Zeitschrift: Acta Tropica

Herausgeber: Schweizerisches Tropeninstitut (Basel)

Band: 29 (1972)

Heft: 3

Artikel: Culture de "Trypanosoma gambiense" et autres trypanosomes en milieu liquide : influence du métabolisme glucidique des hématies servant à l'enrichissement

Autor: Fromentin, H.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-311803

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 12.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Laboratoire de Protozoologie, Institut Pasteur
25, rue du Docteur Roux, 75 Paris 15e, France

Culture de *Trypanosoma gambiense* et autres Trypanosomes en milieu liquide. Influence du métabolisme glucidique des hématies servant à l'enrichissement.

H. FROMENTIN

Abstract

Growth of *Trypanosoma gambiense* in a semi-synthetic liquid medium paralleled glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of red blood cells enriching the medium; this activity was imparted to the liquid medium and was independant of hemoglobin level.

Several glucose phosphate esters favoured multiplication of *T. gambiense:* glucose-6-phosphate (G-6-P); fructose-6-phosphate (F-6-P); fructose-1,6 diphosphate (F-1,6 diP); 6-phosphogluconic acid (6-PG); ribulose-5-phosphate (Ru-5-P) and ribose-5-phosphate (R-5-P). *T. theileri* was stimulated by G-6-P, F-6-P, Ru-5-P and R-5-P; *T. therezieni* by G-6-P and 6-PG; and *T. rotatorium* only by G-6-P. Multiplication of *T. gambiense* was stimulated for 24 h by methylen blue $1{,}6 \times 10^{-4}$ M but not *T. rotatorium.* A sugar phosphate fortified defined medium supported growth of *T. rotatorium* for 4 subcultures over a 3-week period. These observations are construed as perhaps reflecting variations in $NADP^+$ and NADPH levels within the trypanosomes.

Introduction

En attaquant le difficile problème qui consiste à identifier les facteurs du sang indispensables à la culture des trypanosomes, parasites de Vertébrés, il est nécessaire de faire la différence entre ceux qui sont déjà connus comme étant indispensables, telle l'hématine et ceux qui restent non identifiés mais sont systématiquement apportés aux milieux définis par les extraits de sang. C'est ainsi que LWOFF, 1940, a pu cultiver *Trypanosoma cruzi* dans un milieu liquide contenant de l'hématine et du sérum de cheval; les facteurs de croissance apportés par celui-ci demeuraient inconnus. Les trypanosomes polymorphes africains, quant à eux, ne peuvent se développer qu'en présence de sang. Nous-mêmes avons montré (DODIN & FROMENTIN, 1962) que la partie indispensable du sang pour *T. gambiense* n'est pas le sérum mais bien les globules rouges entiers. Leurs propriétés varient, non seulement selon les espèces de Vertébrés, mais encore d'animal à animal: le sang d'un individu peut convenir à la culture et pas celui d'un autre (LWOFF & CECCALDI, 1939).

C'est pourquoi nous avons comparé la croissance des trypanosomes cultivés dans le milieu 199 enrichi par des hématies humaines normales et par des hématies humaines déficientes en glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G-6-P-D) [1].

Un milieu enrichi par du sang déficient en enzyme ne permet pas le développement du trypanosome (FROMENTIN & DODIN, 1964). Cette constatation nous a tout naturellement conduits à rechercher l'action de dérivés phosphorés du glucose qui apparaissent sous l'action des enzymes du sang, au cours de la

[1] Code du catalogue enzymatique ECl. 1. 1. 1949.

glycolyse: glucose-6-phosphate (G-6-P); fructose-6-phosphate (F-6-P); fructose-1,6 diphosphate (F-1,6 diP); acide 6-phospho-gluconique (ac. 6-ph-gl); ribose-5-phosphate (R-5-P) et ribulose-5-phosphate (Ru-5-P).

L'intervention, favorable à *T. gambiense,* de la plupart de ces esters phosphorés du glucose, nous a conduits à observer l'action du bleu de méthylène (B.M.) sur les cultures. On sait que le B.M., transporteur d'électrons, ajouté à une suspension d'hématies, a pour résultat d'intensifier le métabolisme des glucides via la voie des pentoses, ceux-ci tendent alors à s'accumuler dans le milieu (SZEINBERG & MARKS, 1961).

