ESSAI D'ACTIVITE TRYPANOCIDE COMPAREE DES PRINCIPAUX NEO-ARSENOBENZOLS, NOVARSENOBENZOLS D'USAGE COURANT EN BELGIQUE.

PAR

J. RODHAIN et E. HENRY

De très bonne heure, Ehrlich et Bertheim, après avoir réussi la synthèse du Salvarsan puis du Néo-Salvarsan, reconnurent que les produits fabriqués d'après des procédés opératoires absolument identiques présentaient des caractères de toxicité différents, que l'analyse chimique ne permettait pas de soupçonner.

Depuis lors, l'épreuve biologique reste, pour reconnaître le degré de toxicité réel de ces produits, le seul test valable, aucune technique chimique ne peut s'y substituer.

D'un autre côté, ainsi que W. Kolle, dans son mémoire en collaboration avec F. Leupold, le fait ressortir, l'activité thérapeutique d'un dérivé de l'arsénobenzène n'est pas nécessairement en proportion de son degré de toxicité. C'est notamment le cas pour le Néo-Salvarsan. Comme le dit le professeur allemand, au cours d'une expérience portant déjà sur de longues années, il se produit que, parmi des lots de Néo-Salvarsan résultant de procédés de fabrication toujours identiques, il s'en trouve qui montrent une toxicité faible et jouissent pourtant d'une activité thérapeutique bonne, normale.

De ces faits, dûment établis, il résulte que, en dehors de certaines caractéristiques chimiques, les dérivés des arsénobenzènes doivent, au point de vue pharmaceutique, répondre à une toxicité minima et une efficacité thérapeutique maxima, *que, seuls, peuvent établir des essais biologiques.*

La question de la standardisation biologique des arsénobenzènes fut discutée lors de la Conférence internationale convo-

quée par le Comité d'Hygiène de la Société des Nations et tenue du 31 août au 3 septembre 1925 à Genève.

Sa discussion aboutit à une série de résolutions qui établissent, entre autres, les règles à suivre pour la recherche de la toxicité et de l'efficacité thérapeutique. Le produit standard adopté fut, pour le dioxydiaminoarsénobenzène sulfoxylate de Sodium qui nous occupera ici, le Néosalvarsan fabriqué par la firme Meister Lucius, de Hoechst.

Comme complément de ces essais sur animaux, et avant d'autoriser l'emploi thérapeutique d'un lot d'ampoules provenant d'une même fabrication, divers échantillons devraient avoir été utilisés sur une série de malades, sous la surveillance d'un expert qualifié.

Alors que l'épreuve biologique de toxicité a été adoptée par la plupart des pharmacopées des pays d'Europe et d'Amérique, les essais de l'activité thérapeutique sont loin d'être exigés partout. Les raisons en sont sans doute à rechercher, d'une part, dans l'interprétation, disons-le, assez malaisée de la valeur exacte des tests biologiques employés lorsqu'on se sert des trypanosomes, et, d'autre part, la lenteur de la réponse, quand il s'agit d'essais faits sur l'homme.

Il n'est pas dans notre intention de revoir en détail les raisons qui ont amené les expérimentateurs à choisir comme test thérapeutique l'épreuve de la valeur trypanocide. Nous reconnaissons, avec W. Kolle et Voegtlin, les auteurs de la méthode, que, appliquée avec la minutie qu'ils exigent de leurs procédés, les résultats qu'ils obtiennent déterminent la valeur trypanocide et spirillicide des produits qu'ils soumettent à leur test. Remarquons, pourtant, que l'activité trypanocide n'est pas évaluée au point de vue curatif proprement dit; elle est estimée d'après la durée plus ou moins longue de la stérilisation du sang périphérique.

Afin de se mettre à l'abri du trouble qu'apporterait dans l'interprétation des résultats, les variations de virulence et d'arsénico-résistance des trypanosomes, Kolle comme Voegtlin ont choisi des virus « fixes » : le premier, une souche du type Brucei; et le deuxième, une souche de Trypanosoma Equiperdum.

Leurs souches ont une arsénico-résistance qui ne varie plus et un degré de virulence qui paraît constant. Travaillant toujours dans les mêmes conditions, il est certain que leurs résultats ont une valeur suffisamment précise.

