

Survie *in vitro* des larves de troisième stade d'*Angiostrongylus cantonensis*.

Etude de l'activité du L. Tetramisole dans le milieu NCTC 109.

par J.-P. MOREAU * et J. LAGRAULET **

(Collaboration technique : E. Fuller)

*Section des Laboratoires de Recherches biologiques
Institut de Recherches médicales « Louis Malardé » (Directeur : D^r J. LAGRAULET)
B.P. 30, Papeete, Tahiti, Polynésie française*

Résumé

La survie des larves de troisième stade d'*Angiostrongylus cantonensis* a été testée *in vitro* dans différents milieux. A 37° C les meilleurs résultats ont été obtenus avec le milieu NCTC 109 additionné de 30 p. cent de sérum humain décomplémenté. L'activité *in vitro* du L. tétramisole sur les larves de troisième stade d'*A. cantonensis* a été testée dans ce milieu. Le produit s'est révélé très actif à des doses très faibles.

Summary

The *in vitro* survival of the third stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis* was tested in several media. At 37° C the best results was obtained with the NCTC 109 plus 30 per cent inactivated human serum. The *in vitro* activity of L. tetramisole on the third stage larvae of *A. cantonensis* was tried in this medium. This product is very active at very low concentrations.

* Médecin de 1^{re} Classe du Service de Santé des Armées. Assistant des Hôpitaux des Armées.

** Docteur en Médecine, Directeur de l'Institut de Recherches Médicales « Louis-Malardé ».

La méningite à éosinophiles à *Angiostrongylus cantonensis*, outre le problème de son diagnostic étiologique, pose le problème de sa thérapeutique. La question de savoir s'il est opportun de traiter la maladie n'a de sens que si l'on dispose d'un antihelminthique efficace contre le parasite.

Le *L. trétramisole* d'apparition récente s'est révélé actif vis-à-vis de la plupart des Nématodes intestinaux et pulmonaires, ainsi que l'on montré les travaux de D. Thienpont et coll. (1-2) et ceux de F. Gatti et coll. (3).

Il paraissait intéressant de tester son activité vis-à-vis des larves de troisième stade d'*A. cantonensis* dont l'engagement abortif chez l'homme est responsable de la méningite à éosinophiles.

I. — Matériels et techniques.

1. — LE RECUEIL DES LARVES.

Les larves de troisième stade ont été récoltées à partir de *Biomphalaria glabrata* infestés 28 jours auparavant par des larves de premier stade. La technique utilisée s'est inspirée de celle de G. Wallace et L. Rosen (4).

A l'extrémité de la tige d'un entonnoir de verre est adapté un tube de plastique fermé par une pince de Mohr. Le canal de la tige est rempli par le milieu de survie. Quatre couches de gaze sont disposées à l'intérieur de l'entonnoir. Les mollusques sont dilacérés dans une solution de pepsine à 5 g pour 100 ml d'HCl N/100. La suspension est versée dans l'entonnoir. Après une heure d'incubation à 37°, les larves, par leurs mouvements actifs, ont gagné l'extrémité inférieure de la tige. Elles peuvent alors être recueillies et transférées dans les milieux de culture à l'aide d'une pipette Pasteur sureffilée à bords rodés.

2. — LES MILIEUX DE SURVIE.

Plusieurs milieux ont été testés :

— Le milieu 199 de Parker en solution de Hanks (M 199) ;

— Le milieu semi-synthétique à l'hydrolysate de caséine en solution de Earle (H.C.) ;

— Le milieu NCTC 109 de Mc Quilkin (5-6).

Ces milieux ont été additionnés de 10 % de sérum de poulain.

Dans une seconde série d'expérience le milieu NCTC 109 a été utilisé en y ajoutant 10 et 30 % de sérum humain décomplémenté (SHdC).

Tous ces milieux ont été additionnés d'antibiotiques aux concentrations suivantes : pénicilline G : 200 UO, colimycine : 100 U, amphotéricine B : 5 microgrammes pour 1 ml.

