

Cinétique de la mort *in vitro* de *Trypanosoma vivax* et *Trypanosoma congolense* au contact de médicaments trypanocides

par S. M. TOURE

RÉSUMÉ

Trypanosoma vivax et *Trypanosoma congolense* ont été soumis *in vitro* à l'action de trypanocides appartenant à trois familles chimiques : diamidine, quinoléine et phénanthridine. La mort des trypanosomes est précédée de modifications dans leur morphologie : vacuolisation excessive, apparition dans le cytoplasme de granulations métachromatiques, dégénérescence par arrondissement avant la lyse cellulaire. Les causes de la mort sont discutées à la lumière des observations morphologiques qui sont le reflet de perturbations physiologiques chez les trypanosomes.

INTRODUCTION

Lorsque des animaux trypanosomés reçoivent une dose thérapeutique d'un trypanocide efficace, les trypanosomes ne sont pas décelés dans le sang après un temps qui varie selon la drogue utilisée. L'examen microscopique du sang à l'état frais d'un animal traité ne laisse apparaître le plus souvent qu'une diminution progressive du nombre des trypanosomes ; on juge difficilement de l'atteinte de ces derniers en dehors de leur mouvement ralenti. Les modifications les plus apparentes de la morphologie des trypanosomes surviennent *in vitro*.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Les expériences sont faites sur des lames à concavité à la température ambiante du laboratoire (24-26 °C).

Sur chaque lame sont déposées :

a) deux gouttes de sang renfermant *T. congolense* ou *T. vivax*. Le sang, recueilli sur liquoïde Roche à 5 p. 100, provient d'animaux fortement

parasités : souris pour *T. congolense*, chèvre pour *T. vivax* ;

b) deux gouttes de solution physiologique de Hanks ;

c) une goutte de solution trypanocide renfermant 0,125 mg à 0,500 mg de produit actif. La concentration du trypanocide varie entre 0,5 mg par ml et 2 mg par ml.

Les gouttes sont obtenues à partir de pipettes calibrées de 1 ml renfermant 20 gouttes par ml.

La durée de réaction varie entre 2 et 22 heures. Les lectures sont faites périodiquement.

Le tableau résume les données de l'expérience.

RÉSULTATS

Les doses et les concentrations de trypanocide mentionnées sont celles qui ont produit un effet progressif et appréciable sur les trypanosomes. Des doses et des concentrations plus fortes ont entraîné la mort brutale des trypanosomes sans fournir d'information sur leur évolution vers la mort (surtout la lomidine et le bérénil). Des doses plus faibles ou des dilutions extrêmes du