Diverses expérimentations basées sur ces constatations nous permettent de composer et formuler un milieu chimiquement défini convenant à *T. rotatorium.*

Abréviations

GRH	Globules rouges humains
GRR	Globules rouges de Rat
G-6-P	Glucose-6-phosphate
G-6-P-D	Glucose-6-phosphate-déshydrogénase
F-6-P	Fructose-6-phosphate
F-1,6 diP	Fructose-1,6 diphosphate
ac. 6-ph-gl	Acide 6-phospho-gluconique
R-5-P	Ribose-5-phosphate
Ru-5-P	Ribulose-5-phosphate
B.M.	Blue de méthylène
Hb	Hémoglobine
AMP	Adénosine monophosphate
ATP	Adénosine triphosphate
$NADP^+$	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Matériel et Méthodes

I. Souches

- *Trypanosoma gambiense* souche « Eliane », originaire de Côte d'Ivoire, isolée à Paris par M. Vaucel en 1952.
- *T. theileri* d'Irlande (HERBERT, 1961).
- *T. therezieni,* isolée par E. R. Brygoo à Madagascar en 1963 (BRYGOO, 1963) et cultivée par nos soins depuis lors (FROMENTIN, 1967).
- *T. rotatorium,* isolée par J. Rodhain à Anvers en 1943.

II. Milieux de culture

A. Les cultures de la collection sont habituellement conservées sur les milieux diphasiques gélosés de Tobie au sang humain (TOBIE et al., 1950) et de Nöller au sang de lapin (NÖLLER, 1917). Le sang (0,5 à 1 ml) est mélangé à la gélose (3 ml) qui est inclinée et solidifiée. La phase liquide est composée, pour le Tobie, du liquide de Locke (2 ml) et, pour le Nöller, du liquide de Ringer (1,5 ml).

Les milieux doivent séjourner 24 h à 37 °C avant l'emploi tant pour contrôler leur stérilité que pour permettre aux composants solubles, non définis, du sang, de diffuser dans la phase liquide. Ils se conservent 2 semaines à +4 °C. Les cultures sont maintenues à 27 °C et repiquées chaque semaine.

B. Les cultures destinées à l'expérimentation sont repiquées dans un milieu liquide dérivé du Parker (MORGAN et al., 1950), le milieu « 199 modifié » (I. P. Garches). Ce milieu, chimiquement défini, est insuffisant par lui-même pour permettre la multiplication des trypanosomes. Il doit, obligatoirement, être enrichi par un extrait de sang. On procède ainsi:

– addition de 1/15e de volume de la phase liquide du milieu incubé de Tobie (« 199 T »);

– addition de 1/15e de volume de la phase liquide du milieu incubé de Nöller (« 199 N »);

– contact temporaire pendant 18–24 h à 35 °C/37 °C de globules rouges lavés de Rat (GRR) ou d'Homme (GRH) dans la solution physiologique, base du milieu 199. Celui-ci sera ensuite composé en ajoutant à cette solution physiologique « enrichie », les autres constituants, conservés à –20 °C en solutions concentrées (2 et 5) (sels, acides aminés, vitamines, éventuellement glucides).

Les milieux liquides expérimentaux (pH 7,2) sont répartis en tubes de 120/12 mm, contenant 1,9 ml de milieu (sans gélose); ils sont préparés juste avant l'utilisation. Les cultures sont maintenues à 27 °C.

C. Les essais de culture de *T. rotatorium* en milieu chimiquement défini ont été faits avec le milieu « 199 modifié », enrichi par de l'hématine à 0,01 mg/ml, des dérivés phosphorylés du glucose et des phosphonucléotides; l'extrait de sang, non chimiquement défini est supprimé. Après avoir séjourné une nuit à 35 °C, le milieu est complété par addition de $NADP^+$, stérilisé sous rayons U.V., puis distribué à raison de 1,9 ml par tube de 120/12 mm. Seul, un milieu fraîchement préparé est ensemencé.

