Contribution à l'étude d'une souche pathogène de *Trypanosoma cruzi*

(SOUCHE TULAHUEN, CHILI)

I. L'infection chez la souris. Evolution. Effets de la splénectomie, des traitements par la cortisone et l'hormone somatotrope

Par Henri GALLIARD, Jacques LAPIERRE et Marguerite COSTE

La souche de *Trypanosoma cruzi* que nous avons utilisée existe depuis 1945. Elle a été isolée de *Triatoma infestans* à Tulahuén dans le Nord du Chili. Elle est entretenue non seulement dans les laboratoires de la Faculté de Médecine de Santiago mais aussi dans divers Instituts. C'est à l'amabilité du Docteur Jaeger (Ecole de Médecine, Tulane University, Nouvelle-Orléans) que nous devons cette souche.

Matériel et Méthodes

Nous avons utilisé la souris blanche mâle (souche R.A.P.) qui est l'animal le plus sensible pour ce genre d'expériences. Le mode d'entretien a été l'inoculation par voie intrapéritonéale, préférable à la voie cutanée, de 5 gouttes de sang prélevées à la queue d'une souris présentant 5 Trypanosomes par champ du microscope ou agrandissement approximatif de 200 fois (objectif 5 × oculaire 4 Stiasnie).

Nous n'avons pas utilisé le jeune rat dont l'infection devient chronique. Cependant, nous avons constaté que les Trypanosomes de la souche Tulahuén conservent chez lui leur virulence et le passage de sang, apparemment non parasité, tue la souris dans des délais un peu plus longs que d'habitude (27 jours en moyenne).

Les résultats des examens histo-pathologiques seront publiés ultérieurement dans un travail d'ensemble.

Evolution de l'Infection

On sait que cette souche Tulahuen est particulièrement réticulotrope. L'infection des organes, surtout le foie et la rate, est massive au terme de l'évolution, de sorte qu'il n'y a pas un parallélisme absolu entre le taux de parasitémie et la gravité de l'infection.

FIG. 1. — Infection à *Trypanosoma cruzi*, souche Tulahuen, chez les souris. Courbes des différents types d'évolution

La période prépatente est le plus généralement de 5 à 7 jours. Néanmoins, dans certains cas, les *Trypanosomes* apparaissent dès le 2^e jour, sans que pour cela l'infection soit plus aiguë et la survie plus courte par la suite. Ainsi, dans un cas, les *Trypanosomes* apparurent le lendemain et le décès ne se produisit que le 60^e jour. Dans d'autres cas, les *Trypanosomes* n'apparaissent que le 10^e jour.

Comme d'habitude, les premières formes observées sont des formes grêles. Puis les formes adultes apparaissent. A la période d'état il y a prédominance et, le plus souvent, présence exclusive de ces formes. Cependant, dans les infections très importantes, on observe dans les jours qui précèdent la mort la réapparition de formes grêles.

L'évolution est ensuite très variable (fig. 1). Le plus souvent, il y a augmentation progressive du taux de parasitémie et décès vers le 17^e jour avec cinq à dix *Trypanosomes* par champ (obj. 5 $\times$ oc. 4) en moyenne.

La moyenne de survie sur près de 200 souris a été de 17,79 jours pendant plus d'un an (mars 1961-août 1962) (fig. 2).

Mais d'autres types d'évolution sont possibles. L'évolution peut être rapide : la période prépatente est réduite à quatre jours, puis il y a augmentation rapide du nombre des Trypanosomes et décès le 10^e jour avec 40 tr./X.

FIG. 2. — Courbe des moyennes de survie des souris, montrant que la plus grande fréquence se situe à 18 jours. Au-delà de 36 jours, il s'agit d'évolutions chroniques prolongées ou définitives

Dans l'évolution lente chronique, l'apparition des Trypanosomes se fait vers le 7^e jour, mais avec persistance du taux de parasitémie aux alentours d'un à 2 tr./X pendant 15 à 25 jours ; la souris pouvant mourir avec un taux de parasitémie faible ou augmentant subitement pendant les deux ou trois jours précédant le décès. Dans d'autres cas, la parasitémie, après avoir atteint un maximum de 20 Trypanosomes vers le 25^e jour, régresse et le décès survient avec une parasitémie plus faible.

