ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome XLVI

1971

N° 4

Annales de Parasitologie (Paris), t. 46, 1971, n° 4, pp. 337 à 445

MÉMOIRES ORIGINAUX

Contribution à l'étude comparée des besoins nutritifs chez diverses espèces du genre *Trypanosoma*

Possibilités et limites de la culture à 27° C
en milieu semi-synthétique liquide *

par Huguette FROMENTIN

*Service de Protozoologie de l'Institut Pasteur, 25, rue du D^r-Roux, F 75 - Paris-15**

Résumé général

Etude expérimentale sur les besoins nutritifs de 4 espèces de Trypanosomes cultivés en milieux liquides.

Le séjour temporaire à 35° C des hématies normales permet l'enrichissement du milieu 199 qui devient ainsi propre à la culture ; les hématies atteintes d'une déficience enzymatique ne possèdent pas ce pouvoir enrichissant. La présence de dérivés phosphorylés du glucose pendant l'incubation des globules rouges dans le liquide stimule la multiplication des Flagellés.

* Thèse de Doctorat ès Sciences de la Faculté des Sciences de Paris.

T. rotatorium, seul, peut être cultivé pendant 25 jours (5 repiquages) dans un milieu chimiquement défini. Le métabolisme de *T. therezieni*, *T. theileri* et *T. gambiense* est tributaire du métabolisme des hématies et en rapport étroit avec la première partie du cycle de la glycolyse.

General summary

Experimental study concerning nutritional needs for 4 species of Trypanosomes cultivated in liquid media.

The temporary stay of normal erythrocytes at 35° C, allowed an enrichment of the medium 199 which became able to support cultivation; when the erythrocytes were enzymatically deficient, they were not able to enrich the medium.

The multiplication of Flagellates was stimulated by the presence of hexose or pentose phosphates in the liquid during red blood cells incubation.

T. rotatorium alone could be cultivated for 25 days (5 transfers) in a chemically defined medium; *T. therezieni*, *T. theileri* and *T. gambiense*, could not; their metabolism was tributary of erythrocytes metabolism with regard to the first part of glycolyse cycle.

PLAN

Première partie

DONNÉES CLASSIQUES — MÉTHODES D'ÉTUDE

Introduction.

Chapitre I. — Généralités sur les cultures des trypanosomes.

A) MILIEUX DE CULTURE. HISTORIQUE.

— Les milieux solides.	— Enrichissement des milieux nutritifs.
— Les milieux liquides.	— Séjour des milieux au sang à 37 °C.
— Les solutions synthétiques nutritives.	— Choix du sang.
— Les facteurs de croissance.	— Cultures de tissus.

B) PARTICULARITÉS DES TRYPANOSOMES DE CULTURE.

- Mise en culture.
- Pouvoir infectant.
- Morphologie.

Chapitre 2. — Matériel et méthodes.

A) MATÉRIEL.

I. — Trypanosomes d'animaux à température variable :

- a) *T. rotatorium*,
- b) *T. theezieni*.

II. — Trypanosomes d'animaux homéothermes :

- a) *T. theileri*,
- b) *T. gambiense*.

B) MÉTHODES.

1° Verrerie.	5° Ajustement de l'inoculum.
2° Les milieux de culture.	6° Concentration en ions H.
3° Enrichissement d'un milieu synthétique.	7° Température.
4° Mesure de la densité optique d'un liquide.	8° Repiquages.
	9° Lecture des cultures.
	10° Conservation par congélation

Deuxième partie**RECHERCHES SUR LA COMPOSITION MINIMALE D'UN MILIEU NUTRITIF LIQUIDE
PERMETTANT LA CULTURE DES TRYPANOSOMES****Chapitre 1. — Croissance des cultures.**

- I. — Etude du milieu liquide et de ses composants.
- II. — Développement des Trypanosomes dans les milieux incomplets.

Chapitre 2. — Simplification du milieu par suppression successive de chacun des sels, du glucose et des acides aminés.

- I. — Suppression successive des sels.
- II. — Suppression du glucose.
- III. — Détermination des acides aminés nécessaires à la culture de *T. gambiense* dans le milieu semi-synthétique ; proposition d'une nouvelle formule de milieu simplifié.

Troisième partie

RECHERCHES SUR LES FACTEURS DE CROISSANCE APPORTÉS AUX TRYPANOSOMES PAR LE SANG

Chapitre 1. — Fragmentation du milieu de Tobie.

I. — Mesure de la densité optique du liquide enrichissant.	III. — Activité des composants du sang.
II. — Activité de la phase liquide du milieu de Tobie.	IV. — Maturation des hématies dans le liquide physiologique.

Chapitre 2. — Rôle des hématies en fonction de leur origine. Hématies nucléées.

I. — Solution d'hémoglobine.	III. — Acides nucléiques.
II. — Noyaux isolés.	
- Remarques.

Chapitre 3. — Rôle des hématies en fonction de leur origine. Hématies anuclées normales.

I. — Conditions biologiques.	III. — Conditions chimiques.
II. — Conditions physiques.	

Chapitre 4. — Rôle des hématies anuclées déficientes en G-6-P-D. Rôle de la G-6-P-D. Hémolyse.

I. — Action des hématies déficientes.	IV. — Activité de la G-6-P-D et rendement de la culture.
II. — Action de la G-6-P-D des hématies anuclées.	V. — Action de l'hémoglobine.
III. — Diffusion de l'enzyme dans le milieu.	VI. — Enzymes purifiées ajoutées au milieu 199.

Chapitre 5. — Métabolisme du glucose par la voie de l'hexose diphosphate et par la voie des hexoses monophosphates. Application à la mise en évidence de l'activité enzymatique des hématies.

I. — Métabolisme du glucose par la voie d'Embden-Meyerhof ou voie de l'hexose diphosphate.
1° G-6-P.
2° F-6-P et F-1, 6 diP.	III. — Vérification du rôle des dérivés glucidiques.
II. — Métabolisme du glucose par la voie des hexoses monophosphate.	IV. — Contre-expérience destinée à rechercher le rôle du glucose et du phosphate.
	V. — Addition de phosphatase alcaline de Veau.
	VI. — Addition de bleu de méthylène.

Chapitre 6. — Enrichissement du milieu 199 sans intervention de cellules vivantes.

- I. — Substances organiques chimiquement définies, non glucidiques.
- II. — Glucides.
- III. — Formulation d'un milieu synthétique liquide pour la culture de *T. rotatorium*.

DISCUSSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

BIBLIOGRAPHIE

CONTENTS

First part

GENERAL CHARACTERISTICS AND METHODS

Introduction.**Ch. 1. — Trypanosomal cultures.**

A) HISTORICAL DATA.

- Agar media.
- Liquid media.
- Nutritional synthetic solutions.
- Growth factors.
- Enrichment of nutritional media.
- Stay of blood media at 37 °C.
- Choice of blood.
- Tissue cultures.

B) CULTIVATED TRYPANOSOMES PARTICULARITIES.

- Cultivation.
- Infectivity.
- Morphology.

Ch. 2. — Material and methods.

A) MATERIAL.

- I. — Trypanosomes from cold blood animals.
 - a) *T. rotatorium*.
 - b) *T. thezeleri*.
- II. — Trypanosomes from homeotherm animals.
 - a) *T. theileri*.
 - b) *T. gambiense*.

B) METHODS.

- 1) Glassware.
- 2) Culture media.
- 3) Synthetic medium enrichment.
- 4) Measure of absorbance change.
- 5) Preparation of inoculum.
- 6) pH.
- 7) Temperature.
- 8) Transfers.
- 9) Examination of cultures.
- 10) Preservation by freezing.

Second part

INVESTIGATIONS ON MINIMAL NUTRITIONAL LIQUID MEDIUM
FOR TRYPANOSOMES CULTIVATION

Ch. 1. — Growth of cultures.

- I. — Study of the medium and of its components : applied methods.
- II. — Growth curves :

<i>T. rotatorium</i> ,	<i>T. theileri</i> ,
<i>T. theileri</i> ,	<i>T. gambiense</i> .

Ch. 2. — Simplification of the liquid medium.

- I. — Salts suppression.
- II. — Glucose suppression.
- III. — Determination of amino acids needed for *T. gam-*

<i>biense</i> cultivation in a semi-synthetic medium.
— Formulation of a simplified liquid medium.

Third part

BLOOD GROWTH FACTORS

Ch. 1. — Tobie medium fractionation.

- I. — Optical density of enriching medium.
- II. — Overlay activity of Tobie medium.
- III. — Blood compounds activity.
- IV. — Erythrocytes incubation in physiologic medium.

Ch. 2. — Erythrocytes of vertebrate donors. — Nucleated erythrocytes.

- I. — Hemoglobin solution.
- II. — Isolated nuclei.
- III. — Nucleic acids.

Ch. 3. — Anucleated erythrocytes.

- I. — Biological conditions.
- II. — Physical conditions.
- III. — Chemical conditions.

Ch. 4. — Role of anucleated erythrocytes. G-6-P-D deficient. Role of the G-6-P-D.

- I. — Deficient red cells action.
- II. — G-6-P-D action of normal red cells.
- III. — Enzyme diffusion in the liquid medium.
- IV. — G-6-P-D activity and culture yielding.
- V. — Role of hemoglobin.
- VI. — Purificated enzymes added to the 199 medium.

Ch. 5. — Glucose metabolism : hexose di-phosphate pathway and hexose mono-phosphate pathway.

I. — Embden-Meyerhof path-
way.	IV. — Role of glucose and phos-
phate.
II. — Hexose monophosphate
pathway.	V. — Phosphatase alkaline (calf)
added.
III. — Role of carbohydrate
compounds.	VI. — Methylen blue added.

Ch. 6. — 199 medium enrichment without living cells intervention.

- I. — Chemically defined organic substances other than carbohydrates.
- II. — Carbohydrates.
- III. — Formulation of a synthetic liquid medium for *T. rotatorium* cultivation.

General discussion

General conclusion

References

PREMIERE PARTIE

Données classiques. — Méthodes d'étude

RÉSUMÉ DE LA PREMIÈRE PARTIE.

Après avoir rappelé l'histoire de la mise en culture des Trypanosomes, chacune des 4 souches utilisées est présentée: *T. rotatorium*, *T. thezieseni*, *T. theileri* et *T. gambiense*.

Une méthode originale de numération des Flagellés en suspension formolée est décrite.

1ST PART - SUMMARY.

History of Trypanosomes culture.

Description of the 4 strains (*T. rotatorium*, *T. thezieseni*, *T. theileri* and *T. gambiense*) and methods used; the enumerations, carried out with formalized suspensions of Flagellates, allowed to compare the cultures obtained in different media.

Introduction

Aussitôt après la découverte des premiers Trypanosomes par G. Valentin en 1841 chez les Poissons, par G. Gludge, puis par C. Mayer en 1842-1843 chez les Batraciens, les chercheurs essayèrent de les cultiver, mais ce n'est qu'en 1903 que F. Novy et W. MacNeal réussirent à conserver *Trypanosoma lewisi* (Kent), Laveran et Mesnil, 1901, du Rat *in vitro*.

Actuellement, la plupart des Trypanosomes peuvent être cultivés, sous certaines conditions, dans des milieux à base de sang total. Les formes obtenues ainsi correspondent à celles qui existent dans l'intestin de l'hôte vecteur.

Bien que dès 1940, M. Lwoff ait réussi à maintenir *T. cruzi*, Chagas, 1909, dans un milieu liquide contenant de l'hématine, de la vitamine C, et du sérum, il n'a pas été possible, jusqu'à présent, de cultiver les Trypanosomes polymorphes pathogènes africains dont les besoins nutritifs sont beaucoup plus complexes, sans leur fournir du sang total.

C'est ainsi qu'actuellement encore, se posent plusieurs problèmes concernant la multiplication des Trypanosomes *in vitro*:

1° Mettre au point des milieux liquides, chimiquement définis capables de permettre la culture.

2° Etudier les conditions et les facteurs permettant la croissance et la multiplication des diverses espèces.

3° Préciser les conditions et les facteurs présidant aux possibilités de culture de ces mêmes Trypanosomes, mais aux différents stades de leur développement chez l'hôte Invertébré vecteur, et chez l'hôte Vertébré.

En ce qui concerne les étapes de notre étude, elles ont été les suivantes :

1° Simplifier le milieu de culture liquide nous ayant servi de point de départ.

2° Préciser le rôle du sang, et déterminer le ou les facteurs indispensables qu'il apporte.

3° Mettre au point un milieu liquide totalement synthétique.

Nous avons choisi pour cette étude quatre espèces de Trypanosomes :

- deux parasites d'animaux à température variable : *Trypanosoma (Trypanosoma) rotatorium* (Mayer, 1843), Gruby, 1843, de la Grenouille ; *Trypanosoma theezieni*, Brygoo, 1963, du Caméléon ;
- deux parasites d'animaux homéothermes : *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*, Laveran, 1902, des Bovidés ; *Trypanosoma (Trypanozoon) gambiense*, Dutton, 1902, de l'Homme.

Ce travail comporte trois parties :

1° Examen de la composition et des qualités respectives des milieux de culture classiques ainsi que des particularités des Trypanosomes de culture. Exposé des caractéristiques des souches utilisées et des méthodes de travail.

2° Etude du milieu synthétique de Parker (199) complété par un faible volume d'extrait de milieu au sang ; essai de simplification de ce milieu : tracé des courbes de croissance des quatre espèces de Trypanosomes dans le milieu liquide privé de certains groupes de composants (acides aminés, vitamines ou oligoéléments) ; suppression séparément et successivement de l'un des sels, du glucose ou d'un acide aminé.

3° Activité des hématies : le rôle joué par les enzymes globulaires au cours de la glycolyse nous a incités à étudier l'action des hexoses et des pentoses phosphates sur la multiplication des Trypanosomes après contact avec les hématies séjournant temporairement dans le milieu de culture avant l'ensemencement.

Enfin, les essais de caractérisation de l'activité enzymatique des hématies permettront, en remplaçant celles-ci par diverses substances d'origine animale, puis par des substances chimiques, de proposer deux formules de milieu chimiquement défini.

*
**

CHAPITRE I

Généralités sur les cultures de Trypanosomes

A) MILIEUX DE CULTURE. HISTORIQUE.

— *Les milieux solides.*

Le milieu au sang de Novy, Neal, Nicolle (1908) encore appelé Milieu NNN n'est autre qu'une simplification du milieu NN (1903-1904), le bouillon peptoné étant

remplacé par de l'eau physiologique. Il convient à la culture des Leishmanies et de certaines souches de Trypanosomes telles que *T. cruzi*.

Les travaux de A. Ponselle permettent de franchir une étape importante dans la mise en culture des Trypanosomes pathogènes. Avec son milieu à base de gélatine peptonée (1924), il obtient des résultats constants et des cultures abondantes de *T. brucei*, Flimmer et Bradford, 1899, de *T. rhodesiense*, Stephens et Fantham, 1910, et de *T. dimorphon*, Laveran et Mesnil, 1904.

Mais ce sont E. Tobie, T. von Brand et B. Mehlman (1950) qui, les premiers, emploient un milieu diphasique devenu classique ; il s'agit d'un milieu gélosé contenant de l'extrait de viande, et de la peptone, additionné d'un tiers de volume de sang humain inactivé. Du liquide de Locke est ajouté après préparation de la phase solide. M. Vauzel a légèrement modifié la formule originale. Son milieu (formule p. 360) auquel il a conservé le nom de Tobie, est couramment employé dans notre laboratoire pour l'entretien des souches de Trypanosomes, et de quelques souches de Leishmanies. De même, le milieu de Nöller (1917) modifié par I. V. Herbert (1961) est utilisé couramment. La base solide au sang défibriné de Lapin, non inactivé, est glucosée. La phase liquide est constituée par la solution de Ringer.

— *Les milieux liquides.*

Avec la généralisation des cultures de cellules, les essais de culture de Trypanosomes sur les milieux semi-synthétiques se multiplient. J. Jadin, à Anvers (1960-1969), J. Nicoli à Brazzaville (1961) entretiennent les Trypanosomes polymorphes dans les milieux suivants : solution de Hanks, hydrolysate de caséine, ou solution de Earle enrichis par du sérum et par des extraits de globules rouges. Enfin, A. Dodin et H. Fromentin (1962), parviennent à cultiver *T. gambiense* dans le milieu de Parker ou 199 (J. F. Morgan, H. J. Morton et R. C. Parker, 1950), amélioré par l'action des hématies lavées ; il a l'avantage d'être acellulaire et dépourvu de sérum.

— *Les solutions synthétiques nutritives.*

Le premier milieu synthétique adapté à la multiplication de la cellule animale est le milieu de P. R. White (1946 et 1954). Ce milieu est insuffisant par lui-même, et demande un supplément organique : « ... neither, however, will support growth without some organic supplementation ». (1954, p. 92).

Il en est de même de tous les milieux qui en sont dérivés tel précisément, celui de R. C. Parker.

Les milieux de White et de Parker sont des mélanges de solution physiologique, d'acides aminés, et de vitamines. La culture des cellules animales, pour réussir sur de tels milieux, exige, comme l'a vu A. Carrel dès 1910, la présence de plasma sanguin ou de jus d'embryon, c'est-à-dire, de complexes organiques de composition inconnue. Le problème qui se pose pour obtenir une culture de Trypanosomes n'est pas essentiellement différent. Il s'agit de fournir au Protozoaire des facteurs de croissance, dont un certain nombre sont encore à déterminer.

— *Les facteurs de croissance.*

Les besoins en facteurs de croissance des *Trypanosomidae* ont été établis par M. Lwoff (1931-1940). Elle utilise des milieux liquides d'origine organique : eau peptonée et hydrolysate de sérine, et définit les besoins des *Trypanosomidae* qui effectuent au moins une partie de leur cycle chez un Vertébré (*Leishmanies* et *T. cruzi*) : l'aneurine (vitamine B₂), (A. Lwoff, 1938) et l'acide ascorbique (vitamine C), (A. et M. Lwoff, 1938) sont généralement nécessaires à *Leishmania tropica*, Wright, 1903 ; l'hématine et le sérum sont indispensables.

Celui-ci apporte des facteurs de croissance restés indéterminés ; M. Lwoff (1940) écrit : « ... Les Trypanosomides parasites des Vertébrés que nous avons étudiés ont donc tous besoin des facteurs de croissance contenus dans le sérum, et d'hématine ; certains ont, en outre, besoin d'acide ascorbique. » (p. 193).

En 1955, N. Citri met au point un milieu semi-synthétique ne contenant pas de sérum, et permettant la croissance de *T. cruzi*. Des variantes ont été décrites, celle de V. Iralu (1967) contient non seulement de l'hématine et du sérum, mais aussi de la trypticase et du bouillon de foie.

W. Trager (1957) obtient, le premier, un milieu chimiquement défini pour des *Trypanosomidae*, et cultive *Leishmania tarentolae*, Wenyon, 1921. Plus récemment, H. Guttman (1964) réussit la culture de plusieurs espèces de *Crithidia*, puis de quelques souches de *Leptomonades* d'Insectes (1966 a).

Les seuls Trypanosomes qui aient pu jusqu'à présent être cultivés pendant un certain temps sur milieu chimiquement défini sont *Trypanosoma mega*, Dutton et Todd, 1903, pour lequel G. Boné et coll. (1964) n'ont pas publié la formule, et *T. ranarum*, Lankaster, 1871 (H. Guttman, 1966 b).

— *Enrichissement des milieux nutritifs.*

Les milieux synthétiques doivent être complétés par du jus d'embryon, ou par du sérum pour permettre la culture des cellules animales et, sauf exception, les *Trypanosomidae* ne peuvent être cultivés *in vitro* sans hématine et sans sérum. Il est d'ailleurs connu, depuis les essais des premiers chercheurs, que les *Leishmanies* et les Trypanosomes ne peuvent se multiplier en l'absence de sang.

D'après M. Langeron (1949), le premier milieu au sang ayant permis la culture des Trypanosomes ne serait pas le milieu NN ; dès 1900, P. Besançon et V. Griffon préconisaient : « Le sang gélosé comme milieu de culture pour les microbes ne se développant pas sur les milieux usuels. » (*).

Rappelons encore le besoin en sucre des Trypanosomes pathogènes. Ils peuvent consommer deux à trois fois leur propre poids en 24 h (P.-P. Grassé, 1952). Cependant, E. Tobie et coll. (1950) ne considèrent pas la concentration de sucre comme un facteur limitant de la croissance.

(*) Congrès International de Médecine, 1900 (M. Langeron, 1949, p. 855).

— *Séjour des milieux au sang à 37°C.*

La nécessité du maintien des tubes de culture à l'étuve à 37°C avant l'ensemencement a été soulignée par Ch. Nicolle dès 1908 : cet auteur laisse ses tubes pendant cinq jours à 37°C, non seulement pour en contrôler l'aseptie, mais encore pour permettre aux substances nutritives du sang de diffuser dans l'eau de condensation (J. Jadin et coll., 1963).

De même, Ch. Behrens (1914) insiste sur le fait que les tubes de gélose au sang, ensemencés immédiatement après leur fabrication, ne donnent pas d'aussi bons résultats que si on les laisse séjourner 24 heures à l'étuve, à 37°C, avant de les utiliser.

Nous verrons plus loin l'importance de ces constatations.

— *Choix du sang.*

Tous les sangs ne sont pas favorables à la culture des Trypanosomes. M. Lwoff et J. Ceccaldi (1939), lors de l'isolement de *T. gambiense* « Yaoundé », ont utilisé le sang de trois donneurs différents : deux de ces « sangs » ne permettaient pas la culture, seul, le troisième était favorable.

A leur tour, C. Neujan et F. Evens (1952) ont insisté sur la nécessité d'utiliser des milieux variés, et des « sangs » provenant de plusieurs donneurs pour isoler des souches nouvelles. En effet : « La culture peut réussir dans des milieux préparés avec le sang d'un individu, et échouer avec le sang d'un autre. » (p. 504).

Ces données sont confirmées par Y. Amrein et coll. (1969). Nous y reviendrons.

— *Cultures de tissus.*

Diverses espèces de Trypanosomes peuvent se multiplier sur des milieux complexes dépourvus de globules rouges, tels que la membrane chorio-allantoïde de l'embryon de Poulet, les explants de fragments d'organes, ou sur culture de tissu (J. Demarchi et coll., 1960 ; H. Fromentin, 1961 ; J. Nicoli et coll., 1964).

Les Trypanosomes ainsi cultivés trouvent dans ces milieux complexes des facteurs de croissance non déterminés, apportés par les cellules vivantes et indispensables à leur multiplication. Ils ne peuvent survivre en l'absence de cellules, ou bien quand l'explant meurt (A. C. Pipkin, 1960 ; L. Lamy et coll., 1970).

B) PARTICULARITÉS DES TRYPANOSOMES DE CULTURE.

— *Mise en culture.*

La possibilité pour un Trypanosome d'être mis en culture est liée à sa capacité d'infecter l'agent vecteur (E. Reichenow, 1934 ; A. Packchianian, 1958) ; ces deux qualités disparaissent simultanément : tel est le cas pour les Trypanosomes polymorphes conservés par passage mécanique sur petit Rongeur.

La plupart des espèces de Trypanosomes parasites des Vertébrés ont pu être cultivées sur les milieux de culture classiques. Les principales exceptions à cette règle sont :

T. equiperdum, Doflein, 1901, agent pathogène de la dourine des équidés ;

T. evansi, Steel, 1885, agent pathogène du surra et du mbori, qui n'ont jamais été obtenus en culture ;

T. equinum, Voges, 1901, qui ne peut être cultivé que sur embryon de Poulet (A. Chabaud, 1939) ;

Enfin, *T. vivax*, MacFie, 1917, non Ziemann, 1905, a été obtenu exceptionnellement par W. Trager (1959) sur culture de tissu de Glossines, et par J. Jadin et coll. (1963), sur un milieu semi-synthétique.

— *Pouvoir infectant.*

Habituellement, le pouvoir infectant du Flagellé pour l'hôte vertébré se perd dès les tout premiers repiquages. Les exemples de cultures demeurées infectantes sont rares.

Ch. Behrens (1914), obtient sur gélose au sérum de Lapin, des cultures de *T. brucei* qui demeurent virulentes pour le Rat pendant plusieurs années : nul, depuis lors, n'est parvenu à répéter cette expérience.

P. Brutsaert et C. Henrard (1938) infectent deux Chèvres avec une culture de *T. congolense*, Broden, 1904, isolée *in vitro* depuis 156 jours.

D. Weinman (1957) rend leur virulence à des cultures de *T. rhodesiense*, âgées de 51 et 69 jours, en les cultivant sur un milieu au sang additionné de tréhalose. Ces résultats n'ont pu être reproduits, et l'auteur pense (rapporté par J.-D. Fulton, 1958) que la cause du premier succès pouvait être due à la présence d'une impureté dans le tréhalose, ou à un produit du métabolisme de ce sucre.

J. Jadin au troisième passage, et E. B. Grainge au quatorzième passage (1960) trouvent *T. rhodesiense* infectieux. De même, R. Geigy et coll (1964) qui précisent l'influence de la qualité du sang, et de l'âge des milieux (Y. Amrein et coll., 1965-1969).

W. Trager (1959) infecte deux Moutons par inoculation d'une suspension de *T. vivax* en culture de tissu (16 et 39 jours).

H. Fromentin (1963) signale une parasitémie fugace chez *Chameleo lateralis*, Gray, 1831, inoculé avec *T. theezieni*. L'une des souches, 27 jours après l'isolement en est à son troisième repiquage, l'autre souche, quatre mois après l'isolement, à son seizième repiquage.

Enfin, le cas des cultures de *T. lewisi* et de *T. cruzi* est bien connu qui restent infectantes pendant plusieurs années. Nous avons nous-mêmes vérifié ces faits : une culture de *T. cruzi* infecte la Souris après une période d'incubation de quatre semaines ; une culture de *T. lewisi* infecte le Rat après huit jours d'incubation.

La plupart de ces expériences demeurent isolées, et ne sont pas toujours reproductibles.

— *Morphologie.*

La morphologie du parasite se modifie dès sa mise en culture. Ainsi les formes de *T. congolense*, dans le courant sanguin, ne possèdent pas de flagelle libre ; or, en culture, ce Trypanosome est pourvu d'un flagelle (E. Tobie, 1958 et observation personnelle).

Les grandes formes de *T. rotatorium* rencontrées chez l'hôte Vertébré, se divisent dès le premier repiquage, et font place à de petits individus flagellés. De même, après

la mise en culture de *T. theezieni*, les formes en toupie, caractéristiques de l'infection chronique sont tout à fait exceptionnelles (H. Fromentin, 1963).

E. Vickerman (1962) a décrit le chondriome des formes sanguines, et des formes de culture du sous-groupe *T. brucei*. Selon cet auteur, les formes sanguines posséderaient un chondriome antérieur simple, non fonctionnel, tandis que les formes de culture auraient un chondriome postérieur sinueux. Ces modifications morphologiques correspondraient à une modification du système respiratoire, les formes de culture acquérant une respiration de type aérobie, par l'intermédiaire du cycle de Krebs. Il s'agirait, d'après l'auteur, d'une adaptation à un milieu de tension d'oxygène moins forte. Le chondriome semble élaboré par le kinétoplaste. H. Muhlforth (1964) remarque une continuité entre la membrane du kinétoplaste, et celle qui enserre les mitochondries. Ces dernières manqueraient chez les vieilles souches du groupe *brucei* conservées sur le Muridé, et qui ont perdu, à la fois, leur possibilité d'infecter l'Arthropode vecteur, et d'être obtenues en cultures.

Cet historique montre que nos connaissances sur les besoins nutritifs des Trypanosomes de culture sont encore très fragmentaires, et qu'un milieu d'étude rationnel fait défaut.

CHAPITRE II

Matériel et méthodes

A) MATÉRIEL.

Parmi le très grand nombre des espèces appartenant au genre *Trypanosoma*, réparties dans tous les groupes de Vertébrés des Poissons aux Mammifères, et à l'Homme en particulier, nous avons choisi quatre espèces nous permettant d'avoir une gamme de types suffisamment variée parmi l'ensemble complexe du genre étudié.

- deux espèces vivent chez des hôtes Vertébrés, à température variable :
 - une chez des Batraciens, Vertébrés inférieurs aquatiques, au moins temporairement = *T. rotatorium* se cultivant bien dans des milieux classiques ;
 - une chez des Reptiles, Vertébrés terrestres, les Caméléons = *T. theezieni*.
- deux espèces vivent chez des Vertébrés supérieurs homéothermes :
 - une chez les Bovidés = *T. theileri*, grand Trypanosome du groupe des *Stercoraria* de Hoare (1966), c'est-à-dire dont l'évolution est postérograde chez l'hôte Invertébré vecteur et dont la transmission se fait par les déjections ;
 - une chez l'Homme = *T. gambiense* du groupe des *Salivaria* de Hoare, dont l'évolution est antérograde chez l'Insecte vecteur et dont la transmission se fait par inoculation de salive.

Nous partons ainsi de souches associées à des hôtes Vertébrés répartis du haut en bas de l'échelle zoologique, présentant des besoins nutritifs vraisemblablement très

différents, mais en tout cas (sauf pour *T. theezieni*) de souches bien connues, entretenues depuis longtemps au laboratoire, et se multipliant dans des milieux classiques, plus ou moins empiriques certes, mais déterminés.

Nous allons donner, pour chacune de ces espèces, quelques renseignements biologiques, culturels en particulier, qui seront utiles pour la compréhension ultérieure de ce travail.

I. — *Trypanosomes d'animaux à température variable.*

a) *Trypanosoma rotatorium.*

A. Laveran et F. Mesnil (1912) rapportent que la culture en série de *T. rotatorium* a été obtenue pour la première fois par G. Bouet, à l'Institut Pasteur, sur le milieu NNN, puis par M. Mathis (1906) sur un milieu chauffé. La souche utilisée ici a été isolée par J. Rodhain, à Anvers, en 1943.

1) Repiquages = *T. rotatorium* à la particularité, partagée avec certaines souches de *Leishmania tropica* (A. Ponselle, 1923 ; J. Colas-Belcour et coll., 1953) de former un voile sur les milieux liquides. Un fragment de voile, observé sous le microscope, se montre formé d'une multitude de rosaces pouvant compter plusieurs dizaines d'épimastigotes (C. A. Hoare et coll., 1966), réunis vers le centre de la rosace par leur partie antérieure (J.-M. Jadin, 1970), (fig. 1).

A 27° C, la souche s'adapte aux milieux les plus divers : Tobie, Nöller, NNN. Des repiquages bi-mensuels permettent de la maintenir dans de bonnes conditions mais, pour éviter le vieillissement des cultures et obtenir la semence nécessaire aux expériences, le rythme des repiquages est hebdomadaire.

G. Bouet (1906) et C. Wenyon (1926) rapportent des essais réussis d'infection de la Grenouille après inoculation de Trypanosomes de culture. La souche étudiée a été inoculée par nous-mêmes à des Grenouilles *Rana mascarensis* et à des Caméléons malgaches (*) sans provoquer d'infection.

2) Morphologie. Après fixation au méthanol et coloration au Giemsa, on observe de rares promastigotes, des formes arrondies et des épimastigotes.

Les granulations cytoplasmiques manquent le plus souvent.

3) Taille. La longueur moyenne de 100 Trypanosomes dans une de nos cultures de 7 jours est de 21,6 μ avec pour extrêmes 9,3 μ et 38,7 μ .

b) *Trypanosoma theezieni.*

T. theezieni, Brygoo, 1963, a été observé à Madagascar chez le Caméléon, *Chameleo brevicornis*, Gunther, 1879 (E. R. Brygoo, 1963 a et b), qui apparaît comme son hôte naturel.

(*) Institut Pasteur, Madagascar.