III. Dérivés phosphorylés du glucose ajoutés au milieu 199

Les solutions suivantes sont utilisées: G-6-P ($3{,}3 \times 10^{-2}$ M), F-6-P ($3{,}3 \times 10^{-2}$ M), F-1,6 diP ($2{,}5 \times 10^{-2}$ M), ac. 6-ph-gl ($1{,}4 \times 10^{-2}$ M), R-5-P ($2{,}5 \times 10^{-2}$ M) et Ru-5-P ($2{,}0 \times 10^{-3}$ M).

Elles sont stérilisées par filtration et ajoutées à la solution physiologique avant que celle-ci soit temporairement mise en contact avec les hématies ou encore, aux fins de comparaison, ajoutées à la solution saline seulement après l'incubation avec les GR. La concentration finale est de 10^{-4}, 10^{-5} et 10^{-6} M.

IV. Numération des trypanosomes

A. *Inoculum:* les trypanosomes lavés sont comptés vivants à la cellule de Thoma, mis en suspension dans la solution de Hanks et ajustés à 150 000 T/ml dans le milieu final.

B. *Contrôle des résultats:* les trypanosomes sont comptés après 5 jours de culture, sur un mélange de 3 tubes par milieu à l'essai, la suspension étant formolée à 0,25 %. Les résultats sont exprimés en pour cent par rapport à une culture témoin. Compte tenu de la déviation standard, ± 8,5 %, calculée sur 26 échantillons, il a été choisi de considérer un résultat comme significatif s'il est égal ou supérieur à 120 %.

V. Préparation des hématies

Les hématies de Rat (GRR) sont préparées en ponctionnant au cœur des rats mâles albinos de 220 g ± 20 g sous anesthésie en présence d'anticoagulant (liquoïde Roche à 2,5 % ou héparine à 1%). Les hématies humaines sont recueillies par ponction veineuse sur anticoagulant. Les GR séparés du plasma, sont lavés deux fois avec la solution de Hanks et ajoutés aux milieux pendant le temps d'incubation, à raison de 250 millions à un milliard par ml; ils sont ensuite séparés par centrifugation douce.

VI. Mesure de l'activité de la G-6-P-D et du taux d'hémoglobine

A. La mesure de l'activité de la G-6-P-D est basée sur la transformation de la $NADP^+$ en NADPH en présence de G-6-P avec accroissement de l'absorption à 340 nm (MARKS, 1966; MARKS et al., 1961). Le réactif utilisé est le Stat Pack de Calbiochem.

B. Le taux d'hémoglobine est mesuré à 540 nm, au photomètre, par la technique classique de Drabkin sur la solution d'hémoglobine transformée en cyanméthémoglobine (sensibilité 0,1 g %).

Résultats

Après avoir montré (FROMENTIN, 1971) d'une part, la nécessité pour les milieux au sang classiques, de mûrir 24 h à 37 °C préalablement à leur utilisation et, d'autre part pour les hématies lavées, servant à enrichir le milieu « 199 modifié », d'incuber 18–24 h à 35 °C/37 °C afin de transmettre leurs propriétés au liquide, nous avons pensé que l'on pouvait avoir à faire à une propriété enzymatique des hématies transmise au milieu. C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé comparativement des lots de globules rouges humains normaux ou déficients en glucose-6-phosphate déshydrogénase.

1° Dans un premier temps, il a été constaté que, plus les lots d'hématies, servant à enrichir le milieu montraient une déficience dans l'activité de la G-6-P-D, moins la culture de *T. gambiense* se développait; la culture est nulle quand les érythrocytes sont totalement dépourvus d'activité. Quelques unes de ces observations apparaissent dans le tableau 1.

Tableau 1. Croissance de *Trypanosoma gambiense* (exprimée en % des contrôles) en relation avec l'activité de la G-6-P-D des donneurs humains (exprimée en unités internationales: I U/g Hb) et avec l'hémoglobine absolue (densité optique à 540 nm) des milieux enrichis

	Globules rouges humains *			
	lot A contrôle	lot B	lot C	lot D
Activité G-6-P-D	9	9	4,5	0
Hb absolue d.o. milieux	0,013	0,016	0,524	0,193
Quantité relative de trypanosomes à J5	100	106	24	7

* Lots A et B: activité normale; lot C: partiellement déficient; lot D: totalement déficient.