On peut penser pourtant que, lorsqu'il s'agit de mettre en évidence des degrés d'activité trypanosomicide d'un ordre de grandeur qu'ils prétendent très petit, il pourrait être intéressant d'opérer avec des souches de trypanosomes qui n'ont pas perdu la sensibilité aux arsénicaux au même degré que celles employées par les auteurs allemands et américains. C'est avec cette idée que nous avons voulu essayer, vis-à-vis de deux souches différentes de virus du type Brucei-Pecaudi, que nous possédons à l'Ecole de Médecine tropicale, l'activité des principaux types de dioxydiaminoarsénobenzène sulfoxylate de sodium qui sont couramment employés en Belgique. Ce sont : le Néosalvarsan, de Meister Lucius de Hoechts, considéré comme standard; l'Arsébényl Meurice, médicament belge; le Rhodarsan et le Novarsenobenzol Billon, produits français.

Nos deux virus, Tumba et Madimba, proviennent du Moyen Congo. Le premier isolé du gros bétail en 1924 et le deuxième des cochons indigènes en 1925.

Les rats blancs inoculés de Tumba meurent en général après six jours; ceux infectés de Madimba succombent en une moyenne de douze à vingt et un jours.

Leur sensibilité vis-à-vis de l'arsénic, au moment de nos essais, résulte du tableau I ci-dessous, dans lequel l'arsenical employé est le Tryponarsyl Meurice, homologue de la Tryparsamide.

TABLEAU I.

Souche Tumba				Souche Madimba II				
Le 3.2.31, quatre rats sont inoculés avec le Virus Tumba. Le 9.2. tous présentent des Trypanosomes 2 à 4 par champ. Ils sont traités au Tryponarsyl et reçoivent :				Le 14.1.31, quatres rats sont inoculés avec le virus Madimba II. Le 21.1 tous présentent des trypanosomes : 3 par champ en moyenne. Il sont traités au Tryponarsyl et reçoivent ;				
Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5
P. 100 g.	110 g.	115 g.	95 g.	126 g.	100 g.	125 g.	125 g.	Témoin
0,05 g.	0,055 g.	0,085 g.	0,095 g.	0,062 g.	0,05 g.	0,09 g.	0,125 g.	
(0,5 °/oo)	(0,5 °/oo)	(0,75 °/oo)	(1 g. °/oo	(0,5 g. °/oo)	(0,5 g. °/oo)	(0,75 g. °/oo)	(1 g. °/oo)	
Sang resté stérile jusqu'au 16.2	Stérilisé jusqu'au 16.2	Stérilisé jusqu'au 21.2	Guéri	Stérilisé jusqu'au 31.7	Stér'lisé jusqu'au 28.1	Stérilisé jusqu'au 9.2	Guéri	✠ le 26-2
✠ Trypanosé le 20-2-31	✠ Trypanosé le 26-2-31	✠ Trypanosé le 2-3		✠ le 9-2	✠ le 15.2	✠ le 23.2		

Cette expérience confirme ce que nous savions par plusieurs essais antérieurs, que pour obtenir la guérison durable des rats infectés de nos souches « Tumba » et « Madimba » au moyen du Tryponarsyl, il faut employer la forte dose de 1 gramme par kilo de poids. Les animaux doivent être traités au premier ou deuxième jour de l'apparition des trypanosomes dans le sang. Si l'on attend plus tard, l'action de la forte dose devient incertaine.

Pour éprouver l'activité des Néo-arsénobenzènes, nous avons opéré pour chaque produit sur 5 rats, administrant des doses de 0.01 gr., 0.025 gr., 0.05 gr. et 0.1 gr. pour mille de poids.

Cette dernière dose est la dose toxique limite pour les animaux infectés de trypanosomes du moins.

I. — *Virus Tumba.*

Le 29 novembre 1930, 22 rats sont inoculés du virus Tumba; ils reçoivent tous 0.2 cc. d'un mélange de sang de rat riche en Trypanosomes et d'eau physiologique, mélange contenant une moyenne de 2 trypanosomes par champ microscopique.

Le 3 décembre, tous les rats inoculés sont infectés et montrent une moyenne de 5 trypanosomes par champ microscopique dans leur sang.

Vingt sont traités par lots de cinq au moyen de différents Neoarsénobenzènes, et 2 gardés comme témoins. Ces derniers succombent à leur infection le 7 décembre et le 8 décembre.

Le sort des animaux traités est résumé dans le tableau ci-dessous:

TABLEAU II.