Les milieux de survie ont été répartis sous le volume de 1 ml dans des tubes en verre Pyrex de 12 × 80 mm fermés par des bouchons en élastomère de silicone. Les larves ont été réparties au nombre de 50 par tube. Chaque milieu a été testé sur 200 larves, soit quatre tubes par milieu dont deux étaient conservés à la température du laboratoire, soit 25 °C ± 2 et deux à l'étuve à 37° C.

Le pourcentage de larve ayant perdu leur mobilité a été établi toutes les six heures par l'examen au microscope inversé au grossissement 25 X.

3. — LES ESSAIS D'ACTIVITÉ DU *L. TÉTRAMISOLE*.

Le *L. tétramisole* sous forme de chlorhydrate nous a été fourni à l'état cristallisé par les laboratoires Spécia (Paris). Le produit a été testé sur 100 larves aux concentrations suivantes : 0,1, 0,5, 1, 5, 10 et 50 microgrammes par ml. L'essai a été effectué à 37 °C. Deux tubes sans *L. tétramisole* ont servi de témoins.

II. — Résultats.

1. — LES MILIEUX DE SURVIE.

Pour chaque tube il a été noté le temps nécessaire pour que 50 % des larves perdent leur mobilité. Ce temps de perte de la mobilité 50 ou TPM 50 a été calculé à l'aide de papier logarithme probit, en portant en abscisses le temps et en ordonnées le pourcentage des larves immobiles.

Au cours des essais avec différents milieux additionnés de 10 % de sérum de poulain, la meilleure survie des larves a été assurée par le NCTC 109. Les TPM 50 ont été respectivement de 64 et 62 heures à 25 et 37 °C. A 25 °C, le M 199 a permis un TPM 50 de 70 h, mais à 37 °C le TPM ne dépassait pas 12 h (tableau I).

Une deuxième série d'essais a été effectuée avec le NCTC 109 additionné de SHdC. A 37 °C, le TPM 50 a été de 71 h avec les milieux additionnés de 30 % de sérum. Il ne dépassait pas 57 h avec 10 % de sérum (tableau II).

2. — LES ESSAIS D'ACTIVITÉ DU *L. TÉTRAMISOLE*.

Pour tester l'activité du *L. tétramisole* les larves ont été incubées à 37° dans le milieu NCTC 109 additionné de 30 % de SHdC. Aux concentrations de 0,1 microgramme par ml le TPM 50 était de 70 h. Il n'était pas significativement différent de celui des tubes témoins qui étaient de 74 h. Par contre, aux concentrations de 0,5 et 1 microgramme, les TPM 50 étaient respectivement de 5 et 4 h. Enfin, avec des concentrations de 5, 10 et 50 microgrammes ils étaient dans les trois cas, voisins de 30 minutes (tableau III).

III. — Commentaires et discussions.

Parmi les milieux testés, le M 199 et le NCTC 109 se sont révélés supérieurs au milieu à l'hydrolysate de caséine. Le SHdC permet une meilleure survie que le sérum de poulain. A 37 °C c'est avec le milieu NCTC 109 additionné de 30 % de SHdC que le TPM 50 a été le plus élevé. C'est pour cette raison que ce milieu a été retenu pour les tests d'activité du *L. tétramisole*. Ces essais en effet ont été effectués à 37 °C pour se rapprocher des conditions physiologiques.

Tableau I

TPM 50 en heures dans les milieux additionnés de 10 p. cent de sérum de poulain

	M 199	HC	NCTC 109
25° C	70	54	64
37° C	12	24	62

Tableau II

TPM 50 en heures dans le milieu NCTC 109 additionné de 10 et 30 p. cent de sérum humain décomplémenté

	S.H. 10 p. cent	S.H. 30 p. cent
25° C	87	74
37° C	57	71

Tableau III

TPM 50 en heures en fonction de la concentration de L. tétramisole en microgrammes par ml

Témoin	0,1	0,5	1	5	10	50
74	70	5	4	1/2	1/2	1/2

L'activité du L. tétramisole s'est révélée très grande sur la mobilité des larves à des concentrations très faibles puisque, avec 0,5 microgramme par ml, le TPM 50 est de 5 h alors qu'il est de 74 h dans les tubes témoins. Par contre, la concentration de 0,1 microgramme par ml est inefficace. A partir de 5 microgrammes, les TPM 50 sont identiques et correspondent vraisemblablement au temps de pénétration du produit au travers de la cuticule.

