



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Études cytophysiologiques de *Trypanosoma Brucei Brucei* après action de drogues intercalantes

Henkinet, Robert

Award date:
1986

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

ETUDES CYTOPHYSIOLOGIQUES DE
TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI
APRES ACTION DE DROGUES INTERCALANTES.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

HENKINET Robert
1985 - 1986

*FM

B04/1986/

05

BUMP

REMERCIEMENTS

Je désire ,au terme de ce mémoire, exprimer ma profonde gratitude envers le Docteur J.M. Jadin, qui m'a guidé et conseillé tout au long de ce travail.

Qu'il me soit permis également de remercier le Professeur R. Leloup pour m'avoir accueilli dans le laboratoire interfacultaire de microscopie électronique , Madame Ch. Chapeau -- Devignon , Monsieur Y. Houbion et Monsieur M. Lombet pour leur disponibilité et leur aide précieuse.

Je remercie également le Père P. Devos et les Professeurs E. Feytmans et E. Depierreux , qui m'ont permis l'accès à leur laboratoire.

Un merci tout particulier à Mademoiselle M.C. Willem et à Mademoiselle G. Oerlemans.

J'ai fortement apprécié l'aide de Monsieur Collet pour l'iconographie de ce mémoire.

Je tiens à exprimer mes remerciements à tous ceux qui d'une manière ou d'une autre ont participé à la réalisation , la rédaction et plus spécialement l'impression de ce travail.

Je remercie aussi ma famille pour son soutien durant ces quatre années d'études.

TABLE DES MATIERES

page:

<u>CHAPITRE 1 INTRODUCTION</u>	1
<u>1.1 Généralités</u>	1
<u>1.1.1</u> Distribution , hôtes et biologie	1
<u>1.1.2</u> Cycle de vie	1
<u>1.1.3</u> Mode de division du trypanosome	3
<u>1.1.4</u> Morphologie générale	4
<u>1.2 Ultrastructure de <i>Trypanosoma brucei</i></u>	4
<u>1.2.1</u> Le périplaste	4
<u>1.2.2</u> La poche flagellaire	4
<u>1.2.3</u> Le flagelle	5
<u>1.2.4</u> Le noyau	5
<u>1.2.5</u> Le système mitochondrial	5
1.2.5.1 La mitochondrie	5
1.2.5.2 Le cinétoplaste	6
<u>1.2.6</u> Les <i>microbodies</i>	6
<u>1.2.7</u> L'appareil vacuolaire	7
1.2.7.1 L'appareil de Golgi	7
1.2.7.2 Le reticulum endoplasmique	7
1.2.7.3 Les lysosomes	7
<u>1.2.8</u> La nutrition des trypanosomes	7
<u>1.3 Chimiothérapie des trypanosomiases africaines</u>	8
<u>1.3.1</u> Aperçu historique	8
<u>1.3.2</u> Présentation des drogues employées	9
1.3.2.1 L'Acriflavine	9
1.3.2.2 Le Bromure d'éthidium	11
1.3.2.3 L'Antrycide	13

<u>CHAPITRE 2 BUT DU TRAVAIL</u>	15
<u>CHAPITRE 3 MATERIEL ET METHODES</u>	16
<u>3.1 Le parasite</u>	16
<u>3.2 Le maintien de la souche</u>	16
<u>3.3 L'hôte vertébré</u>	16
<u>3.4 Etude du nombre et de la morphologie de <i>Trypanosoma brucei brucei</i></u>	16
<u>3.4.1 Etude du nombre de trypanosomes</u>	17
<u>3.4.2 Etude de la morphologie des trypanosomes</u>	17
<u>3.5 Injection des drogues</u>	17
<u>3.6 Etude de <i>Trypanosoma brucei brucei</i> en microscopie électronique à transmission</u>	18
<u>CHAPITRE 4 RESULTATS</u>	21
<u>4.1 Etude de <i>Trypanosoma brucei brucei</i></u>	21
<u>4.1.1 Etude en microscopie optique</u>	21
<u>4.1.2 Courbe de parasitémie</u>	21
<u>4.1.3 Etude en microscopie électronique</u>	24
<u>4.2 Action de l'Acriflavine sur <i>Trypanosoma brucei brucei</i></u>	31
<u>4.2.1 Etude en microscopie optique</u>	31
<u>4.2.2 Evolution du nombre et de la morphologie de <i>Trypanosoma brucei brucei</i> en fonction du temps, suite à l'injection d'Acriflavine</u>	31
4.2.2.1 Etude du nombre	31
4.2.2.2 Etude de la morphologie	34
<u>4.2.3 Etude en microscopie électronique à transmission</u>	36
<u>4.3 Action du Bromure d'éthidium sur <i>Trypanosoma brucei brucei</i></u>	45
<u>4.3.1 Etude en microscopie optique</u>	45
<u>4.3.2 Evolution du nombre et de la morphologie de <i>Trypanosoma brucei brucei</i> en fonction du temps, suite à l'injection de Bromure d'éthidium</u>	45
4.3.2.1 Etude du nombre	45
4.3.2.2 Etude de la morphologie	48
<u>4.3.3 Etude en microscopie électronique à transmission</u>	50

<u>4.4 Action de l'Antrycide sur <i>Trypanosoma brucei brucei</i></u>	56
<u>4.4.1 Etude en microscopie optique</u>	56
<u>4.4.2 Evolution du nombre et de la morphologie de <i>Trypanosoma brucei brucei</i> en fonction du temps, suite à l'injection d'Antrycide</u>	56
4.4.2.1 Etude du nombre	56
4.4.2.2 Etude de la morphologie	59
<u>4.4.3 Etude en microscopie électronique à transmission</u>	61
<u>4.5 Pouvoir pathogène des trypanosomes sanguins prélevés après injection des médicaments</u>	69
<u>CHAPITRE 5 DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	70
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	74

Abréviations utilisées pour l'iconographie :

A : forme aberrante.

BL : blépharoplaste.

C : cinétoplaste.

CH : chromatine.

D : forme dyscinétoplastique.

DP : doublet de fibres tubulaires périphériques.

F : flagelle.

FED : forme en division.

FN : forme normale.

G : appareil de golgi .

GLY : glycosome.

K : DNA cinétoplastique (kDNA).

LY : lysosome.

MC : enroulement de la mitochondrie.

MI : mitochondrie.

MT : microtubules du périplaste.

N : noyau.

NU : nucléole.

P : périplaste.

PF : poche flagellaire.

PH : phagosome.

RER : réticulum endoplasmique rugueux.

RI : ribosome.

TC : tubules centraux.

TP : triplet de fibres tubulaires périphériques.

VA : vacuole d'autophagie.

BE : Bromure d'éthidium.

GR : globule rouge.

MO : monocyte.

PS : plaquette sanguine.

T.b.b : *Trypanosoma brucei brucei* .

N.B. : le trait en - dessous de chaque microphotographie représente une dimension de 0,5 μm .

Exceptions : les figures 4.1.3.6 ; 4.1.3.7 ; 4.3.3.3.

Le trait en - dessous de chaque photo de microscopie optique représente une dimension de 10 μm .

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Généralités

1.1.1 Distribution, hôtes et biologie

Les trypanosomes sont les agents responsables de maladies graves chez l'homme et chez les animaux domestiques. Les trypanosomoses humaines sont de deux types: en premier lieu, la maladie du sommeil due à *Trypanosoma brucei rhodesiense* et *Trypanosoma brucei gambiense* dans les régions tropicales et subtropicales de l'Afrique; ensuite la maladie de Chagas due à *Trypanosoma cruzi* en régions tropicales et subtropicales de l'Amérique. Ces deux maladies affectent plusieurs millions de patients.

Les trypanosomoses affectant le bétail sont également de plusieurs types: le Nagana dû à *Trypanosoma brucei brucei* en Afrique tropicale, responsable de la mort de trois millions de bovins par an; la Surra, une maladie des chevaux et des chameaux due à *Trypanosoma evansi*; la Dourine, une maladie des chevaux due à *Trypanosoma equiperdum*.