TABLEAU

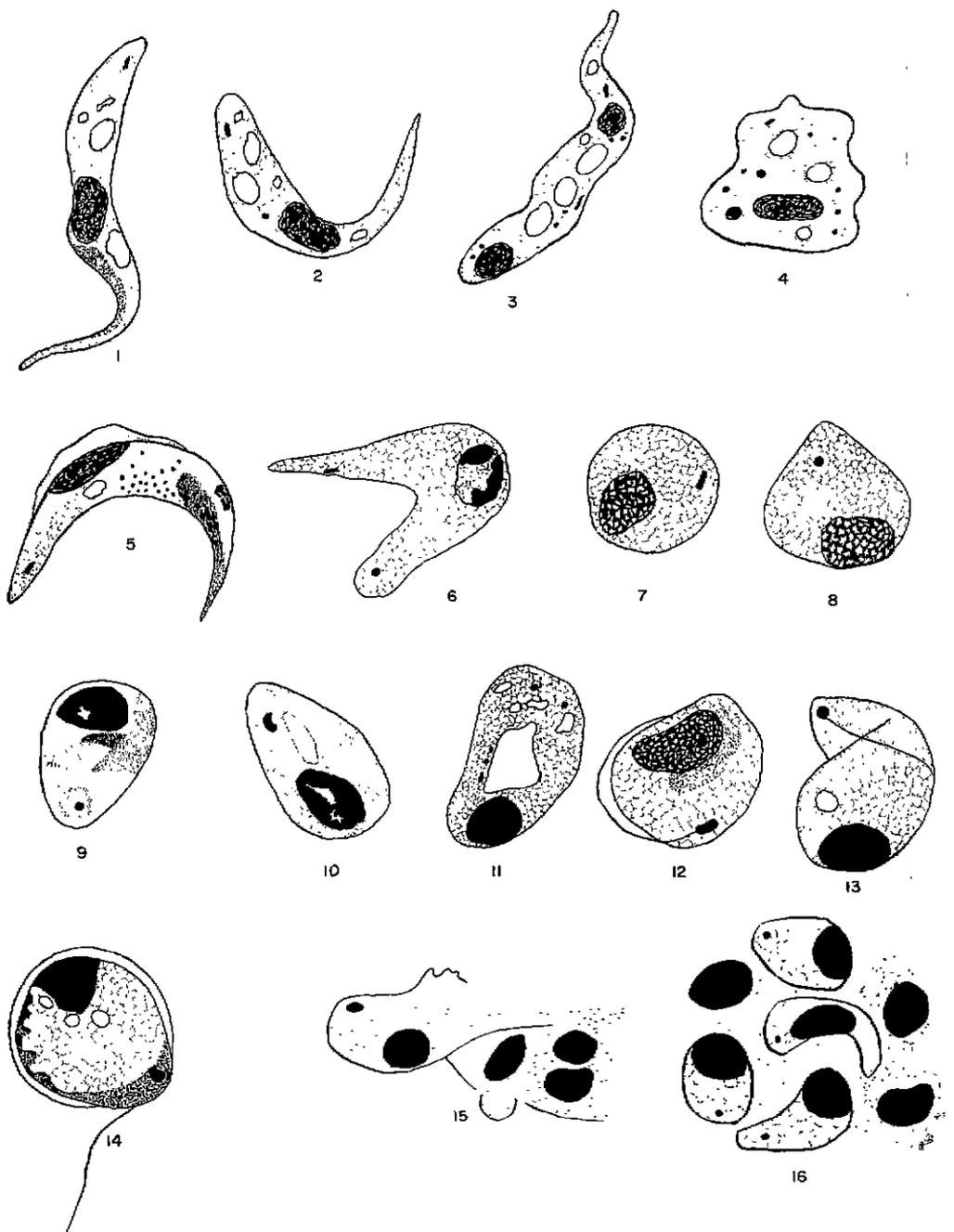
| Trypanocide | Dilution | Dose (mg) | Concentration | Trypanosome | Durée (h) |
|------------------------------|------------|-----------|---------------------|--------------|-----------|
| Berenil | 3,5 p.1000 | 0,175 | 7×10^{-4} | T.congolense | 2 |
| | 7 p.1000 | 0,350 | 14×10^{-4} | T.congolense | 2 |
| | 7 p.1000 | 0,350 | 14×10^{-4} | T.vivax | 2 |
| | 3,5 p.1000 | 0,175 | 7×10^{-4} | T.congolense | 4 |
| | 3,5 p.1000 | 0,175 | 7×10^{-4} | T.congolense | 5 |
| | 2,5 p.1000 | 0,125 | 5×10^{-4} | T.congolense | 22 |
| Lomidine | 10 p.1000 | 0,500 | 2×10^{-3} | T.congolense | 5 |
| | 10 p.1000 | 0,500 | 2×10^{-3} | T.congolense | 22 |
| Méthylsulfate d'Antrycide | 5 p.1000 | 0,250 | 1×10^{-3} | T.congolense | 8 |
| | 2,5 p.1000 | 0,125 | 5×10^{-4} | T.congolense | 22 |
| | 2,5 p.1000 | 0,125 | 5×10^{-4} | T.vivax | 22 |
| | 10 p.1000 | 0,500 | 2×10^{-3} | T.congolense | 22 |
| | 20 p.1000 | 1 | 4×10^{-3} | T.congolense | 6 |
| Tozocide | 5 p.1000 | 0,250 | 1×10^{-3} | T.congolense | 6 |
| Ethidium Cl | 10 p.1000 | 0,500 | 2×10^{-3} | T.congolense | 22 |
| Ethidium Br | 5 p.1000 | 0,250 | 1×10^{-3} | T.congolense | 5 |
| | 5 p.1000 | 0,250 | 1×10^{-3} | T.congolense | 22 |
| Prothidium | 2,5 p.1000 | 0,125 | 5×10^{-4} | T.vivax | 8 |
| | 2,5 p.1000 | 0,125 | 5×10^{-4} | T.congolense | 22 |
| | 5 p.1000 | 0,250 | 1×10^{-3} | T.congolense | 6 |
| Chlorure d'Isoméamidium | 2,5 p.1000 | 0,125 | 5×10^{-4} | T.vivax | 6 |
| | 2,5 p.1000 | 0,125 | 5×10^{-4} | T.congolense | 6 |

trypanocide ne semblent pas agir sur les trypanosomes qui gardent longtemps le pouvoir de se diviser.

Il est à noter que le moranyl utilisé dans les mêmes conditions que les autres trypanocides, à la concentration de 1 mg par ml et 2 mg par ml,

n'a pas manifesté son pouvoir trypanocide : les trypanosomes subissent une mutation culturale d'un type particulier et se multiplient activement.