Ainsi, sur un total de 200 souris, 67 % meurent dans des délais normaux en 17 jours, avec une parasitémie de 5 à 10 Trypanosomes par champ ; 12 % meurent avec une parasitémie élevée de l'ordre de 20 Trypanosomes ; 3 % meurent avec une infection élevée dans des délais très brefs. 10 % des souris meurent avec une faible parasitémie dans des délais normaux ; 6 % des souris ont présenté une évolution chronique de l'infection avec survie de plus de 25 jours et parasitémie faible. Enfin, 2 % des souris ont guéri de leur infection.

Il convient de rappeler que la souche Tulahuen est caractérisée par son viscérotropisme et que le taux de la parasitémie ne reflète pas véritablement la gravité de l'infection.

FIG. 3. — Pourcentages de la survie en fonction de la saison. Chaque colonne représente deux mois

Facteur saisonnier. — D'après les chiffres concernant l'entretien de la souche portant sur plus d'une année, il est apparu que la virulence de la souche était moins marquée pendant les mois de mai à septembre et particulièrement au mois d'août où, sur cinq souris d'entretien de souche, nous avons observé une évolution chronique de 46 jours et trois guérisons. La figure 3 met nettement en évidence un facteur saisonnier.

Il semble évident que le facteur température n'est pas seul en cause, car en hiver l'évolution de l'infection des souris conservées à une température rigoureusement constante de 25° a été identique chez les souris soumises à des fluctua-

tions des températures du laboratoire.

Evolution de l'infection chez les souriceaux. — L'expérience a porté sur 22 souriceaux mâles dont le poids moyen est d'environ 10 grammes.

La moyenne de survie est de 15,85 jours alors que la moyenne de survie des souris mâles adultes pour la même période, et pour un lot de 26 souris, a été de 19,33 jours.

Quant à la parasitémie, d'une façon générale, elle était au moment de la mort plus importante que chez les adultes.

Nous n'avons pas observé d'évolution chronique ni de guérison bien que l'expérience ait été réalisée à une époque où nous avons observé ces types d'infection avec un maximum de fréquence chez l'adulte.

Evolution de l'infection chez les souris femelles gestantes et allaitantes. — Un lot de 17 souris femelles a été inoculé dans les mêmes conditions que les mâles.

Nous avons observé onze décès du 17^e au 30^e jour.

Six souris sont encore en vie le 80^e jour et en voie de guérison après avoir présenté une faible infection.

Les témoins mâles sont décédés le 16^e et le 17^e jour (3 tr. et 1 tr./X).

Dans le lot, deux souris étaient fécondées : l'une a été sacrifiée le 11^e jour de l'infection, présentant alors 1 tr./20 X (elle était alors fécondée depuis environ 12-14 jours). Les embryons ont été examinés en coupes histologiques. L'autre a mis bas deux souriceaux décédés le surlendemain. L'examen de leur sang ne montrait pas de parasites.

Cette expérience, pratiquée en juillet, époque où sont plus fréquemment observés les cas de guérison, fut répétée plus tard sur 10 jeunes femelles non gestantes. Huit sont mortes en 15 à 28 jours, deux ont guéri.

Effets de l'hormone somatotrope (S.T.H.)

Cette hormone, qui reproduit tous les phénomènes de la croissance, tissulaire et métabolique, possède également une action phlogistique ou inflammatoire qui le fait apparaître comme antagoniste des hormones corticotrope.

Il était intéressant de vérifier son effet sur une souche virulente de *Tr. cruzi*. Dans ce but, six souris ont reçu tous les deux jours, et pendant 20 jours, 5 unités d'hormone par voie intrapéritonéale. Le 12^e jour, ces souris ont reçu des Trypanosomes virulents dans les mêmes conditions que les trois souris témoins.

Les souris traitées sont mortes dans des délais de 14 à 35 jours avec une parasitémie de 2 à 17 Trypanosomes par champ, tandis que les témoins ont survécu de 17 à 29 jours et sont morts avec 5 à 14 Trypanosomes par champ. L'hormone somatotrope paraît donc n'avoir pas d'effet sur l'évolution de l'infection avec cette souche virulente de *Tr. cruzi*.

Influence de la Cortisone

L'expérience a porté sur un lot de 55 souris. Les injections de cortisone (2 mg.) par voie sous-cutanée ont été pratiquées en même temps que l'inoculation des Trypanosomes et, par la suite, suivant deux modalités : soit trois jours de suite, soit les 3^e, 5^e, 7^e jours.