L'espèce *Trypanosoma brucei* est divisée en quatre sous-espèces: *Trypanosoma brucei rhodesiense* et *Trypanosoma brucei gambiense* sont pathogènes pour l'homme, *Trypanosoma brucei brucei* qui est pathogène pour beaucoup de mammifères mais pas pour l'homme et le babouin, et *Trypanosoma brucei elephantis*, pathogène pour l'éléphant.

1.1.2 Cycle de vie

Le cycle de développement de *Trypanosoma brucei* est représenté à la figure 1.

On distingue deux types de trypomastigotes dans le sang et les liquides intercellulaires de l'hôte vertébré. Les uns sont allongés et maigres, ce sont les *Slender forms*; ils se retrouvent dans le sang peu après l'inoculation par la mouche tsé-tsé, leur système mitochondrial est peu développé avec très peu de crêtes, les cytochromes sont absents, le cycle de Krebs n'est pas fonctionnel et le métabolisme glucidique reste incomplet.

D'autres sont courts et trapus, ce sont les *Stumpy forms*; ils proviennent des *Slender forms* suite au développement de la mitochondrie et des crêtes tubulaires, la plupart des enzymes du cycle de Krebs sont présents mais les cytochromes sont toujours absents (RUDZINSKA et VICKERMAN, 1969; VICKERMAN, 1962, 1965). Ce sont les *Stumpy forms* qui doivent être ingérées par la mouche tsé-tsé pour que le cycle évolutif se poursuive (WIJER et

WILLET ,1977).

Les *Stumpy forms* semblent être une étape intermédiaire entre les *Slender forms* et les formes de l'hôte invertébré. En effet, les capacités fonctionnelles de la mitochondrie augmentent chez les *Stumpy forms* mais n'atteignent pas celles rencontrées chez les formes trypomastigotes de l'intestin de la glossine (HECKER and BÖHRINGER ,1977). Une fois ingérés par la glossine, les trypanosomes se multiplient d'abord à l'intérieur puis à l'extérieur de la membrane pérityphique. Ces trypanosomes contiennent les enzymes mitochondriaux (NEWTON et al., 1973) et les cytochromes jusqu'alors absents. Ensuite, les parasites migrent dans les glandes salivaires où ils subissent plusieurs multiplications, prennent la forme d'épimastigotes et restent attachés à l'épithélium des glandes salivaires (VICKERMAN , 1965). Ces épimastigotes vont enfin dans la lumière des conduits excréteurs des glandes salivaires se transformer en trypomastigotes infectieux métacycliques (JADIN , 1978). C'est cette dernière forme qui sera inoculée lors de la pique.

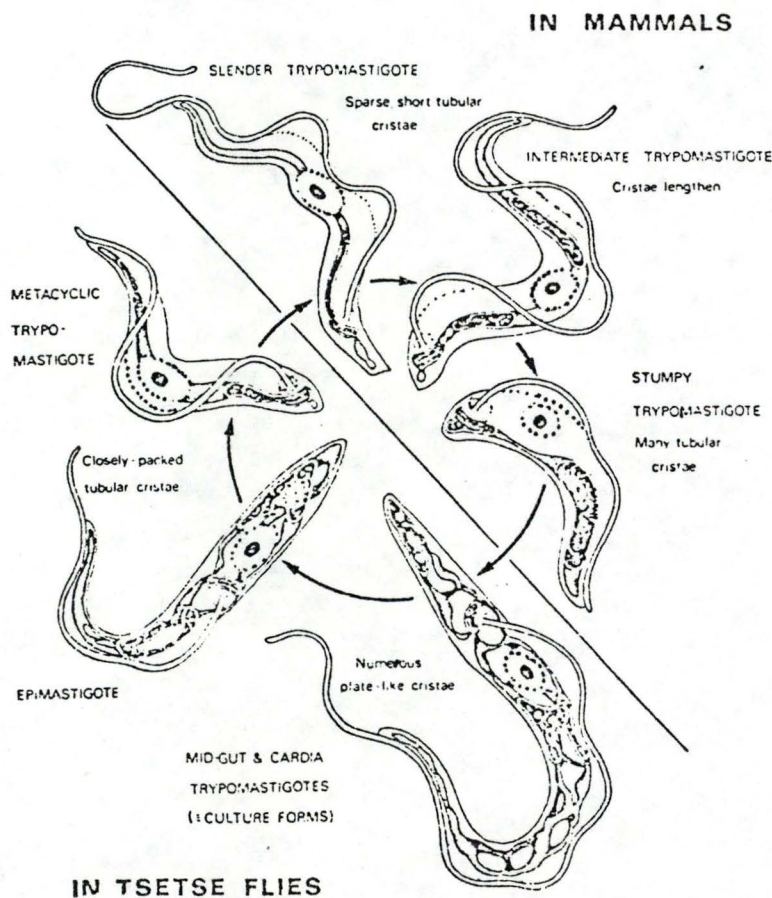


figure 1 schéma du cycle évolutif de *Trypanosoma brucei* (d'après VICKERMAN ,1965)

1.1.3 Mode de division du trypanosome

Le mode de division de *Trypanosoma brucei brucei* est représenté à la figure 2.

Les trypanosomes se reproduisent par division asexuée. Cela comprend plusieurs étapes: on observe d'abord la naissance d'un nouveau flagelle à proximité de l'ancien. Ces deux flagelles vont s'éloigner en étirant la poche flagellaire qui se reforme séparément autour de chaque flagelle.

Le cinétoplaste se divise ensuite par bipartition, en s'allongeant, puis en se déprimant dans sa partie médiane et en se séparant enfin en deux parties distinctes.

La bipartition du cinétoplaste est suivie par la division du noyau, tandis que le nouveau flagelle continue de croître. Les modalités suivant lesquelles s'effectue la division du noyau sont encore mal connues. Il est certain que la membrane nucléaire persiste tout au long du processus de division, le support du matériel génétique étant probablement des chromosomes individualisés de petites tailles.

Au stade final de la division nucléaire, la membrane en s'étranglant dans la partie médiane, sépare le noyau en deux noyaux - fils.

Lorsque la division nucléaire est achevée, le cytoplasme se divise à son tour par fission longitudinale. Celle-ci commence à l'extrémité antérieure, puis se poursuit vers l'extrémité postérieure jusqu'à la séparation en deux cellules - filles (ITARD, 1981).

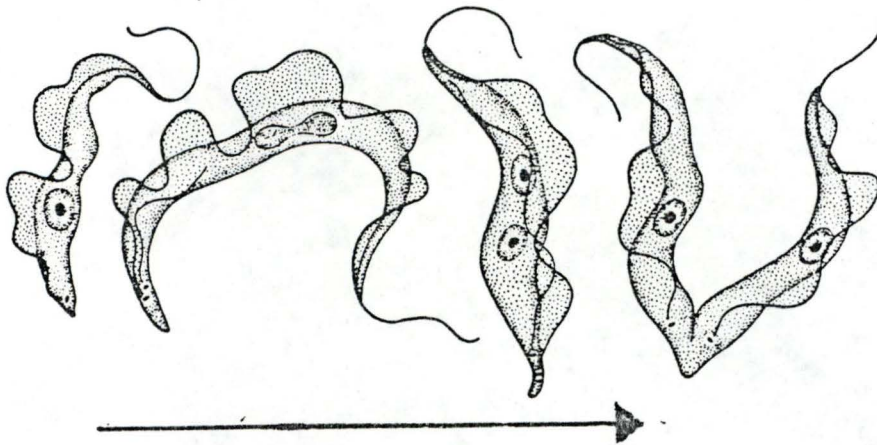


figure 2 schéma du mode de division de *Trypanosoma brucei* (d'après MACKINNON and HAWES, 1961)

1.1.4 Morphologie générale

Les trypanosomes se présentent toujours sous la forme d'une cellule d'où émerge un flagelle. Cette cellule peut varier quant à la taille et à la forme.