2° Ces résultats se vérifient quand l'activité de la G-6-P-D est mesurée directement dans le milieu « 199 GR ». De plus, le rendement de la culture est indifférent à la concentration en hémoglobine (tableau 2).

Tableau 2. Croissance de *T. gambiense* (exprimée en % des contrôles) dans le milieu 199 enrichi par le contact temporaire de globules rouges de Rat (GRR) ou humains (GRH) en relation avec l'activité de la G-6-P-D (I U/g Hb) et le taux d'hémoglobuline totale (g %) du milieu

	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4		Lot 1	Lot 2
		GRR		GRR		GRH	
		500×10^6		250×10^6	500×10^6	500×10^6	
Activité G-6-P-D	18	30	5	0	1	1	2
Hb totale	0,7	0,4	0,4	$> 0,1$		1	1
Quantité relative de trypanosomes à J5	100	245	67	4	100	51	100

3° Les essais suivants sont destinés à montrer que la concentration du milieu en hémoglobine n'intervient pas sur la culture. Le donneur humain est déficient en G-6-P-D: activité = 1,37 UI/g Hb.

Les hématies sont lavées et hémolysées par trois volumes d'eau distillée, les stromas sont éliminés par centrifugation à 5000 t/mn. Les dilutions du pigment sont effectuées dans le milieu 199 suivant le schéma du tableau 3. Les cinq milieux à l'essai et les deux milieux témoins sont ensemencés avec *T. gambiense* à JO. Tous sont positifs à J5; on procède alors au 2e repiquage; des lectures sont effectuées à J9 puis à J14 (tableau 3): à cette date, les 5 milieux à l'essai sont négatifs tandis que les témoins sont positifs.

4° La culture des trypanosomes est effectuée dans le milieu liquide enrichi par le séjour temporaire des globules rouges ayant incubé pendant 18–24 h à 35 °C en présence d'esters phosphorylés du glucose.

Nous avons constaté (Fromentin & Dodin, 1964) que l'action de la G-6-P-D des hématies est renforcée en présence du glucose-6-phosphate, substrat de l'enzyme. Douze essais comparés ont été répétés pour *T. gambiense*. La moyenne des pourcentages obtenus est 150 % par rapport au témoin, avec pour extrêmes 115 et 200. Par la suite, le nombre d'essais servant à établir les moyennes a été fixé à trois (3 essais sur des mélanges de 3 tubes); les écarts, d'une expérience à l'autre, ne sont pas négligeables, c'est la raison pour laquelle on n'a pas cru devoir figurer les moyennes dans le tableau 5.

Tableau 3. Taux d'hémoglobine dans les milieux à l'essai et dans les témoins. Lecture des cultures de *T. gambiense,* 2e repiquage à J9 et J14

Dilution de l'hémolysat dans le 199	Activité G-6-P-D	Taux d'Hb en g %	Lecture des cultures * J9	J14
1/2	0	1,9	±	0
1/4	0	0,9	0	0
1/8	0	0,5	±	0
1/16	0	0,2	±	0
1/32	0	0,1	0	0
Témoin « 199 T » a)	2,5 UI/g Hb	0,2	++	+
Témoin « 199 T » b)	1,0 UI/g Hb	0,1	++	+

* 0 pas de trypanosomes visibles dans 50 champs; ± moins de 500 000 T/ml; + de 1 à 3 millions T/ml; ++ de 4 à 9 millions T/ml.

Le G-6-P améliore en outre le rendement des cultures de *T. theileri, T. therezieni* et *T. rotatorium.*

Nous avons alors cultivé comparativement chacune des quatre espèces de trypanosomes étudiées, dans des milieux liquides enrichis par incubation temporaire d'hématies en présence des dérivés glucidiques suivants qui apparaissent au cours de la glycolyse et mettent évidemment en cause les enzymes correspondants: ac. 6-ph-gl, R-5-P, Ru-5-P (voie des hexoses monophosphates) (tableau 5), F-6-P et F-1, 6diP (voie d'Embden-Meyerhof).

a) *T. gambiense:* la présence des six dérivés glucidiques aux concentrations convenables, provoquent une augmentation du rendement de la culture. Ainsi le F-1, 6diP à $2,5 \times 10^{-6}$ M permet de doubler le rendement, tandis qu'à $2,5 \times 10^{-4}$ M, il est inhibiteur.