Rats traités au Néosalvarsan.				Rats traités à l'Arsébényl.			
Nos	Poids	Dose p. m.	Résultat	Nos	Poids	Dose p. m.	Résultat
1	100 g.	0.01	Stérilisé 6 jours	1	105 g.	0,01	Stérilisé 8 jours
2	90 —	0,025	Stérilisé 50 jours	2	105 —	0,025	Stérilisé 16 jou s
3	100 —	0,025	Stérilisé 12 jours	3	100 —	0,025	Guéri
4	115 —	0,05	Guéri	4	100 —	0,05	Guéri
5	90 —	0,1	Mort intoxiqué	5	105 —	0,1	Mort intoxiqué
Rats traités au Rhodarsan.				Rats traités au Novarsenobenzol.			
1	110 g.	0,01	Stérilisé 6 jours	1	100 g.	0,01	Stérilisé 6 jours
2	110 —	0,025	Stérilisé 14 jours	2	100 —	0,025	Stérilisé 19 jours
3	105 —	0,025	Guéri	3	90 —	0,025	Stérilisé 21 jours
4	107 —	0,05	Guéri	4	105 —	0,05	Guéri
5	115 —	0,1	Guéri	5	110 —	0,1	Mortintoxiqué en 24 h.

Il résulte de cet essai, que la dose faible des différents produits, soit 0.001 gr. par kilogramme de poids, a déterminé la disparition des trypanosomes pendant un temps d'une durée sensiblement égale : six à huit jours.

Qu'en ce qui concerne la dose forte, 0,10 gr., un seul animal a survécu, celui qui a reçu le Rhodarsan. Tous les animaux ayant reçu la dose de 0.05 ont survécu et guéri.

Des 10 rats traités qui ont reçu 0.025 gr. p. m., deux sont restés vivre, un de chaque lot traité respectivement par le Rhodarsan et par l'Arsébényl.

Dans cette expérience, comparés au Dioxydiaminoarsénobenzène sulfoxylate de sodium standard : le Néosalvarsan, les trois autres produits ont montré une valeur similaire.

Nous avons voulu nous assurer, dans un deuxième essai, si les résultats obtenus par les doses minima de 0.01 gr. par kilogramme de poids resteraient comparables.

A cet effet, nous avons inoculé: le 8 décembre 1930, un lot de 8 rats avec 0.2 cc. d'eau physiologique mélangée de sang d'un rat infecté du Virus Tumba.

Le liquide infectant montrait par champ microscopique une moyenne de 10 trypanosomes. Le 10 décembre, tous les animaux sont infectés et sont traités d'après le schéma indiqué dans le tableau III.

TABLEAU III.

Rats traités au Neosalvarsan.				Rats traités à l'Arsébényl.			
Nos	Poids	Dose par kil. de poids	Résultat	Nos	Poids	Dose par kil. de poids	Résultat
1	103 g.	0,01 g.	Stérilisé 5 jours	1	104 g.	0,01 g	Stérilisé 7 jours
2	118 —	0,01 —	Pas stérilisé	2	147 —	0,01 —	Stérilisé 5 jours
Rats traités au Rhodarsan.				Rats traités au Novarsenobenzol.			
1	110 g.	0,01 g.	Pas stérilisé	1	95 g.	0,01 g.	Pas stérilisé
2	90 —	0.01 —	Pas stérilisé	2	120 —	0,01 —	Stérilisé 4 jour

Ainsi, dans cet essai aux faibles doses, les produits allemands et belges ont montré une activité plus grande que les deux autres. Pour tous les produits, la durée de stérilisation a été plus courte dans cet essai que dans le premier (dose 0.01 gr. p. m.). Cela dépend probablement de ce que la dose employée pour infecter nos animaux a été nettement plus forte que dans notre première expérience.

II. — *Virus Madimba II.*

Le 29 décembre 1930, 2 rats sont inoculés du Virus Madimba II; ils reçoivent tous 0.2 cc. d'un mélange d'eau physiologique plus sang de rat riche en trypanosomes. Le mélange injecté montre une moyenne de 6 trypanosomes par champ microscopique.

Le 6 janvier 1931, les rats sont tous infectés; 4-5 trypanosomes par champ.

Vingt sont traités par lots de cinq; 1 sert de témoin; il succombe le 8 janvier 1931.

Le résultat des divers traitements appliqués est résumé dans le tableau IV.