Les tailles peuvent aller de 2 à 3 microns pour les micromastigotes à 120 microns pour les plus grands trypanomastigotes. Un trypanosome de taille exceptionnelle de 1400 microns a été signalé dans le sang d'une chauve-souris d'Afrique Centrale, il a été dénommé *Trypanosoma lizae* (MILTGEN et LANDAU, 1979).

1.2 Ultrastructure de *Trypanosoma brucei brucei*.

La configuration normale du parasite doit être considérée en détail pour bien localiser le site d'action des différentes drogues.

1.2.1 Le périplaste

Le périplaste consiste en une paroi entourant tout le trypanosome. Il est formé d'une membrane de 8 à 10 nm soutenue par une couche de fibres microtubulaires.

La surface externe est recouverte d'un glycocalyx. Ce glycocalyx ou *cell coat* contient surtout des glycoprotéines et est le support de l'antigénicité du trypanosome (VICKERMAN, 1969). Sa nature biochimique varie et est en rapport avec les modifications cycliques de l'antigénicité des trypanosomes.

Une couche de 8 à 10 nm sépare la membrane cellulaire des fibres microtubulaires. Les microtubules sont espacés de 20 à 30 nm et parcourent toute la longueur cellulaire.

(KLEINSCHMIDT et KINDER, 1950 ; KRANEVELD, HOUWINK and KREIDEL, 1951)

Les microtubules de *Trypanosoma brucei brucei* sont composés de protofilaments. Ils sont parallèles entre eux et sont disposés en spirale. Leur fonction n'est pas bien précisée: un rôle de squelette, le rôle d'un organe de contraction ou un rôle de conduction.

1.2.2 La poche flagellaire

L'invagination de la paroi cellulaire au niveau du flagelle s'appelle la poche flagellaire. Cette région est libre de microtubules et représente probablement une aire d'absorption et d'excrétion active par diffusion ou endo- et exocytose (BROWN et al., 1965). Des hydrolases acides y ont été démontrées (JADIN et CREEMERS, 1970 ; LANGRETH and BALBER, 1975 ; SEED et al., 1967), elles proviennent du système lysosomal (JADIN, 1978).

1.2.3 Le flagelle

Le flagelle est situé au fond de la poche flagellaire aux bords de laquelle il est attaché par des desmosomes. Le flagelle d'un trypanosome est composé de trois parties:

- Le blépharoplaste qui occupe la région basale a la forme d'un cylindre de 200-250 nm sur 600-700 nm; sa structure interne comporte neuf triplets de fibres d'un diamètre d'environ 25 nm.
- La zone de transition, très courte, est formée de neuf fibres doubles. Chaque doublet est le prolongement de deux des trois fibres du blépharoplaste.
- Le flagelle, lui-même, est formé par une extension de la membrane plasmique englobant l'axonème composé de neuf doubles et de deux simples fibrilles tubulaires. Les neuf doublets occupent une position périphérique et les deux fibrilles simples une position centrale.

L'extrémité libre du flagelle reste un moment accolée à la paroi extérieure de la cellule avant de battre librement. Cette structure a été décrite en microscopie optique sous le nom de membrane ondulante.

1.2.4 Le noyau

Le noyau est limité par une membrane nucléaire formée de deux feuillettes espacés par une distance de 20 à 30 nm. Quelques ribosomes sont accolés sur la face externe du feuillet extérieure. La membrane nucléaire est percée de pores de 80 à 100 nm de diamètre.

Le noyau contient de l'ADN qui contrôle l'activité métabolique et les caractéristiques morphologiques de la cellule. L'ADN est combiné aux protéines de structure pour former la chromatine qui est soit condensée, soit dispersée.

La composition de cet ADN est légèrement différente de celle de l'ADN du cinétoplaste connu sous le terme de kDNA.

1.2.5 Le système mitochondrial

Les trypanosomes contiennent un organite situé à proximité du lieu d'insertion du flagelle. Cet organite différent du noyau est désigné sous le nom de cinétoplaste.

C'est en fait une partie de la mitochondrie très riche en DNA.

1.2.5.1 La mitochondrie

La mitochondrie est limitée par deux membranes: la membrane externe entoure toute la mitochondrie tandis que la membrane interne s'invagine par intervalles pour former les crêtes mitochondriales.

La mitochondrie qui est en continuité avec le cinétoplaste est d'apparence variable

dépendant des besoins métaboliques de la cellule (WILLIAMSON , 1979).L'organisation du système mitochondrial varie au cours du cycle de vie du trypanosome (VICKERMAN , 1965).

1.2.5.2 Le cinétoplaste

On l'a appelé aussi mitochondrie riche en ADN.En effet,il possède à la fois les qualités tinctoriales du noyau et des mitochondries.Le cinétoplaste est en fait une partie fortement dilatée du système mitochondrial au niveau duquel les crêtes sont effacées.

La région centrale contient de l'ADN sous forme de gros filaments enroulés;cet ADN représente 5 à 25% du DNA total cellulaire.

Néanmoins,l'ADN du cinétoplaste est différent de l'ADN nucléaire,bien qu'ils soient tous deux bicaténaires (RIOU et al., 1966).L'ADN du cinétoplaste n'est pas lié à des histones basiques comme dans le noyau (STEINERT , 1965).De plus il a une densité différente de celle de l'ADN nucléaire (RIOU et PAUTRIZEL , 1967).Grâce aux techniques autoradiographiques à la thymidine tritiée,il est apparu que les temps de synthèse des acides nucléiques dans le noyau et le cinétoplaste ne sont pas équivalents (HERION-DELAUNEY , 1965).

Le kDNA de *Trypanosoma gambiense* comporte environ 80 maxicercles de 20000 paires de bases et 4000 minicercles de 1000 paires de bases,le tout lié ensemble de manière à former un réseau de haut poids moléculaire (RIOU et BARROIS , 1981).

1.2.6 Les *microbodies*

Les *microbodies* constituent un ensemble de petites vacuoles limitées par une membrane simple et dont le contenu est finement granulaire et dense.En fait des études combinées de fractionnement cellulaire et de biochimie ont montré que ces *microbodies* désignent différents types de populations de granules se distinguant par leur contenu enzymatique. Parmi les enzymes contenus dans ces *microbodies*, se trouvent les granules d' α -glycérophosphate oxidase (MULLER , 1975).Cet enzyme sert à la réoxydation du NADH avec production d'eau.

OPPERDOES et BORST en 1977 localisèrent chez *Trypanosoma brucei* un certain nombre d'enzymes glycolytiques dans un organelle de type *microbody* , appelé glycosome.

1.2.7 L'appareil vacuolaire

1.2.7.1 L'appareil de Golgi

Il est généralement formé d'un ensemble de sacs allongés, empilés et courbés; les extrémités se prolongent par de petites vésicules de sécrétion.

On le retrouve souvent à proximité du noyau et du cinétoplaste.

Sa fonction n'est pas encore élucidée.

Chez *Trypanosoma brucei*, VICKERMAN en 1962 a remarqué que le Golgi subit une forte dilatation lors de la transformation des *Slender forms* en *Stumpy forms*.

1.2.7.2 Le réticulum endoplasmique

Il est constitué d'un ensemble de minces tubules dont la paroi est soit lisse (RES), soit porteuse de ribosomes (RER). Ces tubules semblent reliés entre eux et en continuité avec la membrane nucléaire.

Certains tubules sont en relation avec la poche flagellaire et y déversent certains produits (JADIN et CREEMERS, 1969).

1.2.7.3 Les lysosomes

Les lysosomes sont des organites cytoplasmiques entourés d'une membrane simple et contenant des enzymes digestifs.

1.2.8 La nutrition des trypanosomes

La nutrition des trypanosomes s'effectue suivant un processus commun à de nombreuses cellules : l'endocytose.

L'extrémité proximale de la poche flagellaire est dépourvue des microtubules du périplaste. C'est à cet endroit qu'ont lieu les processus d'endocytose. Lorsqu'un élément figuré provenant du milieu péricellulaire pénètre dans la poche flagellaire, il est digéré par le contenu enzymatique de la poche. La présence d'enzymes dans cette poche flagellaire a été confirmée, précisée et quantifiée par des méthodes morphologiques en cytochimie et biochimiques après fractionnement cellulaire (EECKHOUT, 1972 a et b ; VAN HOOFF et al., 1977).