Tableau 5. Stimulation de la culture des trypanosomes dans le milieu 199 enrichi par le contact temporaire de GRR incubés en présence de glucides phosphorés. Une croissance supérieure à 120 % du milieu témoin est exprimée par S (stimulation), par un N s'il n'y a pas stimulation. Chaque résultat répresente la moyenne d'au moins 3 essais (3 tubes par essai)

Souches	G-6-P $3,3 \times 10^{-4}$ M	F-6-P $3,3 \times 10^{-4}$ M	F-1,6 diP $2,5 \times 10^{-6}$ M	ac. 6-ph-gl $1,4 \times 10^{-4}$ M	Ru-5-P $2,0 \times 10^{-4}$ M	R-5-P $2,7 \times 10^{-6}$ M
T. gambiense	S	S	S	S	S	S
T. theileri	S	S	N	N	S	S
T. therezieni	S	N	N	S	N	N
T. rotatorium	S	N	N	N	N	N

b) *T. theileri:* sa croissance est améliorée par le G-6-P, le F-6-P, le R-5-P et le Ru-5-P.

c) *T. therezieni:* seuls le G-6-P et l'acide 6-ph-gl lui sont favorables.

d) *T. rotatorium:* seul le G-6-P augmente la densité de la culture.

Ces glucides sont présents dans le milieu pendant l'incubation temporaire des hématies. Quand l'ordre des opérations est inversé – incubation des globules rouges dans le liquide physiologique de base, constitution du 199, addition d'esters phosphorylés du glucose – un seul glucide, l'acide 6-ph-gl, améliore le rendement de la culture d'une seule espèce de trypanosomes: *T. gambiense.* Nous n'avons pas fourni d'explication à cette exception.

5° L'action du bleu de méthylène sur les cultures dans le 199 enrichi a été recherchée afin de vérifier l'intervention des pentoses. Fixateur d'électrons, le B.M. oxyde les coenzymes indispensables au déroulement normal de la glycolyse et accélère ainsi la formation des pentoses qui s'accumulent dans le milieu selon le schéma:

$$B.M.^{+} + NADPH \rightarrow B.M.H. + NADP^{+}$$

On constate que la stimulation dûe au B.M. se prolonge pendant 48 h dans le cas d'une culture âgée de *T. gambiense* malgré l'absence de renouvellement de milieu nutritif; dans le cas d'une culture jeune, la stimulation est sensible entre la 3e et la 24e heure mais a disparu après 48 h, le colorant, toxique, ayant tué en grand nombre de flagellés.

Il n'y a pas de stimulation de la culture de *T. rotatorium* (tableau 4).

6° La recherche d'un milieu chimiquement défini pour les trypanosomes s'est appuyée sur les résultats expérimentaux indiqués ci-dessus. Le milieu 199 a été complété de façon à obtenir le développement de *T. rotatorium* dans un milieu chimiquement défini. L'extrait de sang, non défini, est supprimé. L'hématine, facteur de croissance nécessaire mais non suffisant, est fournie, ainsi que des esters phosphorylés du glucose, des phosphonucléotides et une coenzyme. Le milieu doit séjourner 18–24 h à 35 °C avant l'inoculation, sous peine d'obtenir des résultats discordants. Le milieu dont la formule est indiquée ici permet d'obtenir quatre à cinq passages consécutifs sur une durée de 21 à 25 jours:

199 + hématine	0,01	mg/ml
R-5-P	0,1	mg/ml
Ru-5-P	0,1	mg/ml
ATP	0,001	mg/ml
AMP	0,001	mg/ml
$NADP^{+}$	0,03	mg/ml