T. rotatorium Fig 1

FIG. 1, 2, 3 et 4. — Trypanosomes de culture. Méthanol. Giemsa
 a) forme promastigote, c) forme trypomastigote,
 b) forme épimastigote, d) division.

E. R. Brygoo (1963 *b*) a tenté la culture du Flagellé, et fait les observations suivantes :

« L'entretien pendant 10-12 jours à la température du laboratoire d'une culture *in vitro* de *T. thezieni* en milieu de Hanks additionné de 10 p. 100 de sérum de Veau, n'offre pas de difficulté. La culture effectuée à partir du sang du cœur d'un Caméléon parasité réussit régulièrement. Par contre, nous n'avons pas obtenu de subcultures. Il ne s'agit cependant pas d'une simple survie *in vitro*, car on observe, en effet, une importante activité avec de nombreuses formes de multiplication. Il est remarquable que tout se passe sous la forme trypanosome et qu'aucune forme leptomonas ou même crithidia ne soit observée » (p. 209).

T. therezieni Fig 2
"verrucosus"

Nous avons isolé *T. therezieni* à partir du sang d'un Caméléon fourni par E. R. Brygoo, *C. verrucosus*, Cuvier, 1829, infecté expérimentalement (H. Fromentin, 1963 et 1967) sur le milieu d'Almeida, et sur milieu liquide.

1) Repiquages : *T. therezieni* «verrucosus» est entretenu par repiquage hebdomadaire sur les milieux diphasiques de Tobie et de Nöller.

2) Morphologie : L'examen microscopique d'une culture de *T. therezieni* montre le polymorphisme de ce Flagellé. Quelques individus de petite taille sont groupés en rosace et coexistent avec des formes libres ; 80 p. 100 de celles-ci sont fusiformes et 20 p. 100 ont le corps arrondi, la membrane ondulante manque, le flagelle s'agite vigoureusement (fig. 2).

T. theileri Fig 3

La plupart des organismes observés sont des épimastigotes, les promastigotes sont rares mais se retrouvent cependant sur chaque préparation. Les formes de multiplication montrent les images classiques de division binaire.

L'infectivité pour le Caméléon peut persister jusqu'à quatre mois (H. Fromentin, 1963).

3) Taille : Des frottis de culture de sept jours sont fixés à l'acide osmique et colorés au Giemsa. La longueur moyenne du Flagellé, sur 100 mesures est de 27 μ avec pour extrêmes 6,7 μ et 45,3 μ .

II. — *Trypanosomes d'animaux homéothermes.*

a) *Trypanosoma theileri.*

M. Miyajima a réussi les hémocultures de *T. theileri* pour la première fois, en 1907, sur bouillon au sang (C. Wenyon, 1926).

La souche étudiée ici a été isolée par I. V. Herbert, en 1959, à partir du sang d'un Bovidé irlandais. Nous la devons à l'obligeance du Professeur J. Jadin.

1) Repiquages : Les repiquages sur milieu de Tobie sont hebdomadaires. Le pouvoir de multiplication en milieu liquide est faible et l'obtention de la semence difficile.

Plusieurs auteurs ont réussi à cultiver des souches américaines de *T. theileri* à 37° C dans des milieux diphasiques à la trypticase (M. Ristic et coll. 1958 ; C. Simpson et coll. 1959 ; E. Splitter et coll. 1967 ; A. Sollod et coll. 1968) ; la souche irlandaise ne survit pas à cette température.

2) Morphologie : I. V. Herbert (1961) remarque le retour des formes de culture aux formes caractéristiques de l'Hôte invertébré : promastigote et épimastigote ; il mentionne également la présence de quelques Trypanosomes vrais. Notre souche montre, sur frottis fixés à l'acide osmique et colorés au Giemsa, une prédominance d'épimastigotes et seulement 3 p. 100 de trypomastigotes (fig. 3).

3) Taille : Nous trouvons, dans une culture de 7 jours en milieu liquide, une longueur moyenne de 44,6 μ sur 100 mesures, avec pour extrêmes 14 μ et 93,3 μ .

b) *Trypanosoma gambiense*.

La souche de *T. gambiense* « Eliane » a été isolée sur petit Rongeur par M. Vaucel à Paris, en 1952, à partir de la pulpe ganglionnaire d'une malade qui avait été contaminée en Côte d'Ivoire. La culture a été obtenue par ensemencement du sang positif d'un Cobaye de premier passage, neuf mois après son inoculation.

1) Repiquages : *T. gambiense* « Eliane » est conservé sur le milieu de Tobie par repiquages hebdomadaires à 27° C.

L'infectivité pour la Souris blanche (Suiss) est perdue ; tous les essais tentés jusqu'à présent pour rendre sa virulence à la culture ont été vains. Une lignée de cette même souche est conservée sur petit Rongeur dans notre laboratoire. Elle est hautement pathogène pour le Mûridé. *Toutes les tentatives effectuées pour l'obtenir en culture ont échoué.*

2) Morphologie : J.-C. Thomson et J. Sinton (1912) réussirent à conserver en culture quatre générations successives de *T. gambiense* pendant 37 jours. Ces auteurs rapprochèrent le développement *in vitro* de celui que l'on rencontre dans l'intestin de la Glossine.

D. Weinman (1953) affirme après C. Wenyon (1926) la présence de formes métacycliques dans les cultures. Ce dernier point est contesté (E. Tobie, 1964).

Notre souche « Eliane » montre une forte prédominance de formes trypomastigotes sur frottis colorés ; les épimastigotes sont peu abondantes, on les trouve dans la proportion de 6 p. 100 environ. Le flagelle libre est court. En général le cytoplasme ne présente pas de granulations (fig. 4).

3) Taille : La longueur moyenne de 100 Trypanosomes « Eliane » dans notre milieu liquide est de 28,4 μ avec pour extrêmes 15,3 μ et 36 μ . La longueur moyenne de 100 Trypanosomes de la même souche dans le milieu diphasique de Tobie n'est que de 23 μ avec pour extrêmes 12 μ et 33,3 μ .

T. gambiense Fig 4

"ELIANE"

B) MÉTHODES.

Les techniques générales utilisées dans ce travail sont décrites ci-dessous :

1° Verrerie.

Rappelons une fois pour toutes la nécessité d'utiliser une verrerie traitée selon la rigueur habituelle (cours de culture cellulaire de P. Lepine, 1960, 3^e leçon, p. 4).

2° Les milieux de culture.

Les formules des milieux de culture les plus couramment employés sont données ci-dessous (pp. 360 et 361).

3° *Enrichissement du milieu synthétique.*

Les milieux de culture sont désignés ainsi : Parker = 199, Tobie = T, Nöller = N.

Le milieu 199 peut être enrichi :

- par addition de 1/20 de volume (0,1 ml pour 2 ml) de la phase liquide du milieu de Tobie : « 199 0,1 T » ;
- par addition de 1/10 de volume (0,2 ml pour 2 ml) de la phase liquide du milieu de Nöller : « 199 0,2 N » ;
- par addition temporaire, pendant 18-24 h à 35° C de globules rouges lavés de Rat (« 199 GRR »), de Lapin (« 199 GRL »), ou d'Homme (« 199 GRH »).

a) *Lyophilisation du liquide enrichissant.*

Vingt tubes de milieu de Tobie (ou de Nöller) donnent 40 ml (30 ml) de liquide soumis aux opérations suivantes :

- centrifugation ;
- purification sur bougie L3 ;
- contrôle de la densité optique au spectrophotomètre ;
- répartition en ampoule sous un volume de 1 ml ;
- lyophilisation ;

au moment de l'utilisation, le contenu d'une ampoule est repris par 1 ml d'eau bidistillée stérile.

b) *Préparation des globules rouges de Rat.*

Les Rats albinos, mâles de 220 g ($\pm$ 20 g) sont anesthésiés à l'éther, et le sang du cœur est prélevé sur anticoagulant (*). Le culot globulaire est lavé deux fois avec le liquide de Hanks, puis les hématies sont dénombrées. La numération est effectuée sur une suspension au 1/1.000 à l'hémocytomètre de Thoma.

Le liquide de base (eau physiologique ou solution de Hanks) à partir duquel on préparera le 199 est additionné, selon les expériences, de 250 millions à un milliard de globules rouges par millilitre. La suspension séjourne 18-24 h à l'étuve, à 35°C. Les hématies sont éliminées par centrifugation. Le 199 est reconstitué avant l'ensemencement.

4° *Mesure de la densité optique d'un liquide.*

a) Le taux d'hémoglobine des liquides pigmentés est mesuré à la longueur d'onde de 541 nanomètres (nm), soit au spectrophotomètre (**) (hémoglobine absolue, c'est-à-dire, Hb active plus Hb de réserve), soit au photomètre par la technique de Drabkin (hémoglobine totale, c'est-à-dire, Hb active seule) ; (lumière visible) (***).

(*) Liquoïde Roche à 2,5 % en eau physiologique. Les résultats sont comparables avec l'héparine Choay à 1 %.

(**) Jobin et Yvon.

(***) Lange, Berlin.

b) La teneur en protéines d'un liquide est mesurée entre les longueurs d'onde de 245 à 400 nm ; l'absorption maximale se situant à 280 nm ; (lampe à rayons ultraviolets).

c) Pour connaître l'activité de la glucose-6-phosphate-deshydrogénase, on mesure la transformation, contrôlée par cette enzyme, de la nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP) : la forme oxydée est transparente, la forme réduite (NADPH) est opaque ; (longueur d'onde de 341 nm, lampe à rayons ultraviolets). Les valeurs normales pour les hématies humaines sont de 270 U.I. pour 10⁹ GRH, ou encore de 5 à 10 U.I./g d'hémoglobine à 30° C. Méthode « stat pack » de Calbiochem).

5° Ajustement de l'inoculum.

Selon la quantité d'inoculum désirée, de deux à six tubes de culture, à l'optimum de la croissance (5-7° jours), sont mélangés et centrifugés pendant 4 mn à 2.000 tours/mn. Le liquide surnageant est rejeté, et le culot de Trypanosomes remis en suspension dans un volume mesuré de liquide de Hanks.

La numération est alors effectuée à l'hémocytomètre de Thoma, et la suspension de Flagellés vivants est ajustée etensemencée de façon à obtenir 150.000 Trypanosomes par millilitre à J0 (*).

Les Trypanosomes ainsi préparés sont désignés par « Trypanosomes lavés » ; (nous avons dû renoncer à un lavage plus poussé de la semence du fait de la fragilité de certaines souches [*T. gambiense*, *T. theileri*] qui ne supportent pas deux centrifugations).

Afin d'éliminer une cause possible d'erreur provoquée par la présence éventuelle de traces du milieu de culture primitif, ne sont considérés comme nutritifs que les milieux dans lesquels trois repiquages consécutifs sont franchement positifs (+).

6° Concentration en ions H.

Le pH est amené à 7,2, 7,3 lors de l'ensemencement à J0, soit par le bicarbonate de sodium à 5,5 p. 100, soit par une solution normale d'acide chlorhydrique. Il varie dans les jours suivants vers l'acidité quand la culture est abondante (pH 5,6), ou vers l'alcalinité si le Flagellé ne se développe pas (pH 8,0).

7° Température.

Les cultures sont maintenues à l'obscurité dans l'étuve à 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

8° Repiquages.

a) *Requippages expérimentaux.* Les repiquages expérimentaux sont effectués tous les cinq jours en moyenne, au début de la phase exponentielle de la courbe de croissance.

b) *Requippages par dédoublement du milieu.* Quand un milieu ne contient que peu de Flagellés, il est dilué dans un volume égal de milieu neuf correspondant, le mélange est alors réparti par moitié dans deux tubes de 120/12. Ce mode de repiquage est désigné par « dd » (dédoublement).

(*) J0, J1, J2... = le jour de l'ensemencement, le lendemain, deux jours après l'ensemencement et ainsi de suite.

9° *Lecture des cultures.*

a) *Evaluation approchée.* Dans un but de rapidité, des prélèvements des cultures sont parfois observés à l'état frais, entre lame et lamelle, à l'objectif 40, oculaire 4 ; pour des cultures très pauvres, il peut être nécessaire de se servir de l'objectif 20 permettant d'explorer un champ plus étendu.

Nous avons adopté les signes conventionnels suivants :

— *Oc4/Obj. 40* : Au-dessus de 20 millions de Trypanosomes par ml, soit plus de 20 par champ : + + + +

De 10 à 20 millions de Trypanosomes par ml, soit de 10 à 20 par champ : + + +

De 4 à 10 millions de Trypanosomes par ml, soit de 4 à 10 par champ : + +

De 1 à 3 millions de Trypanosomes par ml, soit de 1 à 3 par champ : +

— *Oc4/Obj. 20* : Moins de 500.000 Trypanosomes par ml, soit moins de 1 par champ : ±

Pas de trypanosomes visibles dans 50 champs : 0

b) *Numération des Trypanosomes en suspension formolée.* Pour connaître la valeur d'un milieu à l'essai, il est nécessaire de comparer quantitativement la récolte qu'il fournit à celle d'un milieu servant de référence. Des numérations précises sur suspensions formolées sont alors effectuées (*).

Trois tubes de culture d'un même milieu sont mélangés. Le mélange est formolé à 0,25 p. 100, et centrifugé à 2.500 tours/mn. Le culot de Flagellés formolés est remis en suspension dans un volume connu de liquide de Hanks. La numération est faite à l'hémocytomètre de Thoma. (Les formes de division ne sont comptées que pour un seul Trypanosome, et les Flagellés en lyse ne sont pas comptés.)

La moyenne de deux mesures pour chaque numération est calculée pour obtenir, d'une part, le nombre absolu de Flagellés par ml de culture, et d'autre part, le nombre relatif, c'est-à-dire le nombre de Trypanosomes trouvés dans le milieu à l'essai pour 100 Trypanosomes dans le milieu témoin (pourcentage comparé).

Il est nécessaire de compter un minimum de 200 ou, mieux, 400 Trypanosomes (**) à chaque numération.

Le calcul de la déviation-standard (p. 375) permet de considérer les résultats obtenus avec les milieux à l'essai, exprimés en quantités relatives, comme équivalents au témoin dans l'intervalle 100 ± 20 , c'est-à-dire entre 80 et 120 p. 100.

10° *Conservation par congélation.*

Chacune des quatre souches est conservée congelée dans l'azote liquide (-196°C) en présence de diméthylsulfoxyde (D.M.S.O.) (P. J. Walker et coll., 1961) à raison de

(*) Le calcul statistique montre que la numération effectuée sur la suspension de Trypanosomes vivants n'est pas satisfaisante, sans doute parce que leur répartition n'est pas gaussienne ; la comparaison des 2 variances de l'une et de l'autre méthode (F_{10} de Snédégor) donne $F_{10} = 7$, différence hautement significative ($P < 0,01$)

(**) Lorsque l'on compte 200 Trypanosomes, l'écart-type correspondant au risque 5 p. 100 est de 14 p. 100 ; lorsque l'on en compte 400, il est de 10 p. 100.

Les calculs statistiques ont été effectués par D. BEYTOUT que nous remercions.

1 volume de cryoprotecteur pour 9 volumes de culture (M. P. Cunningham et coll., 1963 ; R. Ressler et coll., 1965).

Cette méthode de protection est d'une grande sécurité : après un délai de 8 mois, le taux de survie est de 90 p. 100, et de 80 p. 100 après 12 mois ; le pouvoir de multiplication est conservé (H. Fromentin, 1970).

*
**

MILIEU DE TOBIE (modifié par M. Vaucel)

Gélose	15 g
NaCl	3 g
Granulé CMI (*)	13 g
Eau distillée	1.000 ml

Après dissolution, ajuster le pH à 7,3 avec NaOH et distribuer à raison de 3 ml par tube de 17 mm. Autoclaver pendant 20 mn à 120° C. Refroidir jusqu'à environ 50° C. Ajouter aseptiquement du sang humain total décomplémenté à raison de 1 ml par tube (25 p. 100). Mélanger et laisser solidifier dans la position inclinée.

Après refroidissement, ajouter 2 ml de solution de Locke.

(*) Granulé CMI O.X.O.I.D. :

Extrait de viande	1,0 g
Extrait de levure bactériol.	2,0 g
Peptone bactériol.	5,0 g
NaCl	5,0 g
	13,0 g

MILIEU DE NÖLLER (modifié par I. V. Herbert)

Gélose nutritive O.X.O.I.D.	28 g
Glucose	2 g
Eau distillée	1.000 ml

Autoclaver et refroidir comme ci-dessus, lorsque la gélose est à environ 50° C, ajouter 20 ml de sang entier de Lapin, mélanger et laisser refroidir incliné. Après refroidissement, ajouter 15 ml de solution de Ringer.

SOLUTION DE HANKS

NaCl	8 g
KCl	0,44 g
CaCl ₂	0,14 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	0,12 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
NaHCO ₃	0,35 g
Glucose	1,00 g
Rouge de phénol	0,02 g
Eau bi-distillée q.s.p.	1.000 ml

MÉLANGE SYNTHÉTIQUE N° 199 DE PARKER, 1950

	mg		mg
L-arginine	70	Acide folique	0,01
L-histidine	20	Choline	0,50
L-lysine	70	Inositol	0,05
L-tyrosine	40	Acide para-amino-benzoïque	0,05
DL-tryptophane	20	Vitamine A	0,10
DL phénylalanine	50	Calciférol (Vit. D)	0,10
L-cystine	20	Ménadione (Vit. K)	0,01
DL-méthionine	30	Phosphate Alpha Trocophérol (Vit. E)	0,01
DL-sérine	50	Acide ascorbique	0,05
DL-thréonine	60	Tween 80 (ac. oléique)	20
DL-leucine	120	Cholestérol	0,2
DL-isoléucine	40	Acétate de sodium	50
DL-valine	50	L-glutamine	100
DL-acide glutamique	150	Fer (nitrate ferrique)	0,1
DL-acide aspartique	60	Adénine	10
DL-alanine	50	Guanine	0,3
L-proline	40	Xanthine	0,3
L-hydroxyproline	10	Hypoxanthine	0,3
Glycocolle	50	Thymine	0,3
Cystéine	0,1	Uracil	0,3
Thiamine	0,01	Pyridoxine	0,025
Riboflavine	0,01	Glutathion	0,05
Pyridoxal	0,025	Adénosine tri-phosphate	10
Niacine	0,025	Acide adénylique	0,2
Niacinamide	0,025	Ribose	0,5
Pantothénate	0,01	Désoxyribose	0,5
Biotine	0,01		
Liquide de Earle			Q.S. 1.000 ml

*
**

DEUXIEME PARTIE

Recherches sur la composition minimale
d'un milieu nutritif liquide permettant la culture des Trypanosomes

RÉSUMÉ DE LA DEUXIÈME PARTIE.

L'étude des différents composants du milieu liquide « 199 simplifié, enrichi », contenant 21 acides aminés, amène à formuler le milieu minimum pour *T. gambiense* qui n'en contient plus que 14.

SECOND PART-SUMMARY.

Starting with a simplified liquid medium « simplified, enriched, 199 », an experimental study of *T. gambiense* growth permitted to reduce the number of amino-acids from 21 to 14.

CHAPITRE I

Croissance des cultures

Au début de cette étude, nous disposons de quatre souches de Trypanosomes (p. 350 et suiv.) très bien adaptées au milieu de Tobie, modifié par M. Vaucel, et entretenues à l'étuve à 27°C.

Notre premier objectif a été d'essayer de les adapter à un milieu entièrement liquide, et notre idée s'est immédiatement orientée vers le milieu de Parker, ou 199, habituellement utilisé pour les cultures cellulaires.

En fait, nous sommes partis de la formule dite 199 modifié Institut Pasteur, et après plusieurs séries d'essais sur lesquels nous n'insisterons pas, nous sommes parvenus à la mise au point d'un milieu dit *199 simplifié*, dans lequel, en particulier, la solution de Earle est remplacée par celle de Hanks.

Or, ce milieu utilisé tel quel, ne permet pas la multiplication des Trypanosomes, et il doit être obligatoirement *enrichi* par un faible volume de phase liquide provenant du milieu de Tobie (ou de Nöller). Ce milieu complet est dit : *199 simplifié enrichi*.

I. — ETUDE DU MILIEU LIQUIDE ET DE SES COMPOSANTS.

Nous avons encore voulu contrôler, jusqu'à quel point, tous les constituants présents dans ce milieu sont nécessaires, et nous les avons alors groupés de la manière suivante (formule détaillée p. 362) :

1° Hanks :	vitamine E, nitrate ferrique, acétate de sodium.	proline, hydroxyproline, sérine, acide glutamique, cystéine.
chlorure de sodium, chlorure de potassium, chlorure de calcium, sulfate de magnésium, phosphate disodique, phosphate monopotassique, carbonate de sodium, glucose.	4° Groupe dit « 10 AA » :	
	arginine, histidine, lysine, tryptophane, phénylalanine, méthionine, thréonine, leucine, isoleucine, valine,	6° Groupe des vitamines B et vitamines C dit « B + C » :
2° Groupe I :		nicotinamide, acide nicotinique, pyridoxal, thiamine, riboflavine, pentothonate de calcium, inositol, acide para-aminobenzoïque, choline.
tyrosine, cystine, biotine, acide folique, tween 80, cholestérol, calciférol, hypoxanthine.	5° Groupe dit « 9 AA » :	La vitamine C est ajoutée au moment de l'utilisation.
	glutamine, glycocolle, acide aspartique, alanine,	
3° Groupe dit « KEFeAC » :		
vitamine K,		

Puis l'activité de ces différents groupes a été contrôlée en les associant selon le schéma suivant :

- M1 = Hanks.
- M2 = Hanks + B + C.
- M3 = Hanks + B + C + groupe I.
- M4 = Hanks + B + C + groupe I + KEFeAc.
- M5 = Hanks + B + C + groupe I + KEFeAc + 10 AA.
- M6 = Hanks + B + C + groupe I + KEFeAc + 9 AA.
- M7 = Hanks + B + C + groupe I + 10 AA.
- M8 = Hanks + B + C + 10 AA.

Dans toute la série d'une même expérimentation, chacun des huit milieux, ainsi que le témoin (199 simplifié) est enrichi par un volume identique du même lot de liquide de Tobie modifié, soit :

- 5 p. 100 pour *T. gambiense* et *T. theileri* ;
- 2,5 p. 100 pour *T. theileri* et *T. rotatorium*.

II. — DÉVELOPPEMENT DES *TRYPANOSOMES* DANS LES MILIEUX INCOMPLETS.

Dans le but de comparer le développement des quatre souches choisies dans le milieu « 199 simplifié enrichi » qui sert de témoin, et dans les milieux incomplets à l'essai, on opère des numérations toutes les 48 heures, pendant 12 jours sur la suspension formolée d'un mélange de 3 tubes de culture à chaque lecture, ce qui demande la réalisation de séries de 18 tubes pour chaque milieu, et pour chaque expérimentation.

Le nombre de Trypanosomes trouvés dans chaque milieu à J2, J4..., J12, représente la quantité absolue. On en déduit la quantité relative ou pourcentage comparé, c'est-à-dire le nombre de Trypanosomes trouvés dans chaque milieu à l'essai pour 100 Trypanosomes dans le témoin.

Pour la clarté de l'exposé, les pourcentages comparés sont exprimés ici en indices relativement à 100 Trypanosomes (base 100) trouvés dans le milieu témoin correspondant. (Par exemple, quand le milieu à l'essai contient 2 fois moins de Trypanosomes que le milieu témoin, soit 50 p. 100, l'indice est exprimé par I_{50} ; s'il en contient le même nombre, soit 100 p. 100, il est exprimé par I_{100} , et ainsi de suite.)

Afin de simplifier l'exposé, seuls les résultats globaux sont donnés.

1° *Trypanosoma rotatorium*

Croissance moyenne.

La croissance moyenne de *T. rotatorium* dans le « 199 simplifié » enrichi par 2,5 p. 100 de la phase liquide du milieu de Tobie (0,025 ml/ml) est représentée par un graphique (fig. 5).

La moyenne de huit numérations pour chaque point est donnée ci-dessous :

J0		150.000	Trypanosomes/ml
J2		778.000	Trypanosomes/ml
J4		2.691.000	Trypanosomes/ml
J6		4.765.000	Trypanosomes/ml
J8		5.513.000	Trypanosomes/ml
J10		6.152.000	Trypanosomes/ml
J12		5.082.000	Trypanosomes/ml

Les trois points correspondant aux densités des Flagellés des 2°, 4° et 6° jours sont situés sur une droite dont l'angle avec l'axe des ordonnées est inférieur à 25°, il s'agit de la phase exponentielle de la croissance. La richesse maximale de la culture est atteinte au 10° jour avec 6.152.000 Trypanosomes par millilitre. La décroissance est à peine amorcée à J12, quand se termine l'expérience.

Pourcentages comparés.

Les milieux M1, M2, M3, M4, M6 et M8 donnent une croissance faible avec seulement deux points au-dessus du niveau I_{50} . M7 fournit cinq points au-dessus de I_{50} , l'un de ces points dépasse même I_{100} ; par contre, un seul point se situe au-dessous de I_{50} .

M5 est le plus satisfaisant des milieux incomplets pour la culture de *T. rotatorium* quoiqu'il soit encore inférieur au milieu 199. Ses six points sont situés au-dessus de I_{50} , et deux d'entre eux dépassent I_{100} (fig. 6).

L'aspect en dents de scie observé uniquement sur la représentation graphique de la croissance de *T. rotatorium* dans M5 rappelle le phénomène de diauxie (J. Monod, 1942). En fait, ces irrégularités sont probablement attribuables à des accidents expérimentaux isolés.

2° *Trypanosoma theezieni*

Croissance moyenne.

Le graphique (fig. 7) représente la culture moyenne de *T. theezieni* dans le « 199 simplifié » enrichi par 2,5 p. 100 de la phase liquide du milieu de Tobie.

FIG. 5. — Croissance moyenne de 8 ensemencements de *T. rotatorium* dans le 199 « simplifié » enrichi par 2,5 % de la phase liquide du milieu de Tobie (199 0,05 T)

FIG. 6. — Pourcentage comparé du développement de *T. rotatorium* dans le « 199 0,05 T » (base 100) et dans 8 milieux incomplets

La moyenne de huit numérations pour chaque point est donnée ci-dessous :

J0		150.000	Trypanosomes/ml
J2		317.000	Trypanosomes/ml
J4		597.000	Trypanosomes/ml
J6		625.000	Trypanosomes/ml
J8		496.000	Trypanosomes/ml
J10		323.000	Trypanosomes/ml
J12		307.000	Trypanosomes/ml

Le maximum est atteint le 6^e jour, avec 625.000 Trypanosomes par millilitre, puis la densité de la culture décroît régulièrement.

Pourcentages comparés.

L'examen du graphique n° 8 montre que les huit milieux à l'essai ont au moins deux points au-dessus de I_{50} , M4 en a trois au-dessus de I_{100} , M3 en a deux, et M5, six.

On remarque de *T. theezieni*, cultivé à notre laboratoire depuis moins d'un an au moment où ces courbes ont été tracées, a un pouvoir d'adaptation supérieur à celui de la vieille souche de *T. rotatorium*. En effet, il se multiplie d'une façon satisfaisante dans trois milieux incomplets, tandis que *T. rotatorium* ne se multiplie abondamment que dans un seul milieu incomplet.

3° *Trypanosoma theileri*

Croissance moyenne.

Le graphique (fig. 9) représente la croissance moyenne de *T. theileri* dans le « 199 simplifié » enrichi par 5 p. 100 de la phase liquide du milieu de Nöller (0,05 ml/ml).

La moyenne de huit numérations pour chaque point est donnée ci-dessous :

J0		124.000	Trypanosomes/ml
J2		65.000	Trypanosomes/ml
J4		100.000	Trypanosomes/ml
J6		54.000	Trypanosomes/ml
J8		42.000	Trypanosomes/ml
J10		25.000	Trypanosomes/ml
J12		12.000	Trypanosomes/ml

Ces chiffres, faibles, montrent que l'apport nutritif de la phase liquide du milieu de Nöller, quand elle est utilisée à 5 p. 100, est insuffisante pour cette espèce ; le taux sera porté à 10 p. 100 pour les repiquages ultérieurs de *T. theileri*.

Pourcentages comparés.

Les milieux M5 et M7 permettent la culture pendant 12 jours. M5 et M6 ont respectivement deux et trois points au-dessus du niveau I_{50} ; par contre, M2 et M3 n'ont pas un seul point atteignant I_{50} . Un seul milieu a deux points supérieurs à I_{50} , et permet une culture de 12 jours, c'est M5.

Or, M5 est, parmi les huit milieux incomplets, le plus favorable à *T. rotatorium*, et l'un des plus avantageux pour *T. theezieni* (fig. 10).

FIG. 7. — Croissance moyenne de 8 ensemencements de *T. therezieni* dans le 199 « simplifié » enrichi par 2,5 % de la phase liquide du milieu de Tobie (199 0,05T)

FIG. 8. — Pourcentage comparé du développement de *T. therezieni* dans le « 199 0,05 T » (base 100) et dans 8 milieux incomplets

FIG. 9. — Croissance moyenne de 8 ensemencements de *T. theileri* dans le 199 « simplifié » enrichi par 5 % de la phase liquide du milieu de Nöller (199 0,1 N)

FIG. 10. — Pourcentage comparé du développement de *T. theileri* dans le « 199 0,1 N » (base 100) et dans 8 milieux incomplets

4° *Trypanosoma gambiense**Croissance moyenne.*

La croissance moyenne (fig. 11) de *T. gambiense* a été mesurée dans le milieu « 199 simplifié » enrichi par 5 p. 100 de la phase liquide du milieu de Tobie.

La moyenne de quatre mesures pour chaque point est donnée ci-dessous :

J0		100.000 Trypanosomes/ml
J2		254.000 Trypanosomes/ml
J4		752.000 Trypanosomes/ml
J6		1.416.000 Trypanosomes/ml
J8		1.314.000 Trypanosomes/ml
J10		1.298.000 Trypanosomes/ml
J12		694.000 Trypanosomes/ml

Les trois points correspondant aux densités de Flagellés des 2°, 4° et 6° jours sont situés sur une droite dont l'angle avec l'axe des ordonnées est inférieur à 25°, il s'agit de la phase exponentielle de la croissance. La densité maximale est atteinte le 6° jour avec 1.416.000 Trypanosomes par millilitre.

Pourcentages comparés.

Quatre milieux (sur 8) permettent une culture de 12 jours, ce sont : M1, M6, M7 et M8 (fig. 12). M2 et M3 n'ont aucun point atteignant I_{50} ; M5 ne permet la culture de *T. gambiense* que pendant moins de 10 jours.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE I

— Une formule simplifiée du milieu 199 est proposée.

— Cinq groupes de substances sont ajoutées au liquide de Hanks, base du milieu, pour constituer le « 199 simplifié ».

— Les constatations suivantes sont effectuées :

1° Le milieu témoin « 199 simplifié enrichi » fournit pour chacune des quatre souches, une meilleure croissance qu'aucun des huit milieux incomplets essayés.

2° Chacune des solutions entrant dans la composition du « 199 simplifié » joue un rôle favorable à la multiplication des Trypanosomes.

3° Le milieu M5 satisfait les besoins nutritifs de *T. rotatorium*, *T. thezienti* et *T. theileri* mais il ne permet à *T. gambiense* ni de se multiplier normalement ni de survivre plus de huit jours.

4° Le groupe « 10 AA » est préférable pour la croissance au groupe « 9 AA ». Celui-ci, néanmoins, doit contenir un ou plusieurs acides aminés indispensables au métabolisme des Trypanosomes ; en effet, la seule différence qui existe entre le « 199 simplifié » et M5 réside dans la présence ou l'absence du groupe « 9 AA ».

Ces particularités seront expliquées et les acides aminés indispensables aux Trypanosomes seront identifiés à la fin de cette deuxième partie.