Une fois la digestion accomplie, la paroi cellulaire de la poche flagellaire s'invagine, puis les bords de ces invaginations se rapprochent et fusionnent séquestrant ainsi une proie alimentaire dans un phagosome (JADIN, 1978).

Ensuite plusieurs phagosomes se réunissent entre eux pour donner l'un ou l'autre gros phagosome. Ce phagosome entre alors en contact avec un lysosome pour y subir l'action

digestive des enzymes lysosomiaux.

Remarque:

Dans certains cas, on peut observer sur des préparations de trypanosomes des formations pseudomyéliniques incluses soit dans des vésicules, soit dans des mitochondries. Elles ont la forme de membranes enroulées.

Leur signification n'est pas encore précisée.

1.3 Chimiothérapie des trypanosomiasés africaines

1.3.1 Aperçu historique

En 1902, LAVERAN et MESNIL montrèrent que le cytoplasme de *Trypanosoma brucei gambiense*, suite à l'action de l'arsénite de sodium présente de nombreuses granulations chromatiques.

De semblables observations furent faites par THOMAS en 1905 avec l'Atoxyl et le Trypan Rouge.

Dans la première partie de ce siècle, des composés trypanocides plus actifs furent mis au point par EHRLICH à Francfort et par MESNIL ET NICOLLE à Paris.

Au cours de ces cinquante dernières années, de grandes quantités de substances furent testées. Mais seuls, certains produits se sont révélés actifs et furent utilisés couramment pour le traitement de la maladie du sommeil et du Nagana. WILLIAMSON en 1979 a établi une classification de médicaments trypanocides. Sa classification est basée essentiellement sur le caractère ionique et secondairement sur la structure chimique de ces substances. Durant ces vingt dernières années, l'utilisation de drogues plus anciennes diminua suite à l'accroissement de souches résistantes et à la toxicité de certaines drogues (MESHNICK et al., 1978 ; MESHNICK , 1984 ; WILLIAMSON , 1976).

A ce moment, l'accent fut tourné vers la biochimie des trypanosomes. L'identification de différences biochimiques entre l'hôte et le parasite permit la mise au point de nouveaux médicaments.

Ainsi, le système de la glycérol-phosphate oxidase, système important pour le trypanosome et inexistant chez l'hôte vertébré, représente une cible pour l'acide salicylhydroxamique (SHAM) (BARNICOAT et al., 1981 ; FAIRLAMB et al., 1977 ; MESHNICK , 1984 ; OPPERDOES et al., 1975).

protozoaire à synthétiser l'hème (MESHNICK et al., 1977 ; 1978)

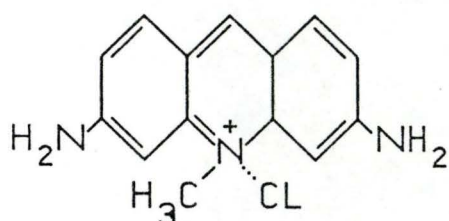
La voie de synthèse des polyamines représente une cible à l'action d'agents chimiothérapeutiques. Ainsi, le DFMO est un puissant inhibiteur de l'ODC (BACCHI et al., 1982 ; GIFFIN et al., 1986).

1.3.2 Présentation des drogues employées

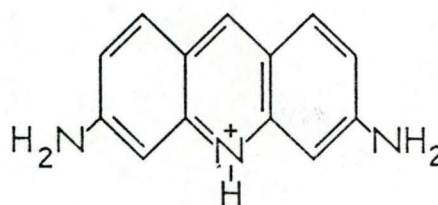
1.3.2.1 L'Acriflavine

L'Acriflavine contient du 3,6-diamino-acridine (Proflavine) mélangé dans des proportions 1:2 avec du 3,6-diamino-10-méthyl-acridium chloride (Trypaflavine) (WILLIAMSON , 1979).

Trypaflavine



Proflavine



L'Acriflavine, si elle est utilisée à une dose inférieure à la dose curative, peut permettre d'étudier certains aspects de la structure du métabolisme de la cellule cible, c'est à dire du trypanosome.

Effets sur *Trypanosoma rhodesiense* (MACADAM and WILLIAMSON , 1967 , 1974)

Les principales lésions se situent au niveau du noyau et du cinétoplaste. L'Acriflavine induit une perte de la membrane nucléaire associée à une dispersion de la chromatine dans le cytoplasme et à une fragmentation nucléolaire. Le pouvoir de ces aminoacridines de se lier au DNA en s'intercalant dans la séquence de bases rend compte de ces effets nucléaires et nucléolaires.

La perte des ribosomes induite par l'Acriflavine est précédée par l'apparition de formes hypertrophiées et une diminution de la densité électronique. Ces formes hypertrophiées sont probablement de petits ribosomes agrégés. L'altération et finalement la perte ribosomique sont une conséquence logique de l'inhibition de la synthèse du RNA ribosomique associée à la désintégration nucléolaire.

Un effet caractéristique de l'Acriflavine est l'apparition de microgranules osmiophiles, d'une densité élevée, dans le cytoplasme. Ils n'ont pas de membrane délimitée. Ce sont

probablement des fragments de chromatine indicateurs d'une inactivation du DNA template (RECKER , SYKES and CHAN , 1976).

L'Acriflavine, en commun avec beaucoup de drogues cationiques, attaque le DNA du cinétoplaste jusqu'à une destruction presque totale.

L'Acriflavine condense le kDNA sous une forme discoïde, cela est sans doute dû au fait qu'elle peut s'intercaler en se liant aux paires de bases adénine-thymine (STECK , 1972) mais qu'elle peut également former des agrégats externes le long des groupes phosphates dorsaux du grand brin (DELAIN et al., 1971).

La destruction du kDNA donne naissance à des formes dites "dyscinétoplastiques". Ces formes, présentant des mitochondries non fonctionnelles, sont incapables de grandir en culture ou de survivre chez des insectes vecteurs. Mais les formes sanguines dyscinétoplastiques peuvent se multiplier.

En 1980 , des travaux de RIOU , BELNAT et BENARD sur *Trypanosoma equiperdum* suggérèrent que ni les mini-cercles, ni les maxi-cercles du kDNA ne sont essentiels pour la vie et la pathogénicité des trypanosomes sanguins.

Les cinétoplastes des formes dyscinétoplastiques ne sont plus détectables avec les colorants basiques au microscope optique, mais en microscopie électronique, il subsiste un petit corps granuleux et dense. La nature de ce corps résiduel reste encore obscure mais on croit qu'il devrait s'agir d'un résidu de kDNA hautement condensé.

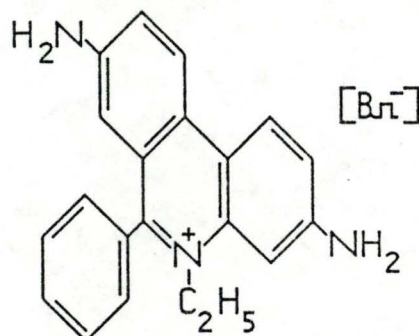
L'Acriflavine qui est fluorescente est captée par les lysosomes des cellules vivantes de mammifères (ALLISON , 1968). Le composé Proflavine de l'Acriflavine se localise à la fois au niveau du noyau et des lysosomes, tandis que le composé Trypaflavine est trouvé seulement dans le noyau.

Après traitement à l'Acriflavine, la proportion de lysosomes évacués est augmentée de 3 à 4 fois, bien que le nombre total de lysosomes reste constant. Les lysosomes endommagés par la drogue, en libérant leurs hydrolases lysosomiales, contribuent à beaucoup de lacunes intracellulaires non spécifiques de la drogue.

L'Acriflavine, en commun avec d'autres drogues cationiques est capable de réagir avec des groupes intracellulaires anioniques autres que ceux des acides nucléiques. Les plus importants sont les phospholipides membranaires. Par ce moyen, il y a entrée facilitée des drogues solubles dans l'eau et totalement ionisées à l'intérieur et au travers des lipides de membrane. Cela conduit à des dommages intracellulaires, tels que la dilatation de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique.