TABLEAU IV.

Rats traités au Neosalvarsan				Rats traités à l'Arsebenyl			
Nos	Poids	p. c. o	Résultat	Nos	Poids	Dose p. c. o	Résultat
1	100 g.	0,01 g.	Pas stérilisé	1	100 g.	0 01 g.	Stérilisé 8 jours
2	115 —	0 025 —	Stérilisé 18 jours	2	125 —	0 025 —	Stérilisé 15 jours
3	100 —	0,025 —	Stérilisé 18 jours	3	150 —	0 025 —	Stérilisé 6 jours
4	160 —	0,05 —	Guéri	4	90 —	0,05	Stérilisé 27 jours
5	50 —	0,1 —	»	5	95 —	0,01 —	Guér

Rats traités au Rhodarsam				Rats traités au Novarsenobenzol			
	135 g.	0,01 g	Stérilisé 8 jours	1	125 g.	0,01 g.	Pas stérilisé
2	115 —	0,025 —	Stérilisé 20 jours	2	100 —	0,025 —	» »
3	125 —	0,025 —	Stérilisé 10 jours	3	115 —	0,025 —	Stérilisé 8 jours
4	90	0,05 —	Stérilisé 8 jours	4	115 —	0,05 —	Stérélisé 13 jours
5	125 —	0,1 —	Stérilisé 22 jours	5	125 —	0.1 —	20 jours

Il résulte de cette expérience que l'action du Rhodarsan et du Novarsenobenzol sur le Tr. Madimba est manifestement inférieure à celle du Néosalvarsan et de l'Arsebenyl.

Devant ce résultat, nous avons pratiqué un nouvel essai, avec la dose de 0.025 par kilogramme de poids.

Quatre rats sont inoculés le 14 janvier 1931 du Virus Madimba, ils reçoivent chacun 0.5 cc. d'un mélange d'eau physiologique et de sang de rats Trypanosés. Le mélange renferme 1 trypanosome par champ microscopique.

Les animaux sont tous infectés le 21 janvier montrant dans leur sang une moyenne de 3 trypanosomes par champ.

Ils reçoivent, le même jour, une dose de produit calculée à raison de 0.025 gr. par kilogramme de poids.

Les résultats sont consignés ci-dessous:

Rat 1. 100 gr. Traité à l'Arsébényl. Reste guéri.
Rat 2. 125 gr. Traité au Néosalvarsan. »
Rat 3. 110 gr. Traité au Novarsénobenzol. Stérilisé 13 jours.
Rat 4. 135 gr. Traité au Rhodarsan. » 23 »

Cette expérience confirme la première, montrant la supériorité d'action des composés Néosalvarsan et Arsebenyl.

Ces résultats ne concordent pourtant pas avec ceux renseignés dans le tableau IV, où la dose de 0.025 n'avait guéri définitivement aucun des animaux. Nous ne pouvons expliquer cette discordance que par les doses employées pour l'infection de nos animaux. Dans le premier essai, cette dose fut beaucoup plus

forte que dans le deuxième. Ce sont d'ailleurs des écarts pareils qui ont amené W. Kolle et Voegtlin à établir leur technique minitieuse, où les doses infectantes sont toujours les mêmes et les animaux traités au même degré d'infection. L'arsénico-résistance « fixée » des virus qu'ils emploient diminue au minimum leurs causes d'erreurs.

Quant aux différences d'activité thérapeutique des divers Arsenobenzènes, suivant qu'il s'agit de la souche Tumba ou de la souche Madimba, l'expérience suivante nous démontra combien il aurait été imprudent de conclure d'une manière absolue.

Cette expérience terminant nos essais, était faite surtout pour éprouver la toxicité des produits administrés à la dose de 0.01 gr. par kilogramme de poids chez des animaux trypanosés.

Le 20 avril 1931, dix rats sont inoculés de la souche Madimba II. Tous sont infestés le 27 avril, montrant de *rares* trypanosomes dans leur sang. Un parasite par 3 champs microscopiques.

Le 27 avril, dix rats sont inoculés de la souche Tumba, ils sont infectés le 29 avril montrant dans leur sang 1 trypanosome par champ.

Seize animaux sont traités ce jour (29 avril). Ils reçoivent tous 0.1 gr. par kilogramme de poids des quatre produits en expérience. Les solutions employées sont à 0.5 pour cent et les mêmes solutions servent pour traiter les rats infectés de Virus Tumba et ceux infectés de Virus Madimba.