Les modifications observées avant la mort des trypanosomes varient selon la drogue et la concentration : vacuolisation excessive, appari-



1- 3 : Vacuolisation excessive (*T. congolense* en présence d'antrycide) ; 4 : Vacuolisation et dégénérescence de *T. congolense* en présence de prothidium ; 5 : Granulations métachromatiques ; 6-11 : Action du bérénil sur *T. congolense* ; 12-14 : Action du bérénil sur *T. vivax* ; 15 : Lyse avec le bérénil ; 16 : Dégénérescence et lyse avec la lomidine.

tion dans le cytoplasme de granulations métachromatiques, dégénérescence par arrondissement. L'irritabilité des trypanosomes diminue et la phase ultime de souffrance est l'immobilité suivie de lyse cellulaire.

1. — Vacuolisation excessive.

Elle est produite par les dérivés de la phénanthridine et de la quinoléine : prothidium à la concentration de 0,5 mg par ml pendant 22 heures ; chlorure d'éthidium, 2 mg par ml pendant 22 heures ; bromure d'éthidium, 1 mg par ml pendant 22 heures ; méthylsulfate d'antrycide entre 0,5 et 2 mg par ml pendant 8 à 22 heures. BRANSS l'avait déjà noté *in vitro* avec le surfen C.

Les vacuoles sont souvent de grande taille (deux à trois microns de diamètre) mais leur nombre peu élevé (fig. 1, 2, 3, 4). L'examen à l'état frais montre une mobilité des vacuoles d'une extrémité à l'autre du trypanosome. La vacuolisation excessive est le résultat d'un catabolisme accru au détriment des synthèses vitales ou la perturbation de ces dernières avec comme conséquence production anormale de gaz.

La vacuolisation est souvent accompagnée d'une autre atteinte cellulaire : précocement, augmentation du volume des granulations métachromatiques et plus tard, dégénérescence par arrondissement (fig. 3, 4).

2. — Granulations métachromatiques.

A l'état normal, les inclusions apparentes sont les grains de volutine, généralement de très petite taille. Chez les trypanosomes en souffrance sous l'effet d'antrycide ou de dérivés de la phénanthridine, apparaissent des granulations denses qui prennent une coloration métachromatique (fig. 3, 5). La formation de ces granules survient après quelques heures de contact avec le trypanocide.

Des expériences d'ORMEROD (1951, 1952) et de NEWTON (1961) font état de ces inclusions basophiles apparues au cours d'épreuves à l'antrycide. Ces inclusions sont un complexe formé par le trypanocide et des ribonucléoprotéines cellulaires (ORMEROD, 1951).

Le mécanisme intime d'action de certains trypanocides pourrait être similaire de celui d'antibiotiques comme la streptomycine qui agit au niveau des ribosomes cellulaires perturbant la synthèse des protéines enzymatiques. Dans le cas

particulier des trypanosomes les sièges de synthèse seraient les grains de volutine. Le résultat en est l'arrêt de la croissance des trypanosomes et de leur division. L'incapacité des trypanosomes à se diviser serait irréversible : plusieurs lots de souris inoculées avec *T. congolense* ayant subi l'action d'antrycide ou de prothidium n'ont révélé aucune infection au bout de trois semaines.

3. — Dégénérescence.

Au contact du bérénil à la concentration de 0,5 à 1,4 mg par ml, *T. congolense* et *T. vivax* ont subi, au bout de deux heures, une involution caractéristique : les trypanosomes perdent leur flagelle et s'arrondissent, prenant ainsi une forme leishmania (fig. 6 à 14). Le kinétoplaste reste longtemps persistant. Cette involution est à apparenter à une dégénérescence, le volume cytoplasmique diminue et le stade final qui désigne la mort est représenté par un noyau entouré d'une pellicule cytoplasmique en voie de lyse (fig. 15). Selon FUSSGÄNGER et BAUER (1960) le bérénil agirait en bloquant le métabolisme des sucres chez le trypanosome. Cette perturbation pourrait expliquer l'involution progressive avec diminution du volume cellulaire.

La lomidine, à la concentration de 2 mg par ml, a une action comparable (fig. 16) mais la mort des trypanosomes est plus rapide.

Les deux dérivés semblent respecter l'intégrité du noyau et agir davantage sur le cytoplasme.

Le prothidium à la concentration de 0,5 mg par ml produit une dégénérescence plus lente (12 à 22 heures). Les formes obtenues sont ici amiboïdes (fig. 4) et renferment des inclusions métachromatiques et des vacuoles agrandies.

