

A propos du mode d'action de l'arsénobenzène sur les trypanosomes

PAR

A. DUBOIS et I. KOHN

Les médicaments chimiothérapeutiques peuvent agir sur les parasites par trois mécanismes possibles. Le premier est l'action directe, c'est-à-dire l'intoxication du parasite par le produit lui-même ou par un dérivé de celui-ci. Les parasites altérés ou morts sont détruits soit par les processus biologiques de l'hôte soit par autolyse.

Le deuxième est l'action indirecte, c'est-à-dire la stimulation des mécanismes humoraux ou cellulaires de l'hôte aboutissant à la guérison.

Le troisième, enfin, est un mécanisme mixte associant la destruction directe des parasites (ictus chimiothérapeutique de Ehrlich) à la stimulation des réactions de défense par leur antigène (ictus immunisateur de Ehrlich).

Sans vouloir discuter ici cette vaste question nous nous bornerons à quelques observations et réflexions sur le mécanisme d'action de l'arsénobenzène (*) sur les trypanosomes pathogènes (trypanosome Brucei, souche Madimba).

On admet généralement que l'action de l'arsénobenzène en ce cas est directe. L'action *in vitro* est caractéristique et sans parler d'études anciennes les expériences relativement récentes et plus précises de Warrington Yorke et Murgatroyd (1) ont mis ce point en parfaite lumière.

(*) Nous avons utilisé ordinairement l'Arsébényl Meurice.

Ci-après les concentrations léthales in vitro à 37° de divers produits arsénicaux d'après les expériences de ces auteurs.

Produit	Concentration léthale		Remarque
	en 6 heures	en 24 heures	
Tryparsamide... .. ¹	1/200	1/1600	As. pentavalent
Tryparsamide réduite par le thioglycollate	1/51 millions	1/204 millions	As. trivalent
Novarsénobillon (914)	1/12 millions	1/51 millions	As. trivalent
P. aminophénylarsénoxyd ...	1/51 millions	1/102 millions	As. trivalent

Nous avons aussi vérifié l'action directe par une méthode dont la simplicité ne diminue pas la valeur : on traite une souris fortement infectée par une dose forte de 914 intraveineux. On prélève ensuite après un temps variable mais bien avant la stérilisation et alors que les trypanosomes sont encore nombreux et bien mobiles une ou deux gouttelettes de sang à la queue de la souris et on en inocule immédiatement un animal neuf (*). Voici les résultats de ces expériences qui concordent au reste avec les essais d'autres auteurs (Gonder, Castelli, cfr. Findlay (2 P. 215), Simic (3).

TABLEAU I.

Souris	Dose injectée	Mode d'injection	Temps après l'injection	Résultat
1.	4,5 mg.	I. V.	a) 5 minutes	nég.
			b) 15 »	nég.
2.	4,5 mg.	S. C.	a) 5 »	nég.
			b) 15 »	nég.
3.	3 mg.	I. V.	a) 10 »	nég.
			b) 10 »	nég.
			c) 20 »	nég.
4.	3 mg.	I. V.	a) 5 »	nég.
			b) 10 »	nég.
			c) 20 »	nég.

(*) Il est à peine besoin de faire remarquer que avec des trypanosomes non influencés par un agent chimique cette pratique donne régulièrement l'infection.

5.	3 mg.	S. C.	a) 10 »	positif
			b) 20 »	positif
(*) 6.	3 mg.	I. V.	10-15 »	toutes posit.
			à six souris	

(*) Souris très fortement infectée.

Sans doute, les résultats ne sont pas absolument constants, en particulier une fois en cas d'injection S. C. (souris 5) et une autre fois chez une souris qui était lourdement infectée (souris 6) les trypanosomes se sont montrés infectieux. Il est certain que la sensibilité de tous les flagellates d'une souris donnée n'est pas la même.