FIG. 11. — Croissance moyenne de 4 ensemencements de *T. gambiense* dans le 199 « simplifié » enrichi par 5 % de la phase liquide du milieu de Tobie (199 0,1 T)

FIG. 12. — Pourcentage comparé du développement de *T. gambiense* dans le « 199 0,1 T » (base 100) et dans 8 milieux incomplets

5° La phase liquide du milieu de Tobie peut être diluée au 1/40 seulement, dans le 199, pour la culture de *T. rotatorium* (199 0,05 T) mais doit être à 5 p. 100 pour celle de *T. gambiense* (199 0,1 T). Une addition de 10 p. 100 de la phase liquide du milieu de Nöller permet la culture de *T. theezieni* et de *T. theileri* (199 0,2 N).

Dans le chapitre suivant, le devenir des souches est observé après repiquage dans le « 199 simplifié, enrichi », privé successivement d'un sel, du glucose et d'un ou plusieurs acides aminés.

CHAPITRE II

Simplification du milieu par suppression successive de chacun des sels, du glucose et des acides aminés

La multiplication des Trypanosomes est étudiée dans le « 199 simplifié enrichi » dont on a retiré individuellement et successivement un sel, le glucose, un ou plusieurs acides aminés.

Nous considérons, en donnant les résultats des expériences qui suivent, soit la croissance du 3° repiquage (sels, glucose), soit le pourcentage comparé du nombre de Trypanosomes trouvés après 5 jours de culture (acides aminés).

I. — SUPPRESSION SUCCESSIVE DES SELS.

On se propose de rechercher si les sels ajoutés à la solution de NaCl, à 0,8 p. 100, sont nécessaires ou suffisants dans nos conditions d'expérience.

En préliminaire, il faut noter que *T. rotatorium* se multiplie indéfiniment dans la solution de Hanks, convenablement enrichie par 5 p. 100 de phase liquide de milieu de Tobie (« Hanks 0,1 T »), tandis que les trois autres souches ne se maintiennent pas au-delà du 3° repiquage.

KCl, CaCl₂, MgSO₄, l'un des deux phosphates ou les deux phosphates sont supprimés à tour de rôle lors de la composition du « 199 simplifié » ; chaque milieu est enrichi par 5 p. 100 d'une des deux phases liquides de milieux au sang, comme il a été indiqué précédemment.

Les résultats de plusieurs essais sont résumés ci-dessous, et consignés dans le tableau n° 1.

Résultats.

1° *T. rotatorium*, *T. theezieni* et *T. theileri* se multiplient dans le milieu « 199 simplifié » privé à tour de rôle de KCl, de MgSO₄ ou de CaCl₂.

2° *T. gambiense* ne supporte pas la suppression de CaCl₂.

3° Les quatre espèces de Trypanosomes se multiplient encore dans le milieu habituel, lorsque les quantités de phosphate sont diminuées :

- une quantité deux fois moindre est favorable ;
- une absence totale est dommageable.

Ces faits peuvent être liés au rôle joué par l'équilibre glucose-phosphate sur le métabolisme du Trypanosome. Nous reviendrons sur cette question dans la troisième partie.

II. — SUPPRESSION DU GLUCOSE.

Il est constaté que :

1° *T. rotatorium*, *T. theezieni* et *T. theileri* supportent aisément un ensemencement, et deux repiquages dans des solutions nutritives privées de glucose.

TABLEAU 1. — Culture des Trypanosomes en milieu « 199 enrichi ». Suppression d'un sel. Suppression du glucose. Lecture du 3° repiquage

Souche	Sans KCl	Sans CaCl ₂	Sans MgSO ₄	Suppression d'un phosph. (*)	Sans phosph.	Sans glucose
<i>T. rotatorium</i> .	+	+	+	+	+	+
<i>T. theezieni</i> ...	++	+	+	+	+	+
<i>T. theileri</i>	+	+	+	+	---	+
<i>T. gambiense</i> ...	+	0	+	+	±	0

(*) Les résultats sont comparables, que ce soit le phosphate disodique ou le phosphate monopotassique qui soit supprimé.

2° *T. gambiense* meurt rapidement en l'absence de glucose.

3° *T. gambiense* peut se multiplier pendant au moins trois repiquages dans le « 199 0,1 T », lorsque le glucose a été remplacé par un dérivé glucidique : hexose phosphate ou pentose phosphate (des glucides tels que le sucrose ou le galactose ne sont pas utilisés par le Flagellé).

III. — DÉTERMINATION DES ACIDES AMINÉS NÉCESSAIRES A LA CULTURE DE *T. gambiense* DANS LE MILIEU SEMI-SYNTHÉTIQUE ; PROPOSITION D'UNE NOUVELLE FORMULE DE MILIEU SIMPLIFIÉ.

Les acides aminés, indispensables au développement de *T. gambiense* à 27°C, sont précisés ci-dessous :

Les numérations sont effectuées le cinquième jour de la culture sur un mélange de trois tubes pour chaque essai. Deux milieux témoins servent de terme de comparaison, ils dérivent de la formule de H. Eagle (1955 a et b) ; l'un contient 21 acides aminés usuels (milieu A), l'autre ne contient que les 13 acides aminés retenus par H. Eagle (milieu B). Les concentrations sont celles indiquées par R. C. Parker (tableau 2).

La numération des Flagellés cultivés dans ces deux milieux a été effectuée au cours de 13 expériences différentes. Les résultats obtenus pour B sont exprimés en valeurs rela-

tives par rapport aux résultats obtenus pour A (nombre de Trypanosomes trouvés dans B pour 100 Trypanosomes trouvés dans A). La moyenne des 13 numérations, soit 65 p. 100, sert de terme de comparaison lors des essais au cours desquels un acide aminé est ajouté ou au contraire supprimé lors de la confection du milieu qui contient alors quatorze, douze ou onze acides aminés. Chaque expérience est répétée quatre fois et la moyenne des quatre numérations est exprimée en pourcentage. Les résultats globaux sont donnés ci-dessous (Tableau 3), les résultats détaillés ont été publiés précédemment (M. Vaucel et H. Fromentin, 1967).

TABLEAU 2. — Composition des milieux synthétiques de référence. Le milieu A comprend les 21 acides aminés contenus dans le milieu 199. Le milieu B comprend les 13 acides aminés contenus dans le milieu de Eagle

Solution physiologique de Hanks :		Acides aminés (*) :		Milieu
	g/l		g/l	
NaCl	8,0	arginine	0,070	B
KCl	0,4	histidine	0,020	
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2	lysine	0,070	
PO ₄ HNa ₂ , 12 H ₂ O	0,60	tryptophane	0,020	
CaCl ₂	0,14	phénylalanine	0,050	
glucose	1,0	méthionine	0,030	
rouge de phénol	0,020	thréonine	0,055	
		leucine	0,120	
		isoleucine	0,040	
		valine	0,050	
		cystine	0,020	
		tyrosine	0,040	
		glutamine	0,010	
		alanine	0,050	A
		sérine	0,050	
		proline	0,040	
		ac. aspartique	0,055	
		ac. glutamique	0,150	
		cystéine	0,010	
		hydroxyproline	0,010	
		glycocolle	0,050	
		</		

(*) Les concentrations utilisées sont celles du milieu 199.

Résultats.

1° Acides aminés ajoutés individuellement, à tour de rôle lors de la composition du milieu, portant le total à 14.

Milieu A	100	p. 100 de croissance de <i>T. gambiense</i>
Milieu B	65	p. 100 de croissance de <i>T. gambiense</i>
Milieu B avec alanine	75	p. 100 de croissance de <i>T. gambiense</i>
Milieu B avec sérine	73,8	p. 100 de croissance de <i>T. gambiense</i>
Milieu B avec proline	93,9	p. 100 de croissance de <i>T. gambiense</i>
Milieu B avec ac. aspartique	67,9	p. 100 de croissance de <i>T. gambiense</i>
Milieu B avec ac. glutamique	67,8	p. 100 de croissance de <i>T. gambiense</i>
Milieu B avec cystéine	62,0	p. 100 de croissance de <i>T. gambiense</i>
Milieu B avec hydroxyproline	62,9	p. 100 de croissance de <i>T. gambiense</i>
Milieu B avec glycolle	44,8	p. 100 de croissance de <i>T. gambiense</i>

TABLEAU 3. — Pourcentage comparé ou nombre de *Trypanosoma gambiense* « Eliane » trouvés dans les milieux à l'essai pour 100 Trypanosomes trouvés dans le milieu témoin A (1)

Milieu A = 21 ac. am.	Milieu B = 13 ac. am.	Milieu B additionné d'un acide aminé = 14 acides aminés								Milieu B sans glutamine = 12 ac. am.
		alanine	sérine	proline	ac. aspar.	ac. glut.	cys-téine	hydroxypro.	glycolle	
100	65	75,0	73,8	93,9	67,9	67,8	62,0	62,9	44,8	41,8

Milieu B sans glutamine et privé d'un autre acide aminé = 11 acides aminés											
argi-nine	histi-dine	lysine	tryp-toph.	phé-nyl. alan.	mé-thio-nine	thréo-nine	leu-cine	iso-leucine	valine	cystine	tyro-sine
25,0	34,3	30,3	31,7	32,4	59,0	41,3	55,7	47,8	50,5	54,0	51,7

(1) Les pourcentages indiqués représentent la moyenne de quatre expériences différentes pour chaque acide aminé essayé. La moyenne des résultats obtenus dans le milieu B a été calculée sur 13 résultats.

2° Acide aminé supprimé lors de la composition du milieu B, portant le total à 12.

Milieu A	100	p. 100 de croissance de <i>T. gambiense</i>
Milieu B	65	p. 100 de croissance de <i>T. gambiense</i>
Milieu B sans glutamine	41,8	p. 100 de croissance de <i>T. gambiense</i>

soit diminution de plus du tiers de la croissance de *T. gambiense*.

3° Acides aminés supprimés individuellement, lors de la composition du milieu B privé de glutamine, ramenant le total à 11.

Milieu A	100	p. 100 de croissance
Milieu B	65	p. 100 de croissance
Milieu B sans glutamine	41,8	p. 100 de croissance

Milieu B sans glutamine et sans cystine	51,7 p. 100 de croissance
Milieu B sans glutamine et sans tyrosine	54,0 p. 100 de croissance
Milieu B sans glutamine et sans arginine	25,0 p. 100 de croissance
Milieu B sans glutamine et sans histidine	34,3 p. 100 de croissance
Milieu B sans glutamine et sans lysine	30,3 p. 100 de croissance
Milieu B sans glutamine et sans valine	50,5 p. 100 de croissance
Milieu B sans glutamine et sans tryptophane	31,7 p. 100 de croissance
Milieu B sans glutamine et sans phénylalanine	32,4 p. 100 de croissance
Milieu B sans glutamine et sans méthionine	59,0 p. 100 de croissance
Milieu B sans glutamine et sans thréonine	41,3 p. 100 de croissance
Milieu B sans glutamine et sans leucine	55,7 p. 100 de croissance
Milieu B sans glutamine et sans isoleucine	47,8 p. 100 de croissance

Ces résultats sont interprétés en choisissant une marge de sécurité de 15 p. 100, ample, afin d'éviter aux inconvénients de la méthode signalés par I. V. Herbert (1965) et très supérieure à celle qu'autorise la déviation-standard de $\pm 8,5$ p. 100 calculée au risque 5 p. 100 sur 13 essais.

Il ressort que :

- a) l'addition de *proline* au milieu contenant déjà 13 acides aminés est très favorable à *T. gambiense* ;
- b) la suppression de la *glutamine* est très dommageable de même que, mais à un moindre degré, celle de l'*arginine* et de la *lysine* ;
- c) la présence du glyco-colle apparaît inhibante et celle de la *méthionine* défavorable quand le milieu est appauvri en acides aminés.

Une deuxième formule minimale de milieu simplifié est proposée, elle contient 14 acides aminés qui sont les acides aminés du milieu de Eagle, auxquels il est indispensable d'ajouter la *proline* (formule p. 377).

CONCLUSION DE LA DEUXIÈME PARTIE :

Nous indiquons la composition d'un milieu liquide dérivé du milieu de Parker et désigné par « 199 simplifié ». La méthode d'étude du milieu « enrichi » consiste à tracer la courbe de croissance des quatre espèces de Trypanosomes dans des liquides nutritifs dérivés du « 199 simplifié » mais privés de certains groupes de produits entrant dans sa composition.

1° Les numérations pratiquées tous les deux jours pendant une période de 12 jours permettent de constater qu'aucun des milieux incomplets utilisés n'est pleinement satisfaisant, chacun des groupes de produits successivement supprimé de la formule est nécessaire à la multiplication des Trypanosomes.

2° Les Trypanosomes se multiplient, sans dommage apparent, après suppression d'un sel (KCl , $MgSO_4$, $CaCl_2$ ou phosphates), à l'exception toutefois de *T. gambiense* qui ne peut survivre dans le milieu privé de $CaCl_2$.

3° *T. gambiense* meurt quand le glucose est absent ; celui-ci peut être remplacé par un dérivé glucidique. *T. rotatorium*, *T. theezienti* et *T. theileri* se multiplient pendant au moins trois repiquages en l'absence de glucose dans le « 199 simplifié enrichi ».

4° Ces essais de simplification du liquide de base n'apportent aucun avantage réel sur la formule intégrale de la solution de Hanks. Cette dernière ne sera pas modifiée.

5° Les 10 acides aminés indispensables aux Mammifères se montrent également indispensables aux Trypanosomes quel que soit leur hôte d'origine (Batracien, Reptile, Mammifère); ce sont : arginine, histidine, lysine, tryptophane, phénylalanine, méthionine, thréonine, leucine, isoleucine, et valine.

6° Deux acides aminés supplémentaires doivent obligatoirement leur être fournis : la glutamine et la proline; la tyrosine et la cystine sont également favorables.

PREMIER MILIEU LIQUIDE DE H. FROMENTIN OU « 199 SIMPLIFIÉ » CONCENTRÉ

Sels :				Autres vitamines :	
NaCl	8,0	g %	Cn(*)×10	Biotine	traces
KCl	4,4	»	Cn × 100	ac. folique	»
CaCl ₂	1,4	»	»	vit. K	»
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	2,0	»	»	vit. E	»
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	1,2	»	»	ac. ascorbique ...	0,22 g % Cn × 100
KH ₂ PO ₄	0,6	»	»	Base purique :	
NaHCO ₃	10,0	»	»	hypoxanthine ...	0,01 g % Cn × 100
Sucre :				Oligoéléments :	
Glucose	10,0	»	»	nitrate ferrique ..	traces
Acides aminés :				acétate de Na ...	0,5 g % Cn × 100
Arginine	0,7	g %	Cn × 100	Lipides :	
Histidine	0,2	»	»	cholestérol	0,002 g % Cn
Lysine	0,7	»	»	×	100
Tryptophane	0,2	»	»	calciférol	0,001 g % Cn
Phénylalanine	0,5	»	»	×	100
Méthionine	0,3	»	»	tween 80	traces
Leucine	1,2	»	»	<p>Les solutions concentrées sont conservées à — 20° C et diluées aseptiquement dans l'eau bidistillée stérile additionnée de rouge de phénol au moment de l'emploi. Amener le pH à 7,2 par le bicarbonate de Na. Répartir.</p> <p>(*) Cn = concentration.</p>	
Isoleucine	0,4	»	»		
Valine	0,5	»	»		
Thréonine	0,6	»	»		
Tyrosine	0,4	»	»		
Cystine	0,2	»	»		
Glutamine	0,5	»	»		
Glycocolle	0,5	»	»		
Acide aspartique	0,6	»	»		
Alanine	0,6	»	»		
Pro'line	0,4	»	»		
Hydroxyproline	1,0	»	»		
Sérine	0,5	»	»		
Acide glutamique	1,5	»	»		
Cystéine	0,1	»	»		
Groupe des vitamines B :					
Nicotinamide	12,5	mg %	Cn×20000		
Acide nicotinique	12,5	»	»		
Pyridoxal	25,0	»	»		
Thiamine	5,0	»	»		
Riboflavine	5,0	»	»		
Pentothénate de Ca	5,0	»	»		
Inositol	25,0	»	»		
ac. para-aminobenzoïque ..	25,0	»	»		
Choline	250,0	»	»		

Diluer à 0,5 % pour obtenir une concentration × 100.

TROISIEME PARTIE

Recherches sur les facteurs de croissance
apportés aux Trypanosomes par le sang

RÉSUMÉ DE LA TROISIÈME PARTIE.

Les hématies normales permettent l'enrichissement du milieu liquide, les hématies déficientes en G-6-P-D non.

Des requipages en série de *T. rotatorium* sont obtenus dans un milieu chimiquement défini. Le métabolisme des Trypanosomes est associé au cycle de la glycolyse lui-même contrôlé par les enzymes des hématies.

THIRD PART - SUMMARY

Normal erythrocytes were able to enrich liquid medium, enzymatic deficient red blood cells were not.

T. rotatorium was cultivated for 25 days in a defined medium.

Carbohydrates metabolism, controlled by erythrocytes enzymes interfered with Trypanosomes metabolism.

La troisième partie est consacrée à l'étude des facteurs non déterminés, indispensables à la culture des Trypanosomes. Les cultures sont habituellement gardées sur des milieux gélosés au sang, le milieu synthétique 199, seul, ne permet pas la multiplication.

Le point de départ de cette étude sera l'examen, constituant par constituant, du milieu classique de Tobie au sang humain qui fournit des récoltes régulièrement abondantes ; on déduira des résultats, lequel de ces constituants est actif, ses particularités seront analysées, et une hypothèse de travail proposée.

CHAPITRE I

Fragmentation du milieu de Tobie

Nous avons vu (2^e partie) que le milieu 199, complété par un faible volume de la phase liquide du milieu de Tobie (5 p. 100) ou du milieu de Nöller (10 p. 100) permet la multiplication des Flagellés. Nous allons étudier la composition du milieu de Tobie (formule p. 360), et l'activité de ses composants.

I. — MESURE DE LA DENSITÉ OPTIQUE DES LIQUIDES ENRICHISSANTS.

La modification de la courbe d'absorption (à une longueur d'onde appropriée) du liquide nutritif après addition de l'extrait de sang, permet de mesurer aisément la propriété nouvelle conférée au milieu.

Cette modification peut être attribuée, soit à la quantité de protéines introduites dans le milieu, soit à l'hémoglobine seule.

Des mesures ont été pratiquées sur trois lots de phase liquide du milieu de Tobie, et sur deux lots de celle du milieu de Nöller, dans la lumière visible (541 nm), et dans l'ultraviolet (270 nm). Les résultats de ces mesures sont portés sur les graphiques des figures 13 et 14. Plus le liquide contient d'hémoglobine, plus le dôme indiquant l'absorption maximale des protéines est prononcé. L'augmentation de l'absorption lumineuse à 270 nm correspond à une augmentation parallèle à 541 nm.

(L'absorption lumineuse due aux protéines peut donc être attribuée presque exclusivement à l'hémoglobine et, dans ces conditions, une seule lecture se révèle suffisante car elle permettrait, si besoin était, de ramener tous les lots de liquides enrichissants utilisés à des concentrations voisines d'hémoglobine donc de protéines). Il est important de remarquer que le lot n° 1 de milieu de Nöller, dont la densité optique est faible : 0,001 à 541 nm et 0,63 à 270 nm, permet néanmoins la multiplication des Trypanosomes. Cette multiplication n'est donc pas due à l'hémoglobine, nous y reviendrons).

II. — ACTIVITÉ DE LA PHASE LIQUIDE DU MILIEU DE TOBIE.

Rappelons que la base gélosée est composée de : gélose, NaCl, granulés CMI, et sang.

1° *Suppression du sang.*

La phase liquide est impropre à la culture quand la base gélosée n'est pas additionnée de sang.

2° *Suppression des granulés CMI.*

Lorsque la base gélosée au sang est privée des granulés CMI (extrait de viande et de levure, peptone), elle ne permet plus la culture de *T. gambiense*, cependant, la phase liquide, provenant de cette gélose au sang incomplète, ajoutée au milieu 199, apporte encore le facteur de croissance indispensable. Par ailleurs, l'adjonction des granulés CMI au 199, dans des proportions identiques à celles du milieu de Tobie, est inefficace, le facteur de croissance recherché n'en provient pas.

FIG. 13. — Densité optique de 3 échantillons de la phase liquide du milieu de Tobie en lumière ultra-violette (entre les longueurs d'onde de 245 et 400 nm). Dilution au 1/20

FIG. 4. — Densité optique de 2 échantillons de la phase liquide du milieu de Nöller, en lumière ultra-violette (entre les longueurs d'onde de 245 et 400 nm). Dilution au 1/20

3° Propriétés de la phase liquide.

a) La phase liquide n'acquiert sa propriété nutritive qu'après contact d'une nuit à 35°C avec la base gélosée au sang.

b) La quantité minimale de liquide à ajouter au milieu synthétique est de 5 p. 100.

c) Le liquide chauffé pendant 1 h à 60°C conserve l'efficacité qu'un chauffage à 100°C lui fait perdre.

III. — ACTIVITÉ DES COMPOSANTS DU SANG.

a) Le plasma humain seul, décomplémenté ou non, ajouté au milieu 199, ne permet pas, aux quantités utilisées, les repiquages en série.

b) Le plasma humain, normal ou dialysé, ajouté au 199 à raison de 1 volume pour 9 volumes, en présence de globules rouges lavés, favorise la culture.

c) Un volume de globules rouges humains lavés, lysé par 3 volumes d'eau distillée et dilué à 5 p. 100 dans le 199, permet des repiquages en série à 27°C. Le lysat garde ses propriétés après chauffage de 1 h à 60°C.

d) Les globules rouges lavés, laissés dans le milieu à 27°C après l'ensemencement, permettent la culture.

e) Les stromas lavés n'apportent pas le facteur de croissance recherché.

f) L'hémoglobine purifiée (G. Schapira et nous-mêmes), l'hématine seule (formule de M. Lwoff, 1940), la ferritine (*), à raison de 1, 20, 200, 2.000, 20.000 M μ g, l'acide δ -amino-lévulinique (fourni aimablement par A. Gajdos) intervenant dans la synthèse des porphyrines, ne sont pas actifs (A. Gajdos et coll., 1962).

Il peut exister un rapport entre le résultat positif constaté au paragraphe « III d », d'une part, *activité des globules rouges entiers*, et au paragraphe « II, 3°, a » d'autre part : *maturation indispensable, à l'étuve à 35°C, du milieu de Tobie fraîchement préparé, permettant à sa phase liquide d'acquérir ses qualités particulières*. Nous en déduisons que l'enrichissement du milieu peut être dû à une action enzymatique des hématies, soit que celles-ci fournissent au 199 un facteur de croissance non encore identifié, soit que le système enzymatique des globules rouges modifie le milieu synthétique dans un sens favorable au Flagellé.

Pour vérifier cette hypothèse, il a été procédé à des essais permettant de préciser quels facteurs contrôlent l'activité des hématies dans le milieu.

IV. — MATURATION DES HÉMATIES DANS LE LIQUIDE PHYSIOLOGIQUE.

Nous allons étudier successivement :

1° *Le facteur température.*

Un volume d'hématies humaines fraîchement prélevées et lavées est mis en contact avec 20 volumes de milieu 199 :

- un lot est porté à + 4° C,
- un autre lot à 27° C,
- et le troisième à 35° C.

Après 24 h d'incubation, les globules rouges sont éliminés par centrifugation, et les surnageants sont prêts pour l'ensemencement.

La culture de *T. gambiense* est abondante (++) dans le milieu préparé à 35°C ; elle est positive, mais environ deux fois moins riche que ci-dessus (+) dans le milieu préparé à 27°C ; elle est négative dans le milieu ayant séjourné à + 4°C.

(*) Mann, New-York.

2° *Le facteur temps.*

Un temps de contact de 6 à 10 h entre les hématies et le 199 est insuffisant ; des durées de 18 à 24 h sont satisfaisantes, et équivalentes quant aux résultats obtenus. Ces derniers temps d'incubation seront habituellement maintenus au cours de ce travail.

3° *L'action des hématies.*

Un lot de globules rouges est lavé deux fois en eau physiologique. Des parties aliquotes du culot globulaire obtenu sont mises en suspension dans les conditions suivantes :

solution a) Eau physiologique 10 ml, culot d'hématies 1 ml.

Le contact est maintenu pendant 24 h à 35° C puis la lyse est provoquée par l'addition de 10 ml d'eau distillée. Les stromas sont éliminés et la densité optique du surnageant est mesurée.

solution b) Eau bidistillée 20 ml, culot d'hématies 1 ml.

Les hématies sont lysées, le contact est maintenu 24 h à 35° C puis, après élimination des stromas, la densité optique est mesurée ; les deux solutions pigmentées sont amenées à une même densité optique de 0,500 sous une épaisseur de 1 cm à 541 nm, valeur moyenne de la densité optique du « 199 0,1 T », pris comme référence. Deux séries de tubes de 120/12 sont préparées ; à 1,9 ml de milieu 199 on ajoute, dans une série 0,1 ml de la « solution a » et, dans l'autre 0,1 ml de la « solution b ».

Résultats

Le troisième repiquage de *T. gambiense* est abondant (++) dans la « solution a », et très faible (±) dans la « solution b », ce qui met en évidence le rôle du séjour temporaire des hématies intactes à 35° C, et limite l'intervention du pigment. Ces résultats correspondent à l'hypothèse émise plus haut.

Le milieu liquide enrichi par l'incubation temporaire, à 35° C, d'hématies lavées humaines, est donc un milieu acellulaire et dépourvu de sérum.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE I

Un milieu semi-synthétique liquide est indiqué : c'est le 199 additionné de 5 p. 100 de la phase liquide du milieu diphasique de Tobie ; ce faible volume d'extrait de gélose au sang est indispensable à la culture des Trypanosomes (« 199 0,1 T »).

Le facteur de croissance non identifié apporté par le sang résiste à un chauffage d'une heure à 60° C mais est détruit à 100° C ; il persiste dans le liquide soumis à la dialyse ; il existe dans les érythrocytes totaux et est présent, en quantité insuffisante dans le plasma ; il n'est pas apporté par les stromas lavés ni, probablement, par l'hémoglobine.

L'activité des hématies entières séjournant 18 h à 35° C dans le 199 est retenue ; les enzymes du sang peuvent être en cause (phosphorylation, glycolyse).

CHAPITRE II

Rôle des hématies en fonction de leur origine

Hématies nucléées

Les hématies humaines sont-elles les seules à fournir le facteur de croissance indispensable au Trypanosome ?

Il est intéressant de rechercher si ce facteur de croissance est également libéré par les hématies d'autres animaux appartenant à différentes classes de Vertébrés. Les quatre espèces de Trypanosomes sont repiquées en série dans le milieu 199 enrichi par :

A) des érythrocytes de Grenouille (*Rana esculenta*) ;

B) des érythrocytes d'embryon de Poulet ou de Poulet âgé de moins d'un mois :

a) animaux sains ; b) animaux infectés par une leucose aviaire.

Résultats

Les résultats sont comparables en *a* et *b* quel que soit l'âge du Poulet. *T. gambiense* et *T. theileri* ne survivent pas au-delà du troisième repiquage.

T. thezieni et *T. rotatorium* se multiplient pendant au moins 5 repiquages dans le milieu enrichi par des globules rouges de Grenouille, et pendant au moins 12 repiquages (12 semaines) dans celui avec érythrocytes de Poulet.

Les hématies nucléées de Batracien et d'Oiseau sont donc capables de fournir au milieu 199 le facteur indispensable à la multiplication des Trypanosomes.

Les globules rouges sont fractionnés afin de déterminer la localisation du facteur recherché ; l'hémolyse permet d'étudier l'activité éventuelle :

- de l'hémoglobine,
- des noyaux,
- des acides nucléiques.

I. — SOLUTION D'HÉMOGLOBINE.

Un volume de culot globulaire lavé (Poulet) est lysé par trois volumes d'eau distillée stérile. Après centrifugation de 30 mn, le surnageant est utilisé en tant que solution pure d'hémoglobine. Le dosage de l'hémoglobine est effectué au spectrophotomètre (Jobin et Yvon) à la longueur d'onde de 541 nm, et l'hémoglobine absolue est amenée à une densité de 0,500 comme précédemment.

Résultats

Deux souches sont ensemencées. La culture de *T. gambiense* est négative dès le deuxième repiquage. Celle de *T. thezieni* est négative au troisième repiquage.

Une fois de plus l'intervention du pigment seul est écartée, ce que nous avons déjà démontré après M. Lwoff (1940). Nous y reviendrons.

II. — NOYAUX ISOLÉS.

Il est procédé à quatre lavages en solution hypotonique de $MgCl_2$, à 0,005 M, afin de provoquer l'hémolyse des hématies de Poulet tout en préservant les noyaux (M. Vaucel et coll., 1964), suivis de deux lavages en eau physiologique.

Une partie aliquote d'érythrocytes lavés et comptés sert à enrichir le milieu témoin « 199 GRP ». Erythrocytes d'une part, noyaux d'autre part, sont portés à l'étuve à 35° C dans la solution de Hanks pendant 18 h. Passé ce temps, les éléments cellulaires sont éliminés, le 199 est préparé à partir des liquides surnageants.

Résultats

Deux souches sont ensemencées. La culture de *T. therezieni* disparaît dès le deuxième ou troisième repiquage. Celle de *T. rotatorium* est encore positive après au moins sept passages (sept semaines).

Une partie aliquote des milieux ci-dessus est traitée pendant 3-5 h à 35°C, par une solution de ribonucléase à 50 µg/ml. Que la ribonucléase exerce son activité sur le milieu nutritif avant ou après l'élimination des noyaux, les résultats sont les mêmes que ci-dessus : la culture de *T. therezieni* est négative au deuxième repiquage, celle de *T. rotatorium* est positive pendant au moins trois repiquages.

III. — ACIDES NUCLÉIQUES.

Les recherches sont poursuivies avec les acides ribonucléique (ARN), et désoxyribonucléique (ADN), natifs, extraits soit des noyaux, soit des érythrocytes (méthode de K. S. Kirby modifiée, 1957-58).

Résultats

Le deuxième repiquage de *T. rotatorium* est négatif en présence ou non d'hématine à 1 mg p. 100.

Des numérations de *T. rotatorium* exprimées en pourcentage comparé, sont reportées ci-dessous :

« 199 GRP » témoin	199 + Noyaux	199 + ADN	199 + ARN
100	89	0,01	0,2
100	80	9	1,5
		en présence d'hématine	

Les acides nucléiques isolés des hématies nucléées de Poulet n'apportent pas le facteur de croissance indispensable à la multiplication des Trypanosomes.

Remarques

1° *Taille des hématies.* Plus la taille du globule rouge augmente, plus la quantité numérique à ajouter au milieu pour obtenir l'enrichissement diminue : on passe de 250 millions/ml pour les hématies humaines à 120 millions/ml pour celles de Poulet et à 20 millions/ml pour celles de Grenouille.

Les volumes respectifs sont les suivants :

Mammifère (Homme adulte)	86 μm^3 (diamètre = 7,5 μ) (*).
Poulet	146,2 μm^3 (R = 6,7 μ ; r = 3,5 μ) (**).
Grenouille	636,8 μm^3 (R = 13,0 μ ; r = 7,8 μ) (**).

micron = μ ;

Le volume des hématies de Poulet est 1,7 fois plus grand que celui des hématies de Mammifères et le volume de celles de Grenouille 7,4 fois plus grand (moyenne calculée sur 50 GR).