Quatre animaux servent comme témoins; ils meurent tous le même jour (5 mai) ayant vécu: les rats Madimba 15 jours; les rats Tumba 8 jours.

Quant aux animaux traités, le tableau V renseigne sur leur sort :

TABLEAU V.

Rats traités au Néosalvarsan.			Rats traités à l'Arsébényl.		
Virus Tumba					
Rat 1	110 g.	Guéri.	Rat 1	90 g.	Guéri.
Rat 2	100 g.	Mort après 7 jours, stérilisé intoxiqué.	Rat 2	100 g.	Guéri.

Virus Madimba					
Rat 1	130 g.	Mort stérilisé après 5 jours intoxiqué.	Rat 1	100 g.	Mort stérilisé après 7 jours intoxiqué.
Rat 2	130 g.	Guéri.	Rat 2	130 g.	Mort stérilisé après 11 jours intoxiqué.
Rats traités au Rhodarsan.			Rats traités au Novarsenobenzol.		
Virus Tumba.					
Rat 1	100 g.	Guéri.	Rat 1		Guéri.
Rat 2	100 g.	Guéri.	Rat 2		Mort après 4 jours stérilisé intoxiqué.
Virus Madimba.					
Rat 1	130 g.	Guéri.	Rat 1	125 g.	Mort stérilisé après 6 jours.
Rat 2	150 g.	Mort stérilisé après 7 jours intoxiqué.	Rat 2	110 g.	Mort stérilisé après 6 jours intoxiqué.

Ainsi, pour le Néosalvarsan, nous constatons deux guérisons et deux décès par intoxication; pour l'Arsebenyl, deux guérisons et deux décès par intoxication; pour le Rhodarsan, trois guérisons et un décès par empoisonnement et pour le Novarsenobenzol, une guérison et trois intoxications.

Additionnant ces résultats à ceux obtenus antérieurement (tableaux II et IV), nous obtenons, pour les 6 rats traités aux fortes doses 0.1 p. m. :

I. — *Néosalvarsan:*	3 rats Tumba.	1 guéri.	2 intoxiqués.
	3 rats Madimba.	2 guéris.	1 intoxiqué.
II. — *Arsébényl:*	3 rats Tumba.	2 guéris.	1 intoxiqué.
	3 rats Madimba.	1 guéri.	2 intoxiqués.
III. — *Rhodarsan:*	3 rats Tumba.	3 guéris.	0 intoxiqué.
	3 rats Madimba.	1 non guéri.	2 intoxiqués.

La seule conclusion que nous tirerons de ces essais, est que, aux doses fortes (0.1 p. m.), le Novoarsenobenzol, dans 50 p. c. des cas, s'est montré, au point de vue curatif, inférieur aux trois autres produits.

En ce qui concerne les doses faibles (0.01 p. m.), c'est l'Arsebenyl qui a montré l'action la plus régulière.

En dehors de ces résultats, il ne nous a pas été possible d'établir une différence bien évidente entre l'activité des produits expérimentés suivant qu'ils agissaient sur l'une ou l'autre souche de nos trypanosomes.

Dans l'ensemble, le Virus Tumba s'est montré, au moment de nos essais, plus sensible aux Néoarsenobenzènes que le Virus Madimba.

Nous ajouterons que les discordances dans les résultats de certains de nos essais ont renforcé notre opinion que lorsqu'il s'agit d'un test biologique visant à rechercher le degré d'activité trypanocide des produits de la série des arsénobenzènes, c'est la technique de Kolle ou celle de Voegtlin qu'il faut suivre. Aussi longtemps, du moins, que nous ne disposerons pas d'une souche de trypanosomes dont la sensibilité (non la résistance) aux arsénicaux serait définitivement fixée.

Une souche pareille permettrait d'apprécier, non seulement l'activité minima par la durée de stérilisation plus ou moins longue, mais aussi l'activité maxima par le nombre de guérisons définitives.

Nous croyons que c'est parmi les souches du Trypanosome Gambiense qu'on pourrait rencontrer un pareil virus. Mais ici surgit une autre difficulté, c'est celle d'un animal d'expérience adéquat, le Trypanosome Gambiense étant le plus souvent peu et irrégulièrement virulent pour les rats et les souris.