On remarque après introduction du médicament qu'après une première vague de stérilisation quasi complète il persiste une infection discrète qui disparaîtra à son tour; de même en cas de dose non curative la rechute est créée par les parasites les moins sensibles au médicament. On peut donc admettre que l'irrégularité des résultats peut tenir à ce que de temps en temps on prélève un de ces trypanosomes moins sensibles. Il n'en reste pas moins que dans un bon nombre des cas on constate que les trypanosomes ont fixé dans un délai très court la dose mortelle de produit ou, en tout cas, la dose qui suffit à les rendre non infectieux. La rapidité de ce phénomène exclut la possibilité de faire intervenir les forces de défense de l'organisme et assurément la petite quantité d'arsenic introduite avec le sang est bien en dessous d'une dose protectrice.

L'action extérieure du produit est limitée dans le temps de façon précise: les trypanosomes sont immédiatement mis dans un milieu favorable, malgré cela le phénomène toxique se montre ordinairement irréversible. Cette observation paraît en contradiction avec celle de Hawking (4) qui a constaté après fixation d'arsenic trivalent in vitro que le lavage désintoxiquait les trypanosomes. La contradiction entre ces résultats et les nôtres peut tenir aux différences de produit (tryparsamide réduite — 914) et de dose, peut-être aussi à ce que Hawking se contente de la survivance in vitro.

On pourrait se demander cependant si l'action du liquide de lavage n'est pas différente de celle du sang. On note, en

effet, que Simic (3) en prélevant en masse les trypanosomes de souris traitée au 914 et en les lavant, a souvent des infections (1/2 h. après 1,66 mg. — 1 3/4 h. après 1,66 mg. — 1 h. après 1,25 mg. — 1 h. 3/4 après 1,25 mg. — 3 h. après 1,25 mg. — 5 h. après 1,25 mg.).

A dire vrai, ces doses sont plus faibles que les nôtres, d'autre part, la prise de sang en masse permet sans doute de prélever les rares trypanosomes plus résistants qui à des dosages pareils seront l'origine de la rechute possible.

Dans le but de vérifier l'action du lavage à l'eau physiologique nous avons prélevé le sang de la souris 6 après 30 minutes, l'avons lavé deux fois à l'eau physiologique et injecté à 4 souris 0,5 cc. du culot montrant des trypanosomes mobiles. Les 4 souris se sont infectées.

Il est difficile de tirer une conclusion de cette expérience puisque l'autre technique a aussi abouti à des infections (tableau I).

Une autre expérience (souris 7) non citée au tableau I, a été faite de façon suivante : 3 mg. 914 s. c. souris + + + +. Sang pris à la queue après 10 minutes : infection.

Sang pris à la queue après 25 minutes : pas d'infection (2 souris).

Sang total lavé 2 fois après 30-35' : pas d'infection (2 souris).

Nous avons noté que le nombre des trypanosomes injecté dans les 2 cas était approximativement le même (50.000 trypanosomes).

Une expérience toute semblable (souris 8) faite après 30-35 minutes donne le résultat suivant :

Prise du sang à la queue 1 souris +, 1 souris —

Inoculation après lavage 2 souris —

Nos essais ne font donc pas apparaître une réversibilité de l'intoxication par le lavage à l'eau physiologique. Ils sont en contradiction avec ceux de Hawking (11) qui résume son expérience dans la phrase suivante :

« When trypanosomes are exposed in vitro to reduced tryparsamide or Halarsol, until all but a very few organisms are

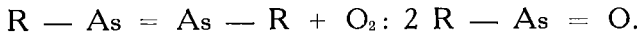
killed, and then washed and inoculated into mice, infection nearly always results ».

On peut facilement imaginer que les phénomènes physiques soient différents en milieu aqueux et milieu sanguin et Jancso a montré la différence d'absorption des cellules de Kupfer selon que le foie est irrigué avec l'un ou l'autre liquide transportant les granules phagocytibles. Néanmoins nous n'avons pas pu noter cette différence en ce cas, le contact toxique ayant lieu in vivo.