Huit souris sont mortes dans la semaine qui a suivi l'inoculation des Trypanosomes et sans parasitémie décelable. Il est vraisemblable que ces souris sont mortes d'infection intercurrente et nous les avons classées hors expérience.

Chez les souris soumises à un traitement cortisonique, l'évolution a été généralement plus aiguë, la période prépatente étant plus courte et l'ascension de la parasitémie plus rapide. La moyenne de survie a été de dix jours, si l'on fait intervenir les huit souris déjà mentionnées, ou de 11,69 jours si elles sont exclues. De toute façon, la survie est nettement plus courte que celle d'un lot équivalent de souris témoins chez qui la durée de survie a été de 18,56 jours.

Effets de la Splénectomie

L'expérience a porté sur deux lots de souris : Dans un premier lot de trois souris splénectomisées et inoculées dès le lendemain, une souris est morte le 26^e jour avec 15 Trypanosomes par champ (oc. 4 $\times$ obj. 5), la deuxième est morte le 96^e jour avec peu de Trypanosomes (0,5 par champ) après avoir présenté un maximum d'infection de 2 tr./X le 17^e jour, la troisième souris après avoir fait une infection chronique (maximum de parasitémie : 1 tr./2 X le 30^e jour) est toujours vivante le 240^e jour sans parasites décelables dans le sang. Les trois souris témoins sont mortes en 23 à 29 jours avec une parasitémie de 4 à 7 Trypanosomes par champ.

Nous avons voulu vérifier ces résultats d'autant plus qu'une souris, ayant fourni les Trypanosomes pour l'inoculation des souris splénectomisées et leurs témoins, fit par la suite une infection chronique.

Un deuxième lot de neuf souris a donc été splénectomisé et a reçu le 2^e jour des Trypanosomes provenant d'une souris dont l'évolution de l'infection a été normale. Les neuf souris sont mortes dans des délais de 12 à 20 jours contre 18 à 22 jours chez les témoins, et avec des parasitémies variant de 3 à 50 Trypanosomes par champ mais généralement supérieures à 15 contre 2 et 20 chez les témoins.

Il semble donc que la splénectomie n'ait pas d'effet sur l'évolution de l'infection avec cette souche de *Trypanosoma cruzi*, sauf dans certains cas où la prolongation de la survie et même la guérison pourraient être dues à des facteurs non déterminés.

Discussion

Les recherches sur cette souche particulière, réticulotrope, de *T. cruzi* Tulahuen, ont été nombreuses. Pizzi et coll., dans une série de travaux commencés en 1945, ont insisté en particulier sur l'importance de la constitution génétique des souris dans la résistance à l'infection. La souche C₃H est particulièrement sensible, les souris mourant toutes en dix à douze jours. Par contre, les rats présentent une infection chronique de longue durée qui les prémunit contre toute réinfection.

Kagan et Norman (1960), avec la souche C.F.W. de souris, obtiennent une infection mortelle, quels que soient le poids et le nombre de parasites en neuf à quatorze jours. Les plus grandes variations s'obtiennent avec des souris jeunes. Un total de 1.000 à 5.000 Trypanosomes inoculés à des souris de 12 à 15 grammes leur paraît être la dose optima pour l'entretien de la souche avec passage tous les sept à dix jours.

Dans nos expériences, l'évolution n'a pas eu ce caractère d'acuité noté par les autres auteurs, puisque la moyenne de la survie a été de 17,79 jours pendant un an. Il s'agit peut-être de la sensibilité de la souche de souris utilisée.

Mais il y a aussi des facteurs individuels si l'on en juge par les résultats remarquablement variables dans un lot d'une même expérience.

L'influence du sexe sur la sensibilité des souris infectées par des souches avirulentes de *T. cruzi* a été notée par plusieurs auteurs.

Hausckha en particulier (1947) a montré que sur 20 souris mâles infectées avec « Reichenow-strain », toutes sont mortes le 14^e jour. Sur 20 femelles, 15 étaient mortes le 15^e jour, la dernière mourut le 35^e jour. Avec « Brasil-strain », les neuf mâles moururent en 43 jours ; parmi les neuf femelles, trois survécurent indéfiniment.