Notons que chez le chien et le veau, après une prise orale de 10 mg par kg de poids, le taux sanguin atteint 6 microgrammes par ml 1/2 heure plus tard. Il s'abaisse progressivement pour atteindre 0,15 microgramme par ml après 4 h. Après 8 h, le taux est trop faible pour être dosé (7).

Les travaux de H. Van Den Bossche et P.-A.-J. Janssen (8) ont confirmé que le L. tétramisole est un puissant inhibiteur de la succinate déshydrogénase du muscle

d'*Ascaris suum*. On sait que cet enzyme intervient dans la phase initiale d'utilisation des glucides dans la voie de la glycolyse anaérobie d'Embden-Meyerhof. Les travaux de E. Bueding (9) ont montré que cette voie métabolique était, chez les Nématodes, la voie la plus importante pour la synthèse de l'ATP donc pour la fourniture énergétique. Le L. tétramisole en inhibant la synthèse de l'ATP entraîne une perte rapide de l'activité musculaire.

Les résultats obtenus *in vitro* avec *A. cantonensis* sont en faveur de l'existence d'un processus identique.

IV. — Conclusion.

Le L. tétramisole s'est révélé être un antihelminthique très efficace *in vitro* sur les larves infestantes d'*A. cantonensis*. Le mode d'action de cette molécule étant bien connu, il est possible d'extrapoler quant à son efficacité *in vivo*.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Docteur Léon Rosen, Chef de la Pacific Research Section of the National Institutes of Health, Honolulu (Hawaii - U.S.A.) qui nous a procuré la souche d'*Angiostrongylus cantonensis* et la souche de *Biomphalaria glabrata*.

En outre, nos remerciements s'adressent à M. le Professeur G. Charmot, Direction des Recherches Thérapeutiques, SPECIA (Paris) qui nous a fourni le L. tétramisole.

Références

- THIENPONT (D. F. J.) et coll., 1966. — Tetramisole (R 8299) a new potent spectrum anti-helminthic. *Nature*, 209, 1084-1086.
- et coll., 1969. — Evaluation of tetramisole in the treatment of nematode infections in man. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18 (4), 520-525.
- GATTI (F.) et coll., 1969. — Treatment of round worm infection in african children with a single dose of tetramisole (R 8299). *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 49, 51-62.
- WALLACE (G. D.) et ROSEN (L.), 1969. — Techniques for recovering and identifying larvae of *Angiostrongylus cantonensis* from molluscs. *Malacologia*, 7 (2), 427-438.
- QUILKIN Mc (W. T.) et coll., 1957. — The adaptation of additional lines of NCTC clone 929 (strain L.) cells to chemically defined protein free medium NCTC 109. *J. Natl. Canc. Inst.*, 19, 885-907.
- SAWYER (T. K.) et WEINSTEIN (P. P.), 1961. — Survival of *Dirofilaria immitis* in physiological saline solutions. *J. Parasit.*, 47 (4, sec. 2), 24.
- ALLEWIJN (F.) et DEMOEN (P.). — Janssen Pharmaceutica - Beerse, Belgique, communication personnelle.
- VAN DEN BOSSCHE et JANSSEN (P.), 1967. — The biochemical mechanism of action of the antihelminthic drug tetramisole. *Life Sci.*, 6, 1781-1782.
- BUEDING (E.), 1960 *in* Host influence on parasite physiology, ed. by L. A. Stauber, p. 93, Rutgers University Press, New Brunswick, U.S.A.