Tableau 4. Stimulation de la culture de *Trypanosoma gambiense* par le bleu de méthylène (B.M.) à $1{,}6 \times 10^{-4}$ M; comparaison avec *Trypanosoma rotatorium*. La croissance est exprimée en % des témoins

Trypanosoma gambiense

A. Cultures de 7 jours dans le milieu « 199 T »

Temps après l'addition de B.M.	Croissance relative par rapport au témoin
0	100 %
5 mn	53 %
10 mn	119 %
30 mn	125 %
1 h	154 %
3 h	153 %
7 h	163 %
24 h	183 %
48 h	140 %
72 h	90 %

B. Culture jeune, B.M. ajouté juste avant l'ensemencement

Temps après l'addition de B.M.	Croissance relative
0	100 %
3 h	152 %
24 h	258 %
48 h	73 %
72 h	32 %

Trypanosoma rotatorium

A. Milieu « 199 N »

Temps après l'addition de B.M.	Croissance relative
0	100 %
15 mn	97 %
1 h	108 %
24 h	88 %
48 h	96 %

B. Milieu chimiquement défini (2e repiquage)

Temps après l'addition de B.M.	Croissance relative
0	100 %
15 mn	100 %
1 h	86 %
24 h	83 %
48 h	116 %

Discussion

Activité de la G-6-P-D et taux d'Hb

La multiplication de *T. gambiense* est liée à l'activité de la G-6-P-D des hématies ayant servi à enrichir le milieu; plus cette activité enzymatique est forte, meilleur est le développement de la culture.

A l'opposé, cette multiplication n'est pas proportionnelle au taux d'hémoglobine. Cette constatation n'est pas en contradiction avec les faits rapportés par LWOFF (1940). Celle-ci avait choisi d'étudier, parmi les trypanosomes, *T. cruzi,* agent de la maladie de Chagas, de physiologie particulière: on sait qu'il ne se multiplie, chez l'hôte Vertébré, que sous la forme amastigote. LWOFF (1940) a montré que, outre l'acide ascorbique et l'hématine qui sont facteurs de croissance, le sérum est indispensable à la multiplication de *T. cruzi* sans qu'il soit possible de préciser quel facteur de croissance il apporte au milieu (p. 125). Mais, dans les mêmes conditions, les trypanosomes africains par exemple, ne se multiplient pas, ils sont réputés avoir tous besoin de sang total. En fait, ils ont besoin, non pas du globule rouge normal en soi, mais plus précisément de son métabolisme.

Nous avons vu précédemment (FROMENTIN, 1969) que les hématies pouvaient, dans certaines conditions, être efficacement remplacées par d'autres cellules: explants de cœur ou Levures, l'essentiel étant que les cellules adjointes au milieu liquide restent vivantes, faute de quoi le trypanosome meurt.

Dérivés phosphorés du glucose

Des quatre espèces de trypanosomes étudiées, il ressort que *T. gambiense,* isolé de l'Homme, est le plus sensible à la présence, dans le milieu liquide, pendant l'incubation temporaire des hématies, de dérivés posphorés du glucose. En ordre de sensibilité décroissante viennent ensuite *T. theileri* des Bovidés, *T. therezieni* du Caméléon et *T. rotatorium* de la Grenouille. Ce dernier est non seulement le moins concerné par le métabolisme glucidique des érythrocytes mais encore il montre une possibilité d'adaptation supérieure puisqu'il est le seul capable de survivre plus de 3 semaines dans un milieu liquide chimiquement défini de formule originale. Il est ainsi démontré que, pour cette espèce au moins, on peut remplacer l'intervention indispensable du métabolisme des érythrocytes, par l'addition au 199, non seulement d'hématine mais de phosphonucléotides ATP, AMP et de la coenzyme $NADP^+$ en présence de dérivés glucidiques phosphorés.

Bleu de méthylène

La stimulation d'une culture de *T. gambiense,* au contraire de ce qui passe avec *T. rotatorium,* est une manifestation supplémentaire des besoins particuliers de *T. gambiense* en facteurs de croissance.