1.3.2.2 Le Bromure d'éthidium

3,8-diamino-5-éthyl-6-phényl-phénanthridinium bromide



L'éthidium est un des composés les plus actifs de la série des aminophénanthridines, il a été utilisé pour son activité thérapeutique à cause de l'isomérisme de la phénanthridine avec le noyau acridine de l'Acriflavine. A part un usage intensif dans le traitement des trypanosomoses du bétail dans l'ouest de l'Afrique, c'est devenu, tout comme l'Acriflavine, un moyen d'étude métabolique. De fait, il a un effet inhibiteur spécifique sur la synthèse du DNA (NEWTON, 1957).

En 1974, MACADAM et WILLIAMSON ont observé chez *Trypanosoma rhodesiense* un changement morphologique dans le cinétoplaste où le kDNA est anormalement condensé et dans la mitochondrie qui est généralement dilatée avec un enroulement de la membrane. Un travail montra que des polymérases de DNA isolé et que des polymérases de RNA amorcé au DNA sont sensibles à la drogue et que c'est le résultat de l'intercalation de la drogue avec le DNA. Cela cause un déroulement local et un allongement de l'hélice du DNA (GUTTERIDGE and COOMBS, 1977).

La synthèse du kDNA chez *Crithidia luciliae* et chez *Trypanosoma cruzi* était plus susceptible d'être inhibée par l'éthidium que la synthèse du DNA nucléaire (RIOU, 1970). La base de la sensibilité sélective du kDNA à l'éthidium et aux autres trypanocides cationiques réside dans une combinaison de facteurs tels que absence d'histones, position adjacente à la poche flagellaire qui est très active du point de vue phagocytose (STEINERT, 1971).

La condensation du kDNA produite par le Bromure d'éthidium est différente de celle produite par l'Acriflavine. La condensation induite par le Bromure d'éthidium est plus amorphe et ne montre aucun profil discoïde que l'on trouve avec l'Acriflavine.

DELAIN, en 1971, note que le mode de liaison de la drogue peut affecter le type de condensation du kDNA.

Le Bromure d'éthidium provoque une dilatation de la mitochondrie. Cela est dû

Le Bromure d'éthidium provoque une dilatation de la mitochondrie. Cela est dû probablement à une interférence avec la synthèse de la membrane mitochondriale ou une altération de l'environnement ionique, auquel les mitochondries en général sont particulièrement sensibles.

Des travaux effectués par FROMENTIN en 1973 ont montré que la consommation d'oxygène par *Trypanosoma gambiense* rendu dyscinétoplastique suite à l'action de Bromure d'éthidium est réduite de moitié (FROMENTIN , 1973 ; FROMENTIN et al., 1974).

Effets sur *Trypanosoma congolense* , *Trypanosoma brucei* , *Trypanosoma vivax*

(TOURE , 1971)

Le Bromure d'éthidium ajouté à des trypanosomes in vitro provoque un détachement étendu de la membrane nucléaire suivi de la rupture et la fragmentation du nucléoplasme. Des agrégats ribosomiques sont formés laissant des espaces vides dans le cytoplasme. L'absence de structures mitochondriales et cinétoplastiques suggère qu'elles étaient une des premières cibles de la drogue.

Seuls le flagelle et la membrane cellulaire restent intacts.

Toxicité

La toxicité du Bromure d'éthidium présente plusieurs aspects : alopecies , photosensibilisation , dermatite , larmolement , nécrose tissulaire à l'endroit de l'injection et atteinte médullaire (agranulocytose) lors de traitements prolongés.

Vu ces inconvénients majeurs , on évite depuis plus de 20 ans, d'utiliser cette drogue chez l'homme.

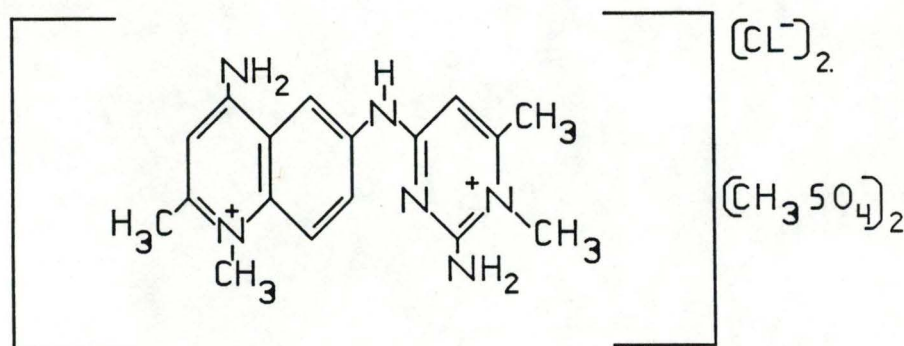
Remarque

Les inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques peuvent se lier au DNA de n'importe quelle source. La sélectivité de leur action n'est pas fonction de leur capacité de discerner entre du DNA de différentes sources, mais elle semble être plutôt fonction de la perméabilité de la drogue qui pénètre plus rapidement dans les protozoaires que dans les cellules de l'hôte (GUTTERIDGE and COOMBS , 1977).

1.3.2.3 L'Antrycide

L'Antrycide ou quinapyramine est soit sous forme d'un sel facilement soluble (chlorure ou diméthosulfate), soit le plus souvent sous la forme d'un mélange de ces deux sels.

C'est un mélange qui est commercialisé sous le nom d'Antrycide Prosalt.



L'Antrycide est un agent curatif employé pour les trypanosomoses animales d'Afrique, mais son utilisation au cours des récentes années a été restreinte par l'étendue des souches résistantes (WILLIAMSON, 1979).

Effets sur *Trypanosoma rhodesiense* (MACADAM and WILLIAMSON, 1974)

L'Antrycide produit une dilatation considérable de la mitochondrie. Cette dilatation est semblable à celle décrite avec le Bromure d'éthidium.

L'Antrycide provoque également des dommages au kDNA. Des expériences récentes ont montré qu'une dose curative d'Antrycide à des souris infestées de *Trypanosoma rhodesiense* peut produire jusqu'à 31% de formes dyscinétoplastiques, 6 heures après le traitement et jusqu'à 46% après 22 heures.

L'attaque sélective de l'Antrycide sur le kDNA s'explique probablement par les mêmes raisons que celles décrites auparavant pour l'éthidium.

Mais il semble qu'un autre facteur moins évident peut expliquer l'attaque sélective sur le kDNA : Cela a trait à la configuration moléculaire affectant le passage membranaire. La sortie des drogues et des colorants hors des organelles est régie par un contrôle actif de la perméabilité.

L'Antrycide produit une condensation terminale et discoïde du kDNA (DELAIN et al., 1971).

On ne connaît pas la nature de la liaison Antrycide-DNA.

L'effet le plus important de la drogue est l'inhibition de la synthèse des protéines. L'Antrycide

agit en déplaçant des ions magnésium et des polyamines; cela provoque une aggrégation et une inactivation des ribosomes cytoplasmiques, ce qui a pour effet d'inhiber le taux de croissance des trypanosomes (GUTTERIDGE and COOMBS , 1977).

L'Antrycide ne vise pas la synthèse de l'ADN ou de l'ARN dépendant d'ADN. En effet, la structure nucléaire et nucléolaire n'est pas altérée.

Effets sur *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma brucei* et *Trypanosoma vivax*

(TOURE . 1971)

Les effets de l'Antrycide sur ces trypanosomes sont semblables à ceux produits par l'éthidium, excepté qu'ils sont produits plus lentement; le noyau est moins endommagé.

Toxicité (MESHNICK . 1984)

L'Antrycide peut présenter un effet semblable au curare sur le bétail 10 à 30 minutes après l'administration. Le bétail souffre de transpiration excessive, salivation, tremblements, d'une augmentation du rythme cardiaque et respiratoire et d'affaiblissement temporaire. Certains animaux peuvent mourir de cette drogue soit sans qu'il y ait eu rétablissement, soit 6 à 20 jours après un rétablissement apparent. Ces derniers animaux meurent de gastroentérite hémorragique, d'œdèmes pulmonaires et péricardiques et d'insuffisance rénale.