2° *Plasticité du Flagellé.* *T. gambiense* et *T. theileri* ne se multiplient pas dans les milieux synthétiques complétés par l'incubation temporaire d'hématies appartenant à des Vertébrés de Classe différente : la culture s'appauvrit et disparaît au cours des tout premiers passages. La plasticité de ces Trypanosomes est insuffisante pour leur permettre de s'adapter à des substances organiques hétérologues. A l'opposé, les Trypanosomes de la Grenouille et du Caméléon se multiplient activement dans ces milieux bien qu'ils soient cultivés depuis respectivement 26 ans (*T. rotatorium*) et 6 ans (*T. theizeni*) sur sang de Mammifère : leur possibilité d'adaptation est conservée.

3° Particularités des érythrocytes de Grenouille.

L'utilisation de ces érythrocytes présente des difficultés : le sang de Grenouille est rarement stérile.

a) Chez plus des deux tiers des animaux utilisés on trouve, soit des Gamontes de *Dactylosoma*, soit des microfilaires ;

b) Le sang d'une série d'animaux contenait des bacilles qui se sont développés *in vitro*, malgré la présence d'antibiotiques dans le milieu.

c) Des cellules sanguines (**), lavées et remises en suspension dans la solution de Hanks, présentent, après un temps de latence de 24-48 h, des formes épimastigotes d'un Flagellé identifié comme étant *T. rotatorium* grâce aux formes trypomastigotes, extrêmement rares dans le sang circulant.

La présence constante de parasites n'est pas en faveur de l'emploi systématique des cellules sanguines de la Grenouille pour l'identification du facteur de croissance apporté au milieu 199 par les hématies de Vertébré.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE II

a) *Les hématies nucléées* de Grenouille ou de Poulet permettent les repiquages en série de *T. rotatorium* et de *T. theizeni* au contraire de *T. theileri* et de *T. gambiense* qui meurent vers le troisième repiquage.

b) *Les noyaux*, isolés des érythrocytes et traités comme les cellules rouges, permettent de maintenir indéfiniment en culture *T. rotatorium*, à l'exclusion des trois autres espèces de Trypanosomes. Après traitement par la ribonucléase, la culture est encore abondante.

c) *Les acides nucléiques* natifs extraits des érythrocytes totaux ou des noyaux et utilisés pour enrichir le 199 en présence d'hématine, ne permettent pas la survie des Trypanosomes.

(*) Tables scientifiques Geigy, 1963.

(**) Mesures effectuées sur nos animaux d'expérience.

(***) Mélange du sang du cœur de 3 *Rana* récolté sur liquoïde Roche.

CHAPITRE III

Rôle des hématies en fonction de leur origine

Hématies anucléées normales

Les hématies nucléées étudiées dans le chapitre précédent sont des cellules complètes, au contraire des hématies anucléées dépourvues de noyau. Quoi qu'il en soit, le potentiel enzymatique de ces dernières est complet (les globules rouges jeunes ou érythroblastes, ayant possédé un noyau), mais non modifiable, du fait de l'absence d'acides nucléiques dans les érythrocytes adultes.

Hématies de Lapin (GRL).

Les milieux sont préparés comme indiqué précédemment (p. 357). Les quatre souches se multiplient indéfiniment dans le 199 enrichi par le contact temporaire des GRL.

Hématies humaines normales (GRH).

On a vu au chapitre I que *T. gambiense* se multiplie indéfiniment dans le « 199 GRH ». Il en est de même de *T. theziesi* et de *T. rotatorium*. *T. theileri* n'est pas cultivable dans ce milieu.

Hématies de Rat (GRR).

Trois des quatre souches sont cultivables indéfiniment dans le « 199 GRR », ce sont *T. gambiense*, *T. theziesi* et *T. rotatorium*. *T. theileri* ne se multiplie pas.

Dilution du milieu. Quand le milieu « 199 GRR » est dilué au 1/2 ou au 1/4 avec du 199 pur, le facteur de croissance est dilué d'autant, et on constate, après numération des Flagellés au cinquième jour de la culture, que *T. theziesi* et *T. rotatorium* ne sont pas affectés, au contraire de *T. gambiense* qui meurt.

Contrôle de l'activité des hématies de Rat. Les érythrocytes sont soumis à certaines conditions biologique, physique ou chimique dont l'influence sur la croissance des Trypanosomes permettra de confirmer ou non le rôle des enzymes globulaires envisagé dans le chapitre I.

I. — CONDITIONS BIOLOGIQUES.

1) *Hématies de Rat vieilles* à + 4°C. — Pour rechercher l'influence du vieillissement sur l'activité enzymatique des hématies, un culot lavé d'érythrocytes est abandonné pendant une semaine à + 4°C. Après numération, des milieux sont préparés avec ces cellules vieilles, selon le procédé décrit.

Résultats

Les globules rouges lavés, conservés en culot pendant sept jours à + 4°C, sont encore capables, passé ce délai, d'assurer la culture de *T. gambiense*.

2) *Épuisement des hématies à 35°C.* — L'épuisement des hématies par des bains successifs dans des liquides physiologiques devrait permettre de distinguer deux possibilités :

- ou bien la substance recherchée est stockée par l'hématie, et diffusera d'abord et surtout dans le premier bain (un séjour de l'hématie à + 4°C, en mettant la cellule au repos, devrait permettre le renouvellement de la substance qui serait alors décelée également dans le bain suivant) ;
- ou bien elle est fabriquée par l'hématie, à condition qu'on lui apporte les éléments nécessaires à sa synthèse, et elle diffusera dans chaque bain successif.

Les globules rouges séjournent à 35° C dans 3 bains successifs d'eau physiologique ou de solution de Hanks. La durée de chaque bain est de 24 h. Après centrifugation, chaque liquide est décanté et conservé à + 4° C. A l'issue de la 3^e décantation, le culot de GR est conservé à + 4° C pendant 48 h puis les hématies sont portées pour la 4^e fois dans le liquide correspondant pour une nouvelle période de 24 h. Les 4 liquides correspondant aux 4 séjours d'un même lot de GR à 35° C sont désignés par les numéros 1, 2, 3, et 4 ; chacun d'eux est utilisé pour composer le 199 qu'on ensemente.

On note que les hématies qui séjournent plusieurs fois consécutives dans l'eau physiologique à 35° C s'hémostolent dès le 3^e bain, il n'y a plus, en suspension dans les liquides, que des stromas globulaires. Par contre, si elles baignent dans la solution de Hanks, l'hémostol est discrète.

Résultats

La diminution d'activité est nette dans l'eau physiologique, elle est due à un phénomène d'autodestruction des hématies qui continuent à respirer à 35°C en utilisant leurs propres réserves ; *T. gambiense* ne peut se maintenir.

Par contre, dans le Hanks, il n'a pas été mis en évidence d'épuisement des hématies, les quatre liquides : 1, 2, 3 et 4 permettent la culture. La solution de Hanks contient, outre le chlorure de sodium, cinq autres sels (p. 360) et le glucose ; le métabolisme du glucose peut se poursuivre sans altération du globule rouge. Ce résultat vient à l'appui de l'hypothèse selon laquelle la substance recherchée est fabriquée par les érythrocytes en présence de glucides et de phosphore.

Notons qu'à propos du transfert des phosphates à travers la membrane cellulaire, G. M. Guest et S. Rapoport (1941) pensent que ce transfert est plutôt associé à un processus enzymatique qu'à une diffusion, mais que, cependant, les deux pourraient avoir lieu, la diffusion étant affectée par la rapidité de synthèse ou de décomposition des esters phosphoriques dans la cellule. On en est, encore actuellement, réduit aux hypothèses.

II. — CONDITIONS PHYSIQUES.

Dialysat des globules rouges de Rat. R. Zeledon (1959) démontre qu'un dialysat (*) d'hématine ou d'érythrocytes lavés, ou de sérum de Cheval, ne permet pas la culture, tandis que le dialysat de sérum de Cheval, additionné d'hématine, assure celle de *T. cruzi*, mais pas celle de *T. lewisi* ; l'auteur conclut :

« Some of the required substances are present in very low concentration and act as limiting factor. » (p. 652).

(*) Dialysat contre un liquide physiologique.

Les hématies de Rat sont contenues dans un sac de cellophane baigné par le liquide, à raison de 500 millions par millilitre de milieu final.

La dialyse a lieu, soit dans l'eau physiologique qui servira à préparer le milieu 199 (*T. thezienti*), soit dans le 199 lui-même (*T. gambiense* et *T. rotatorium*).

Trois repiquages sont effectués à cinq jours d'intervalle, dans le milieu qui n'est plus en contact avec le sac à dialyse.

Résultats

a) Les cultures sont négatives, soit après le deuxième repiquage (*T. gambiense*), soit après le troisième (*T. thezienti*).

b) *T. rotatorium* se cultive aisément dans le milieu enrichi par un dialysat de GRR normal ou chauffé 1 h à 56°C ; un chauffage de 1 h à 100°C lui fait perdre sa propriété.

Nos conclusions concernant *T. rotatorium* sont identiques à celles présentées par E. Tobie et Ch. Rees (1948) pour *T. cruzi* : « The fact that no other species has adapted to this environment indicates that the other trypanosomes are more exacting in their requirements. » (p. 420).

III. — CONDITIONS CHIMIQUES.

Inhibiteurs de la glycolyse intervenant à différents niveaux. Les cultures de *T. gambiense* obtenues dans des milieux « mûris » en présence d'hématies et de certains produits réputés inhibiteurs de la glycolyse sont examinées. Les résultats obtenus aideront à conclure à l'intervention ou la non-intervention de la glycolyse dans le développement des Trypanosomes *in vitro*.

1) *Chlorpromazine* (*). — La chlorpromazine a la propriété d'inhiber l'oxydation du glucose (R. A. Lewis, 1964). Cette oxydation peut être bloquée, soit par la voie des hexoses monophosphates avec inhibition de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase et de la 6-phosphogluconate-déshydrogénase, soit par la voie d'Emden-Meyerhof avec inhibition de la 3-phosphoglyceraldéhyde-déshydrogénase.

La chlorpromazine est utilisée à 0,05 mg/ml.

a) Les hématies humaines ou de Rat sont mises dans l'eau physiologique, base du 199 contenant la chlorpromazine, avant le séjour de 18 h à 35°C.

b) La chlorpromazine est ajoutée au 199 enrichi par 1/20 de la phase liquide du milieu de Tobie, juste avant l'ensemencement.

Résultats

Le premier repiquage est négatif, les témoins sont positifs.

2) *Fluorure de sodium*. — Les halogènes sont connus pour leur action oxydante qui est appliquée, entre autres, à la préparation de certains glucides, et à leur analyse (W. Pigman, 1957).

(*) Largactil SPECIA, formule chimique : chloro-3-(diméthylamino-3' propyl) — 10 phénothiazine.

L'ion fluore, d'après S. Plouvier (1965) : « inhibe électivement la voie de dégradation des hexoses ou voie d'Embden-Meyerhof, en bloquant par formation d'un complexe fluoro-phospho-magnésien, l'enzyme responsable de la transformation de l'acide phospho-2-glycérique en acide phospho-énol-pyruvique ».

Pour T. von Brand et coll. (1967) qui ont décrit cette même réaction, le NaF interviendrait en tant qu'inhibiteur d'une ou de plusieurs enzymes de la séquence d'Embden-Meyerhof.

La solution de NaF dans le milieu final est à 0,2 p. 100.

Résultats

Dès le premier ensemencement les cultures sont négatives.

3) *Acétyl-phényl-hydrazine*. — L'acétyl-phényl-hydrazine (APH) est connu pour son action sur le glutathion réduit, dont le stock dans l'hématie est très diminué après le contact prolongé de ce produit avec le sang complet (E. Beutler, 1959). Or, nous savons que le couple glutathion réducteur-glutathion réduit joue un rôle important comme transporteur d'hydrogène, et qu'en particulier, le glutathion réducteur serait un réservoir de groupements-SH pour les enzymes cellulaires (J. Ducas, 1961). En appauvrissant les hématies en glutathion, l'APH pourrait bloquer l'action enzymatique des hématies et, par contrecoup, la culture des Trypanosomes.

La concentration d'APH est de 20 mg pour 4 ml de sang total de Rat (E. Beutler, 1959).

Résultats

Le troisième repiquage est positif (+), l'APH n'inhibe pas la multiplication de *T. gambiense*.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE III

Les hématies anucléées de Lapin, de Rat et d'Homme permettent la multiplication de *T. rotatorium*, *T. theileri* et *T. gambiense*. *T. theileri* n'est cultivable que dans le 199 enrichi par les érythrocytes de Lapin.

L'activité des hématies de Rat responsables de l'enrichissement du « 199 GRR » persiste :

- après un séjour de sept jours à + 4° C ;
- après immersion dans des bains successifs de solution de Hanks à 35° C ;
- dans le liquide de dialyse (multiplication de *T. rotatorium* seulement) ;

Le blocage de l'oxydation du glucose par la chlorpromazine ou des enzymes du sang par le fluorure de sodium sont des facteurs empêchants pour la culture de *T. gambiense*. Par contre, l'appauvrissement des réserves de glutathion par l'acétyl-phényl-hydrazine n'entrave pas le développement du Flagellé.

Les Trypanosomes provenant d'animaux à température variable peuvent se multiplier dans des conditions qui ne conviennent pas à *T. gambiense*.

Notre hypothèse de départ se confirme, la phosphorylation du glucose au niveau des hématies semble nécessaire à la croissance des Trypanosomes.

*
**

Poursuivant cette démonstration, l'action des hématies humaines déficientes en glucose-6-phosphate-déshydrogénase est étudiée.

CHAPITRE IV

Rôle des hématies anucléées déficientes en glucose-6-phosphate-déshydrogénase. Rôle de la G-6-P-D. Hémolyse

I. — ACTION DES HÉMATIES DÉFICIENTES.

Après avoir constaté le rôle actif des érythrocytes normaux, nucléés ou non, il va être possible, grâce à la particularité présentée par certains globules rouges humains (GRH), d'examiner l'action d'hématies à système enzymatique déficient.

On sait que cette déficience (R. Truhaut et coll., 1963), (A. Lewis, 1964) peut entraîner des perturbations graves du métabolisme telles que l'ictère néonatal ou le favisme (J. Ducas, 1961 ; G. Charmot et coll., 1965). La déficience est génétique, héréditaire, et touche des groupes importants de population (16 p. 100 des Africains d'après H. Knight et coll., 1961 ; A. Dodin, 1970).

Il a été démontré que le paludisme a pu favoriser son expansion. En effet, le *plasmodium* s'attaque, de préférence, aux individus normaux qui, jusqu'à il y a 25 ans, étaient décimés ; les individus atteints de la déficience, moins touchés, ont survécu (A. Allison, 1960 ; H. Gilles, 1961).

Les cultures de Trypanosomes obtenues dans des milieux enrichis par des GRH normaux ou déficients en glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G-6-P-D) seront comparées et les conclusions seront tirées.

Les mesures de l'activité enzymatique et de taux d'hémoglobine absolue sont décrites p. 357-358. Les hématies sont préparées suivant la technique indiquée page 357.

Expérience I

Le nombre d'hématies humaines ajoutées au milieu est de 500 millions par millilitre. Quatre échantillons de sang sont étudiés : A, B, C et D.

Le taux d'activité de la G-6-P-D à 341 nm est respectivement, pour (*) :

A	9	UI/g	Hb
B	9	UI/g	Hb
C	4,5	UI/g	Hb
D	0	UI/g	Hb

(*) Le dépistage des individus déficients en G-6-P-D et le dosage de l'enzyme au photomètre Calbiochem (341 nm) ont été effectués (méthode « Calsul » de Calbiochem), par les soins de l'Institut Pasteur, à Tananarive pour les échantillons A à G.

La densité optique à 541 nm de chaque milieu avant l'ensemencement est :

pour le milieu A 0,013
pour le milieu B 0,016
pour le milieu C 0,524
pour le milieu D 0,193

Inoculum : *T. gambiense* 150.000 Trypanosomes/ml.

Résultats

Les deux échantillons de sang qui présentent un taux normal de G-6-P-D fournissent des récoltes très voisines, tandis que les deux échantillons de sang déficients en G-6-P-D ne donnent qu'une culture faible (tableau 4).

TABLEAU 4. — Culture comparée de *T. gambiense* dans des milieux enrichis par le séjour à 35° C d'hématies humaines normales ou déficientes en G-6-P-D

Numérations	Echantillons de sang humain			
	A 9 UI/gHb	B 9 UI/gHb	C 4,5 UI/gHb	D O
Quantité absolue à J 5 (*) .	86.000	92.000	21.000	6.000
Quantité relative (**)	100	106	24	7

(*) Nombre de Trypanosomes par ml de milieu.

(**) Nombre de Trypanosomes trouvés dans chacune des séries pour 100 Trypanosomes dans la série témoin.

Expérience II

Afin de confirmer l'intervention de la G-6-P-D sur la culture des Trypanosomes, son substrat, le glucose-6-phosphate (G-6-P) a été ajouté aux milieux (*).

Des cultures comparées sont effectuées avec trois échantillons de sang humain E, F et G, tous trois fortement dépourvus d'activité G-6-P-D. Les hématies sont mises en incubation dans l'eau physiologique qui servira à constituer le 199 enrichi, en présence ou non de l'hexose (H. Fromentin et coll., 1964).

La solution-mère de G-6-P est à $3,3 \times 10^{-2} M$

Les concentrations sont pour chaque série à :

$3,3 \times 10^{-4} M$ série 1 ;

$3,3 \times 10^{-5} M$ série 2 ;

$3,3 \times 10^{-6} M$ série 3 ;

témoins sans G-6-P série 4.

(*) Le G-6-P appartient au cycle de la glycolyse (cf. chapitre V, 3^e partie). Il est introduit pour obvier à la déficience en G-6-P-D par stimulation de la faible quantité d'enzyme pouvant subsister.

L'addition de G-6-P dans les trois séries de l'échantillon G a provoqué l'hémolyse. Un témoin supplémentaire a dû être ajouté (série 5). Il est préparé avec des hématies humaines normales, hémolysées par l'eau distillée; la densité optique (à 541 nm) de ce « témoin hémolyse » est mesurée et ajustée à celle de la série 1 (G) soit 0,100.

Inoculum : *T. gambiense* pour les trois échantillons de sang ; *T. rotatorium* pour G seulement.

Résultats

a) Les cultures de *T. gambiense* sont négatives avec les deux échantillons E et F en présence ou non de G-6-P, ainsi qu'avec l'échantillon G sans substrat (série 4). Par contre, elles sont faiblement positives avec G dans les séries 1, 2 et 3 contenant du G-6-P.

A densité optique égale, on obtient une culture 20 fois plus abondante dans la série 5 « témoin hémolyse », que dans la série 1 (G) (tableau 5).

b) Les cultures de *T. rotatorium* sont positives dans les cinq séries, cependant la multiplication est très faible dans la série 4 (G) sans G-6-P (tableau 6). Ces résultats peuvent s'expliquer ainsi :

TABLEAU 5. — Culture de *T. gambiense* dans des milieux enrichis par le séjour à 35° C de globules rouges humains déficients en G-6-P-D, en présence ou non de G-6-P

Numération à J 5	Série 1 G-6-P $3,3 \times 10^{-4} M$	Série 2 G-6-P $3,3 \times 10^{-5} M$	Série 3 G-6-P $3,3 \times 10^{-6} M$	Série 4 sans G-6-P	Série 5 témoin hémolyse
Echantillon					
Quantité absolue (*) E	0	0	0	0	...
Quantité absolue .. F	0	0	0	0	...
Quantité absolue .. G	111 000	125 000	82 500	0	2 250 000
Quantité rela- tive (**) G	4,7	5,3	3,5	0	100
Densité optique à 541 nm G et série 5	0,101	0,070	0,025	...	0,100

(*) Nombre de Trypanosomes par ml de milieu.

(**) Nombre de Trypanosomes trouvés dans les séries 1-2-3-4 pour 100 Trypanosomes dans la série 5 (témoin hémolyse).

Le facteur de croissance serait pratiquement absent de la série 4 (G) sans G-6-P, et serait présent à des taux minimes dans les séries 1, 2 et 3 contenant l'hexose. Ces taux minimes seraient insuffisants pour permettre le développement de *T. gambiense* mais assureraient la multiplication de *T. rotatorium*. On a vu au chapitre I que ce Trypanosome exige le même facteur de croissance que *T. gambiense*, mais en quantité plus faible. Seul, le « témoin hémolyse » (série 5) enrichi par l'hémolysat de sang frais normal supporte la culture de *T. gambiense*.

TABLEAU 6. — Culture de *T. rotatorium* dans des milieux enrichis par le séjour à 35° C de globules rouges humains déficients en G-6-P-D, en présence ou non de G-6-P

Numération à J 7	Série 1 G-6-P $3,3 \times 10^{-4} M$	Série 2 G-6-P $3,3 \times 10^{-5} M$	Série 3 G-6-P $3,3 \times 10^{-6} M$	Série 4 sans G-6-P	Série 5 témoin hémolyse
Echantillon G					
Quantité absolue (*)	845.000	315.000	347.000	40.000	506.000
Quantité relative (**)	166	62,2	68,5	7,9	100
Densité optique à 541 nm	0,101	0,070	0,095	...	0,100

(*) Nombre de Trypanosomes par ml de milieu.

(**) Nombre de Trypanosomes trouvés dans chacune des séries 1-2-3-4 pour 100 Trypanosomes dans la série 5 (témoin hémolyse).

Il reste à comparer la croissance de *T. gambiense* en fonction de l'activité de la G-6-P-D des érythrocytes et de la concentration en hémoglobine.

L'activité enzymatique est mesurée au spectrophotomètre, à 341 nm (*), d'une part, avant la mise en incubation temporaire des globules rouges dans le milieu liquide, d'autre part, dans le milieu après incubation et élimination des hématies.

Le taux d'hémoglobine est mesuré à la longueur d'onde de 541 nm, soit directement au spectrophotomètre (hémoglobine absolue), soit au colorimètre, après transformation en carbométhémoglobine (hémoglobine totale).

II. — ACTION DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE-DESHYDROGÉNASE DES HÉMATIES ANUCLÉÉES.

(Trois expériences). Des échantillons de globules rouges humains et de Rat sont traités deux par deux de façon identique : lavage, numération, mesure de l'activité enzymatique, taux d'hémoglobine et mise en incubation temporaire dans le milieu maintenu à 35° C avant l'ensemencement. Les pourcentages comparés du nombre de Flagellés trouvés dans les milieux enrichis par le contact de 250 millions, ou 750 millions de GR/ml sont portés dans le tableau 7 (expérience 1).

Résultats

L'activité de la G-6-P-D étant, pour un même nombre d'hématies d'espèces différentes, de 450 UI/10⁹ GRH, et de 600 UI/10⁹ GRR, le nombre de Flagellés dénombrés le cinquième jour dans les milieux correspondants, est respectivement de 100 et de 237. Pour ces mêmes lots, la densité optique, à 541 nm (hémoglobine absolue), est de 0,390 chez l'Homme, et de 0,265 chez le Rat (première expérience).

TABLEAU 7. — Mesure de l'activité de la G-6-P-D exprimée en UI/nm/10⁹ GR à 341 nm et taux d'hémoglobine absolue à 541 nm d'hématies d'Homme et de Rat servant à enrichir le milieu 199. Nombre de Trypanosomes trouvés dans les milieux correspondants et pourcentage comparé

	GRH	GRR
Activité G-6-P-D	450	600
Taux d'Hb absolue	0,390	0,265
250 $\overline{M}$ -ml (*):		
Quantité absolue (**)	610.000 T/ml	1.450.000 T/ml
Quantité relative (***)	100	237
750 $\overline{M}$ -ml:		
Quantité absolue	1.520.000 T/ml	
Quantité relative	249	

(*) $\overline{M}$: millions.

(**) Nombre de Trypanosomes trouvés dans 1 ml de milieu.

(***) Nombre de Trypanosomes trouvés dans les milieux à l'essai pour 100 Trypanosomes dans le milieu témoin (ici 199 250 $\overline{M}$ /GRR).

Quand le nombre des globules rouges est multiplié par 3, passant de 250 à 750 millions par millilitre, le nombre des Trypanosomes trouvés dans le milieu correspondant est multiplié par 2,5, passant de 610.000 à 1.520.000 Trypanosomes par millilitre.

Ainsi la multiplication des Trypanosomes dans le 199 GR est fonction de l'activité de la G-6-P-D des hématies ayant servi à enrichir le milieu: *plus l'enzyme est active, plus les Flagellés sont abondants*. Par contre, *le développement de la culture n'est pas proportionnel à la quantité d'hémoglobine présente*.

Les mesures suivantes permettent de vérifier que cette activité enzymatique a été communiquée au liquide physiologique où ont baigné les érythrocytes.

III. — DIFFUSION DE L'ENZYME DANS LE MILIEU.

Des mesures sont effectuées sur les liquides enrichis (après incubation à 35°C, et élimination des hématies), et sur l'hémolysat correspondant. Trois échantillons de sang de Rat sont utilisés, et un échantillon de sang humain déficient (tableau 8).

TABLEAU 8. — Mesure de l'activité de la G-6-P-D et du taux d'hémoglobine pour 3 hémolysats de GRR, un hémolysat de GRH et les liquides enrichis, acellulaires, correspondants.

	Hémolysat 1 × 10 ⁹ GR				Liquide de Hanks 250 M GR/ml (*)			
	1	2	3	4 Hom- me défic.	1	2	3	4
	Rats							
Activité G-6-P-D :								
en UI/10 ⁹ GRR	111	870	450	210	16	28	20	20
en UI/gHb	25	26	14	2,7	1,0	1,7	0,7	0,6
Hb absolue, densité optique	0,335	0,470	0,228	0,555	0,013	...	0,02	...
Hb totale en g %	0,9	2,1	1,9	4,6	0,2	0,5	0,8	1,0

(*) M = millions.

Les hématies cèdent au milieu liquide dans lequel elles ont séjourné 18 h à 35°C, une partie de leur activité enzymatique à condition qu'il y ait début d'hémolyse.

A nombre de cellules égales, l'activité enzymatique de l'hémolysat total et celle d'un milieu acellulaire où ont incubé temporairement des hématies entières, ne diffèrent au plus que dans la proportion de 30 à 1 (870 contre 28, échantillon n° 2).

IV. — ACTIVITÉ DE LA G-6-P-D ET RENDEMENT DE LA CULTURE.

Les chiffres ci-dessous montrent :

a) Qu'il existe un rapport entre l'activité de la G-6-P-D du milieu, et le nombre de Trypanosomes trouvés après 5-6 jours de culture ;

b) Qu'une activité enzymatique faible est suivie d'un faible développement de la culture, malgré la diffusion d'hémoglobine dans le milieu.

Inoculum : *T. gambiense* à raison de 150.000 Trypanosomes par millilitre (tableau 9).

Quand on ne peut déceler ni trace d'activité G-6-P-D, ni trace d'hémoglobine, il n'y a pas de culture possible.

TABLEAU 9. — Culture de *T. gambiense* exprimée en pourcentage comparé, en fonction de l'activité de la G-6-P-D et de la quantité d'hémoglobine du milieu

	Expérience n° 1				Expérience n° 2	
	lot 1 témoin	lot 2	lot 3	GRH 500 M/ml	GRR	
	GRR 500 M/ml (*)				250 M/ml	500 M/ml
Activité G-6-P-D- ramenée à 1×10^9 GR/ml	18 UI	30 UI	5 UI	10 UI	0.0	1 UI
Hb totale	0,7 g %	0,4 g %	0,4 g %	1 g %	non mesurable	
Quantité absolue à J5 (**)	340.000	835.000	230.000	240.000	4.000	140.000
Quantité relative (***) ..	100	245	67	67	4	100

(*) M = millions.

(**) Nombre de Trypanosomes par ml de milieu.

(***) Nombre de Trypanosomes trouvés dans les milieux à l'essai pour 100 Trypanosomes dans le milieu témoin.

V. — ACTION DE L'HÉMOGLOBINE.

Les essais suivants sont destinés à mettre en évidence le rôle de l'hémoglobine. Le donneur humain est déficient en G-6-P-D (activité = 20 UI/10⁹ GR/ml, ou encore 1,37 UI/g Hb).

Les hématies sont lavées et hémolysées par trois volumes d'eau distillée, les stromas sont éliminés par centrifugation à 5.000 r.p.m. Les dilutions du pigment sont effectuées dans le milieu 199 suivant le schéma du tableau 10.

Les cinq milieux à l'essai et les deux milieux témoins sont ensemencés avec *T. gambiense* à J0. Tous sont positifs à J5, on procède alors au deuxième repiquage. Deux jours plus tard, à J7, les cultures du premier repiquage sont négatives, sauf chez les témoins. Le quatrième jour, soit à J9, les cultures du deuxième repiquage sont faiblement positives (1/4 et 1/32) ou négatives (1/2, 1/8 et 1/16); toutes sont négatives le septième jour (J14), tandis que les témoins sont positifs.

Le taux d'hémoglobine, toxique dès le premier repiquage, se situe à 2 g p. 100.

VI. — ENZYMES PURIFIÉES AJOUTÉES AU MILIEU 199.

Les résultats précédents prouvent que la G-6-P-D intervient sur la culture des Trypanosomes en modifiant le 199 dans un sens favorable au Flagellé. Ces faits permettent de supposer qu'il suffirait d'ajouter, dans le 199, l'enzyme purifiée pour obtenir la modification nécessaire.

TABLEAU 10. — Taux d'hémoglobine dans les milieux à l'essai et dans les témoins

Dilution de l'hémolysat dans le 199	Taux d'hémoglobine	Nombre de GRR lysés
1/2	1,9 g %	2 milliards
1/4	0,95 »	1 »
1/8	0,47 »	500 millions
1/16	0,23 »	250 »
1/32	0,12 »	125 »
Témoins « 199 T »	0,23 » 0,12 »	

Les enzymes suivantes sont essayées :

1° G-6-P-D a) extraite de levure, Calbiochem ; b) extraite de GRR (par nous-mêmes [*]).

2° Glutathion-réductase Calbiochem.

Justification de ce choix :

1° G-6-P-D : la multiplication du Trypanosome est liée à l'activité de cette enzyme. Sa fonction sera étudiée au chapitre suivant.

2° Glutathion-réductase : la déficience en G-6-P-D s'accompagne d'une déficience en glutathion-réduit dont la formation est gouvernée, en outre, par la glutathion-réductase selon le schéma :

Cette réaction régit le système oxydo-réducteur des hématies.

Les essais sont effectués, pour les trois échantillons d'enzymes dans le 199, en présence d'hématine à 1-2 mg p. 100 (**), de NADP à 3 mg p. 100 (***), de G-6-P à 1,6-3,3 mg p. 100.

Les milieux sont laissés 18-24 h à 35°C avant achèvement du 199.

Inoculum : *T. gambiense* et *T. rotatorium* ; éventuellement *T. theziesi*.

(*) Extraction par le sulfate d'ammonium suivant la méthode de P. Marks et coll., 1961.

(**) Hématine en solution à 20 mg p. 100, préparée selon la formule de M. Lwoff, 1940 : Hémine Roche, 10 mg ; Na₂HPO₄ M/2 6,3 ml, porter dans un bain-marie bouillant quelques secondes ; eau distillée 43 ml ; KH₂PO₄ M/1 0,6 ml, mélanger les 2 solutions et filtrer sur bougie L3.

(***) NADP (TPN) Calbiochem stérilisé par séjour de 2 h sous une lampe U.V.

*Résultats*1° *G-6-P-D* :

a) de levure (activité 320 UI/ml à 30° C).

T. gambiense et *T. theezieni* sont négatifs dès le 1^{er} repiquage ;

T. rotatorium est négatif au 3^e repiquage ;

b) de globules rouges de Rat (activité 300 UI/ml à 30° C).