Ces divers résultats suggèrent deux possibilités:

– les enzymes du sang ne fourniraient pas une substance définie mais plutôt des coenzymes, principalement $NADP^+$ et NADPH; de ce fait, elles maintiendraient un potentiel d'énergie intracellulaire;

ou:

– l'activité de la G-6-P-D serait la manifestation d'un état métabolique des globules rouges dû à ce potentiel d'énergie lié à l'apparition de facteurs de croissance non identifiés, hautement labiles. La situation est semblable à celle décrite à propos des *Plasmodium*: leur survie, provoquée par la coenzyme A et l'ATP, peut être en rapport avec la synthèse d'une substance nécessaire à la préservation de l'intégrité de la paroi extérieure du parasite (TRAGER, 1971).

Les lésions produites chez *T. gambiense* par la carence en facteurs provenant du sang restent à préciser.

Bibliographie

BRYGOO, E. R. (1963). Contribution à la connaissance de la parasitologie des caméléons malgaches. – Masson et Cie, Paris.

DODIN, A. & FROMENTIN, H. (1962). Premier essai de culture de trypanosomes en milieu synthétique. – Bull. Soc. Path. exot., *55,* 798–804.

FROMENTIN, H. (1967). Mise en culture de *Trypanosoma therezieni* Brygoo, 1963. – Arch. Inst. Pasteur, Madagascar, *36,* 51–62.

FROMENTIN, H. (1969). Culture de trypanosomes dans le milieu de Parker en présence de micro-organismes. – Bull. Soc. Path. exot., *62,* 1084–1090.

FROMENTIN, H. (1971). 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 (Thèse de Doctorat d'Etat, Paris). – Ann. Parasit. hum. comp., *46,* 337–445.

FROMENTIN, H. & 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.

HERBERT, I. V. (1961). Bovine trypanosomiasis due to *Trypanosoma theileri* Laveran, 1902, and its occurrence in Eire. – Irish vet. J., 8 p.

LWOFF, M. & CECCALDI, J. (1939). Culture *in vitro* d'une souche de *Trypanosoma gambiense* d'isolement ancien. – Bull. Soc. Path. exot., *32,* 721–726.

LWOFF, M. (1940). Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomides. Monographie de l'Institut Pasteur. – Masson et Cie, Paris.

MARKS, P. A. (1966). Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Clinical aspects. – Methods in Enzymologie, *IX,* 131–137.

MARKS, P. A., SZEINBERG, A. & BANKS, J. (1961). Erythrocytic G-6-P-D of normal and mutant subjects. – J. biol. Chem., *236,* 10–17.

MORGAN, J. F., MORTON, H. J. & 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.

NÖLLER, CH. (1917). Blut und Insektenflagellatenzüchtung auf Platten. – Arch. Schiffs- und Trop. Hyg., *21*, 53–94.

SZEINBERG, A. & MARKS, P. A. (1961). Substances stimulating glucose catabolism in human erythrocyts. – J. clin. Invest., *40*, 914–924.

TOBIE, E. J., VON BRAND, T. & MEHLMAN, B. (1950). Cultural and physiological observations on *Trypanosoma rhodesiense* and *Trypanosoma gambiense*. – J. Parasit., *36*, 48–54.

TRAGER, W. (1971). Malaria parasites *(Plasmodium lophurae)* developing extracellulary *in vitro:* incorporation of labeled precursors. – J. Protozool., *18*, 392–399.

Zusammenfassung

Das Wachstum von *Trypanosoma gambiense* in einem flüssigen halbsynthetischen Medium scheint an die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität der roten Blutkörperchen, die dem Kulturmedium zugegeben werden, gebunden zu sein; diese Aktivität wird in die Kultur übertragen und ist unabhängig von der Haemoglobin-Konzentration.

Der Einfluß des Glucose-Metabolismus wird gezeigt durch die Wirkung verschiedener Zucker-Phosphatester, die das Wachstum von Kulturformen verschiedener Trypanosomenarten begünstigen. Ein chemisch definiertes Medium, das zusätzlich phosphorylierte Zuckerderivate enthält, ermöglicht 4–5 Subkulturen von *T. rotatorium* innerhalb von 3–4 Wochen.

Eine Erklärung dieser Phänomene wird vorgeschlagen.