CHAPITRE 2 BUT DU TRAVAIL

Notre but est de réaliser une étude comparative de trois drogues intercalantes, à savoir l'Acriflavine, le Bromure d'éthidium et l'Antrycide.

On sait depuis longtemps que ces médicaments ont un effet trypanocide.

M.F. MERLEVEDE (1980 - 1981) a étudié la toxicité hépatique de ces drogues administrées aux doses thérapeutiques habituelles.

Notre but est d'utiliser ces médicaments en choisissant délibérément une seule administration avec une dose conforme à ce qui est cité par James WILLIAMSON (1979), le grand spécialiste en la matière.

Nous nous intéressons à l'effet de ces trois substances sur l'évolution de la parasitémie ainsi qu'aux modifications cytologiques qu'elles imposent aux trypanosomes. Ces modifications sont suivies tant en microscopie optique qu'en microscopie électronique conventionnelle.

CHAPITRE 3 MATERIEL ET METHODES

3.1 Le parasite

Au cours de ce travail, nous avons utilisé une souche de *Trypanosoma brucei brucei* LUMP 127.

3.2 Le maintien de la souche

Il s'effectue par passages mécaniques répétés tous les 3 ou 4 jours. Cela consiste en une injection intrapéritonéale de sang provenant de souris infestées et dilué dans du PBS. Cette injection est réalisée sur des souris ou des rats sains.

Formule du PBS (Phosphate Buffer Saline)

Solution A : 21,25 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (P.M. :137,99) pour 1000 ml d' H_2O

Solution B : 18,30 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (P.M. :177,99) pour 1000 ml d' H_2O

Ces deux solutions sont ensuite mélangées selon les proportions suivantes:

1,36 volume de solution A et 8,64 volumes de solution B (LUMSDEN et al., 1973).

La quantité de solution injectée par souris est de 0,5 ml et de 1 ml pour un rat.

3.3 L'hôte vertébré

Nous avons utilisé deux hôtes vertébrés : à savoir la souris NMRI dont dispose l'animalerie de la Faculté des Sciences, et le rat WISTAR également disponible à l'animalerie.

Ces souris et rats avaient nourriture et boisson "ad libitum".

Le sexe des individus employés n'a pas été pris en considération dans nos expériences.

3.4 Etude du nombre et de la morphologie de *Trypanosoma brucei brucei*

Des frottis sanguins sont réalisés de la façon suivante: une goutte de sang est déposée à l'extrémité d'une lame au contact de laquelle on amène l'arête d'une autre lame. Le sang fuse par capillarité et on fait ensuite glisser la lame d'un mouvement régulier de manière à obtenir une répartition homogène de la goutte.

Les frottis sont alors fixés au méthanol avant d'être colorés au Giemsa.

L'observation se fait au microscope optique Zeiss KM à un grossissement de 1000 fois.

3.4.1 Etude du nombre de trypanosomes

Le nombre de trypanosomes est estimé par comptage des globules rouges et des trypanosomes à un grossissement de 1000 fois. Le nombre de champs examinés par frottis est de 20 et plusieurs frottis provenant de souris identiques et de souris différentes, soumises aux mêmes conditions, sont observés.

Le rapport entre le nombre de trypanosomes et le nombre de globules rouges est obtenu et exprimé en pourcent.

3.4.2 Etude de la morphologie des trypanosomes

Le pourcentage de formes anormales est déterminé comme suit: l'observation s'effectue à un grossissement de 1000 fois et le nombre de champs examinés varie en fonction du nombre de trypanosomes pour des raisons de précision. On observe 20 champs si le nombre de trypanosomes dépasse 5%, 50 champs si ce nombre est compris entre 1 et 5% et 100 champs pour des valeurs inférieures à 1%.

Plusieurs frottis provenant de la même souris et de souris différentes, traitées dans les mêmes conditions, sont examinés.

Ensuite, chaque trypanosome est classé dans une catégorie bien définie et on établit ainsi un pourcentage de trypanosomes dans chaque catégorie.

La même méthode est employée pour les trois drogues utilisées.

3.5 Injection des drogues

Les drogues utilisées se présentent sous forme de "poudre" et elles sont mises en solution dans du PBS (voir plus haut) à la dose appropriée. Les différentes doses injectées sont celles citées par WILLIAMSON, 1979.

L'injection se fait de manière intrapéritonéale dans les trois cas.

Toutes les expériences ont été réalisées après une seule injection. Le temps séparant l'inoculation des trypanosomes et l'injection des drogues varie en fonction de l'action plus ou moins efficace de la drogue utilisée.

3.6 Etude de *Trypanosoma brucei brucei* en microscopie électronique à transmission

-Par section de la tête, le sang des souris est prélevé et recueilli dans un milieu PSG contenant de l'héparine.

PSG (Phosphate Buffer Saline - Glucose) à pH 8

a) Solution mère dite PS:

16,9 gr de $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (P.M.:177,99)

0,7 gr de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (P.M.:137,99)

4,25 gr de NaCl (P.M.:58,44)

1000 ml d' H_2O bidistillée

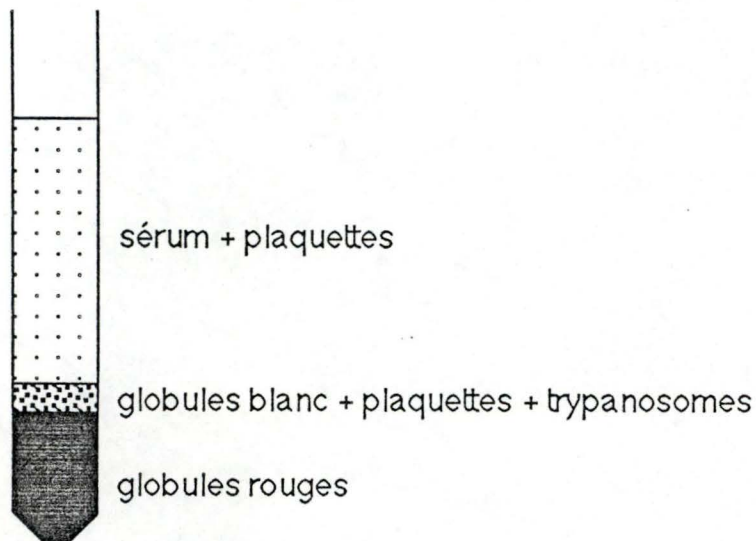
b) Solution PSG:

On dilue 6 volumes de la solution PS avec 4 volumes d' H_2O bidistillée et on ajoute 1% de glucose afin de maintenir l'osmolarité.

On obtient de la sorte une solution de pH 8 et de force ionique=0,217.

-Centrifugation à 2500 tours/minute pendant 20 minutes à 4°C.

Le profil obtenu est le suivant:



-L'interface est récoltée et déposée dans un tube de microfuge avec quelques gouttes de glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon PO_4 0,1M à pH 7,2.

Tampon PO_4 0,1M

a) $\text{Na H}_2 \text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (P.M.:138)

Solution 1M : 138 gr/1000cc

0,1M : 13,8 gr / 1000cc

b) $\text{Na}_2 \text{H PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (P.M.:178)

Solution 1M : 178 gr /1000cc

0,1M : 17,8 gr/1000cc

On prend 140 cc de a et on ajoute du b pour arriver à pH7,2.

-Passage à la microfuge Beckman de modèle B pendant 4 minutes.

-Le culot contenant des trypanosomes est récupéré par découpe du fond du tube de la microfuge.

-Fixation des petits culots dans de la glutaraldéhyde 2,5% durant 2h30.

Rem : Ces 2h30 débutent au moment où la glutaraldéhyde est ajoutée à l'interface (voir plus haut).

-Lavage dans du tampon PO_4 0,2M pH 7,2.