T. gambiense est négatif dès le 1^{er} repiquage ;

T. rotatorium est négatif au 3^e repiquage.

2° *Glutathion-réductase* en présence de glutathion (stock à 0,7 p. 100) 4 mg p. 100 :

T. gambiense est négatif dès le 1^{er} repiquage ;

T. theezieni et *T. rotatorium* se négativent au cours du 3^e repiquage.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE IV

Les hématies humaines déficientes en *G-6-P-D* ne sont pas capables d'apporter au milieu 199 le facteur indispensable à la culture des Trypanosomes. Cependant, lorsque ces hématies séjournent temporairement dans le liquide en présence de glucose-6-phosphate, substrat de l'enzyme, le facteur de croissance apparaît : la culture de *T. gambiense* est pauvre, celle de *T. rotatorium* abondante.

La croissance de *T. gambiense* dans le 199 enrichi par le séjour temporaire à 35° C d'érythrocytes lavés, est proportionnelle à l'activité glucose-6-phosphate-déshydrogénasique des hématies, mesurée à 341 nm (en présence de *G-6-P* et de NADP) mais n'est pas fonction du taux d'hémoglobine présente. L'activité enzymatique de la cellule rouge est partiellement transmise au liquide pourvu qu'il y ait un début d'hémolyse.

Il est démontré qu'une solution d'hémoglobine, dénuée d'activité enzymatique, ne permet pas le maintien d'une culture de *T. gambiense* qui disparaît dès le deuxième repiquage.

Le taux de toxicité de l'hémoglobine humaine est indiqué. Des enzymes actives (*G-6-P-D* et glutathion-réductase), isolées du milieu cellulaire normal et ajoutées au 199, ne confèrent pas au milieu la qualité indispensable à la multiplication des Trypanosomes.

Le chapitre suivant sera consacré à l'étude de la multiplication des Trypanosomes dans des milieux enrichis par des globules rouges normaux, en présence ou non de *G-6-P* et d'autres composés du cycle du glucose.

CHAPITRE V

**Métabolisme du glucose par la voie de l'hexose diphosphate
et par la voie des hexoses monophosphates.**

**Application à la mise en évidence,
de l'activité enzymatique des hématies**

L'intervention des hématies normales lors de la préparation du milieu « 199 enrichi » a été mise en évidence dans les chapitres précédents. On a vu, en particulier,

FIG. 15. — Schéma du métabolisme du glucose (d'après J. Sallach et R. W. Mac Gilvery, 1967)

le rôle de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase des cellules rouges, dont l'action, favorable au Trypanosome, est renforcée en présence de glucose-6-phosphate (G-6-P).

Nous allons approfondir ces faits en utilisant, pour préparer le milieu 199, des hématies anucléées normales, en présence ou non de G-6-P, et de différents autres produits de la glycolyse.

Nous nous reporterons au schéma (inspiré par T. Truhaut et coll., 1963, et D. E. Nicholson, 1963) du métabolisme du glucose (figure 15) pour mettre en évidence les principales voies de dégradation du glucose qui sont, d'une part :

- la voie de la glycolyse par l'hexose diphosphate ou voie d'Embden-Meyerhof qui aboutit à l'acide pyruvique ; d'autre part,

— la voie des hexoses monophosphates (HMP), initiée par la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G-6-P-D) qui oxyde le glucose-6-phosphate en acide 6-phosphogluconique par l'intermédiaire de la 6-phosphogluconolactone, et d'une lactonase (voie de Warburg et Dickens).

Associée à la G-6-P-D, la 6-phosphogluconate-déshydrogénase (6-P-G-D) intervient dans l'oxydation du 6-phosphogluconate en pentose-phosphate.

Les pentoses donneront, par la suite, du sédoheptulose-phosphate, et du glyceraldéhyde-phosphate qui, à leur tour, fourniront du fructose-phosphate, et de l'érythrose-phosphate. L'érythrose-phosphate se combinera au ribulose-phosphate pour donner du fructose-phosphate, et du glyceraldéhyde-phosphate.

Le fructose-6-phosphate (F-6-P) se transforme alors, par isomérisation, en glucose-6-phosphate. La reconstitution des hexoses à partir des pentoses porte le nom de cycle de Horecker (figure 15).

Afin de préciser le métabolisme glucidique des hématies, J. Ducas écrit (1961, pp. 10 et 11) :

« ... L'hématie transforme le glucose circulant en glucose-6-phosphate et l'utilise de deux manières et dans deux buts différents :

« — en anaérobiose par la voie de Embden-Meyerhof qui lui procure les 9/10 de l'énergie dont il a besoin ;

« — en aérobie par la voie des pentoses (*) de Horecker qui lui fournit le reste de l'énergie et qui, surtout, lui procure du triphosphopyridine nucléotide réduit (NADPH)... La seule source de NADPH dans l'hématie réside dans les deux premières réactions de la voie des pentoses :

« Le NADPH intervient notamment dans le métabolisme du glutathion :

« L'importance du NADPH, coenzyme indispensable à de nombreuses réactions de réduction, est ainsi expliquée par R. Truhaut et coll. (1963) (p. 438) :

« Or, la vitesse de régénération du NADPH, est conditionnée par la transformation du G-6-P en acide-6-phosphogluconique qui ne se réalise que par l'action de la G-6-P-D. L'absence ou, du moins, la diminution d'activité de cet enzyme, entraînera donc de multiples conséquences métaboliques... »

(*) Habituellement appelée voie des hexoses monophosphates.

(**) NADP (= TPN), nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate.

NADPH (= TPNH), nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate réduit.

Ru-5-P = ribulose-5-phosphate.

I. — MÉTABOLISME DU GLUCOSE PAR LA VOIE D'EMBDEN-MEYERHOF OU VOIE DE L'HEXOSE DIPHOSPHATE.

1° *Glucose-6-phosphate*.

A) HÉMATIES HUMAINES NORMALES

Après avoir mis en évidence l'influence du G-6-P sur les hématies déficientes en G-6-P-D (chapitre IV), nous allons rechercher, d'une part, si l'action enrichissante des

TABLEAU 11. — Multiplication de *T. gambiense* « Eliane » en fonction du nombre d'hématies d'origine humaine ayant enrichi le milieu à 35° C en présence ou non de G-6-P

Lots de GRH normaux	Témoin sans G-6-P	G-6-P à 1×10^{-5} M	Sans G-6-P	G-6-P à 1×10^{-5} M
	250 millions GRH/ml		1 milliard GRH/ml	
Numération à J 6				
N° 1313 :				
Quantité absolue (*)	160 000	276.000	1.403.000	1.503.000
Quantité relative (**)	100	166	876	939
N° 1370 :				
Quantité absolue	470 000	658.000		
Quantité relative	100	140		

(*) Nombre de Trypanosomes trouvés par ml de milieu.

(**) Nombre de Trypanosomes trouvés dans chaque série pour 100 Trypanosomes dans le milieu témoin.

globules rouges humains normaux séjournant temporairement dans le milieu liquide est, elle aussi, renforcée par l'hexose ; d'autre part, si les résultats obtenus sont proportionnels au nombre d'hématies introduites dans le milieu. Les érythrocytes de deux donneurs, n° 1313 et 1370, sont utilisés.

Les milieux sont préparés avec ou sans G-6-P, en présence de 250 millions, ou de 1 milliard de globules rouges par millilitre de milieu.

Inoculum : *T. gambiense* « Eliane ».

Résultats (tableau 11)

Le nombre de Trypanosomes dénombrés dans le milieu, à un jour donné, est :

a) à quantité d'hématies égale, plus élevé, quand l'incubation de celles-ci a eu lieu en présence de G-6-P ;

b) proportionnel au nombre d'hématies introduites temporairement dans le milieu.

En dernier lieu, nous recherchons si ces résultats sont particuliers à la souche *T. gambiense* « Eliane » ou non. Pour cela, des essais comparatifs sont répétés avec *T. gambiense* « Mine » (*) (tableau 12).

T. gambiense « Mine » est 2,5 fois plus abondant dans le milieu ayant contenu du G-6-P pendant l'incubation des GRH que dans le milieu témoin.

Il s'agit donc d'un phénomène général.

TABLEAU 12. — Culture comparée à J 5 de 2 souches de *T. gambiense* dans le 199 enrichi par des GRH normaux en présence ou non de G-6-P (exprimé en quantité relative)

Souche	Témoin sans G-6-P	G-6-P à 1×10^{-4} M
<i>T. gambiense</i> « Eliane »	100 *	152
<i>T. gambiense</i> « Mine »	100	261

B) HÉMATIES DE RAT

Le G-6-P est, soit ajouté aux érythrocytes durant leur séjour dans le milieu à 35°C (« G-6-P à 35°C »), soit ajouté dans le 199 après élimination des hématies par centrifugation, juste avant l'ensemencement (« G-6-P extemporané »).

Inoculum : quatre souches sont ensemencées : *T. gambiense*, *T. theileri*, *T. theezieni* et *T. rotatorium*.

Les dilutions de l'hexose sont pour la

série a : G-6-P à $3,3 \times 10^{-4}$ M

série b : G-6-P à $3,3 \times 10^{-5}$ M

série c : G-6-P à $3,3 \times 10^{-6}$ M

série d : sans G-6-P

Résultats

Le G-6-P, qu'il soit ajouté au milieu nutritif avant le séjour temporaire des hématies à 35°C, ou après reconstitution du « 199 GRR », juste avant l'ensemencement :

- 1° ne permet pas une multiplication plus abondante de *T. rotatorium*, ni de *T. theezieni* ;
- 2° par contre, il favorise le développement de la culture de *T. gambiense* quand il a été en contact avec les globules rouges pendant le temps d'incubation du milieu ; il est sans action quand il est ajouté en l'absence des hématies ;
- 3° il permet des repiquages consécutifs en nombre indéfini de *T. theileri*, dont la culture n'est pas possible dans le « 199 GRR » en l'absence de l'hexose (tableau 13, 14 et 15).

(*) *T. gambiense* « Mine », isolé par nous-mêmes au laboratoire en 1959, à partir d'un cas de trypanosomiasse humaine, s'est aisément adapté à notre milieu « 199 0,1 T ».

C) HÉMATIES DE LAPIN

Les hématies de Lapin sont, à leur tour, utilisées pour enrichir le milieu « 199 GRL » en présence ou non de G-6-P. Deux souches sont plus particulièrement étudiées : *T. theileri* et *T. thezieni*. (Ce milieu convient également à *T. gambiense* et à *T. rotatorium*.)

TABLEAU 13. — Culture de *T. rotatorium* dans des milieux enrichis par des globules rouges de Rat en présence ou non de G-6-P

Souches	G-6-P à 35° C		G-6-P extemporané		Témoin sans G-6-P
	$3,3 \times 10^{-5} M$	$3,3 \times 10^{-6} M$	$3,3 \times 10^{-5} M$	$3,3 \times 10^{-6} M$	
<i>1^{re} expérience :</i>					
Numération à J 5 (*)	1.080.000	1.236.000	1.083.000	1.180 000	933.000
Pourcentage comparé (**)	115	132	116	126	100
<i>2^e expérience :</i>					
Numération à J 7	72.500	53.300	38.300	58.300	47.500
Pourcentage comparé	152	112	81	122	100

(*) Nombre de Trypanosomes trouvés dans 1 ml de milieu.

(**) Nombre de Trypanosomes trouvés dans chacun des milieux pour 100 Trypanosomes dans le milieu témoin.

Le G-6-P est à $3,3 \times 10^{-4} M$, les quantités absolues et relatives de Trypanosomes trouvés à J 5 sont réunies dans le tableau n° 20.

Résultats

T. theileri et *T. thezieni* sont favorisés par la présence de G-6-P dans le milieu pendant l'incubation des GRL.

2° Fructose-6-phosphate et fructose-1, 6-diphosphate.

L'apparition de chaînes glucidiques du type fructose au cours du cycle, nous a incités à poursuivre notre étude. Les deux fructoses sont ajoutés comparativement à un témoin « 199 GRR » sans hexose, et à un témoin « 199 GRR » contenant du G-6-P. Les uns sont mis à incuber à 35°C, les autres sont préparés extemporanément au moment de l'ensemencement.

TABLEAU 14. — Culture de *T. thezienti* dans des milieux enrichis par des globules rouges de Rat en présence ou non de G-6-P

	<i>G-6-P</i> à 35° C			Témoin sans <i>G-6-P</i>
	$3,3 \times 10^{-4} M$	$3,3 \times 10^{-5} M$	$3,3 \times 10^{-6} M$	
<i>1^{re} expérience :</i>				
Numération à J 5 (*)	130.000	151.000	140.000	145.000
Pourcentage comparé (**)	90	104	96	100
<i>2^e expérience :</i>				
Numération à J 5		453.000	366.000	401.000
Pourcentage comparé		112	91	100
<i>3^e expérience :</i>				
Numération à J 5		430.000	165.000	173.000
Pourcentage comparé		248	95	100
	<i>G-6-P « extemporané »</i>			Témoin sans <i>G-6-P</i>
		$3,3 \times 10^{-5} M$	$3,3 \times 10^{-6} M$	
<i>1^{re} expérience :</i>				
Numération à J 5		240.000		170.000
Pourcentage comparé		141		100
<i>2^e expérience :</i>				
Numération à J 7		205.000	488.000	876.000
Pourcentage comparé		23	56	100

(*) Nombre de Trypanosomes trouvés dans 1 ml de milieu.

(**) Nombre de Trypanosomes trouvés dans chacun des milieux pour 100 Trypanosomes dans le milieu témoin

série 1 : témoin sans hexose

série 2 : *G-6-P* à $3,3 \times 10^{-4} M$ série 3 : *F-6-P* à $3,3 \times 10^{-4} M$ série 4 : *F-1*, 6-diP à $2,5 \times 10^{-4} M$

TABLEAU 15. — Culture de *T. gambiense* dans des milieux enrichis par des globules rouges de Rat en présence ou non de G-6-P

	G-6-P à 35° C			Témoin sans G-6-P
	$3,3 \times 10^{-4} M$	$3,3 \times 10^{-5} M$	$3,3 \times 10^{-6} M$	
<i>1^{re} expérience :</i>				
Numération à J 6 (*)	2.240.000	2.400.000	2.960 000	1.780.000
Pourcentage com- paré (**)	125	134	165	100
<i>2^e expérience :</i>				
Numération à J 6		750.000	1.470 000	736.000
Pourcentage com- paré		102	200	100
<i>3^e expérience :</i>				
Numération à J 5		2 040.000	1.965.000	1.370.000
Pourcentage com- paré		148	143	100
	G-6-P « extemporané »			Témoin sans G-6-P
		$3,3 \times 10^{-5} M$	$3,3 \times 10^{-6} M$	
<i>1^{re} expérience :</i>				
Numération à J 7		30.000		65.000
Pourcentage com- paré		46		100
<i>2^e expérience :</i>				
Numération à J 6		103.000	85.000	81.000
Pourcentage com- paré		121	104	100

(*) Nombre de Trypanosomes trouvés dans 1 ml de milieu.

(**) Nombre de Trypanosomes trouvés dans chacun des milieux pour 100 Trypanosomes dans le milieu témoin

Inoculum : *T. gambiense*, à raison de 150.000 Trypanosomes par millilitre, comme précédemment.

Résultats

Les résultats sont réunis dans les tableaux 16 et 17. Les cultures sont favorisées non seulement par le G-6-P, mais encore par le F-6-P, lorsque ces glucides sont ajoutés pendant l'incubation des hématies de Rat à 35°C. Ces hexoses restent sans

TABLEAU 16. — Culture comparée de *T. gambiense* dans le « 199 GRR » en présence d'hexoses ajoutés, soit avant l'incubation à 35° C, soit après (milieux « extemporanés »)

Numération à J 5	Milieux mûris à 35° C				Milieux « extemporanés »		
	Série 1 témoin	Série 2 G-6-P $3,3 \times 10^{-4}$ M	Série 3 F-6-P $3,3 \times 10^{-4}$ M	Série 4 F-1,6-diP $2,5 \times 10^{-4}$ M	Série 5 G-6-P $3,3 \times 10^{-4}$ M	Série 6 F-6-P $3,3 \times 10^{-4}$ M	Série 7 F-1,6-diP $2,5 \times 10^{-4}$ M
Quantité absolue (*)	400.000	2.216.000	1.796.000	243.000	315.000	373.000	160
Quantité relative (**)	100	554	447	61	80	93	0,4

TABLEAU 17. — Culture comparée de *T. gambiense* dans le « 199 GRR » après incubation en présence de quantités croissantes de F-1,6-diP

Numération à J 5	Série 1 témoin	Série 2 F-1,6-diP $2,5 \times 10^{-6}$ M	Série 3 F-1,6-diP $2,5 \times 10^{-5}$ M	Série 4 F-1,6-diP $2,5 \times 10^{-4}$ M
Quantité absolue (*)	236.000	832.000	316.000	30.000
Quantité relative (**)	100	352	134	13

(*) Nombre de Trypanosomes trouvés dans un 1 ml de milieu.

(**) Nombre de Trypanosomes trouvés dans chacun des milieux à l'essai pour 100 Trypanosomes dans le milieu témoin.

effet sur la multiplication des Flagellés, quand ils sont ajoutés extemporanément à des milieux déjà préparés.

Les résultats obtenus dans le « 199 GRR » incubé en présence de F-1, 6-diP varient en fonction de la concentration.

C'est ainsi qu'à la concentration de $2,5 \times 10^{-5} M$, et de $2,5 \times 10^{-6} M$, le pourcentage comparé est élevé par rapport au témoin (134 % et 352 %). Par contre, des essais multipliés, à la concentration de $2,5 \times 10^{-4} M$, montrent une inhibition de la culture (quantités relatives obtenues : 18 %, 13 %, 61 %).

Il apparaît que *T. gambiense* est beaucoup plus dépendant du G-6-P que les autres espèces étudiées. Cette « servitude », qui signe des besoins nutritifs plus différenciés, est peut-être imputable aux hôtes différents, Mammifères pour *T. gambiense*, animaux à température variable pour *T. rotatorium*, et pour *T. thezienti*.

Nota :

1° La méthode statistique appliquée aux résultats obtenus dans les milieux « 199 GRR » en présence ou non de G-6-P, montre que les différences sont très significatives : $p > 0,01$, au risque 5 % ; la précision de la moyenne (quantité relative de Trypanosomes en présence de G-6-P) est 150 ± 22 .

2° Analyse quantitative de l'eau physiologique « GRR » (*).

Ion métallique	Eau pure (**)	Eau physiologique « enrichie »
Na	0,80 mEq ou 0,0184 g/l	119 mEq ou 2,737 g/l
K	0,05 mEq ou 0,001995 g/l	3,5 mEq ou 0,139 g/l
Ca	2,70 mEq ou 0,0541 g/l	4,8 mEq ou 0,0961 g/l
Fe	2,70 mEq ou 0,00005 g/l	4,8 mEq ou 0,3 g/l d'hémoglob.
Sucres réducteurs	non décelables par techniques classiques ni par orto-toluidine.	
Phosphore total	0,0102 g/l (tech. Fiske, Subarow). 0,0035 g/l (tech. Bell, Doisy).	
Phosphore inorganique ...	1,04 g/l (tech. Folin, Ciocalteu).	
Protéines	ou 1,27 g/l (Biuret modifié).	

Constatations :

- a) les glucides libres sont absents ;
- b) l'apport d'ions métalliques et de phosphore organique (6,7 mg/l) n'est pas négligeable ;
- c) on décèle des protéines autres que l'hémoglobine.

(*) Analyses effectuées par J. Richaud, I.P., Tananarive, que nous remercions.

(**) Eau d'Evian précipitée à l'autoclave et filtrée.

II. — MÉTABOLISME DU GLUCOSE PAR LA VOIE DES HEXOSES-MONOPHOSPHATE.

Les milieux sont enrichis par des hématies de Rat séjournant temporairement à 35°C dans l'eau physiologique, en présence d'acide-6-phosphogluconique, de ribose-5-phosphate, de ribulose-diphosphate, de ribulose-5-phosphate, ou de glycéro-phosphate de sodium.

- a) acide 6-phosphogluconique (Ac 6-phos-gluc.) ;
- b) ribose-5-phosphate (R-5-P).

Ces dérivés du glucose sont, soit ajoutés au liquide dans lequel baignent les hématies à 35°C, soit introduits extemporanément dans le 199 déjà préparé.

série 1 : témoin

série 2 : acide 6-phosphogluconique à $1,4 \times 10^{-4} M$

série 3 : d-ribose-5-phosphate de baryum à $2,7 \times 10^{-4} M$

Inoculum : *T. gambiense* (1^{re}, 2^e et 3^e expériences), *T. theezieni* (3^e expérience)
150.000 Trypanosomes par millilitre.

Résultats

Les essais faits avec *T. gambiense* mettent en lumière le rôle de première importance joué par l'acide 6-phosphogluconique, qu'il soit ajouté dans le milieu avant l'incubation, ou au contraire, après élimination des hématies avant l'ensemencement (tableau 18). *L'acide 6-phosphogluconique est le seul dérivé du glucose, parmi ceux que nous avons essayés, dont la présence dans le 199 est favorable à T. gambiense, sans qu'il ait eu à subir l'incubation à 35°C.*

L'intervention favorable de ce glucide sur *T. theezieni* est décelable seulement après incubation du milieu à 35°C.

Le ribose-5-phosphate ne favorise pas la multiplication de ces deux espèces.

- c) Ribulose-diphosphate (Ru-diP) ;
- d) Ribulose-5-phosphate (Ru-5-P) ;
- e) Glycérophosphate de sodium (Glycéroph.).

Solutions-mères :

Ribulose-diphosphate (sel de baryum) à $1,7 \times 10^{-3} M$

Glycérophosphate de sodium pentahydrate (Alpha et Beta) $3 \times 10^{-2} M$

Ribulose-5-P (sel de Na) à $2 \times 10^{-3} M$

Série 1 : témoin

Série 2 : ribulose-diphosphate à $1,7 \times 10^{-4} M$

Série 3 et 4 : ribulose-5-phosphate à $2 \times 10^{-5} M$ et $2 \times 10^{-4} M$

Série 5 : glycérophosphate de sodium à $3 \times 10^{-4} M$

TABEAU 18. — Cultures de *Trypanosoma gambiense* et de *Trypanosoma thezienti* dans des milieux enrichis par le séjour de globules rouges de Rat à 35° C en présence d'acide-6-phosphogluconique et de ribose-5-phosphate et dans des milieux où ces glucides sont ajoutés extemporanément

<i>T. gambiense</i>	Milieux mûris à 35° C			Milieux « extemporanés »	
	Témoin	Ac.-6-phos.-gluc. $1,4 \times 10^{-4} M$	R-5-P $2,7 \times 10^{-4} M$	Ac.-6-phos.-gluc. $1,4 \times 10^{-4} M$	R-5-P $2,7 \times 10^{-4} M$
1 ^{re} expérience :					
Numération à J 6 (*)	58.300	159.100	61.600	143.300	91.600
Pourcentage comparé (**)	100	272	105	245	157
2 ^e expérience :					
Numération à J 5	25.000	35.000	27.500	40.800	10 000
Pourcentage comparé	100	140	110	163	40
3 ^e expérience :					
Numération à J 5	112 500	581.000	120.000	170.000	135.000
Pourcentage comparé	100	516	106	151	120
<i>T. thezienti</i>					
Numération à J 6	431.000	641.000	270.000	323.300	296.000
Pourcentage comparé	100	128	62,5	75	69

(*) Nombre de Trypanosomes trouvés dans 1 ml de milieu.

(**) Nombre de Trypanosomes trouvés dans chaque série pour 100 Trypanosomes dans le milieu témoin.

Les glucides sont soit ajoutés au liquide pendant l'incubation temporaire des hématies, soit introduits extemporanément dans le 199.

Inoculum : *T. gambiense*.

Résultats

Le ribulose-diphosphate et le ribulose-5-phosphate améliorent le milieu nutritif convenant à la culture de *T. gambiense*, quand ils sont ajoutés au liquide avant l'incubation ; ils ne favorisent pas la culture du Flagellé dans le milieu « extemporané » (tableau 19).

Dans nos conditions d'expérience, le glycérophosphate de sodium n'influence pas la multiplication de *T. gambiense*, qu'il soit ajouté au milieu avant ou après le séjour temporaire des hématies.

TABLEAU 19. — Culture de *T. gambiense* dans des milieux enrichis par le séjour d'hématies de Rat à 35° C en présence de ribulose-5-phosphate, de ribulose-diphosphate et de glycérophosphate de sodium et dans des milieux où ces produits sont ajoutés extemporanément

Numération à J 5	Témoin	Milieux mûris à 35 °C en présence de :				Milieux « extemporanés »		
		Ru-5-P $2 \times 10^{-5} M$	Ru-5-P $2 \times 10^{-4} M$	Ru-diP $1,7 \times 10^{-5} M$	glycéroph. $3 \times 10^{-4} M$	Ru-5-P $2 \times 10^{-4} M$	Ru-diP $1,7 \times 10^{-4} M$	glycéroph. $3 \times 10^{-4} M$
Quantité rela- tive (*)	100	145	188	183	118	102	87	98

(*) Nombre de Trypanosomes trouvés dans chacun des milieux à l'essai pour 100 Trypanosomes dans le milieu témoin.

III. — VÉRIFICATION DU RÔLE DES DÉRIVÉS GLUCIDIQUES AJOUTÉS AU MILIEU PENDANT SA MATURATION A 35°C EN PRÉSENCE D'HÉMATIES DE LAPIN.

Dans les expériences suivantes, les dérivés phosphorylés du glucose déjà étudiés en présence de GRR, sont essayés dans les mêmes conditions en présence de globules rouges de Lapin.

Composition des milieux :

Série 1 : témoin

Série 2 : G-6-P à $3,3 \times 10^{-4} M$

Série 3 : F-6-P à $3,3 \times 10^{-4} M$

Série 4 : ribose-5-P à $2,7 \times 10^{-4} M$

Série 5 : acide 6-phosphogluconique à $1,4 \times 10^{-4} M$

Série 6 : ribulose-diphosphate à $1,7 \times 10^{-5} M$

Inoculum : *T. theileri*, 150.000 Trypanosomes par millilitre (3 expériences), et *T. thezienti* (2° et 3° expériences seulement).

Résultats

Nous savons déjà que la présence du G-6-P (p. 403) pendant l'incubation du milieu « 199 GRL » permet un meilleur rendement des cultures. De l'examen du tableau 20, il ressort que, non seulement le G-6-P, mais aussi le F-6-P améliore la croissance de *T. theileri* et de *T. thezieni*. Le R-5-P favorise *T. theileri*, et l'acide 6-phosphogluconique *T. thezieni*. Le Ru-di-P est sans effet. Il se confirme ainsi que la présence de certains produits du cycle du glucose dans le liquide pendant l'incubation des hématies à 35°C permet d'obtenir une meilleure culture des Flagellés.

TABLEAU 20. — Cultures de *Trypanosoma theileri* et de *Trypanosoma thezieni* dans des milieux enrichis par des globules rouges de Lapin, ayant mûri 18 heures à 35°C en présence ou non de glucides

<i>T. theileri</i>	Témoin	G-6-P $3,3 \times 10^{-4} M$	F-6-P $3,3 \times 10^{-4} M$	R-5-P $2,7 \times 10^{-4} M$	Ac.-6-phos.- gluc. $1,4 \times 10^{-4} M$	Ru-diP $1,7 \times 10^{-5} M$
<i>1^{re} expérience :</i>						
Numération à J 5 (1)	446.000	536.000	540.000	595.000	328.000	
Pourcentage comparé (2) ...	100	120	121	133	73,5	
<i>2^e expérience :</i>						
Numération à J 5	128.000	116.000	120.000	123.000	100 000	
Pourcentage comparé	100	91	94	96	78	
<i>3^e expérience :</i>						
Numération à J 7	85.000			143.000	88.000	93.000
Pourcentage comparé	100			168	103	109
<i>T. thezieni</i>						
<i>2^e expérience :</i>						
Numération à J 6	67.500	94.000	90.000	52.500	83.300	
Pourcentage comparé	100	139	133	77	123	
<i>3^e expérience :</i>						
Numération à J 5	1.870.000			1.460.000	1.986.000	1.653.000
Pourcentage comparé	100			78	105	88

(1) Nombre de Trypanosomes par ml de milieu.

(2) Nombre de Trypanosomes trouvés dans chacun des milieux à l'essai pour 100 Trypanosomes dans le milieu témoin.

IV. — CONTRE-EXPÉRIENCE DESTINÉE A RECHERCHER LE RÔLE DU GLUCOSE ET DU PHOSPHATE AJOUTÉS AUX LIQUIDES PHYSIOLOGIQUES AVANT LE SÉJOUR DES HÉMATIES A 35°C.

L'influence favorable à la multiplication des Trypanosomes de certains esters phosphorés du glucose pourrait être due à un apport supplémentaire de glucide ou de phosphore. A titre de contrôle, des expériences identiques sont effectuées en faisant séjourner temporairement à 35°C, dans l'eau physiologique, base du 199, des globules rouges de Rat, en présence de glucose et de phosphate de sodium. Les concentrations moléculaires sont choisies de façon à obtenir des quantités de glucose et de phosphore comparables à celles fournies par les hexoses monophosphates à $3,3 \times 10^{-4} M$ (*).

On constate que, dans ces conditions, la multiplication de *T. gambiense* n'est pas augmentée par rapport au témoin. Ce ne sont donc pas les molécules de glucose et de phosphate, seules, qui favorisent la croissance des Trypanosomes, mais les produits phosphorylés eux-mêmes ou l'énergie libérée par leur dégradation.

Nous avons vu que plusieurs de ces produits phosphorylés sont actifs en présence des érythrocytes ; la G-6-P-D n'est donc pas seule en cause, d'autres enzymes du sang, responsables de la glycolyse, doivent également intervenir, dans nos conditions d'expérience, pour transformer les glucides ajoutés à l'eau physiologique qui servira à constituer le 199, dont la composition se trouvera ainsi modifiée.

Pour confirmer nos résultats et étayer nos déductions, deux autres contre-expériences sont effectuées :

— addition de phosphatase alcaline dans le 199 : cette enzyme pourrait intervenir directement sur le milieu en catalysant le clivage des esters phosphorylés ;

— shunt des pentoses par le bleu de méthylène (**). Ce transporteur d'électrons, en oxydant les coenzymes indispensables au déroulement normal de la glycolyse ($NADPH \longleftrightarrow NADP^+$) provoque une formation accélérée des pentoses qui s'accumulent dans le milieu. Si le facteur de croissance recherché est sous leur dépendance, directe ou indirecte, la multiplication des Trypanosomes devrait être améliorée en présence de bleu de méthylène — B.M. — (M. Brin et R. H. Yonemoto, 1958), (A. Szeinberg et P. A. Marks, 1961).

(*) Calculs : Poids moléculaire du G-6-P (sel de sodium) = 300. P.M. du glucose ($C_6H_{12}O_6$) = 180.

Masse atomique du phosphore $P = 31$.

Le glucose représente $\frac{180}{300} = 0,60$ de la molécule d'hexose monophosphate.

Le phosphore représente $\frac{31}{300} = 0,10$ de cette molécule.

Nos solutions d'hexoses monophosphates étant à 1 g pour 100 ml, il suffit de faire une solution de glucose à 0,60 p. 100 et nous obtiendrons la concentration molaire désirée.

Pour obtenir un apport de phosphore minéral représentant 0,10 p. 100, nous avons recours au phosphate disodique PO_4HNa_2 , 12 H_2O de poids moléculaire = 358.

$\frac{358 \times 0,10}{31} = 1,15$ g, soit 1,15 g de Na_2HPO_4 12 H_2O pour 100 ml d'eau bi-distillée.

(**) Expérience de contrôle conseillé par M. le Pr CARTIER que nous remercions.