La souche Tulahuen n'échappe pas à la règle puisque, dans nos expériences, huit souris femelles sur dix-huit ont présenté une infection chronique.

En ce qui concerne le rôle de la saison sur l'intensité de l'infection, Hausckha (1949) avait observé avec la souche W.B.H. (Wellcome-Brazil-Hamburg) un rythme saisonnier, avec une augmentation du nombre des Trypanosomes au printemps et une chute en été et en hiver, c'est-à-dire que ce nombre s'accroît avec l'abaissement de température et diminue quand la température augmente. Or, dans nos expériences avec Tulahuen, nous avons nettement constaté l'importance de la température la plus élevée, ou tout au moins des mois les plus chauds, sur le degré de parasitémie.

Il est curieux de constater que l'hormone somatotrope n'ait pas, sur l'infection à *Tr. cruzi* dont la souche Tulahuen se développe si intensément dans le système réticulo-histiocytaire du foie et de la rate, les effets que l'on pourrait attendre de ses propriétés phlogistiques. En 1953, H. Galliard et J. Lapierre avaient obtenu un effet atténuant, non seulement sur *Plasmodium berghei* mais aussi sur une souche avirulente de *T. cruzi*, souche Cura. Mais, dans ce cas, cet effet était évidemment de peu d'importance sur l'évolution générale de l'infection.

Les effets de la cortisone sur cette souche Tulahuen ont été essayés par plusieurs auteurs. Agosin et coll. (1951-1952) ont constaté que la parasitémie est considérablement élevée ainsi que le taux de mortalité, même lorsque l'on injecte en même temps un trypanocide (pentaquine). Thiermann et Christen (1952) constatent l'action aggravante de l'association cortisone-auréomycine. Pour Neghme et coll. (1952), la cortisone n'a aucun effet sur la survie des souris surrénalectomisées, bien au contraire, et concluent que l'aggravation de l'infection est une conséquence de l'involution des surrénales par inhibition de l'hypophyse.

Pour Pizzi et Chemke (1957), de fortes doses de cortisone intensifient l'infection même chez le rat et le tuent en 14 jours, alors que les témoins survivent indéfiniment. L'effet aggravant s'explique par l'accélération du cycle de reproduction du parasite, l'inhibition de la réaction inflammatoire, de la capacité macrophagique et de la formation des anticorps. Des doses faibles de cortisone sont sans effet sur la formation des anticorps non lytiques.

Rubio (1954) a montré que la cortisone injectée à des souris renforce la

virulence des formes de culture de *T. cruzi* récente ou ancienne, alors que chez les témoins ces formes sont pour la plupart phagocytées et lysées et que l'infection sanguine reste faible.

Pizzi et coll. en 1952 avaient tiré des effets de la cortisone les conclusions suivantes : L'effet dépend de l'espèce de l'hôte, de la dose et du moment de l'administration. Il faut de fortes doses, il faut qu'elles soient données précocement, sinon les anticorps peuvent se former. Les faibles doses sont, par contre, bénéfiques.

Les auteurs sont donc unanimes sur les effets de la cortisone. Dans nos expériences, nous avons observé également cette aggravation consistant en une réduction de la période prépatente et une ascension rapide de la parasitémie. Cependant, pour nos expériences, la souche Tulahuen est suffisamment virulente pour que l'on n'ait pas à l'exalter.

En ce qui concerne la splénectomie, l'un de nous (H. Galliard, 1930) en avait déjà recherché l'effet avec trois souches de *T. cruzi*. Les conclusions étaient que la marche générale de l'infection n'est pas sensiblement modifiée, que la splénectomie soit pratiquée avant ou après l'injection de parasites.

Dans nos expériences avec la souche Tulahuen, les deux séries donnent des résultats différents. Dans la première, nous avons eu la surprise de voir que deux souris sur trois ont fait une infection chronique avec une survie dépassant 240 jours, ce qui est exceptionnel pour cette souche de Trypanosomes. Dans la deuxième série, la splénectomie n'a eu aucun effet sur l'évolution de l'infection et les souris sont mortes dans les mêmes conditions que les témoins.

Il y a donc dans toutes ces expériences des facteurs d'atténuation ou d'aggravation qui dépendent de conditions qu'il est impossible de définir exactement.