Dans les expériences 1 à 4 du tableau I on peut dire que les trypanosomes altérés sont détruits par les forces du nouvel hôte (souris neuve) avant d'être désintoxiqués. C'est assurément possible mais il n'en est pas moins que l'expérience montre la fixation du produit sur les parasites et que de ce fait la majorité de ceux-ci ne sont plus infectieux.

*
**

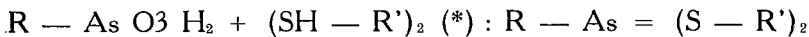
Cependant les arsénobenzènes sont fort altérables en solution et on peut se demander s'ils agissent comme tels ou après transformation chimique. Ehrlich, Voegtlin et collaborateurs admettaient leur oxydation jusqu'au stade arsénoxyde :



Inversement, les produits pentavalents du type Atoxyl-Tryparsamide (voir plus haut leur faible activité in vitro) seraient réduits selon les formules hypothétiques suivantes :



ou



(Voir l'action de ces produits de réduction au tableau.)

Ici les observations in vitro ne peuvent pas nous renseigner.

Laissée à l'air à 37° pendant des heures une solution étendue de 914 (comme les concentrations étudiées par W. Yorke et

(*) De tels composés existent dans l'organisme (cystéine, glutathion).

Murgatroyd) s'altère profondément avec production entre autres d'arsénoxyde et il n'est pas possible de dire si la destruction des trypanosomes observée *in vitro* est due au produit primitif ou à la fraction transformée. Strangeways (5) a constaté que le 914 conservé 6 heures en solution n'était pas plus trypanocide *in vitro* que la solution fraîche.

Cependant nos expériences *in vivo* montrent que du Salvarsan oxydé (2 h. à 37° en boîte de Petri ouverte) stérilise bien plus rapidement la souris que le produit non altéré et aussi à des doses normalement non stérilisantes; la toxicité est aussi notablement augmentée. Simic (3) a du reste établi nettement le fait tant pour les spirochètes que pour les trypanosomes. Peut-être faut-il faire intervenir, au cours des essais *in vivo*, des différences physiologiques tenant à l'hôte (élimination, etc.).

Mais, répétons le, tout en admettant que le produit d'altération soit plus trypanocide cela ne veut pas dire que le 914 comme tel ne le soit pas.

On a voulu avancer comme preuve de la nécessité de la transformation le fait que l'injection souscutanée ou péritonéale de 914 se montrait d'action plus rapide et plus intense que l'injection intraveineuse (cfr. Findlay: Castelli-Simic) (*).

La toxicité du 914 est incontestablement plus forte en S. C. que en I. V. et ce fait est volontiers attribué aux modifications chimiques subies au cours de la résorption bien que puissent intervenir aussi des différences d'élimination.

Castelli cite comme dose toxique 85 mg./K° (1,7 mg./20 gr.) par S. C. et 250 mg./K° (5 mg./20 gr.) par I. V. (souris); Pearce et Brown 100 mg./K° (2 mg./20 gr.) par S. C. et 175 mg./K° (3,5 mg./20 gr.) par I. V. (souris); Kolmer 100 mg./K° S. C. 200 mg./K°: I. V. (rat) (d'après Fisch et Schlossberger (6), p. 478).

Personnellement nous n'avons noté que de plus légères différences mais dans le sens indiqué: nous considérons la dose limite S. C. comme 3 mg, 5-3 mg, 75 et I. V. 4,5-5 mg./20 gr. (souris). Il y a donc augmentation de toxicité par voie S. C. et l'on peut donc escompter aussi une action plus rapide et peut-être plus puissante.

(*) En réalité les expériences de Simic ont surtout porté sur les spirochètes.

TABLEAU II.