V. — ADDITION DE PHOSPHATASE ALCALINE DE VEAU.

Des quantités pesées d'enzyme cristallisée (Calbiochem) sont stérilisées par exposition sous lampe à rayonnement ultraviolet pendant deux heures. Différentes formules de milieux à base de 199 sont essayées, dans lesquelles les quatre espèces de Trypanosomes sont ensemencées. Deux formules types sont indiquées :

	Milieu A	Milieu B
Phosphatase	50 mg p. 100	50 mg p. 100
Hématine à 0,2 mg/ml	1/10.000	1/10.000
AMP	0,25 mg/ml	0,25 mg/ml
G-6-P	$3,3 \times 10^{-4} M$	
F-6-P		$3,3 \times 10^{-4} M$
199	Q. S.	Q. S.

T. gambiense et *T. theileri* ne survivent pas. La culture de *T. theirezi* est négative au troisième repiquage (J11) ; seul, *T. rotatorium* se multiplie jusqu'au quatrième repiquage qui est négatif (18 à 19 jours) (H. Fromentin, 1967 b).

Ici encore, les conditions physiologiques naturelles ne sont pas exactement reconstituées, et le Flagellé ne peut s'adapter, il manque encore le facteur essentiel apporté par le sang.

VI. — ADDITION DE BLEU DE MÉTHYLÈNE.

La solution-mère de bleu de méthylène (B.M.) à $1,6 \times 10^{-2} M$ est stérilisée par tyndallisation. Les effets du colorant sont essayés sur *T. gambiense*, et sur *T. rotatorium*, dans le milieu 199 enrichi par 1/20 de la phase liquide du milieu de Tobie (199 0,1 T).

A) *T. gambiense*

a) culture âgée : La culture de huit jours est en phase de décroissance (cf. 2^e partie). Le B.M. est ajouté à la concentration de $1,6 \times 10^{-4} M$ sans que le milieu ait été renouvelé. Les numérations sont effectuées à temps variable sur les Trypanosomes vivants et les résultats exprimés en quantités relatives (nombre de Trypanosomes trouvés dans les milieux à l'essai pour 100 Trypanosomes dans le milieu témoin), et portés sur un graphique (fig. 16) ;

b) culture jeune : Le B.M. à $1,6 \times 10^{-4} M$ est ajouté dans le milieu neuf juste avant l'ensemencement. Les numérations sont effectuées simultanément sur le milieu témoin et sur le milieu contenant le B.M., les résultats sont portés sur le graphique numéro 17.

On constate que la stimulation due au B.M. se prolonge pendant 48 h dans le cas de la culture âgée malgré l'absence de renouvellement du milieu nutritif ; dans le cas de la culture jeune, la stimulation est sensible entre la 3^e et la 24^e heure, mais a disparu après 48 h, le produit, toxique, ayant tué un grand nombre de Flagellés. Il est intéressant de noter que, dans ce cas, le temps de latence est supprimé.

Des essais identiques ont été faits avec le milieu « 199 GRR » et les numérations effectuées à J5 comme à l'accoutumée ; dans ces conditions, seul l'effet toxique du B.M. a été mis en évidence.

FIG. 16. — Pourcentage comparé du développement de *T. gambiense* dans une culture âgée de 8 jours après addition de bleu de méthylène, pour 100 Trypanosomes à T0

DONNÉES DE LA FIGURE 16

Temps	Quantités relatives de Trypanosomes
T 0	100
T + 1/2 h	125
T + 1 h	154
T + 3 h	153
T + 24 h	183
T + 48 h	140
T + 72 h	90

B) *T. rotatorium*

La culture dans le « 199 0,1 T » est âgée de 4 semaines. Le B.M. est ajouté à la concentration de $0,8 \times 10^{-5} M$ et de $1,6 \times 10^{-4} M$.

Il n'est observé ni stimulation ni effet toxique ; la souche reste viable : les repiquages sont positifs.

Au cours d'une autre série d'expériences, le B.M. a été ajouté à un milieu chimiquement défini dont le seul dérivé du sang est l'hématine. La survie de *T. rotatorium* dans ce milieu n'a pas été prolongée malgré la présence du transporteur d'électrons.

En résumé, le bleu de méthylène, dans nos conditions d'expérience, est capable de stimuler la multiplication d'une culture âgée de *T. gambiense* pendant environ 48 h. De même sur une culture jeune, l'action stimulante s'exerce pendant 24 h mais est rapidement contrebalancée par l'effet toxique.

Il n'a pas été décelé d'action stimulante sur la culture de *T. rotatorium* pour lequel le colorant ne semble pas toxique aux concentrations utilisées.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE V

1) Les esters phosphorylés suivants, utilisés à diverses concentrations, favorisent la multiplication de *T. gambiense* quand ils sont ajoutés à la solution physiologique, base du milieu 199 en présence d'hématies de Rat pendant le « mûrissement » du milieu à 35° C ; il s'agit de : glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, acide 6-phosphogluconique, ribulose di-phosphate et ribulose-5-phosphate. Seul l'acide 6-phosphogluconique améliore la culture du Flagellé quand il est ajouté extemporanément au milieu acellulaire déjà préparé.

FIG. 17. — Pourcentage comparé du développement de *T. gambiense* dans une culture fraîche en présence de bleu de méthylène et dans la culture témoin (base 100 à T0)

DONNÉES DE LA FIGURE 17

Temps	Témoin	« 199 0,1 T » + B.M.
T 0	100	100
T + 3 h	98	148
T + 24 h	95	246
T + 48 h	215	157
T + 72 h	282	91

2) Le ribose-5-phosphate et le glycérophosphate ne sont pas favorables.

3) Le fructose-1,6-diphosphate, selon sa concentration, favorise ou inhibe la culture de *T. gambiense*. Ces constatations peuvent être reliées au fait que la formation de cet hexose est commandée par la phosphofructokinase, enzyme allostérique (c'est-à-dire intervenant dans des réactions non réversibles). (J. Monod et coll., 1965 ; A. Sols, 1969).

4) Des essais, en nombre limité, poursuivis avec *T. theezieni* sur « 199 GRR » ou sur « 199 GRL » montrent que la présence de G-6-P ou de F-6-P pendant l'incubation des hématies de Lapin dans le milieu, ou d'acide 6-phosphogluconique pendant l'incubation des érythrocytes de Rat, favorisent la croissance de ce Flagellé.

5) *T. theileri* qui ne se cultive pas dans le « 199 GRR », peut cependant se multiplier pendant 3 repiquages au moins, dans ce même « 199 GRR », à condition qu'il ait « mûri » en présence de G-6-P. Sa croissance dans le « 199 GRL » est active et n'est pas améliorée par l'addition d'hexose.

6) Quand le 199 est additionné de phosphatase alcaline (en présence d'hématine et d'hexose), il permet à *T. rotatorium*, et à lui seul, de se maintenir en culture pendant près de trois semaines ; la glucose-6-phosphate-déshydrogénase et la glutathion-réductase n'ont pas ce pouvoir.

7) Le bleu de méthylène est capable de stimuler le développement de *T. gambiense* pendant 24 à 48 h selon l'âge de la culture.

8) Des essais effectués en présence de quantités moléculaires de glucose et de phosphate équivalentes à celles apportées par les hexoses monophosphates, permettent d'éliminer l'intervention quantitative de ces molécules et de confirmer l'intervention des esters phosphorylés eux-mêmes sur le développement des Trypanosomes.

*
**

CHAPITRE VI

Enrichissement du milieu 199 sans intervention de cellules vivantes

Nos recherches personnelles ont permis de mettre en évidence trois séries de circonstances qui favorisent la multiplication des Trypanosomes dans un milieu liquide chimiquement défini, ce sont :

- a) la présence d'un facteur de croissance provenant des hématies (H. Fromentin et A. Dodin, 1964) ;
- b) la présence d'une Levure (H. Fromentin, 1969 a et b) ;
- c) la présence d'un explant de cœur de Souriceau (H. Fromentin, 1970).

Ces différentes circonstances ont un point commun : l'intervention de cellules vivantes. Or, sachant que la première partie du cycle de Krebs (oxydations respiratoires à partir du glucose) se retrouve chez tous les animaux, et chez les Levures (T. von Brand et coll., 1955), on en déduit que l'ensemble du métabolisme cellulaire et, plus particulièrement du métabolisme glucidique, est en cause (M. Marquet, 1964 ; P. Prieur, 1965) ; c'est pourquoi le milieu 199 va être complété maintenant par des substances organiques chimiquement définies, connues pour intervenir au cours du métabolisme des cellules animales. Leur rôle sera indiqué au fil de l'expérimentation. On peut espérer parvenir, grâce à une association judicieuse de ces substances, à reconstituer *in vitro* un milieu synthétique capable de fournir aux Flagellés l'environnement,

l'énergie et les produits nutritifs indispensables au libre déroulement de leur métabolisme, assurant ainsi, non seulement leur survie, mais la perpétuation de l'espèce.

I. — SUBSTANCES ORGANIQUES CHIMIQUEMENT DÉFINIES NON GLUCIDIQUES.

Le milieu 199 est additionné d'hématine (facteur de croissance indispensable en l'absence de sang), et des produits suivants :

- urée,
- acide adénosine monophosphorique (AMP),
- acide adénosine triphosphorique (ATP),
- stéarate de sodium (et incidemment coenzyme A),
- nicotinamide adénine dinucléotide (NAD),
- nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP),
- vitamine B 12.

1° Hématine.

Le chlorhydrate d'hématine, ou hémine est de formule complexe. A un noyau porphyrrique, lui-même théoriquement constitué par l'union de cycles pyrroliques au moyen de groupements $-\text{CH} =$, on trouve fixés :

- 4 CH_3 (méthyle),
- 2 $-\text{CH} = \text{CH}_2$ (vinyle),
- 2 $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ (propanoïque),

combinés à un atome de fer.

Nous avons vérifié que l'hématine en présence de sérum dans le 199 permet la croissance de *T. cruzi* (M. Lwoff, 1940) mais qu'aucune de nos quatre espèces de Trypanosomes ne supporte trois repiquages dans ces conditions. De plus, dans le 199 pur, sans hématine, aucune souche ne dépasse le deuxième repiquage car l'hématine est facteur de croissance.

L'hématine utilisée dans ce travail est dissoute dans un tampon phosphate (formule p. 397). Le phosphore minéral apporté par la solution est calculé :

phosphate	199	solution d'hématine
+ Na_2HPO_4	$0,4 \times 10^{-3}M = 0,013 \text{ g/l}$	$6,0 \times 10^{-2}M = 3,87 \text{ g/l}$
KH_2PO_4	$0,4 \times 10^{-3}M = \frac{0,013 \text{ g/l}}{0,026 \text{ g/l}}$	$1,25 \times 10^{-2}M = \frac{+0,39 \text{ g/l}}{4,26 \text{ g/l}}$
Total		

Lorsque la solution-mère d'hématine à 0,2 mg/ml est diluée au 1/20 dans le 199, la quantité de phosphore minéral introduite est dix fois plus forte que celle contenue dans le 199 pur. Il est nécessaire de tenir compte de ces différences quantitatives importantes : le métabolisme du glucose, intimement lié à celui des phosphates, peut subir des modifications dans des milieux où la quantité de phosphore minéral est décuplée. On sait, par exemple, que les phosphates inhibent l'activité de la G-6-P-D (P. Marks, 1961).

2° *Urée.*

M. Steinert et G. Boné (1956) ont remarqué que sous l'action du sérum de Veau, les formes trypomastigotes de *T. mega*, en culture, se transforment en formes épimastigotes. Cette même transformation est obtenue lorsqu'on remplace le sérum de Veau par une solution d'urée (M. Steinert, 1958).

Les milieux suivants sont essayés :

199 + hématine à 0,2 mg/ml : 5 p. 100 ;

199 + urée $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (solution-mère à $1,25 \times 10^{-2} M$) : 1 p. 100 ;

199 + hématine + urée (mêmes concentrations),

ils ne conviennent pas à la mise en culture de nos quatre espèces de Trypanosomes.

3° *Acide adénosine monophosphorique et acide adénosine triphosphorique.*

Les phosphonucléotides, AMP et ATP, agissent comme des coenzymes pourvoyant aux transferts d'énergie libre qui ont lieu lors des réactions de synthèse et de dégradation au sein de la cellule, c'est-à-dire qu'ils sont un élément énergétique essentiel du métabolisme cellulaire. De plus, l'ATP est fournisseur d'acide phosphorique. Il est à noter que l'ATP inhibe l'activité de la G-6-P-D (P. Marks, 1961).

Ces deux phosphonucléotides sont ajoutés au 199 contenant déjà de l'hématine et de l'urée à raison de 0,05 et 0,1 mg/ml.

Seule la culture de *T. rotatorium* est encore positive, dans le milieu contenant AMP et ATP, jusqu'au quinzième jour, mais le quatrième repiquage est négatif.

4° *Stéarate de sodium.*

Ce composé a permis à G. Boné et coll. (1963) de réaliser un progrès dans la culture de *T. cruzi* : lorsque ces auteurs ajoutent du stéarate de sodium à un milieu liquide peptoné, il n'est plus nécessaire de l'additionner de sérum.

L'acide stéarique $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ est un acide gras appartenant à la série saturée. Nous utilisons son sel sodique ; la solution-mère est à 2 mg/ml.

Le milieu utilisé est le 199 additionné d'hématine ; la concentration finale de stéarate de sodium est à 0,1 mg/ml en présence ou non d'ATP.

Le troisième repiquage de *T. rotatorium* est toujours négatif. En corollaire, nous avons essayé l'action de la coenzyme A.

5° *Coenzyme A.*

L'essai de cette coenzyme est effectué du fait de son rôle dans le transport des fonctions acyles COCH_3 , et dans l'oxydation et la synthèse des acides gras et des phospholipides entre autres.

La coenzyme A (Calbiochem) est ajoutée à raison de 0,025 ml pour 5 ml de milieu dans le 199 additionné d'hématine et de F-6-P.

La culture de *T. rotatorium* est trouvée positive jusqu'au vingtième jour : le cinquième repiquage est constamment négatif, même lorsque les essais sont effectués en enrichissant le milieu d'autres enzymes : phosphatase alcaline, glycéraldéhyde-déshydrogénase, G-6-P-D, et d'autres dérivés glucidiques : glyo-6 ou 3-phospho-glycérate. Des témoins sans enzyme sont négatifs dès le troisième repiquage. *T. gambiense* ne se multiplie pas dans de tels milieux.

6° Vitamine B 12.

Cette vitamine n'entre pas dans la composition du milieu de Parker. Or, B. Kolochine-Erber et M. Mailloux (1963) ont montré que certaines souches de *Leptospires* saprophytes pouvaient se multiplier en milieu synthétique, à condition qu'il contienne la vitamine B 12.

Au cours de nos essais, le milieu final contient de 0,002 µg/ml de vitamine B 12 (*), concentration préconisée par S. C. Nagle et coll. (1963), à 0,002 mg/ml (**).

On constate que *T. gambiense* et *T. rotatorium* :

a) sont négatifs dès le deuxième repiquage dans le milieu 100 pour 100 synthétique d'une part ;

b) ne se multiplient pas plus activement quand le « 199 0,1 T » est additionné de vitamine B 12.

La vitamine B 12 n'est donc pas un facteur de croissance pour les Trypanosomes.

7° Nicotinamides.

Les coenzymes I et II (NAD et NADP) ont été ajoutées au milieu 199 additionné d'hématine, soit à partir d'une solution-mère à 20 mg p. 100, soit directement après avoir été stérilisées par séjour sous rayonnement ultraviolet. Les concentrations finales varient de 0,6 à 6 mg p. 100. Le deuxième repiquage de *T. rotatorium* est négatif en présence ou non d'un hexose.

II. — GLUCIDES.

Après avoir passé en revue différents composés organiques susceptibles d'intervenir au cours du métabolisme cellulaire, nous avons constaté que seule la présence dans le milieu de coenzyme A (tout comme de phosphatase alcaline) permettait quatre repiquages en série de *T. rotatorium*. Nous allons maintenant, en nous appuyant sur les résultats présentés dans le chapitre 5, poursuivre la recherche d'un milieu chimiquement défini permettant la culture des Trypanosomes.

La plupart des glucides utilisés ont été examinés dans le chapitre précédent ; les concentrations molaires des solutions-mères sont :

(*) Docémine Roussel.

(**) Dibenzoan I.S.H.

G-6-P	$3,3 \times 10^{-2}M$
F-6-P	$3,3 \times 10^{-2}M$
ac. 6-P-gluconique	$1,4 \times 10^{-2}M$
ribose-5-P	$2,7 \times 10^{-2}M$
ribulose-diphosphate	$1,7 \times 10^{-2}M$
xylose	$3,0 \times 10^{-2}M$
érythrose	$3,3 \times 10^{-2}M$
sédoheptulose	$3,3 \times 10^{-2}M$
ribulose-5-phosphate	$2,0 \times 10^{-3}M$

leur concentration est à $10^{-4}M$ dans le milieu final. La composition des différents milieux est reportée dans le tableau 21. Les différents inoculums sont ajustés à 200.000 Trypanosomes par millilitre.

1° *Hexoses monophosphates et acide 6-phospho-gluconique.*

Trois milieux sontensemencés : milieu *a*, milieu *b*, et milieu *c*. Chacun contient à la fois du G-6-P et du F-6-P, mais le milieu *b* ne contient pas d'hématine, et le milieu *c* seul, contient de l'acide 6-phospho-gluconique.

Inoculum : *T. gambiense*, *T. therezieni* et *T. rotatorium*.

TABLEAU 21. — Composition des différents milieux chimiquement définis

Milieu	G-6-P	F-6-P	Acide 6-phos. gluc.	Xylose	R-5-P	Ru-diP	Ru-5-P	éry- throse	sédohep- tulose
a	+	+							
b	+	+							
c (*) ..	+	+	+						
d			+						
e			+			+			
f			+	+					
g			+	+		+			
h	+	+							
i	+								
j		+			+		+		
k (*) ..	+	+	+						
l (*) ..		+						+	+
m		+			+		+	+	+

(*) Milieux permettant 4 repiquages au moins de *T. rotatorium*.

Résultats

T. gambiense meurt dès le premier repiquage, et *T. theezieni* au troisième repiquage, dans le milieu *c*, le plus favorable.

La culture de *T. rotatorium* est positive ($\pm$) jusqu'au 23^e jour après l'ensemencement (5 repiquages) dans le milieu *c*.

2° Acide 6-phospho-gluconique, xylose et ribulose-diphosphate.

L'intervention positive de l'acide 6-phospho-gluconique étant une nouvelle fois mise en évidence, nous nous efforçons de préciser le rôle possible d'autres dérivés glucidiques.

Chacun des quatre milieux *d*, *e*, *f* et *g* sont additionnés d'acide 6-phosphogluconique ; de plus, on ajoute :

dans le milieu *e* : ribulose-diphosphate ;

dans le milieu *f* : xylose ;

dans le milieu *g* : ribulose-diphosphate + xylose ;

Chaque milieu est divisé en deux parties : l'une séjourne 24 h à 35°C, l'autre est conservée à + 4°C pendant le même temps. Cette température de 35°C peut accélérer les réactions éventuelles pouvant intervenir dans le milieu en modifiant sa composition.

Résultats

- Milieux préparés à + 4°C : les cultures sont négatives dès le deuxième repiquage ;
- Milieux préparés à 35°C : la culture de *T. rotatorium* est faiblement positive ($\pm$) au troisième repiquage et négative au quatrième.

T. gambiense, *T. theileri* et *T. theezieni* ne survivent pas dans ces milieux.

Deux faits sont ainsi mis en évidence :

- a) influence de la température à laquelle le milieu 199 est préparé : le séjour à 35°C avant l'ensemencement permet un meilleur développement du Flagellé ;
- b) supériorité de *T. rotatorium* sur les autres espèces pour les recherches en milieu synthétique. Il sera seul semencé par la suite.

3° Association de « donneur » et d'« accepteur » de glycolaldéhyde active.

L'hypothèse de B. Horecker et coll. (1953), et de W. Pigman (1957) concernant la formation d'une « glycolaldéhyde active » est prise en considération. Ces auteurs envisagent la possibilité de l'existence de « donneurs » et d'« accepteurs » de « glycolaldéhyde active ». Parmi les composés donneurs, ils citent le ribulose-5-phosphate, le sédoheptulose-phosphate, et le fructose-6-phosphate. Parmi les composés « accepteurs », le D-érythrose-4-phosphate, et le ribose-5-phosphate. Ces glucides sont groupés de façon

à mettre en solution dans le milieu 199 à la fois « donneur » et « accepteur » ; le ribulose-5-phosphate est associé au ribose-5-phosphate, et l'érythrose au sédoheptulose en présence de F-6-P.

milieu *j* : ribulose-5-P + ribose-5-P + F-6-P ;

milieu *k* : G-6-P + F-6-P + ac. 6-P-gluconique (*id.* milieu *c*) ;

milieu *l* : F-6-P + érythrose + sédoheptulose aux concentrations indiquées p. 419 ;

milieu *m* : F-6-P + Ru-5-P + R-5-P + érythrose + sédoheptulose, concentrations au 1/2.

Résultats

a) Comme précédemment, les milieux conservés à + 4°C fournissent des cultures moins abondantes que les milieux conservés à 35°C ; nous n'envisagerons que les résultats fournis par ceux-ci.

b) Les résultats sont encore positifs (+) dans le milieu *j*, et dans le milieu *k*, après le cinquième repiquage pratiqué à J20 ; les Flagellés disparaissent au cours de ce cinquième repiquage.

L'addition au milieu de glycérol ou de subtosan à 10 p. 100 qui augmentent la pression osmotique du milieu et, de ce fait, protègent la membrane, ou encore de NAD et de NADP aux concentrations indiquées précédemment, en présence ou non de bleu de méthylène (cf. chapitre 5), n'améliore pas les possibilités de culture.

c) Les cultures sont négatives après le quatrième repiquage dans les milieux *l* et *m*.

III. — FORMULATION D'UN MILIEU SYNTHÉTIQUE LIQUIDE POUR LA CULTURE DE *Trypanosoma rotatorium*.

Plusieurs essais de culture de Trypanosomes dans le milieu « 199 hématine » additionné de divers glucides ont été couronnés de succès. On obtient des cultures positives de *T. rotatorium* après cinq repiquages pendant plus de 20 jours.

Nous formulons ainsi le milieu synthétique, but de nos recherches, qui permet au moins cinq repiquages consécutifs de *T. rotatorium* pendant une durée de 25 jours :

hématine	1	mg	%
Ru-5-P	10	mg	%
R-5-P	10	mg	%
NADP	3	mg	%
ATP	0,1	mg	%
ADP	0,1	mg	%

Cinq esters phosphorés du glucose interviennent activement, mais pas isolément dans ces milieux synthétiques, ce sont : le glucose-6-phosphate, le fructose-6-phosphate, l'acide 6-phosphogluconique, le ribose-5-phosphate et le ribulose-5-phosphate, ils doivent être associés entre eux de façon convenable pour agir sur la culture des Trypanosomes.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE VI

Des repiquages consécutifs de *T. rotatorium* sont obtenus dans le milieu 199 additionné d'hématine en l'absence de tout apport extrait des hématies ou d'autres cellules susceptibles de fournir le facteur de croissance indispensable ; il suffit d'ajouter au milieu :

- 1° la coenzyme A en présence de G-6-P ;
- 2° certains esters phosphorylés du glucose en l'absence d'enzyme ;

La formulation d'un milieu synthétique, but de ce travail devient possible ; une formule est proposée. Nous démontrons ainsi que le facteur de croissance indispensable est situé dans la première partie du cycle de la glycolyse.

**

Discussion générale

Arrivés au terme de cette étude expérimentale, examinons les résultats obtenus à la lumière des faits déjà connus, afin de discuter de leur signification et de leur portée.

Trois points seront successivement envisagés :

- A. — Le matériel d'étude ;
- B. — Le milieu « 199 enrichi » et les différentes modifications introduites dans sa composition ;
- C. — Le supplément organique d'origine sanguine.

A. — Le matériel d'étude

a) Notre choix s'est porté sur *T. gambiense* pour son importance en épidémiologie humaine africaine. Du fait de l'extrême fragilité de ce Trypanosome, les expérimentations ont toujours été effectuées en présence d'extrait de sang. Nous avons ainsi obtenu les très importants résultats rappelés plus bas concernant la qualité du sang entrant dans la composition des milieux de culture.

En utilisant *T. rotatorium* dont les besoins nutritifs sont aisément satisfaits, nous avons pu mener à bien nos recherches sur le milieu liquide totalement synthétique ; en effet, *T. rotatorium*, et lui seul, peut se multiplier dans un tel milieu.

L'étude parallèle de *T. gambiense* et de *T. rotatorium* est donc parfaitement justifiée puisqu'elle nous a permis d'obtenir des résultats complémentaires.

Quant aux deux autres espèces, elles furent choisies, l'une (*T. theezieni*) parce qu'elle fut découverte et décrite pour la première fois (E. R. Brygoo, 1963) au début de nos travaux ; elle provient, tout comme *T. rotatorium*, d'un Vertébré à température variable, et c'est nous-mêmes qui l'avons obtenue pour la première fois en culture (H. Fromentin, 1963 et 1967 a).

L'autre, *T. theileri*, fut choisie sur les indications du Professeur Grassé, du fait de sa fréquence en zone tropicale africaine, tout comme *T. gambiense*, quoiqu'appartenant, de par son cycle de développement, à une section différente (C. A. Hoare, 1966).

Nous avons pu situer leurs besoins nutritifs par rapport à ceux des deux souches principales, tout en contrôlant les données obtenues avec celles-ci.

b) En ce qui concerne le *liquide nutritif*, notre choix s'est tout naturellement porté sur le milieu de Parker, un des principaux milieux nutritifs synthétiques utilisés pour les cultures cellulaires à l'époque où nous avons commencé ces travaux (janvier 1961). Le milieu de Eagle, de composition voisine, mais de formule plus simple, a été, à son tour, utilisé avec succès par nous-mêmes, quelques années plus tard. C'est en combinant les avantages de ces deux milieux que nous avons pu mettre au point le milieu désigné par « 2° milieu simplifié » (fin de la 2° partie).

c) La *solution saline*, base des milieux liquides, est la solution de Hanks ; celle de Earle de formule voisine, donne des résultats comparables.

Au cours de nos recherches personnelles, nous avons eu l'opportunité de remplacer la solution de Hanks par un liquide physiologique de composition originale, appelé « solution P. 5 » (H. Fromentin, 1969 a). Les courbes de croissance de *T. gambiense* dans un milieu diphasique, dont la phase liquide était constituée, soit par la « solution P. 5 », soit par le Hanks, sont tout à fait comparables. L'ion sodium peut donc être fourni indifféremment par le NaCl, ou par le glycérphosphate de Na. Ce dernier produit présente un avantage : c'est qu'il permet d'amener automatiquement le pH de la solution à 7,3.

d) Le milieu gélosé, diphasique dit de Tobie, au sang humain, joue un rôle essentiel dans notre recherche, puisqu'il est à la base de la troisième partie de ce travail, concernant l'extrait de sang indispensable aux Trypanosomes. La formule utilisée depuis près de vingt ans, par nos prédécesseurs, puis par nous-mêmes, au laboratoire, a été mise au point par M. Vaucel (non publiée, mais diffusée dans son enseignement au Grand Cours Pasteur, elle mériterait de porter son nom).

Le milieu de Nöller au sang de Lapin a été utilisé dans les mêmes conditions que celui de Tobie. Nous avons vu que, selon les espèces de Trypanosomes, la phase liquide de l'un convient mieux que celle de l'autre pour l'enrichissement du milieu de Parker. *T. gambiense* ne se cultive qu'en présence d'extrait de sang humain, *T. theileri* en présence d'extrait de sang de Lapin. *T. rotatorium* et *T. thezieni* s'accroissent indifféremment de l'un ou de l'autre. Ceci est un point à retenir : les Trypanosomes provenant de Vertébrés à température variable ont une plasticité plus grande que ceux provenant de Vertébrés supérieurs.

B. — Le milieu « 199 enrichi », et les différentes modifications introduites dans sa composition

a) Nous avons simplifié le milieu de Parker (199) de formule complexe. Une première formule est présentée en tête de la deuxième partie de notre travail, puis une deuxième formule, tenant compte des résultats que nous avons obtenus, est proposée en conclusion de cette deuxième partie.

Le « 199 simplifié enrichi » comprend, dissous dans la solution saline glucosée : des acides aminés, des lipides, une base purique, des vitamines, quelques oligo-éléments, et l'indispensable extrait de milieu au sang. Ces différents composants ont été répartis en groupes, et ces groupes ajoutés successivement ou simultanément à la solution de Hanks. Les différents milieux obtenus ont permis la culture des quatre espèces de Trypanosomes, leur croissance a été traduite en graphiques. Les combinaisons de groupes auraient pu être plus nombreuses, ou agencées différemment. Nous en avons choisies huit qui sont susceptibles d'apporter les réponses demandées : besoins en vitamines, ou en oligo-éléments, ou en acides aminés. De fait, l'examen de ces graphiques nous a fourni des renseignements importants ; chaque groupe joue son rôle, et ne peut être supprimé sans qu'il s'ensuive une chute du développement de la culture.

Les dix acides aminés dits « indispensables aux Vertébrés » sont également indispensables aux Trypanosomes conservés *in vitro*. Parmi les neuf autres acides aminés entrant dans la composition du 199 un, au moins, est indispensable aux Trypanosomes.

Les résultats fournis par *T. rotatorium* sont nets ; ils sont confirmés par *T. thezieni* et par *T. theileri*. Quant à *T. gambiense*, il se développe mal dans ces milieux incomplets et, de ce fait, se montre un instrument de choix pour l'approfondissement de nos recherches concernant les composants indispensables à la culture.

b) C'est ainsi que nous avons pu montrer que 14 acides aminés sont nécessaires et suffisants à la culture de *T. gambiense*. Outre les 10 acides aminés « indispensables » (arginine, histidine, lysine, tryptophane, phénylalanine, méthionine, thréonine, leucine, isoleucine, et valine), on doit lui fournir : tyrosine, cystine, et surtout glutamine et proline.

S. H. Hutner et coll. (1968) rappellent que la proline est présente à une forte concentration dans l'hémolymph de *Rhodnius* (W. Ormerod, 1967), et dans les muscles de la plupart des Insectes (B. Sacktor et coll., 1967). On peut donc interpréter le besoin en proline comme étant le « souvenir » de l'environnement primitif si nous retenons l'hypothèse selon laquelle l'ancêtre commun des *Trypanosomidae* pourrait être un *Leptomonas* d'Insecte.

Des travaux récents ont montré, en outre, que *Leishmania tarentolae*, cultivée en milieu chimiquement défini, n'avait pas besoin de glucose, quand on lui fournissait de la proline (S. Krassner, 1965, 1967 et 1969).

c) On sait, depuis les recherches des premiers Protistologues, que les besoins en glucides des Protozoaires sont parfaitement couverts *in vitro* par le glucose (G. Biot et coll., 1911) (L. Reiner et coll., 1934). Certaines espèces de Trypanosomes peuvent utiliser le galactose (R. Hall, 1965), ce qui n'est pas le cas des Trypanosomes polymorphes comme l'a montré T. von Brand et coll., 1955 ; nous l'avons nous-mêmes vérifié pour *T. gambiense*. Ce dernier auteur a réussi à cultiver *T. gambiense* et *T. rhodesiense* dans le milieu de Tobie, en remplaçant le glucose contenu dans le liquide de Locke par de la glycérine ; nous n'avons pu confirmer ce résultat.

