938 que la teneur du sang en urée n'était pas modifiée par l'infection à *Trypanosoma congolense* et *Trypanosoma brucei* du bœuf et du mouton.

Plus récemment, une série d'études fort intéressantes a été entreprise par M. STEINERT, G. STEINERT et G. J. BONE (12) (13) (14). Ces auteurs ont mis en évidence le rôle très important joué par l'urée sur *Trypanosoma mega* ; ils ont insisté sur le fait que ce corps était capable d'induire la transformation de la forme crithidia en forme trypanosome.

Cet effet ne pouvait évidemment pas se manifester sur *Trypanosoma evansi* puisque ce flagellé ne présente jamais de formes crithidiennes.

Les résultats que nous avons obtenus avec l'urée ont été négatifs, même du point de vue toxicité, cette dernière n'apparaissant faiblement qu'à la dose de 10 mg par ml de milieu.

CONCLUSION

Outre des corps tels que l'hydroxylamine et la colamine, déjà étudiés dans d'autres publications (3) (4), ce travail nous a permis d'ajouter à la liste des substances favorables à *Trypanosoma evansi*, l'adénine et l'acide benzoïque. Par contre, se sont montrés toxiques, les sels biliaires et sous certaines réserves, l'anhydride carbonique. Ce dernier est susceptible de prendre naissance dans les milieux de survie usuels et son accumulation contribuerait à provoquer la mort des flagellés.

SUMMARY

Influence of some chemical substances on « in vitro » survival of *Trypanosoma evansi*. II. Protidic and glucidic metabolicwaster. Detoxication substances

In this work the author studies « in vitro » behaviour of *Trypanosoma evansi* with 27 chemical substances : protidic and glucidic metabolisms waster, and detoxication substances present in the circulating blood

Hydroxylamin, Colamin, Adenin and benzoic acid are favourable for *Trypanosoma evansi*, but biliary salts and carbonic dioxide are toxic.

RESUMEN

Influencia de algunos compuestos químicos sobre las upervivencia « in vitro » de *Trypanosama evansi*. Mermas de los metabolismos protidicos y glucidicos. Sustancias de destoxicación

En este trabajo el autor estudió el comportarse « in vitro » de *Trypanosoma evansi* con 27 compuestos químicos : Mermas de los metabolismos protidicos y glucidicos, así como sustancias de destoxicación presentes en la sangre circulante.

La hidroxilamina, la colamina, la adenina y el acido benzoico favorecen a *Trypanosoma evansi*.

En cambio, las sales biliares y el anhidrido carbonico son toxicos.

BIBLIOGRAPHIE

1. AGOSIN (M.) et von BRAND (T.). — The influence of puromycin on the carbohydrate metabolism of *Trypanosoma equiperdum*. *Antibiot. Chemoth.* 1954, 4, p. 624-632.
2. BALIS (J.). — Utilisation des glucides et de leurs produits de métabolisme par *Trypanosoma evansi* et *Trypanosoma brucei*. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.* 1964, T. XVII, n° 3, p. 361-368.
3. Elimination de l'acide pyruvique des milieux de culture en vue de favoriser la survie de *Trypanosoma evansi*. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.* 1964, t. XVII, n° 3, p. 369-375.
4. 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, n° 1, t. XVIII, p. 95-100.
5. BONE (G. J.) et STEINERT (M.). — Isotopes incorporated in the nucleic acids of *Trypanosoma mega*. *Nature* 1956, T. 178, p. 306-309.
6. FRENCH (M. H.). — Studies in animal trypanosomiasis. III — The effects of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* on blood urea. *The Journ. of comp. Path. Ther.* 1938, vol. 51, n° 1, p. 42.
7. FROMENTIN (H.). — Action du salicylate de sodium sur deux souches de *Trypanosoma gambiense* chez le rat blanc. *Bull. Soc. Path. exo.* 1955, T. 48, p. 651-655.
8. FROMENTIN (H.). — Action de l'acide salicylique et de quelques-uns de ses dérivés sur l'infection expérimentale du rat blanc à *Trypanosoma gambiense*. *Bull. Soc. Path. Exo.* 1956, T. 49, p. 272-277.
9. HARVEY (S. C.). — Some effects of plasma and its fractions on *Trypanosoma hippicum*. *J. cell. a. comp. Physiol.* 1950, T. 35, p. 371-386.
10. HEWITT (R. J.), GUMBLE (A.-R.), WALLACE (W. J.), WILLIAMS (J. H.). — Experimental chemotherapy of trypanosomiasis. IV — Reversal by purines of the « in vivo » activity of puromycin and an amino nucleoside analog against *Trypanosoma equiperdum*. *Antibiot. and chemother.* 1954, T. 4, p. 1222-1227.
11. SEN (H. G.), DUTTA (B. N.) et RAY (H. N.). — Milk diet in *Trypanosoma evansi* infection in rats. *Ind. J. Vet. Sci. and an. Husb.* 1955, T. 25, p. 117-120.
12. STEINERT (M.) et BONE (G. J.). — Induced change from culture form to blood stream form in *Trypanosoma mega*. *Nature*, 1956, T. 178, p. 362.
13. STEINERT (M.). — Etudes sur le déterminisme de la morphogénèse d'un trypanosome. *Exp. cell. Res.* 1958, T. 15, p. 560-569.
14. STEINERT (M.) et STEINERT (G.). — Inhibition de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique de *Trypanosoma mega* par l'urée à faible concentration. *Arch. Int. Physiol.* 1960, T. 68, p. 413-414.
15. WILLIAMSON (J.) et LOURIE (E. M.). — Interference with the trypanocidal action of gamma (p. arsenophenyl) butyric acid by p. aminobenzoic acid. *Ann. trop. Med. Parasit.* 1946, T. 40, p. 255-264.