Paires Souris	Doses Arsébenyl mg./20 gr.	Temps de stérilisation	
		I. V.	S. C.
1.	0,125	+	+
2.	0,125	+	+
3.	0,125	2 h. 30	2 h. 30
4.	0,200	2 h.	3 h. 30
5.	0,200	2 h.	3 h. 30
6.	0,200	3 h.	2 h. 30
7.	0,200	2 h. 30	2 h. 30
8.	0,200	2 h. 15	2 h. 15
9.	0,200	2 h. 15	2 h. 15
10.	0,500	2 h.	2 h. 30
11.	0,500	2 h.	2 h. 30
12.	0,500	3 h.	3 h.
13.	1 mg.	1 h.	1 h.
14.	2 mg.	1 h.	1 h.
15.	3 mg.	50'	50'
16.	3 mg.	1 h. 50	1 h. 50
17.	4 mg.	1 h.	1 h. 10
18.	4,5 mg.	1 h. 10	40'
19.	4,5 mg.	1 h. 10	1 h. 10
20.	4,5 mg.	50'	50'

En réalité nous n'avons pu confirmer le fait admis comme démontré par Findlay. Le tableau II montre que l'I. V. ne s'est quasi jamais montré inférieure en rapidité à la S. C. ; si l'on tient compte des stérilisations partielles (1^{re} vague) elle serait même un peu supérieure. Il y a, de-ci de-là, des variations dans le temps de stérilisation : différences individuelles, tubes différents de produits et aussi variations de l'infection (bien entendu les paires ont été choisies aussi égales que possibles).

Il ne semble pas que la dose minima effective soit non plus abaissée (voir la dose de 0,125 mg. qui n'est pleinement active qu'en cas d'infection discrète).

Pour ralentir encore la résorption nous avons injecté le produit dans la queue. Il semble qu'ici il y ait un léger renforcement de l'action en corrélation avec ce que nous avons noté sur l'action du Salvarsan oxydé ; en effet, 2 souris très infectées traitées à la dose de 0,125 mg. par voie S. C. n'ont pas été stérilisées alors que la même dose dans les tissus de la queue

a stérilisé une autre souris en 3 jours. Trois souris très infectées traitées par voie I. V. à la dose de 0,15 n'ont pas été complètement stérilisées alors que les deux autres injectées dans la queue ont été stérilisées en 24 heures et 3 jours.

Nous croyons que ces essais comparés (S. C. et I. V.) ne peuvent pas apprendre grand chose à cause de la rapidité extrême de la résorption. Celle-ci nous est bien démontrée par l'exemple de l'Émétique de Potassium (0,2 à 0,5 mg./20 gr.). Il est en ce cas nécessaire pour observer une différence en faveur de l'injection I. V. d'examiner les souris immédiatement après l'injection et la différence observée — différences de degré de stérilisation — disparaît au bout de 10 minutes.

On conçoit que lorsqu'il s'agit d'un produit stérilisant en 1 ou 2 heures le temps de la résorption ne se marque guère. L'injection dans la queue semble elle avoir une certaine efficacité spéciale.

*
**

Nous avons alors recherché si l'injection préliminaire de substances rédox diminuaient la rapidité d'action du 914. Nous avons utilisé comme Jancso (7) l'acide ascorbique, le bleu de toluidine, le bleu de méthylène. Le tableau III résume nos constatations; on se rapportera au tableau II pour les temps de stérilisation normale.

TABLEAU III.

Action de substances rédox sur le 914 (in vivo).

N ^o	Acide ascorbique	914 (mg./20 gr.)	Stérilisation
1.	5 mg./20 gr.	2	1 h. 40
2.	4 mg.	3	1 h. 50
3.	4 mg.	3	+2 h. 20

N ^o	Bleu de toluidine	914 (mg./20 gr.)	Stérilisation
1.	2 mg.	2	2.3 h.
2.	2 mg.	1	2 h. 20
3.	2 mg.	3	2 h.
4.	2 mg.	3 mg.	2 h. 45

N ^o	Bleu de méthylène	914 (mg./20 gr.)	Stérilisation
1.	4 mg.	0,50	6 h. 30
2.	4 mg.	0,50	7-7 h: 30
3.	4 mg.	2	6 h.
4.	4 mg.	2	5 h.
5.	4 mg.	4	5 h.
6.	4 mg.	4	2 h. 10 très faible infection
7.	4 mg.	2	5 h.
8.	2 mg.	3	3 h.
9.	2 mg.	3	† (morte)

Remarques : 1) Le bleu de méthylène agit de façon toxique; 2) Les produits sont injectés sous la peau, les substances rédox 1 h. avant le 914.