Quand le glucose est supprimé lors de la composition du « 199 simplifié », *T. gambiense* meurt dès le premier repiquage, les trois autres espèces de Trypanosomes

continuent à se multiplier pendant au moins trois repiquages. Des glucides de remplacement peuvent être utilisés : tous les dérivés phosphorylés (hexoses et pentoses) que nous avons essayés permettent une culture abondante de *T. gambiense* dans le milieu « 199 simplifié enrichi », en l'absence de glucose. Notons ceci : *T. rotatorium*, *T. thezeleri* et *T. theileri* peuvent être cultivés dans le milieu « 199 enrichi » quand le glucose a été supprimé, tandis que *T. gambiense* meurt dans les mêmes conditions. H. Danforth (1967) distingue les sources de carbone des sources d'énergie en s'appuyant sur le fait que l'assimilation de carbone provenant des glucides est faible chez les *Trypanosomidae*. Ceci peut expliquer la possibilité, signalée ci-dessus, de remplacer le glucose par la proline si *L. tarentolae* recherche dans le glucose une source de carbone, et non une source d'énergie. Il peut en être de même pour trois de nos souches dont les besoins en carbone seraient couverts, en l'absence de glucose, par d'autres composants. Par contre, si *T. gambiense* fait exception, c'est que ses besoins énergétiques sont tels qu'ils ne sauraient être couverts que par le glucose, ou par un dérivé glucidique. Nous y reviendrons.

d) Le milieu 199 contient des *lipides* essentiels au métabolisme cellulaire : ce sont l'ergostérol, le calciférol et le Tween 80 (acide oléique). Nous n'y avons pas apporté de modification.

Les besoins des Protistes en stérols ont été étudiés, en particulier par R. Cailleau (1937), pour les *Trichomonas*, et par S. H. Hutner et coll. (1962) pour *Tetrahymena*. Le cholestérol est nécessaire à *Peranema* (J. Allen et coll., 1966) et *T. cruzi* utilise l'acide oléique (N. Citri et coll., 1955). Nous-mêmes avons montré (H. Fromentin, 1970) que la culture de *T. rotatorium* était améliorée en milieu semi-synthétique par la lécithine d'œuf, mais ce phospholipide ne favorise pas la culture en milieu chimiquement défini.

Il n'est pas exclu que le sang utilisé pour l'enrichissement des milieux n'apporte un facteur lipidique qui serait passé jusqu'à présent inaperçu ; récemment, en effet, D. Mawdsley et coll. (1967) ont mis en évidence dans la membrane des globules rouges un complexe glucose-fraction lipidique dû à la solubilisation du glucose par les lipides des globules rouges.

e) Les besoins en *bases puriques et pyrimidiques* entrant dans la composition des acides nucléiques sont impératifs. H. Guttman (1963) montre que les *Trypanosomidae* inférieurs peuvent aisément convertir les purines en leurs dérivés en partant de n'importe laquelle des bases puriques. Rappelons, après S. H. Hutner et coll. (1955, 1959) que l'un des rôles de l'acide folique (ptéridine conjuguée) est la synthèse des composés dans lesquels un simple atome de carbone doit être inséré ou, au contraire, retiré ; à ce titre, il intervient au cours de certaines phases de la synthèse des purines. Facteur de croissance indispensable, il figure dans la formule de la plupart des milieux définis, et en particulier, dans celle du 199.

Le milieu de Parker original contient, en outre, adénine, guanine, xanthine, hypoxanthine, thymine et uracil. Dans notre « 199 simplifié » nous ajoutons seulement l'hypoxanthine, suivant en cela H. Eagle (1955). L'adénosine et la guanine sont d'ailleurs tout aussi favorables.

f) Nous examinerons successivement les vitamines entrant ou non dans la composition du milieu de Parker :

1° Les vitamines A, E, et K figurent dans la formule du « 199 simplifié ». Le milieu de Eagle ne les contient pas, et nous les avons supprimées sans inconvénient de notre « 2° milieu 199 simplifié ». Cependant, pour les recherches en milieu totalement synthétique, nous sommes toujours revenus à la première formule de « 199 simplifié » qui est plus complète.

2° Le complexe des vitamines B. Notre complexe liquide de vitamines B est voisin de celui de Parker et de Eagle, nous n'avons pas cherché à le modifier.

3° L'acide ascorbique est un facteur de croissance identifié par A. et M. Lwoff, 1938. Il agirait, d'après l'interprétation de S. H. Hutner, comme un oxydo-réducteur.

4° La vitamine B 12 n'apparaît pas dans les formules des milieux de Parker et de Eagle. Elle est indispensable pour la culture du genre *Ochromonas malhamensis*, et de beaucoup d'autres Flagellés (L. Provasoli et coll., 1953) (H. Hutner et coll., 1956). Lors de nos essais, nous n'avons pas obtenu d'amélioration des cultures en les additionnant de vitamine B 12, que ce soit en milieu semi-synthétique, ou en milieu chimiquement défini.

g) Au cours de nos expérimentations sur la suppression d'un sel lors de la composition du « 199 simplifié enrichi », nous avons constaté que l'absence de CaCl_2 ou des phosphates entraînait la mort de *T. gambiense*. Les trois autres souches survivent pendant au moins trois repiquages. Quand les quantités de phosphates sont diminuées de moitié seulement, les cultures sont encore très abondantes. Ces faits peuvent être liés à l'équilibre glucose-phosphate dont le rôle primordial est mis en évidence dans la troisième partie de notre travail : les esters phosphorés du glucose, liés au métabolisme des hématies, intervenant également sur le métabolisme du Trypanosome.

Divers auteurs se sont intéressés aux questions de tolérance et de besoin en sels : qu'il nous suffise de rappeler les travaux de A. Ponselle (1924) qui faisait varier le taux de NaCl selon l'espèce de Trypanosome cultivée (0,3 p. 100 pour *T. brucei*, et 0,8 p. 100 pour *T. rhodesiense*), et ceux de L. Sardou et coll. (1963 a et b ; 1964) qui ont déterminé les seuils de toxicité du Na et du K pour notre propre souche *T. gambiense* « Eliane », ainsi que ceux de D. L. Lehman (1961, 1962, 1963). G. Boné (communication personnelle) a vu que, si le chlorure de potassium était remplacé par une solution de phosphates à 13 p. 100, *Trypanosoma mega* se cultivait aisément. De même, T. von Brand et coll. (1967) ont remplacé le NaCl par le KCl. Nous-mêmes avons montré (1969), comme nous le rappelons plus haut, que le NaCl pouvait être remplacé avantagusement par le glycérophosphate de Na.

Il est évident que la portée de ces résultats est limitée du fait de l'introduction dans nos milieux d'une quantité, si minime soit elle, de supplément organique. Quoi qu'il en soit, le milieu chimiquement défini convenant à la culture des Trypanosomes doit posséder certaines qualités précisées par P. R. White (1946) :

— être ioniquement équilibré ;

- contenir des substances nutritives et énergétiques : acides aminés, glucose, bases puriques ;
- contenir oligo-éléments et vitamines.

En fait, l'élaboration d'un tel milieu reste d'une grande difficulté, car la connaissance des besoins des Protistes en éléments inorganiques est capitale. Or, beaucoup de sels du commerce ne sont pas purs. C'est ainsi que les sels de fer sont préparés à partir de dépôts d'hématite, tandis que les sels de calcium et de magnésium proviennent de carrières ou de dépôts salins qui peuvent être riches en squelettes d'animaux marins (S. H. Hutner et coll., 1968).

Il a été démontré que la culture de *Tetrahymena* en milieu acide (pH 4,0) nécessite un mélange de sels d'aluminium, de nickel, plomb et brome (S. H. Hutner et coll., 1965) ; celle d'*Euglena gracilis* réclame du fer, manganèse, molybdène, cuivre, vanadium et bore (S. H. Hutner et coll., 1966). Enfin, H. Iwasaki (1967) a montré les besoins de *Porphyra tenera*, stade libre d'une algue rouge, en brome, strontium, lithium et rubidium. Précisons que l'addition à nos milieux de certains groupes de ces éléments n'ont pas amélioré la culture de *T. rotatorium* et de *T. conorhini* (non publié).

L'état actuel de nos connaissances peut amener le chercheur à identifier un facteur organique dont le seul rôle est d'apporter un élément à l'état de traces, mais à une concentration particulièrement favorable.

h) Nous avons rapporté, dans le cours de notre travail, une remarque de P. R. White (1954) : aucun milieu synthétique ne permet la culture cellulaire s'il ne reçoit un supplément organique. Cette constatation reste actuellement vraie pour la majeure partie des organismes malgré quelques résultats partiels : la survie de certains *Trypanosomidae* peut être obtenue, pendant une durée limitée, en milieu totalement synthétique, c'est le cas de *L. tarentolae* (W. Trager, 1957), *T. mega* (G. Boné et coll., 1964) et *T. ranarum* (H. Guttman, 1966).

Pour obtenir la culture des Trypanosomes dans le « 199 simplifié », un apport d'extrait de sang est indispensable. Il est apporté, soit par un faible volume (5 à 10 p. 100) de la phase liquide d'un milieu diphasique au sang, soit par le séjour temporaire d'hématies lavées.

C. — Le supplément d'origine sanguine

Nous avons rappelé, dans la première partie de ce travail, par quel cheminement est passée l'histoire de la culture des Trypanosomes *in vitro*. Nous avons vu, en particulier, que près d'un demi-siècle s'était écoulé entre les premières cultures de *T. lewisi* réussies par F. Novy et W. MacNeal (1903) sur sang gélosé, et la formulation du milieu diphasique de E. Tobie et coll. (1950), adapté à la conservation des Trypanosomes polymorphes.

L'un des problèmes qui se posait à nous lorsque nous avons abordé cette étude, consistait à trouver comment préparer de façon standard un milieu liquide permettant la multiplication de diverses espèces de Trypanosomes. La difficulté soulevée par l'enrichissement du milieu avec un extrait de sang n'était pas la moindre. C'est ainsi

que nous avons été amenés à remplacer, dans le milieu de Tobie, la solution de Locke, constituant la phase liquide, par du 199, puis à utiliser le 199 simplement enrichi par 5 p. 100 de phase liquide du milieu de Tobie (A. Dodin et H. Fromentin, 1962).

De simplification en simplification, nous avons prouvé que seules les *hématies entières* étaient indispensables à l'enrichissement du liquide en facteur de croissance non déterminé. Celui-ci n'est contenu qu'en faible quantité dans le plasma et n'est pas apporté par les stromas lavés. Il est détruit à 100°C. Les facteurs température et temps de contact interviennent : les globules rouges lavés doivent séjourner une nuit au moins à 35°C dans le milieu liquide pour lui transmettre ses nouvelles propriétés. Ces faits sont à rapprocher des constatations des premiers chercheurs qui plaçaient leurs milieux de culture au sang pendant plusieurs heures à l'étuve avant de les ensemençer.

Ceci n'était pas une simple mesure de précaution pour contrôler la stérilité, mais un moyen de renforcer les qualités nutritives des milieux (Ch. Nicolle, 1908).

En arrivant à ce stade de nos recherches, nous avons émis l'hypothèse de l'intervention enzymatique des *hématies* (H. Fromentin et A. Dodin, 1964).

Nous savons que tous les sangs humains ne conviennent pas à la confection du milieu de Tobie (M. Lwoff et coll., 1939). De même, selon l'espèce du Trypanosome à cultiver, certaines *hématies* sont utilisables, et d'autres non. C'est ainsi que les *hématies* nucléées de Grenouille et de Poulet permettent des repiquages en série de *T. rotatorium* et de *T. theezieni*, mais seul, *T. rotatorium* peut se multiplier indéfiniment dans un milieu enrichi par le séjour temporaire des noyaux d'érythrocytes. Les acides nucléiques extraits, soit des érythrocytes totaux, soit des noyaux, et utilisés pour enrichir le milieu (en présence d'hématine), ne permettent pas la survie des Trypanosomes. Ces résultats s'expliquent ainsi : si le facteur de croissance non déterminé, apporté par les *hématies*, est bien sous la dépendance d'une enzyme globulaire, les acides désoxyribonucléique réplicateur et ribonucléique messager, isolés du noyau, n'ont pas provoqué la synthèse de l'enzyme *in situ*, celle-ci est donc absente et, si le noyau lui-même, séjournant temporairement dans le milieu, est suffisant pour provoquer encore la multiplication de *T. rotatorium*, on peut supposer que c'est parce qu'il contient un précurseur de l'enzyme, suffisant pour subvenir aux besoins nutritifs très restreints de *T. rotatorium*. *T. theezieni* ne peut s'en contenter, le facteur de croissance doit lui être fourni par la cellule rouge totale.

Parmi les *hématies* anucléées que nous avons essayées, celles de Rat, de Lapin et d'Homme permettent la culture indéfinie de *T. rotatorium*, de *T. theezieni*, et de *T. gambiense*. Par contre, *T. theileri* ne peut se multiplier que dans le 199 enrichi par des globules rouges de Lapin.

Nous notons que l'activité des globules rouges responsables de l'enrichissement du milieu 199 persiste après un séjour de 7 jours à + 4°C, et après immersion dans des bains successifs de Hanks à 35°C. Le blocage de l'oxydation du glucose par la chlorpromazine, ou des enzymes du sang par le fluorure de sodium, sont des facteurs empêchants pour la culture de *T. gambiense*.

Ces faits confirment notre hypothèse de l'intervention des enzymes du sang dont le rôle est essentiel pour les phosphorylations et la glycolyse.

Mais la démonstration devait en être apportée par une expérimentation faisant intervenir des quantités mesurables. Pour cela, nous avons comparé la richesse en Flagellés des cultures obtenues dans le 199 enrichi par des hématies normales, et par des hématies déficientes en enzymes, plus particulièrement en glucose-6-phosphate-déshydrogénase. Des mesures ont été effectuées tant pour connaître l'activité de l'enzyme (en lumière ultra-violette, à 341 nm), que le taux d'hémoglobine contenu dans le milieu (à 541 nm) : les Trypanosomes ont été dénombrés dans les milieux correspondants.

Notre hypothèse s'est trouvée confirmée ; on constate que le développement de la culture, *in vitro*, n'est pas proportionnel à la quantité d'hémoglobine présente dans le milieu.

Des expériences semblables ont précédemment été effectuées par M. Lwoff (1940) qui conclut à l'inefficacité de l'hémoglobine (la culture de *T. cruzi* est négative, souvent dès le premier repiquage, en eau peptonée additionnée d'hématies hémolysées de Cheval). Nous-mêmes, avec A. Dodin (1962) avons noté l'incapacité de l'hémoglobine humaine ou murine à permettre les repiquages en série de *T. gambiense*. Le rôle actif du pigment seul est donc ainsi éliminé ; le facteur de croissance apporté par l'hématie entière n'est pas contenu dans la solution d'hémoglobine, ce qui n'infirme pas le besoin vital en hématine (M. Lwoff, 1940).

Le nombre des Trypanosomes trouvés à un jour donné dans les milieux liquides acellulaires, est fonction de l'activité de la G-6-P-D des hématies ayant servi à enrichir les milieux : *plus l'enzyme est active, plus les Flagellés sont abondants*. Les hématies totalement déficientes ne permettent pas l'enrichissement du milieu.

On sait que le rôle de la G-6-P-D n'est pas tellement d'obtenir l'oxydation du glucose en soi, que sa conversion en précurseurs pour les biosynthèses : *en pentose* intervenant dans la synthèse des dérivés ribo et désoxyribonucléiques, et dans celle de coenzymes, de polysaccharides et de polynucléotides : *en nicotinamide-adénine-dinucléotide réduite* (NADPH), source du pouvoir réducteur pour toutes les biosynthèses (acides gras, stéroïdes).

Or, malgré le rôle primordial joué par la G-6-P-D, nous avons, d'une part, constaté l'inefficacité de la G-6-P-D extraite de Levure, ajoutée au milieu chimiquement défini en l'absence d'extrait de sang, et d'autre part, remarqué que *T. theileri* se développe dans un milieu enrichi par le contact temporaire d'hématies de Lapin et non de Rat. J. Sumner et G. Somers (1953), nous aident à expliquer ces faits : « Since each species possesses its own specific enzymes, it can be seen that an indefinite number of pepsine, amylases, catalases, etc., exist. » (p. 60).

Autrement dit, selon son origine, une enzyme peut convenir à certains Trypanosomes, et une autre non, alors que les propriétés de ces diastases nous apparaissent identiques (P. A. Marks et coll., 1960). Nous trouvons là l'explication à la spécificité d'espèce *in vivo*, un Trypanosome pouvant effectuer la synthèse de ses protéines au contact du sang de certains hôtes à l'exclusion des autres.

Dans le même ordre d'idées, nous avons remarqué qu'à quantité égale de globules rouges, ceux de Rat montrent, en général, une activité plus grande que ceux

d'Homme. Ceci s'explique par le fait que les Mûridés utilisés sont des individus jeunes, âgés de moins de trois mois, tandis que les donneurs de sang volontaires sont des adultes. Or, d'après P. A. Marks (1958), la quantité de G-6-P-D du sang diminue avec l'âge de l'individu.

Il nous reste à envisager l'influence du sang humain déficient en G-6-P-D sur la parasitémie dans la nature : le pourcentage de déficience atteindrait 16 p. 100 parmi les Africains (H. Knight et coll., 1961). Il devrait être intéressant de rechercher comparativement le pourcentage de déficience en G-6-P-D chez les malades trypanosomés, et chez les individus sains.

Cette recherche n'a pas été effectuée systématiquement, cependant, il nous a été rapporté que, sur 60 malades trypanosomés examinés en Ouganda, aucun n'était porteur de la déficience (J. Harley, communication personnelle). Par contre, cette question a été largement discutée au sujet des individus impaludés : le parasite se développerait moins dans les érythrocytes de sujets atteints de la déficience enzymatique, que dans les globules normaux (A. Allison, 1960 ; H. Gilles et coll., 1961).

Les hématies d'animaux infectés expérimentalement présenteraient une activité accrue de la G-6-P-D, ce qui renforce l'intégrité du globule rouge (K. Fletcher et coll., 1962) ; (I. Sherman, 1965).

Les *Plasmodium* bénéficieraient du NADPH formé sous l'action de la G-6-P-D, indispensable à la réduction du glutathion oxydé.

Ces faits sont confirmés par l'expérience de K. Devakul et coll. (1966) qui expliquent la protection des sujets déficients en G-6-P-D par le fait que les érythrocytes sont rendus incapables de soutenir l'invasion parasitaire assez longtemps pour que le *Plasmodium* se multiplie.

Plusieurs auteurs critiquent cette hypothèse (C. Kidson et coll., 1962 ; R. Lisker et coll., 1965) : en effet ces auteurs ont dépisté une proportion non négligeable de malades impaludés parmi les déficients en G-6-P-D sans toutefois préciser la densité parasitaire dont la faiblesse pourrait faciliter la résistance à la maladie.

Quoique les Trypanosomes choisis pour notre étude ne passent pas par un stade cellulaire, le raisonnement exposé ci-dessus peut s'appliquer également à leur métabolisme, tant chez l'hôte Vertébré qu'*in vitro*. Les hématies atteintes de la déficience enzymatique ne sont plus capables de métaboliser le glucose, et ne fournissent plus au Trypanosome les substances nécessaires à la survie. J. Paul (1967), se référant aux travaux d'A. Lwoff (1944), rappelle que si la plupart des animaux et des plantes synthétisent l'acide nucléique à partir du glucose, de l'acide aspartique et de la glycérine, les virus ne le peuvent pas. L'auteur ajoute qu'il est donc possible que les parasites sanguicoles aient également perdu les enzymes nécessaires à cette synthèse ou à d'autres, tandis que ces fonctions sont parfaitement remplies par l'hôte sain.

D'où, on peut conclure que, lorsque l'hôte est atteint d'une déficience de son système enzymatique sanguin, le sang perd son privilège de favoriser la croissance des Trypanosomes *in vitro*.

Or, nous avons précisément montré que *Trypanosoma gambiense* de culture ne montre aucune activité de la G-6-P-D (J. Richaud et coll., 1966 ; H. Fromentin et coll., 1968).

Pour renforcer notre démonstration, il nous restait à montrer que le substrat de la G-6-P-D, à savoir le glucose-6-phosphate, en activant l'enzyme, améliorait le rendement de la culture de *T. gambiense*. Il en est bien ainsi, la quantité relative moyenne des Flagellés dénombrés le cinquième jour de l'expérience, quand les hématies ont séjourné dans le milieu en présence de G-6-P, augmente du tiers, passant de 100 à 150.

Nous avons démontré, de surcroît, que d'autres dérivés phosphorylés du glucose, à savoir le fructose-6-phosphate, l'acide-6-phosphogluconique et le ribulose-5-phosphate, exercent la même action, faisant évidemment appel à d'autres enzymes appartenant aussi au cycle du glucose.

C'est pourquoi nous avons procédé au « shunt » des pentoses en faisant intervenir le bleu de méthylène, soit lors de l'enrichissement du 199 par le contact des hématies à 35 °C, soit directement sur la culture. Le pouvoir réducteur du bleu de méthylène s'exerce dans un sens favorable à *T. gambiense*, quand la culture est âgée ; le milieu nutritif est alors appauvri en substances nutritives, et chargé de déchets. Le bénéfice de l'opération peut être imputé, soit à la stimulation de la production de pentoses, soit à une détoxification du milieu par transport d'électrons, oxydant des substances réduites, telles que la coenzyme II. Les deux phénomènes sont d'ailleurs liés, et peuvent être tous deux nécessaires au métabolisme du Trypanosome.

Nous appuyant sur nos résultats expérimentaux, rappelés, ci-dessus, nous avons cherché à obtenir la multiplication des Trypanosomes dans un milieu totalement synthétique. La souche de choix pour ce travail délicat est évidemment *T. rotatorium*.

En l'absence d'extrait de sang, le milieu 199 est toujours additionné d'hématine, facteur de croissance indispensable aux *Trypanosomidae* (M. Lwoff, 1940). On y ajoute des esters phosphorylés du glucose, en tenant compte de la théorie (non confirmée) de B. Horecker (1953) reprise par W. Pigman en 1957, concernant la formation, au cours de la glycolyse de « glycolaldéhyde active », en présence de « donneur » et d'« accepteur ».

Deux combinaisons différentes de glucides nous ont permis d'obtenir quatre repiquages consécutifs de *T. rotatorium*, la souche s'éteint lors du cinquième repiquage, vers le 21^e jour de la culture. Dans les formules de milieu chimiquement défini que nous présentons, le « donneur » est le F-6-P ou le Ru-5-P, tandis que l'« accepteur » est le G-6-P ou le R-5-P.

Ainsi, à l'issue de ce travail expérimental, le but que nous poursuivions est atteint : nous obtenons la multiplication *in vitro* d'une des souches étudiées, au moins pendant un temps limité, en milieu totalement synthétique. Nous pouvons affirmer l'intervention des enzymes glycolytiques du sang sur la composition du milieu, en tout premier lieu celle de la G-6-P-D.

La phosphorylation et la glycolyse sont donc intimement liées à la multiplication des Trypanosomes, dont le métabolisme doit s'intégrer au cycle du glucose, au niveau où intervient la G-6-P-D ; la déficience de celle-ci rompt à la fois le déroulement du cycle du glucose et le développement de la culture.

Nous nous garderons cependant, d'affirmer que tel ou tel pentose est facteur de croissance pour les Trypanosomes.

Nous pensons que la réaction indispensable est sous le contrôle des *enzymes cellulaires* : on ne peut perdre de vue que, dans certaines conditions, les érythrocytes peuvent être remplacés par une Levure (H. Fromentin, 1969 *a* et *b*) ou par un explant de cœur (H. Fromentin, 1970). Le rôle des enzymes ne serait pas forcément de fournir un produit défini (glucide), mais plus probablement, de *l'énergie*, libérée par les réactions réversibles :

$$\text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{NADH} \quad \text{et} \quad \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{NADPH}$$
ou encore, de fournir les coenzymes elles-mêmes (K. Vickerman, 1966 ; F. Jacob, 1970).

L'addition de certains hexoses ou pentoses au milieu 199 améliorerait les conditions de développement de la culture en provoquant une augmentation quantitative de ces réactions vitales.

Cependant, nous avons constaté que l'addition des coenzymes I et II, directement dans le milieu, ne l'améliore pas : c'est que les coenzymes du commerce ne sont pas « natives ». Il manque encore au milieu toute la série des enzymes permettant le déroulement normal des réactions énergétiques. Malgré les succès certains que nous avons obtenus en ajoutant au milieu chimiquement défini de la phosphatase et de la coenzyme A, force est de reconnaître que dans l'état actuel de la science, les enzymes nécessaires ne peuvent être apportées que par des cellules vivantes : explant, micro-organisme ou érythrocyte.

Conclusion générale

Nous nous sommes proposés, dans ce travail :

- de préciser quels sont les facteurs de croissance apportés par le sang aux Trypanosomes de culture ;
- d'obtenir un milieu chimiquement défini permettant la multiplication de ces Flagellés.

Pour atteindre ce double but, nous avons examiné, d'une part le développement de quatre espèces de Trypanosomes dans des milieux semi-synthétiques liquides de composition variable, et, d'autre part, observé le mode d'action du facteur de croissance non déterminé, apporté par le sang.

Dans la première partie, l'historique de la mise en culture des Trypanosomes a été rappelé, et les principaux milieux nutritifs ayant fait progresser les recherches ont été mentionnés, ce qui nous a permis de situer notre étude par rapport au travail accompli par nos devanciers, et face aux problèmes non encore résolus posés par la multiplication du parasite *in vitro*.

Le matériel d'étude est présenté, il s'agit de quatre espèces de Trypanosomes : deux sont isolées du sang de Vertébrés à température variable, *T. rotatorium* et *T. thezieni*, et deux de Vertébrés homéothermes : *T. theileri* et *T. gambiense*.

Le milieu nutritif, base de nos recherches, est la solution synthétique de Parker ou 199, enrichie par un extrait de gélose au sang (milieu de Tobie ou de Nöller), ou par le contact temporaire à 35°C d'hématies lavées d'origine essentiellement humaine ou murine.

Les principales méthodes d'étude sont indiquées :

- technique de préparation et d'enrichissement des milieux liquides ;
- modalité de repiquage ;
- comptage des Flagellés par une méthode originale de numération appliquée aux suspensions formolées ;
- mesures photométriques de l'activité enzymatique des hématies et de la concentration en hémoglobine.

De ce travail expérimental personnel, nous retenons les principaux faits suivants :

1° Un milieu semi-synthétique de formule simplifiée contenant seulement 14 acides aminés au lieu de 21 permet la culture de *T. gambiense* ; il s'agit de : arginine, histidine, lysine, tryptophane, phénylalanine, méthionine, thréonine, leucine, isoleucine, valine, cystine, tyrosine, *glutamine*, *proline*.

2° Chacun des sels entrant dans la composition de la solution saline, glucosée de base (liquide de Hanks), peuvent être supprimés individuellement à l'exception du chlorure de sodium et du chlorure de calcium dont l'absence ne convient pas à *T. gambiense*.

3° Si le glucose est supprimé lors de la préparation du milieu « 199 enrichi », *T. gambiense* et lui seul, cesse de se multiplier et meurt. Cependant, le glucose peut être remplacé par l'un de ses dérivés phosphorylés.

4° L'intervention du sang total est inutile et nous supprimons le sérum sans inconvénient pour les cultures. On obtient un milieu nutritif liquide acellulaire dont le seul composant non défini est apporté par des hématies entières de Vertébrés : Grenouille, Poulet, Rat, Lapin, Homme, séjournant temporairement dans la solution physiologique à 35° C.

5° Le contact du fluorure de sodium et de la chlorpromazine prive les hématies de leur pouvoir enrichissant.

Il apparaît ainsi que le facteur de croissance apporté par les globules rouges est étroitement lié à l'activité des enzymes globulaires intervenant au cours du métabolisme glucidique.

6° Les hématies humaines déficientes en glucose-6-phosphate-déshydrogénase ne permettent pas la multiplication des *Trypanosomes* ; celle-ci est proportionnelle à l'activité (mesurée à 341 nm) de l'enzyme ayant diffusé dans le milieu et n'est pas influencée par la concentration en hémoglobine.

7° L'addition de glucose-6-phosphate au liquide physiologique dans lequel séjournent temporairement les hématies normales avant reconstitution du 199, augmente le rendement des cultures de *T. gambiense* et de *T. theileri*.

8° Il en est de même lorsque les hématies ont été en contact à 35° C avec le fructose-6-phosphate, le fructose-1,6-diphosphate, l'acide 6-phospho-gluconique ou le ribulose-5-phosphate aux concentrations convenables.

9° A la lumière de ces faits, il nous est possible de conclure que le facteur glucidique actif apparaît au niveau de la G-6-P-D ; nous modifions en conséquences la composition du milieu synthétique et obtenons plusieurs repiquages consécutifs de *T. rotatorium* pendant une durée de 21 jours dans un milieu totalement défini. Le 199 est additionné d'hématine à laquelle on adjoint soit G-6-P et F-6-P, soit R-5-P et Ru-5-P. Il est ainsi démontré que les réactions métaboliques indispensables au *Trypanosome* sont situées dans la première partie du cycle glucidique ; il s'agit probablement de réactions énergétiques faisant intervenir les coenzymes NAD et NADP plutôt que de l'apparition d'un glucide fini.

Il ressort de ce travail expérimental que les quatre espèces de *Trypanosomes* étudiées ne montrent pas les mêmes exigences nutritionnelles.

10° Seul, *T. rotatorium* se multiplie dans des milieux très pauvres, telle la solution de Hanks, complétée par le séjour temporaire des hématies ou dans le milieu de Parker enrichi par le dialysat d'une suspension de globules rouges ; seul, il peut vivre plus de trois semaines dans un milieu liquide totalement défini. L'addition de dérivés glucidiques au milieu 199 enrichi par des globules rouges, ne modifie pas sa croissance.

11° Les possibilités de culture de *T. theileri* sont moins larges ; il se développe, comme peut le faire *T. rotatorium*, quand le 199 enrichi par le séjour temporaire des hématies, est dilué de moitié, ce dont *T. theileri* et *T. gambiense* ne sont pas capables. Il se multiplie plus abondamment quand le milieu a été préparé en présence d'esters phosphorylés du glucose.

12° La particularité de *T. theileri* est de se multiplier de préférence dans le 199 enrichi par le séjour temporaire d'érythrocytes de Lapin ; les hématies de Rat ne conviennent que lorsqu'elles ont « mûri » dans le milieu en présence de G-6-P.

13° *T. gambiense* est le seul, sur les quatre espèces étudiées ici, qui ne puisse survivre dans le « 199 enrichi » privé de glucose. En outre, il est très sensible à la présence, dans le milieu, de dérivés glucidiques pendant la maturation du milieu à 35° C. Les nouvelles qualités ainsi acquises par le milieu, favorisent sa multiplication.

14° En conclusion, ces quatre espèces de Trypanosomes sont toutes tributaires, mais à des taux variables, de la substance — ou de l'énergie — liée à l'activité glycolytique des hématies, les parasites d'animaux à sang froid étant les moins exigeants. Ces besoins nutritifs différents peuvent être en relation avec la place occupée par l'hôte naturel dans la classification des Vertébrés.

P.-P. Grassé (1952), envisageant l'origine des Trypanosomes parasites des Vertébrés, a émis l'hypothèse d'un parasitisme primitif des Poissons, puis des Batraciens et Reptiles aquatiques suivi de celui des Batraciens et Reptiles terrestres et enfin, des Oiseaux et des Mammifères. Cette hypothèse a été reprise par J. Baker (1965) : cet auteur suppose que les Trypanosomes ont tous dérivé des *Leptomonas* de l'intestin des Invertébrés, au temps où Annélides et Arthropodes ont divergé d'un ancêtre commun.

Ainsi, l'ordre de précision croissante en besoins nutritionnels des quatre espèces étudiées *in vitro* — *T. rotatorium*, *T. theileri*, *T. theileri* et *T. gambiense* — correspond-il à la fois à l'ordre supposé d'adaptation du parasite aux Vertébrés et à celui de la classification de différenciation de l'hôte naturel dans le règne animal : Batraciens, Reptiles, Mammifères (Bovidés et Primates).