-Fixation dans OsO_4 1% dans tampon PO_4 0,1M durant une heure.

-Lavage dans le tampon PO_4 0,2M.

-Déshydratation : alcool 50° : 1 x 10'

alcool 70° : 1 x 10'

alcool 90° : 1 x 10'

alcool 100° : 2 x 10'.

-Inclusion : Dans l'époxyde de propylène 4 x 10 minutes.

Dans le mélange oxyde de propylène / épon 2 x 15 minutes.

Mise en plaquettes.

Etuve à 37° durant 12h

47° durant 24h

60° durant 72h.

-Polymérisation : Les sections sont effectuées par un ultratome Reichert Austria OMU 3.

-Coloration : Les coupes semi-fines sont colorées au Bleu de toluidine.

Les coupes ultra-fines sont contrastées à l'acétate d'uranyleet au citrate de plomb (MILLONIG , 1961 ; REYNOLDS , 1963).

-Les grilles sont examinées au microscope électronique Philips EM 301 sous une différence de potentiel de 60 KV.

CHAPITRE 4 RESULTATS

4.1 Etude de *Trypanosoma brucei brucei*

4.1.1 Etude en microscopie optique

A partir de l'examen de frottis sanguins réalisés sur souris infestées de trypanosomes, on observe -- des trypanosomes "*Slender form* " avec le noyau et le cinétoplaste colorés (fig. 4.1.1.1).

-- des trypanosomes à différents stades de la division (fig 4.1.1.1).

-- des trypanosomes "*Stumpy form* ".

4.1.2 Courbe de parasitémie

Des frottis sanguins sont effectués à différents moments après l'inoculation des trypanosomes, ceci jusqu'à la mort des souris.

Le nombre de trypanosomes est estimé par la méthode détaillée au point 3.4.1.

Les résultats sont présentés au tableau 4.1.2 et à la figure 4.1.2. Seule, la moyenne des différentes valeurs obtenues est reprise.

La courbe de parasitémie peut être scindée en trois périodes.

--La période de latence

En deça de 24 heures, on ne retrouve pas de trypanosomes dans le sang.

--La période de multiplication active

Elle s'étend de 24h à 78h. Durant cette période, les trypanosomes se divisent par bipartition pour atteindre des valeurs d'un trypanosome pour trois ou quatre globules rouges.

--La période mortelle

Les souris meurent après un intervalle de temps variant de 75h à 85h après l'inoculation des trypanosomes.

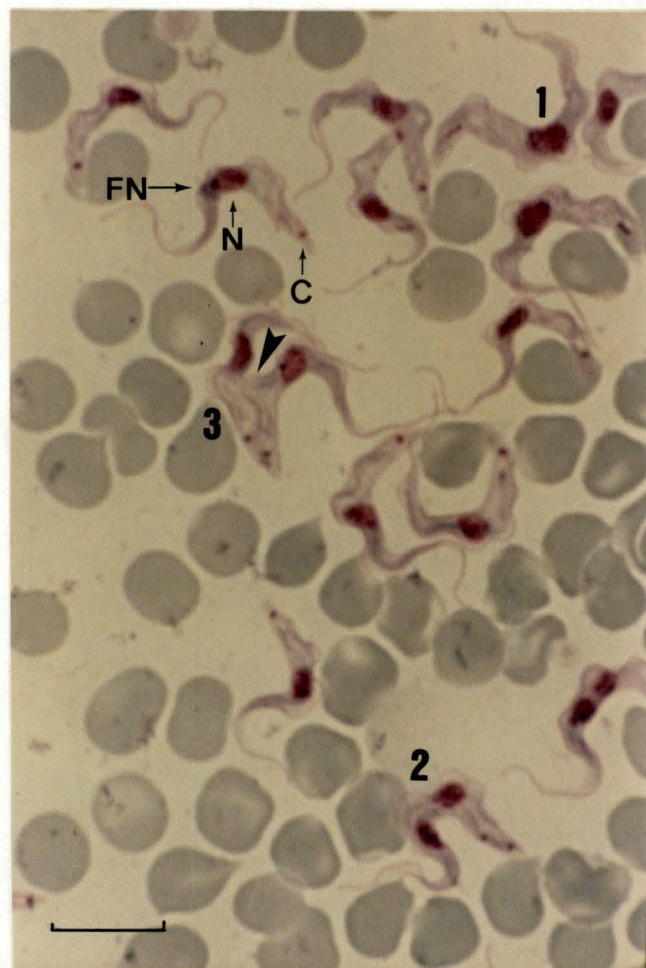
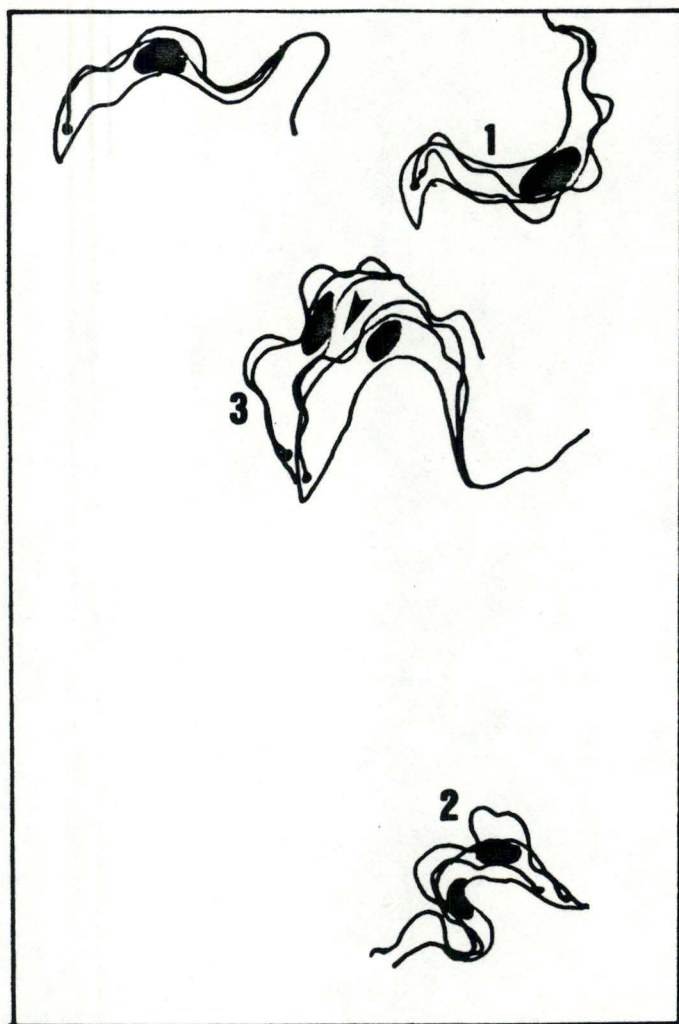


Fig. 4.1.1.1 – Frottis de sang de souris infestée de *Trypanosoma brucei brucei*.

On y retrouve des formes normales de type "slender form" (FN) présentant un cinétoplaste (C) et un noyau (N) bien colorés.

Différents stades de la division peuvent être retrouvés sur ce frottis:

- 1) Le cinétoplaste se scinde en deux et le nouveau flagelle commence sa croissance.
- 2) Le noyau s'est divisé en deux parties et le nouveau flagelle s'individualise.
- 3) La fission longitudinale (flèche) va aboutir à la séparation en deux trypanosomes-fils.