Il semble bien que tous ces produits aient une certaine action retardante sur le 914. Le fait n'est cependant bien marqué qu'avec le bleu de méthylène (*). Moncorps et Bohnstedt ont noté que l'addition de glutathion ou de cystein à du 914 diminue son activité aussi bien in vivo que in vitro (cfr. Findlay (2), p. 215), Strangeways a noté le fait in vitro, à concentration déterminée (5).

Il est intéressant aussi de noter que les trypanosomes de souris ayant reçu 4 mg. de bleu de méthylène puis 4 mg. ou 2 mg. de 914, prélevés 1 h. 40 après l'injection du 914, se sont montrés infectieux en 8-9 jours, au contraire des trypanosomes traités au 914 seul (1 ou 2 gouttes prises à la queue et inoculées immédiatement).

*
**

Un seul essai a été fait en utilisant des dilutions variables : 3 souris traitées par une dose unique de 0,125 mg. ont donné 1 stérilisation et 2 stérilisations incomplètes en 24 heures, alors que 3 souris traitées à la même dose globale mais en 3 fois (chaque fois solution fraîche) en quelques heures ont donné 2 stérilisations et 1 stérilisation incomplète. Deux souris ayant reçu la même dose sous un grand volume (10 cc.) et

(*) Des essais sont en cours avec des doses plus faibles de chaque produit.

2 injections ont donné une stérilisation et une stérilisation incomplète.

La série en question est statistiquement trop faible pour apprécier si ces facteurs (répétition, dilution) ont l'influence favorable que leur attribue Scholtz (8). L'interprétation éventuelle nous en ayant paru ambiguë nous n'avons pas fait plus d'essais dans ce sens.

Discussion.

L'action directe du 914 nous paraît surabondamment démontrée : action *in vitro*, non-inoculabilité quelques minutes après traitement intraveineux, constatation de la fixation de l'arsenic par les parasites soit de façon indirecte (Warrington Yorke et collab. (10), Hawking (11)), soit de façon directe (Simic (3), Singer (9) avec ce fait particulièrement significatif que les trypanosomes arséno-résistants ne fixent pas en mêmes quantités le produit actif (tryparsamide réduite dans le cas des auteurs anglais).

Par contre la question de savoir si le 914 agit comme tel ou après transformation reste plus obscure. Il y a, en effet, ici des arguments pour et contre.

1. L'action du 914 est modérément rapide, celle de l'arsénoxyde ou des produits d'oxydation de l'arsénobenzène est bien plus rapide. Cette observation que nous pouvons confirmer en ce qui concerne les produits oxydés est plutôt en faveur de la probabilité d'une transformation.

2. Par contre, nous ne pouvons pas considérer que la comparaison entre la rapidité d'action de l'injection veineuse et de l'injection sous-cutanée apporte un argument en faveur de l'existence de cette transformation. En réalité nous n'avons pas vu de différence dans la vitesse de stérilisation par ces deux procédés. L'augmentation de toxicité par voie S. C. est cependant réelle et il est donc légitime d'admettre que par cette voie d'introduction les médicaments subissent certaines modifications chimiques; malgré cela, la rapidité de stérilisation n'est pas accentuée et l'efficacité pas non plus ou dans une mesure bien faible. La méthode des injections dans la queue

se heurte à une difficulté technique (sortie du liquide à travers la peau).