Bibliographie

- ALLEN (J. R.), LEE (J. J.), HUTNER (S. H.) and STORM (J.), 1966. — Prolonged culture of the voracious flagellate *Peranema* in antioxidant containing media. *J. Protozool.*, 13, 103-108.
- ALLISON (A. C.), 1960. — Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in red blood cells of East african. *Nature*, 186, (n° 4724), 531-532.
- AMREIN (Y. U.), GEIGY (R.) and KAUFMANN (M.), 1965. — On the reacquisition of virulence in Trypanosomes of the brucei group. *Acta tropica* (Bâle), 22, 193-203.
- and HANNEMAN (R. B.), 1969. — Suitable blood sources permitting reacquisition of infectivity by culture form. *Acta tropica* (Bâle), 26, 70-75.
- BALIS (J.), 1964. — Utilisation des glucides et de leurs produits de métabolisme par *T. evansi* et *T. brucei*. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 17, 361-368.
- BAKER (J. R.). — *Evolution of Parasites*, 1965, ch. I. — The Evolution of parasitic protozoa. 1-27, 3rd Symposium of the British Soc. for Parasitol., 133 p. Blackwell Scientific Publ. (Oxford).
- BEHRENS (C. A.), 1914. — An attenuated culture of *Trypanosoma brucei*. *J. infect. Dis.* (Chicago), 15, 24-62.
- BEUTLER (E.), 1959. — The hemolytic effect of Primaquine and related compounds: a review. *Blood*, 14, 103-139.
- BIOT (C.), BIOT (R.) et RICHARD (G.), 1911. — Influence du glucose sur la vitalité du *Trypanosoma lewisi* in vitro. *C.R. Soc. Biol.* (Paris), 71, 368-369.
- BONÉ (G.) and PARENT (G.), 1963. — Stearic acid, an essential growth factor for *T. cruzi*. *J. of Gen. Microbiol.*, 31, 261-266.
- et STEINERT (M.), 1964. — La culture de Trypanosomes en milieu défini, 1^{er} Cong. Intern. Parasit., (Rome).
- BOUET (G.), 1906. — Culture du Trypanosome de la Grenouille (*Trypanosoma rotatoriorum*). *Ann. Inst. Pasteur*, 20, 564-577.
- BRAND (T. von) and AGOSIN (M.), 1955. — The utilisation of Krebs cycle intermediates by the culture forms of *T. cruzi* and *L. tropica*. *J. infect. Dis.*, 97, 274-279.
- , TOBIE (E. J.) and HIGGINS (H.), 1967. — Hexose and glycerol absorption by some *Trypanosomatidae*. *J. Protozool.*, 14, 8-14.
- BRIN (M.) and YONEMOTO (R. H.), 1958. — Stimulation of the glucose oxydative pathway in human erythrocytes by methylen blue. *J. Biol. Chem.* 230, 307-317.
- BRYGOO (E. R.), 1963 a. — Hématozoaires de Reptiles malgaches. I. — *Trypanosoma thezeleri* n. sp. parasite des Caméléons de Madagascar. Infestation naturelle et expérimentale. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 31, 133-141.
- , 1963 b. — Contribution à la connaissance de la parasitologie des Caméléons malgaches. Masson édit., (Paris), 399 p.
- CAILLEAU (R.), 1937. — La nutrition des flagellés tétramitidés ; les stérols, facteurs de croissance pour les Trichomonades, *Ann. Inst. Pasteur*, 59, seconde partie, 293-330.
- CHABAUD (A.), 1939. — Infection de l'embryon de poule par quelques trypanosomes pathogènes. *Bull. Soc. Path. exot.*, 32, 489-492.
- CHARMOT (G.), DODIN (A.), AUGER (G.), CONSTANT (B.) et VOELCKEL (J.), 1965. — Fièvre typhoïde hémoglobinurique et déficit en G-6-P-D (2 observations). *Soc. Méd. des hôpitaux de Marseille*.

- CITRI (N.) and GROSSOWICZ (N.), 1955. — Growth Requirements of *Leishmania tropica* and other *Leishmanias*. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 49, 603-604.
- COLAS-BELCOUR (J.) et VERVERT (G.), 1953. — Les caractères de la culture en voile de *Leishmania tropica* WRIGHT, 1903, sur milieu liquide n'ont pas une valeur spécifique mais varient selon les souches. *Arch. Inst. Pasteur Maroc*, 4, 389-404.
- CUNNINGHAM (M. P.), LUMSDEN (W. H.) and WEBBER (W. A.), 1963. — Preservation of viable Trypanosomes in lymph Tubes at low Temperature. *Exper. Parasit.*, 14, 280-284.
- DANFORTH (W.), 1967. — Respiratory metabolism. 202-306 in TZE-TUAN-CHEN. *Research in Protozoology*, Pergamon Press, 428 p.
- DEMARCHI (J.) et NICOLI (J.), 1960. — La multiplication des agents des trypanosomiasés humaines africaines en culture de tissus. *Ann. Inst. Pasteur*, 99, 120-130.
- DEVAKUL (K.), GARBY (L.) et HARINASUTA (T.), 1966. — Erythrocyte destruction in *Plasmodium falciparum* malaria: effects of Erythrocyte glucose-6-phosphate-dehydrogenase Deficiency. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 60, 432-438.
- DODIN (A.), 1970. — Les déficiences enzymatiques érythrocytaires. Conférence Fac. Méd., (Lyon).
- et FROMENTIN (H.), 1962. — Premier essai de culture de trypanosomes en milieu synthétique. *Bull. Soc. Path. exot.*, 55, 797-804.
- DUCAS (G.), 1961. — Contribution à l'étude d'une erreur congénitale du métabolisme: le déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase. Thèse de Doctorat en Médecine, (Nancy), 163 p.
- DUTTON (J. E.), 1903. — Preliminary note upon a Trypanosome occurring in the blood of Man. *Liverpool School trop. Med.* (from the Thomson Yates Laboratories reports 18/5/1902), 455-467.
- EAGLE (H.), 1955 a. — The specific amino-acid requirements of a human carcinoma cell (Strain Hela) in tissue culture *J. exper. Med.*, 102, 37-48.
- , 1955 b. — Nutrition Needs of Mammalian cells in tissue cultures. *Science*, 122, n° 3168, 501-504.
- FLETCHER (K. A.), and MAEGRAITH (B. G.), 1962. — G-6-P and 6-P gluconate dehydrogenase activities in erythrocytes of monkeys infected with *Plasmodium knowlesi*. *Nature*, 196, 1316-1318.
- FROMENTIN (H.), 1961. — Entretien de *Trypanosoma gambiense* sur culture de tissu. *Bull. Soc. Path. exot.*, 54, 1046-1053.
- , 1963. — Mise en culture de *Trypanosoma thezieseni* BRYGOO, 1963, *Bull. Soc. Path. exot.*, 57, 219-224.
- , 1967 a. — Mise en culture de *Trypanosoma thezieseni*, BRYGOO, 1963, *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 36, 51-62.
- , 1967 b. — Semi-defined liquid Media for Cultivation of *Trypanosoma rotatorium*. *J. Protozool.*, supplt, 14, 20, abstract, 64.
- , 1969 a. — Culture de *Trypanosoma conorhini* en milieu gélosé. Intérêt et exigences. *Protistologica*, 5, 35-38.
- , 1969 b. — Culture de Trypanosomes dans le milieu de Parker en présence de micro-organismes. *Bull. Soc. Path. exot.*, 62, 1084-1090.
- , 1970. — Possibilité de conservation des cultures de Trypanosomes par congélation ou sur explant de cœur de Souriceau *J. Protozool.*, 17, 34, supplt, abstract, 127.

- FROMENTIN (H.) et DODIN (A.), 1964. — Culture de *Trypanosoma gambiense* en milieu semi-synthétique. Rôle de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 259, 1599-1601.
- , et —, 1964. — Culture de *Trypanosoma gambiense*. Acquisitions nouvelles, *Cong. Parasit. (Rome)*.
- , RICHAUD (J.) et DODIN (A.), 1968. — Dosages enzymatiques effectués sur différentes souches de *Trypanosoma gambiense*, DUTTON, 1902. *Acta. tropica* (Bâle), 25, 29-38.
- FULTON (J.-D.), 1958. — *Trop. Dis. Bull.*, 55, 377-378 (abstracts).
- GAJDOS (A.) et GAJDOS-TOROK (M.), 1962. — Etude *in vitro* de la cinétique des différentes étapes de la synthèse de l'hème par les globules rouges au cours des anémies et des polyglobulies. *Nouvelle Rev. frse d'Hématologie*, 2, fasc. 4, 563-576.
- GEIGY (R.) et KAUFFMANN (M.), 1964. — On the effect of substances found in glossina tissue on culture Trypanosomes of the Brucei sub-group. *Acta Tropica*. (Bâle), 21, 169-173.
- GILLES (H. M.) and TAYLOR (B. G.), 1961. — The existence of the glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency trait in Nigeria and its clinical implications. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 55, 64-69.
- GLUGE (G.), 1842. — Über ein eigenthümliches Entozoon in Blutes des Frosches. *Arch. f. Anat. Phys. und Wissens. Med.*, p. 148 (Müllers, Berne).
- GRAINGE (E. B.), 1960. — Infectivity of a *T. rhodesiense* culture to mice. *E.A.T.R.O. Report*, 14.
- GRASSÉ (P.-P.), 1952. — *Traité de Zoologie*, Ordre des Trypanosomides, I, 602-668. Masson édit., (Paris).
- GRUBY (D.), 1843. — Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaires, *Trypanosoma sanguinis*. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 17, 1134-1136.
- , 1844. — Sur une nouvelle espèce d'Haematozoaire (*Trypanosoma sanguinis*). *Ann. Sci. Nat.*, 3^e série, Zoologie, I, 104-107.
- GUEST (G. M.) and RAPOPORT (S.), 1941. — Organic acid soluble phosphorus compounds of the blood. *Physiol. Reviews*, 21, 410-437.
- GUTTMAN (H. N.), 1963. — Experimental glimps at the lower Trypanosomatidae. *Exper. Parasit.*, 13, 129-142.
- , and WALLACE (F. G.), 1964. — Nutrition and Physiology of the Trypanosomatidae. 459-494 in *Biochem. and Physiol. of Protozoa*, S. H. Hutner ed. Acad. Press (N. Y.), 616 p.
- , 1966 a. — First defined media for *Leptomonas* spp. from insects. *J. Protozool.*, 13, 390-395.
- , 1966 b. — The first defined medium for *Trypanosoma* spp. *J. Protozool.*, 13, 18, suppl. abstract 59.
- HALL (R. P.), 1965. — Protozoan nutrition. *Blaisdell Publ. Comp.* (N. Y.), 90 p.
- HERBERT (I. V.), 1961. — Bovine Trypanosomiasis due to *Trypanosoma theileri* (LAVERAN 1902 and its occurrence in Eire. *Irish vet. J.*, 8 p.
- , 1965. — Some observations on the isolation and *in vitro* culture of two mammalian Trypanosomes: *T. theileri*, LAVERAN, 1902, and *T. melophagium*, FLU, 1908, with special Reference to *T. theileri*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 59, 277-293.
- HOARE (C. A.), 1966. — The classification of mammalian Trypanosomes. *Ergebnisse der Mikrobiologie immunitätsforschung und exper. Therapie, Sond* 39, 43-57.

- HOARE (C. A.) and WALLACE (F. G.), 1966. — Developmental stages of Trypanosomatid Flagellates: a new terminology. *Nature*, 212, (n° 5068), 1385-1386.
- HORECKER (B. L.), SMYRNIOTIS (P. Z.) and KLENOW (H.), 1953. — The formation of sedoheptulose phosphate from pentose phosphate. *J. Biol. Chem.*, 205, 661-682.
- HUTNER (S. H.), BACH (M. K.) and ROSS (G. I.), 1956. — A sugar containing basal medium for vitamin B12 assay with *Euglena*. Application to body fluids. *J. Protozool.*, 3, 101-112.
- , COX (D.) and ZAHALSKY (A. C.), 1965. — Growth of protozoan bacteria in acid media. *Progress in Protozoology*, 100-101. International Congress, series n° 91, Excerpta Medica Foundation, 280 p.
- , FROMENTIN (H.) and O'CONNELL (K. M.), 1968. — Some biological leads to chemotherapy of blood *Protista*, especially *Trypanosomatidae*, ch. 9, 175-216 in *Infectious blood diseases of mammal animals*. I. — *Diseases caused by Protista*. Ed. by D. Weinman and M. Ristic, *Acad. Press.* (N. Y.). 492 p.
- , and HOLZ (G. G.), 1962. — Lipid requirements of microorganisms. *Annual Rev. of Microbiol.*, 16, 189-204.
- and LWOFF (A.), 1955. — *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. II. *Acad. Press.* (N. Y.), 388 p.
- , NATHAN (H. A.) and BAKER (H.), 1959. — Metabolism of folic acid and other Pterin - Pteridine vitamins. 1-50 ch. 17 in *Vitamins and hormones, advances in research and applications*, R. Harris Edit. *Acad. Press.* (N. Y.), 359 p.
- , ZAHALSKY (A. C.), AARONSON (S.), BAKER (H.) and FRANK (O.), 1966. — Culture media for *Euglena gracilis*. ch. 8, 217-228, in *Methods in Cell Physiol.*, 2, Ed. by D. Prescott, *Acad. Press.* (N. Y.).
- IRALU (V.), 1967. — *Trypanosoma cruzi* cultivation in trypticase soy broth with hemin and serum. *J. Parasitol.*, 53, 653-654.
- IWASAKI (H.), 1967. — « Nutritional studies of the edible seaweed *Porphyra tenera*. II. Nutrition of *Conchocelis* ». *J. Phycology*, 3, 30-34.
- JACOB (F.), 1970. — *La logique du vivant*, N.R.F., Gallimard édit., 354 p.
- JADIN (J.) et PIERREUX (G.), 1960. — Un milieu de culture pour trypanosomides. *Ann. Soc. belge Med. trop.*, 40, 901-906.
- et WERY (M.), 1963. — La culture des *Trypanosomidae*. *Ann. Soc. belge Med. trop.*, 43, 83-92.
- et LE RAY (D.), 1969. — Acquisitions récentes dans les techniques de culture des Trypanosomes africains. *Ann. Soc. belge Med. trop.*, 49, 331-340.
- JADIN (J.-M.), 1970. — Thèse de l'Université de Paris, sous presse.
- KAUFMAN (S.), 1967. — Pteridine cofactors. *Ann. Rev. Biochem.*, 36, 171-184.
- KIDSON (C.) and GORMAN (J. G.), 1962. — A challenge to the concept of selection by malaria in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiencies. *Nature*, 196, (8.499), 49-51.
- KIRBY (K. S.), 1956. — A new method for isolation of RNA from mammalian tissues. *Biochem. J.*, 64, 405.
- , 1957. — A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids. Evidence on the nature of bonds between DNA and protein. *Biochem. J.*, 66, 495.
- KNIGHT (R. H.) and ROBERTSON (D. H. H.), 1961. — The prevalence of the erythrocyte glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in male Africans living near Tororo. *E.A.T.R.O. Report*, 26-27.

- KOLOCHINE-ERBERT (B.) et MAILLOUX (M.), 1963. — Quelques différences entre Leptospires pathogènes et Leptospires saprophytes. *Biol. Med.*, 52, 496-504.
- KRASSNER (S. M.), 1965. — Effect of temperature on growth and nutritional requirements of *Leishmania tarentolae* in a defined medium. *J. Protozool.*, 12, 73-78.
- , 1967. — The effect of L. proline on respiration in *Leishmania*. *J. Protozool.*, suppl. 14, 20, abstract, 63.
- , 1969. — Proline metabolism in *Leishmania tarentolae*. *Exper. Parasit.*, 24, 348-363.
- LAMBRECHT (F. L.), 1966. — Notes on the growth curve of *Trypanosoma cruzi*, CHAGAS 1909, as determined by optical density. *Rev. Inst. Med. Trop. (Sao Paulo)*, 8, 249-254.
- LAMY (L.) et (H.), 1970. — Transformation intracellulaire des formes amastigotes de *T. cruzi* et de *Leishmania* en formes mastigotes. Groupement des Protistologues de langue française. 9^e réunion annuelle, (Aussois).
- LANGERON (M.), 1949. — *Précis de Microscopie*, Masson édit., (Paris), 1430 p.
- LAUNOY (L.), 1950. — Métabolisme des glucides dans les trypanosomes. *Actualités pharmacologiques*, 2^e partie, 179-204.
- LAVERAN (A.), 1902. — Sur un nouveau Trypanosome des Bovidés. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 134, 512-514.
- , 1902. — Au sujet de deux Trypanosomes des Bovidés du Transvaal. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 135, 717-721.
- et MESNIL (F.), 1912. — *Trypanosomes et trypanosomiasés*, Masson édit., (Paris), 1.000 p.
- LEHMANN (D. L.), 1961. — Attempts at the selective cultivation of *T. rhodesiense*, *T. brucei* and *T. congolense*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 55, 440-446.
- , 1962. — Differential effects of osmotic pressure and of Suramine upon cultures of *T. congolense* and *T. rhodesiense*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 56, 1-3.
- , 1964. — An autoclaved medium for the growth and possible differentiation of african trypanosomes. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 58, 6-8.
- LÉPINE (P.), 1960. — 5^e Cours de Techniques des cultures cellulaires. Inst. Pasteur, (Paris).
- LEWIS (A.), 1964. — Inhibition of sickling by phenothiazines: effect of promazine. *Ghana Med. J.*, 3-8.
- LISKER (R.), LORIA (A.), IBARRA (S.) y SANCHEZ MEDAL (L.), 1965. — Estudio sobre las características genéticas hematológicas en la Costa Chica de Oaxaca y Guerrero. *Salud. Publica (Mexico)*, 7, 45-50.
- LWOFF (A.), 1938. — Les facteurs de croissance pour les micro-organismes. *Ann. Inst. Pasteur*, 61, 580-617.
- , 1944. — *L'évolution physiologique, étude des pertes de fonction chez les micro-organismes*. Hermann édit., (Paris), 308 p.
- , 1951. — *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, vol. I, Acad. Press (N. Y.), 434 p.
- , 1969. — *L'ordre biologique*. Robert Laffont, édit., (Paris), 179 p.
- et LWOFF (M.), 1938. — L'hématine et l'acide ascorbique, facteurs de croissance pour le Flagellé *Schizotrypanum cruzi*. *C.R. Acad. Sci.* (Paris), 206, 540.
- LWOFF (M.), 1929. — Milieu d'isolement et d'entretien pour *Schizotrypanum cruzi* CHAGAS. *Bull. Soc. Path. exot.*, 22, 909-912.
- , 1931. — La nature de la substance du sang indispensable aux Trypanosomides. *C.R. Soc. Biol.* (Paris), 107, 1234-1236.

- LWOFF (M.) et CECCALDI (J.), 1939. — Culture *in vitro* d'une souche de *T. gambiense* d'isolement ancien. *Bull. Soc. Path. exot.*, 32, 721-726.
- et —, 1940. — *Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomides*. Monographies de l'Inst. Pasteur, Masson édit., (Paris), 213 p.
- MAC NEAL (W. J.), 1904. — The life history of *T. lewisi* and *T. brucei*. *J. Infect. Dis.*, 1, 517-543.
- MARKS (P. A.), 1958. — Red cell G-6-P and 6-phosphogluconic dehydrogenase and nucleoside phosphorylase. *Science*, 127, 1338-1339.
- and BANKS (J.), 1960. — Inhibition of Mammalian glucose-6-phosphate dehydrogenase by steroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Washington)*, 46, 447-452.
- , — and SZEINBERG, 1961. — Erythrocytes glucose-6-phosphate-dehydrogenase of normal and mutant human subjects. *J. Biol. Chem.*, 236, 10-17.
- MARQUET (M.), 1964. — *La voie des hexoses monophosphates chez le Bacillus subtilis : isolement et étude de quelques propriétés des glucoses-6-phosphate et 6-phosphogluconate déshydrogénases*. Thèse de Doctorat de 3^e cycle (Paris).
- MATHIS (M.-C.), 1906. — Sur une modification au milieu de Novy-Mac Neal, pour la culture des trypanosomes. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 61, 550-552.
- MAWDSLEY (D. A.) and WIDDAS (W. F.), 1967. — A lipid soluble glucose complex extractable from human erythrocyte ghosts. *J. Physiol.*, 189, 75-76.
- MAYER (A. F. I. Carolus), 1843. — *Specilegium observationum anatomicarum de Organe electrico in Raiis anaelectricis et de Haematozois* (Bonn), 17 p.
- MIYA-JIMA (M.), 1907. — On the cultivation of a bovine *Piroplasma* : a preliminary communication. *Philippine J. Sci.*, 2, B. 83.
- MONOD (J.), 1942. — *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Le phénomène de diauxie*. Hermann, édit. (Paris), 210 p.
- , WYMAN (J.) et CHANGEUX (J.-P.), 1965. — On the nature of allosteric transitions : a plausible model. *J. Mol. Biol.*, 12, 88-118.
- MORACZEWSKI (S. A.) et KELSEY (F. E.), 1948. — Distribution and rate of metabolism of phosphorus compounds in *T. equiperdum*. *J. infect. Dis.*, 82, 45-51.
- MORGAN (J. F.), MORTON (H. J.) and PARKER (R. C.), 1950. — Nutrition of animals cells in tissue culture. I. — Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 73, 1-8.
- MÜHLPFORD (H. von), 1964. — Über den Kinetoplasten des Flagellaten. *Zeits. f. Tropenmed. und Parasits.*, 15, 289-323.
- NAGLE (S. C.), Jr, TRIBBLE (H. R.) Jr, ANDERSON (R. E.) et GARY (N. D.), 1963. — A chemically defined medium for growth of animal cells in suspension. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 112, 340-344.
- NEUJEAN (G.) et EVENS (F.), 1952. — Valeur pratique de l'hémoculture comme moyen de diagnostic dans la trypanosomiase humaine à *T. gambiense*. *Bull. Soc. Path. exot.*, 45, 503-516.
- NICOLI (J.), 1961. — Etude préliminaire sur les conditions de culture de *T. gambiense*. *Bull. Soc. Path. exot.*, 54, 77-83.
- , et VATTIER (G.), 1964. — Culture de *Trypanosoma rhodesiense* sur tissus de pupes de Glossines. *Bull. Soc. Path. exot.*, 57, 213-219.
- NICOLLE (Ch.), 1908. — Recherches sur le Kala-Azar. *Arch. Inst. Pasteur (Tunis)*, 1, 97-99.

- NOLLER (W.), 1917. — Blut und Insektenflagellatenzuchtung auf Platten. *Arch. f. Schiffs, und Trop. Hyg.*, 21, 53-94.
- NOVY (F. G.) and MAC NEAL (W. J.), 1903. — On the cultivation of *Trypanosoma lewisi*. *Am. J. Med. Ass.*, 45,
- et —, 1904. — On the cultivation of *T. brucei*. *J. infect. Dis.*, 1, 1-30.
- ORMEROD (W. E.), 1967. — The effect of *Trypanosoma rangeli* on the concentration of amino acids in the hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *J. Invert. Pathol.*, 9, 247-255.
- PACKCHANIAN (A.), 1958. — The cultivation *in vitro* of *T. brucei*, *T. cruzi*, *T. gambiense* and *T. rhodesiense* and the biologic and diagnostic significance of the cultures, 6th Int. Cong. on trop. Med. and Malaria, (Lisbonne), p. 74.
- , 1958. — On the cultivation of *T. brucei in vitro*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 8, 168-174.
- PAUL (J.), 1967. — General principles of cell nutrition. 71-80 in « Problems of *in vitro* culture ». 5th. Symposium of the British Soc. for Parasit. Blackwell Scientific. publ. (Oxford), ed. by A. E. R. Taylor, 86 p.
- PIGMAN (W.), 1957. — The carbohydrates. *Acad. Press* (N. Y.), 902 p.
- PIPKIN (A. C.), 1960. — Avian Embryos and Tissue culture in the study of Parasitic Protozoa. II. — Protozoa other than *Plasmodium*. *Exper. Parasit.*, 9, 167-203.
- PLOUVIER (S.), 1965. — Courbes d'hémolyse diphasique après incubation de sang humain en présence de fluorure de sodium à 37° C. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 34, 75-85.
- PONSELLE (A.), 1923 — La culture de *T. inopinatum*, trypanosome pathogène de la grenouille. *Ann. Parasit.*, 1, 155-158.
- , 1924. — Culture des Trypanosomes pathogènes. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 178, 1210-1221.
- PRIEUR (P.), 1965. — Caractère adaptatif du cycle des pentoses chez *Acetobacter Xylinum*. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 260, 1298-1301.
- PROVASOLI (L.) and PINTER (I. J.), 1953. — Ecological implications of *in vitro* nutritional requirements of algal flagellates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 56, 839-851.
- RESSELER (R.), LE RAY (D.) et GOEDVRIEND (J.), 1965. — Conservation de protozoaires particulièrement en culture à la température de l'azote liquide. *Ann. Soc. belge. Med. Trop.*, 45, 665-678.
- RICHAUD (J.), FROMENTIN (H.) et DODIN (A.), 1966. — Dosages enzymatiques effectués sur différentes souches de *Trypanosoma gambiense*. *Ann. Parasit. hum. et comp.*, 41, 545-548.
- RISTIC (M.) et TRAGER (W.), 1958. — Cultivation at 37° C of a trypanosome *T. theileri* from cows with depressed milk production. *J. Protozool.*, 5, 146-148.
- SACKTOR (B.) et CHILDRESS (C. C.), 1967. — Metabolism of Proline in insect flight muscle and its significance in stimulating the oxidation of Pyruvate. *Arch. Bioch. Bioph.*, 120, 583-588.
- SARDOU (R.) et RUFFIE (J.), 1963. — Cultures de *Trypanosoma gambiense*. Influence de la teneur du milieu en sodium. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 256, 4533-4535.
- , 1963. — Culture de *T. gambiense*. Rôle du potassium : résistance de la souche à des doses toxiques. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 258, 1322-1323.
- , 1964. — Culture de *T. gambiense*. Rôle du calcium. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 258, 3899-3900.

- SENEKJIE (H. A.), 1943. — Biochemical reactions, cultural characteristics and growth requirements of *Trypanosoma cruzi*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 23, 523-531.
- SHERMAN (I. W.), 1965. — Glucose-6-phosphate-dehydrogenase and reduced glutathione in malaria infected erythrocytes (*Plasmodium lophurae* and *P. berghei*). *J. Protozool.*, 12, 394-396.
- SIMPSON (C. F.) et GREEN (J. H.), 1959. — Cultivation of *Trypanosoma theileri* in liquid medium at 37° C. *Cornell Vet.*, 49, 192-193.
- SOLLOD (A. E.) and SOULSBY (E. J. L.), 1968. — Cultivation of *Trypanosoma theileri* at 37° C in partially defined medium. *J. Protozool.*, 15, 463-466.
- SOLS (A.), 1969. — Phosphofructokinase p. 62 et 63 dans *Carbohydrate metabolism and its disorders* ed. Dickens, Randle, Whelan. *Acad. Press.* (N. Y.).
- SPLITTER (E. J.) and SOULSBY (E. J. L.), 1967. — Isolation and continuous cultivation of *Trypanosoma theileri* in media containing tissue culture fluids. *Exper. Parasit.*, 21, 137-148.
- STEINERT (M.), 1958. — *Action morphogénétique de l'urée sur le trypanosome*. Inst. pour la Rech. Scient. en Afrique Centrale. Centre de Recherche du Katanga-Elisabethville (Congo Belge), 431-433.
- and BONÉ (C. J.), 1956. — Induces change from culture form to blood stream form in *Trypanosoma mega*. *Nature*, 178, 362.
- SUMMER (J. B.) and DOUNCE (A. L.), 1937. — Crystalline catalase. *J. Biol. Chem.*, 21, 417-424.
- and SOMERS (G. F.), 1953. — Chemistry and methods of enzymes (Ch. I, in *General properties of enzymes* 1-67). *Acad. Press.* (N. Y.), 462 p.
- SZEINBERG (A.) and MARKS (P. A.), 1961. — Substances stimulating glucose catabolism by the oxydative reactions of the pentose phosphate pathway in human erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, 40, 914-924.
- THOMSON (J. G.) and SIMTON (J. A.), 1912. — The morphology of *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma rhodesiense* in cultures and a comparison with the developmental forms described in *Glossina palpalis*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 6, 331-356.
- TOBIE (E. J.), 1964. — Cultivation of mammalian Trypanosomes. *J. Protozool.*, 11, 418-423.
- , BRAND (T. VON) and MEHLMAN (B.), 1950. — Cultural and physiological observations on *Trypanosoma rhodesiense* and *Trypanosoma gambiense*. *J. Parasit.*, 36, 48-54.
- and JAMES (H. D. Jr), 1958. — The cultivation of *T. congolense* in vitro. *J. Parasit.*, 44, 241-242.
- and REES (C. W.), 1948. — The cultivation of *Trypanosoma cruzi* in dialysate medium. *J. Parasit.*, 34, 162-163.
- TRAGER (W.), 1957. — Nutrition of a hemoflagellate (*Leishmania tarentolae*) having an interchangeable requirement for choline or pyridoxal. *J. Protozool.*, 4, 269-276.
- , 1959. — Development of *Trypanosoma vivax* to the infective stage in tse-tse fly tissue culture. *Nature*, 184, B. A. 30-31.
- TRUHAUT (R.) et BOHUON (C.), 1963. — Aperçus sur les poisons hémolytiques et leurs mécanismes biochimiques d'action. *Ann. Biol. clin.*, 21, 437-450.
- VALENTIN (G.), 1841. — Über ein Entozoon im Blute von *Salmo fario*. *Arch. f. Anat. Physiol. und Wissens. Med.*, (Müllers, Berne).
- VAUCEL (M.), 1952. — *Médecine tropicale*. Ed. Med. Flammarion (Paris), 1, 955 p.

- VAUCEL (M.), DODIN (A.), et FROMENTIN (H.), 1964. — Concentration des hémoparasites par une méthode non traumatisante. *Ann. Soc. belge, Méd. trop.*, 44, 353-358.
- et FROMENTIN (H.), 1967. — Recherche sur les acides aminés favorables à la culture de *Trypanosoma gambiense* en milieu semi-synthétique liquide. *Acad. Roy. Sci. Outre-Mer*, (Bruxelles), *Bull. des séances*, 2, 279-284.
- VICKERMAN (K.), 1962. — The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *T. brucei* subgroup : an hypothesis based on ultrastructural observation. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 56, 487-495.
- , 1966. — Genetic systems in unicellular animals. *Sci. Prog. Oxf.*, 54, 13-26.
- WALKER (P. J.) and ASHWOOD-SMITH (M. J.), 1961. — Dimethyl sulphoxide, an alternative to glycerol for the low temperature preservation of trypanosomes. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 55, 93-96.
- WEINMAN (D.), 1953. — African sleeping sickness trypanosomes. Cultivation and properties of the culture forms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 56, 995-1003.
- , 1957. — Cultivation of Trypanosomes. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 51, (n° 6), 560-561.
- WENYON (C. M.), 1926. — *Protozoology*, 2 vol. Baillière and Co., édit., (London).
- WHITE (P. R.), 1946. — Cultivation of animal tissues *in vitro* in nutrients of precisely known constitution. *Growth*, 10, 231-289.
- , 1954. — *The cultivation of animal and plant cells*. Roy. Press. Cy., (N. Y.), 239 p.
- ZELEDON (R.), 1959. — Differentiation of *T. rangeli* and *Sch. cruzi* in a liquid medium, with notes on the nutrition of hemoflagellates. (Research note). *J. Parasit.*, 45, 652.
-