Résumé

Une souche de *Trypanosoma cruzi*, souche Tulahuen, a été utilisée chez la souris.

1° Sur un total de 200 souris mâles, 67 % meurent en 17 jours avec une parasitémie de 5 à 10 Trypanosomes par champ, 12 % avec 20 Trypanosomes, 10 % avec une parasitémie faible. Cette allure de l'infection est indépendante du nombre des Trypanosomes inoculés. 6 % survivent plus de 25 jours avec parasitémie faible ; 2 % ont guéri apparemment de leur infection.

La moyenne de survie des souriceaux est de 15,85 jours contre 19,33 jours chez l'adulte, avec une parasitémie plus importante.

Sur un total de 27 souris femelles infectées en deux lots à deux époques différentes, huit guérisons ont été constatées, ce pourcentage étant beaucoup plus élevé que chez les mâles.

2° Le facteur saisonnier est assez net, la virulence de la souche diminuant de mai à septembre, surtout au mois d'août.

3° Le traitement des souris par la cortisone aggrave l'infection et réduit la survie. L'hormone somatotrope ne produit aucun effet.

4° Les résultats de la splénectomie sont contradictoires. Elle est tantôt sans effet sur l'évolution de l'infection, tantôt elle peut avoir une action inhibitrice et a permis la survie ou la guérison apparente de 240 jours, ce qui est exceptionnel avec cette souche, sans qu'il soit possible de déterminer les facteurs de cette variabilité.

Bibliographie

- AGOSIN (M.), CHRISTEN (R.) et JARPA (A.), 1951. — Action of cortisone alone or associated to pentaquine phosphate or to compound pentaquine phosphate. Quinine sulphate on experimental trypanosomosis (*T. cruzi*) in mice. *J. Para.*, 37, 31.
- GALLIARD (H.), 1930. — Infections à *Trypanosoma cruzi* chez les animaux splénectomisés. *Bull. Soc. Path. Exot.*, XXIII, 188.
- GALLIARD (H.) et LAPIERRE (J.), 1953. — Effets neutralisants de la somatotrophine hypophysaire dans les infections à *Plasmodium berghei* chez la souris. *Comptes rendus des séances Académie Sciences*, 237, 477.
- HAUSCHKA (Th. S.), 1947. — Sex of host as a factor in Chagas' disease. *J. Parasit.*, 33, 399.
- HAUSCHKA (Th. S.), 1949. — Persistence of strain-specific behavior in two strains of *Trypanosoma cruzi* after prolonged transfer through inbred mice. *J. Parasitol.*, 35, 593.
- KAGAN (Irving G.) et NORMAN (L.), 1960. — Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. I. Susceptibility of C.F.W. stock mice for the « Tulahuen » strain of *T. cruzi*. *J. infect. dis.*, 107, 165.
- NEGhme (A.), BADINEZ (O.), JARPA (A.), AGOSIN (M.) et CHRISTEN (R.), 1952. — Accion de la cortisona sobre la trypanosomosis chagastica experimental del raton suprarreno privo y total. *Bol. inform. parasit. Chilenas*, 7, 4.
- PIZZI (T.), 1945. — Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas experimental. Comunicacion preliminar. *Biologica*, 3, 53.
- PIZZI (T.), AGOSIN (M.), CHRISTEN (R.), HOECKER (G.) et NEGhme (A.), 1948-49. — Influencia de la constitucion genetica en la resistencia de la laucha a la infeccion experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Biologica*, 8-11, 43.
- PIZZI (T.), RUBIO (M.), PRAGER (R.) et SILVA (R.), 1952. — Accion de la cortisona en la infeccion experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas*, 7, 22.
- PIZZI (P. T.) et CHEMKE (S. J.), 1955. — Accion de la cortisona sobre la infeccion experimental de la rata por *Trypanosoma cruzi*. *Biologica*, Santiago, 21, 31.
- RUBIO (D. M.), 1954. — Estudio de los factores que intervienen en la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi*. Accion de la cortisona en la capacidad de invasion y multiplication del parasito. *Biologica*, Santiago, 20, 89.
- THIERMANN (E. I.) et CHRISTEN (R. A.), 1952. — Influencia del acerto de cortisona y de la aureomicina como agente agravador de la infeccion chagastica atenuada. *Bol. de Inf. Parasitarias Chilenas*, V, VII, 53.