3. L'action retardante d'un produit comme le bleu de méthylène pourrait s'interpréter par une inhibition de l'oxydation du 914, mais il faut avouer que l'existence de phénomènes toxiques rend l'interprétation assez délicate et qu'un système redox comme la Vitamine C. (non toxique) paraît bien moins actif.

4. La non-infectiosité fréquente des trypanosomes prélevés quelques minutes après traitement ne paraît pas en faveur de la nécessité d'une oxydation du 914. Il se pourrait cependant selon l'hypothèse de Simic (3), Strangeways (5) que l'arsénobenzène fixé comme tel sur le parasite, soit alors oxydé dans son protoplasma même.

Cette hypothèse correspond assez bien avec la fixation rapide que nous avons observée et qui dans les essais de Hawking ne dépasse non plus quelques minutes et, d'autre part, avec la stérilisation sensiblement plus lente.

Conclusion.

1. La comparaison de l'action de l'arsénobenzène sur trypanosoma Brucei, d'une part, en I. V. et, d'autre part, en S. C. ne fait pas conclure à la nécessité d'une transformation du 914 dans l'organisme.

2. Le bleu de méthylène à grosses doses in vivo retarde manifestement l'action du 914. La Vitamine C., le bleu de toluidine sont bien moins actifs, aussi n'oserions-nous conclure à l'intervention de phénomènes indubitables d'oxydo-réduction.

3. La rapidité avec laquelle les trypanosomes soumis in vivo à l'arsénobenzène cessent d'être infectieux (15-20 minutes pour la généralité d'entre eux) paraît démontrer la fixation du produit comme tel, ce qui n'exclut pas, bien entendu, des transformations ultérieures dans le parasite même.

Institut de Médecine Tropicale, Anvers.

BIBLIOGRAPHIE.

1. — W. Yorke and P. Murgatroyd. — Studies in chemotherapy. III. The action of certain arsenical compounds on *Tr. rhodesiense*. *Ann. Trop. Med. and Paras.*, 1930, vol. 24, n° 3, p. 449.
 2. — Findlay. — *Recent advances in Chemotherapy*, 2^e éd., Londres, 1939.
 3. — Simic. — Untersuchungen über die Wirkungsweise des Neosalvarsans. *Zent. f. Hyg. und Inf. krank.*, Bd. 99, h. 4, p. 417, 1923.
 4. — P. Hawking. — Analysis of the trypanocidal action of As. III and acriflavine. *Ann. Trop. Med. and Paras.*, 1938, vol. 32, n° 3, p. 313.
 5. — W. Strangeways. — Trypanocidal activity *in vitro* of aromatic thioar-sinites and neoarsphenamine. *Ann. Trop. Med. and Paras.*, 1937, vol. 31, n° 3, p. 387.
 6. — Fischl and Schlossberger. — *Handbuch der Chemotherapie*, Berlin, 1934, p. 478.
 7. — N. v. Jancso. — Beziehungen zwischen chemotherapeutisches wirkung, oxydationskatalyse und redupotential. *Zeit. für Immt. forsch.*, t. LXXXVIII, 1936, p. 275.
 8. — W. Scholtz. — Ueber die wirkung des Salvarsans bei verschiedener verdünnung und dosierung auf die Trypanosomen Infektionen im Mausen und Kaninchen. *Munch. Med. Woch.*, 1935, t. 82, 23-V-1935.
 9. — E. Singer. — Die Wirkungsweise der chemotherapeutika bei Spirocheten und Protozoeninfektionen. *Med. Klin.*, 1935 (Mars), t. XXXI.
 10. — W. Yorke, P. Murgatroyd and Fr. Hawking. — Studies in Chemotherapy IV. *Ann. Trop. Med. and Paras.*, 1931, vol. 25, n° 2, p. 351.
 11. — F. Hawking. — Contribution on the Mode of action of Germanin. *Ann. Trop. Med. and Paras.*, 1939, vol. 33, n° 1, p. 13.
-