CONCLUSION

Les diverses épreuves mettent en évidence des modifications souvent importantes dans la morphologie intime des trypanosomes et que l'on peut rattacher sûrement à l'action des trypanocides utilisés. Le bérénil et la lomidine agissent directement sur le cytoplasme et entraînent la dégénérescence progressive des trypanosomes. Les trypanocides dérivés de la quinoléine et ceux du groupe des phénanthridines entraînent la formation de granulations métachromatiques et

une vacuolisation excessive qui sont le reflet d'un désordre du métabolisme. Dans les limites de l'expérimentation, on peut faire le partage entre les médicaments à activité trypanocide vraie et ceux qui entravent la multiplication par arrêt des synthèses vitales. Le bérénil et la lomidine semblent du premier type : leur action est rapide. L'antrycide et les dérivés du phénanthridium sont du deuxième type : les trypanosomes restent longtemps à leur contact en gardant leur forme générale et leur irritabilité.

En rapport avec la chimiorésistance, on peut dire que le bérénil, parce qu'il tue effectivement les trypanosomes, ne crée pas de souches qui lui résistent ensuite tandis que les dérivés de la quinoléine et de la phénanthridine peuvent faire apparaître des mutants chimiorésistants.

*Institut d'Elevage et de Médecine vétérinaire
des Pays tropicaux, Maisons-Alfort.
Laboratoire national de l'Elevage
et de Recherches vétérinaires, Dakar-Hann. -*

SUMMARY

The progress of death *in vitro* of *Trypanosoma vivax* and *T. congolense* in contact with trypanocidal drugs

The morphological changes which had occurred in *Trypanosoma congolense* and *T. vivax* before they died following the effect *in vitro* of trypanocidal drugs have been reviewed in this paper.

Experiments were carried out with drugs of three chemical groups : diamidine, quinoleine and phenanthridium.

The lesions due to these drugs consisted in an excessive widening of the vacuoles, an apparition in the cytoplasm of metachromatic granules or a degeneration of the cell which is getting round-shaped and then lysed.

The causes of the death are discussed in view of the morphological changes which are reflecting the physiological disturbance of the trypanosomes.

RESUMEN

Modificaciones *in vitro* de la morfología del *Trypanosoma vivax* y del *Trypanosoma congolense*, antes de su muerte, causadas por medicamentos tripanocidos

Se nota la acción *in vitro* de tripanocidos perteneciendo a tres familias químicas : diamidina, quinoleina y fenanthridina, contra el *Trypanosoma vivax* y el *Trypanosoma congolense*. Modificaciones ocurren en la morfología de los tripanosomas : crecimiento excesivo de las vacuolas, aparición en el citoplasma de granulaciones metacromáticas, degeneración de la célula redondeándose antes de su lisis. Se discuten las causas de la muerte de los tripanosomas según las observaciones morfológicas que demuestran perturbaciones fisiológicas en dichos tripanosomas.

BIBLIOGRAPHIE

1. BAUER (F.). — The development of drug-resistance to berenil in *Trypanosoma congolense*. *Vet. Rec.*, 1962, **74** (9) : 265-266.
2. BRANSS (F. W.). — Recherches sur l'activité de nouveaux agents chimiothérapeutiques vis-à-vis des trypanosomes du groupe Nagana. *Zeits. Immunität. Forsch.*, 1944, **105**, 104 in *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 1947, p. 169.
3. FROMENTIN (H.). — Etude expérimentale de quelques trypanocides usuels. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1957, **50** (5) : 758-769.
4. FUSSGÄNGER (R.) et BAUER (F.). — Investigations on berenil resistance of trypanosomes. *Vet. Rec.*, 1960, **72** (49) : 1118-21.
5. HAWKING (F.). — Action of drugs upon *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. rhodesiense* in tsetse flies and in culture. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1963, **57** (3) : 255-261.
6. HAWKING (F.) et THURSTON (J. P.). — The action of antrycide upon trypanosomes *in vitro*. *British J. Pharmacol. Chemotherapy*, 1955, **10**, 454-455.
7. Van HOEVE (K.), CUNNINGHAM (M. P.) et GRAINGE (E. B.). — A test for the estimation *in vitro* drug activity. *East afric. Trypan. Res. Org., Annual Report*, 1963-1964, p. 61.
8. NEWTON (B. A.). — The mode of action of quaternary ammonium trypanocides. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1961, **55** (2) : 147-148.
9. ORMEROD (W. E.). — I) The mode of action of antrycide. II) A study of basophilic inclusion bodies produced by chemistherapeutic agents in trypanosomes. *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy*, 1951, **6**, 325-334.
10. ORMEROD (W. E.). — A study of resistance to antrycide in a strain of *Trypanosoma equiperdum*. *British J. Pharmacol. Chemotherapy*, 1952, **7**, 674-684.
11. PETANA (W. B.). — Comparative studies on the survival and viability of african trypanosomes *in vitro*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1964, **58** (4) : 467-72.