Tableau 4.1.2 : Courbe de parasitémie

Temps(heures)	Nombre(%)
0	0
24	0,1
44	1,3
48	2,1
53	2,9
56	4,4
67	10,3
71	15,8
78	28,1
82	28,6

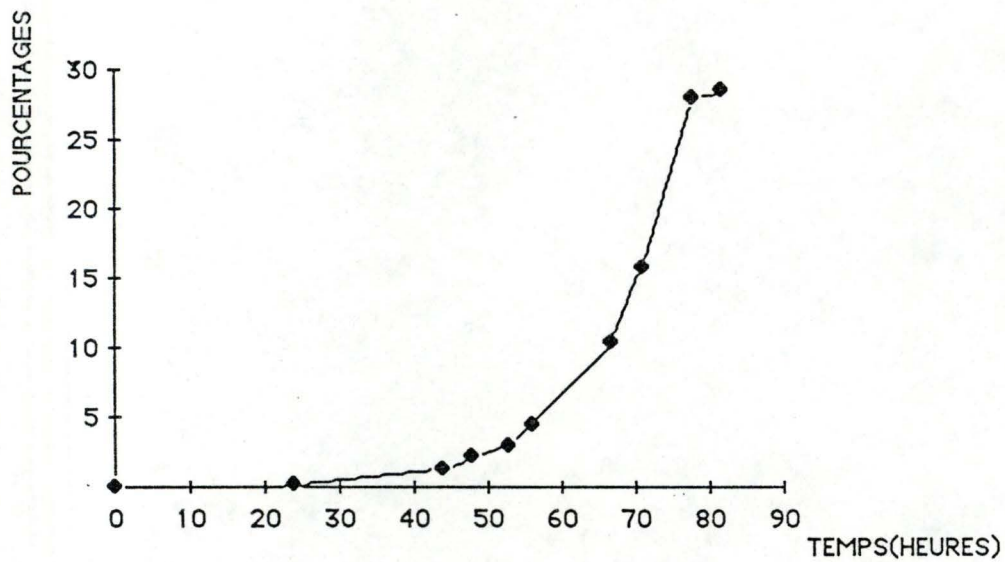


Figure 4.1.2 : Courbe de parasitémie.

Le nombre de parasites s'exprime par rapport à cent globules rouges et ce, en fonction du temps.

4.1.3 Etude en microscopie électronique

1) Le périplaste

Le trypanosome est entouré par une simple membrane recouverte d'une couche de protéines antigéniques : le glycocalix. (Fig 4.1.3.6)

Une rangée de fibres microtubulaires est située sous la membrane. On remarque qu'une structure d'origine tubulaire, semble t'il, s'insère et englobe des groupes de 3 ou 4 microtubules.

(Fig. 4.1.3.7 ; Fig. 4.1.3.8 ; Fig. 4.1.3.12)

2) Le noyau

Le noyau est délimité par un double feuillet : un feuillet interne qu'un espace virtuel sépare d'un feuillet externe sur lequel de nombreux ribosomes sont accolés (Fig. 4.1.3.12).

La chromatine est soit dispersée, soit condensée.

(Fig. 4.1.3.9 ; Fig. 4.1.3.10 ; Fig. 4.1.3.11)

Le feuillet externe du noyau peut être en rapport avec les microtubules du périplaste.

(Fig. 4.1.3.12)

3) Les organites cytoplasmiques

a) Les ribosomes

Les ribosomes occupent l'entiereté du cytoplasme. Ils sont répartis de façon homogène.

(Fig. 4.1.3.3 ; Fig. 4.1.3.5)

b) Le réticulum endoplasmique

Il est formé d'un ensemble de minces tubules recouverts (RER) ou non (RES) de ribosomes.

Certains tubules sont en continuité avec la membrane nucléaire.

(Fig. 4.1.3.5 ; Fig. 4.1.3.9 ; Fig. 4.1.3.11)

c) L'appareil de Golgi

Il est constitué d'un empilement de sacs aplatis dont les extrémités se détachent pour former des vésicules de sécrétion.

(Fig. 4.1.3.9)

d) Les glycosomes

Les glycosomes sont des organites cytoplasmiques à membrane simple et à contenu dense.

(Fig. 4.1.3.3; Fig. 4.1.3.9 ; Fig. 4.1.3.15)

e) Les lysosomes

Les lysosomes sont des organites cytoplasmiques à membrane simple et à contenu très dense. Ils apparaissent très opaques aux électrons.

(Fig. 4.1.3.9)

4) L'appareil mitochondrial

Il est composé de deux parties : la mitochondrie et le cinétoplaste qui n'est en fait qu'une partie de la mitochondrie enrichie en DNA et appauvrie en crêtes mitochondriales.

a) Le cinétoplaste

Le cinétoplaste situé au pied de la poche flagellaire contient de l'ADN sous forme de gros filaments enroulés.

(Fig. 4.1.3.2 ; Fig. 4.1.3.3 ; Fig. 4.1.3.7)

b) La mitochondrie

La mitochondrie qui est en continuité avec le cinétoplaste est limitée par une double membrane commune à tout l'appareil mitochondrial.

Le feuillet interne se replie par endroit pour former les crêtes mitochondriales.

(Fig. 4.1.3.2 ; Fig. 4.1.3.3)

5) La poche flagellaire

Elle se présente comme une invagination de la paroi cellulaire où prend racine le flagelle.

Cette région du périplaste est dépourvue de microtubules et de ce fait est l'endroit favorisé pour les phénomènes d'endocytose nécessaires à la nutrition du trypanosome.

De fait, on retrouve des éléments figurés au sein de la poche flagellaire.

On remarque que les phagosomes en formation sont associés à des tubules.

(Fig. 4.1.3.3 ; Fig. 4.1.3.5 ; Fig. 4.1.3.13 ; Fig. 4.1.3.14 ; Fig. 4.1.3.15 ; Fig. 4.1.3.16)

6) Le flagelle

En coupe transversale, on distingue trois régions:

- La région basale est constituée du blépharoplaste qui contient neuf triplets de fibrilles tubulaires en position périphérique. (Fig. 4.1.3.7)
- La région intermédiaire est constituée de neuf doublets périphériques sans tubules centraux. (Fig. 4.1.3.5)
- Le flagelle lui-même est constitué de neuf doublets périphériques et de deux tubules centraux. (Fig. 4.1.3.3 ; Fig. 4.1.3.4 ; Fig. 4.1.3.6; Fig. 4.1.3.13 ; Fig. 4.1.3.14)

7) La division

La division qui s'effectue par bipartition débute par la formation de deux poches flagellaires à partir d'une seule (Fig. 4.1.3.4) ; ensuite, le cinétoplaste, puis le noyau se scindent en deux parties, et enfin la cellule entière se divise en deux cellules- filles.

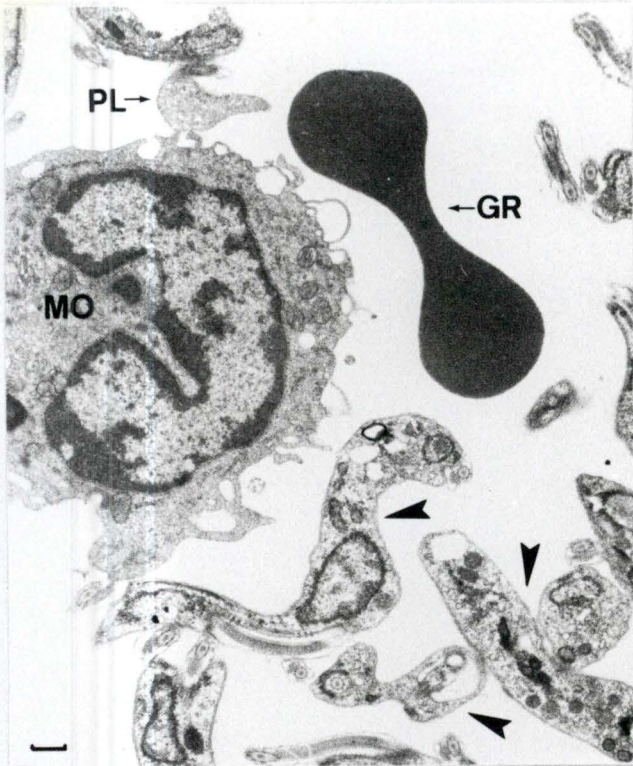


Fig. 4.1.3.1 -- Cette figure reprend les différents éléments rencontrés au cours de l'observation. On y retrouve une section d'un monocyte (MO), un globule rouge (GR), une section de plaquette sanguine (PL) ainsi que de nombreuses sections de *Trypanosoma brucei brucei* (flèches).
Gross. : 9000X

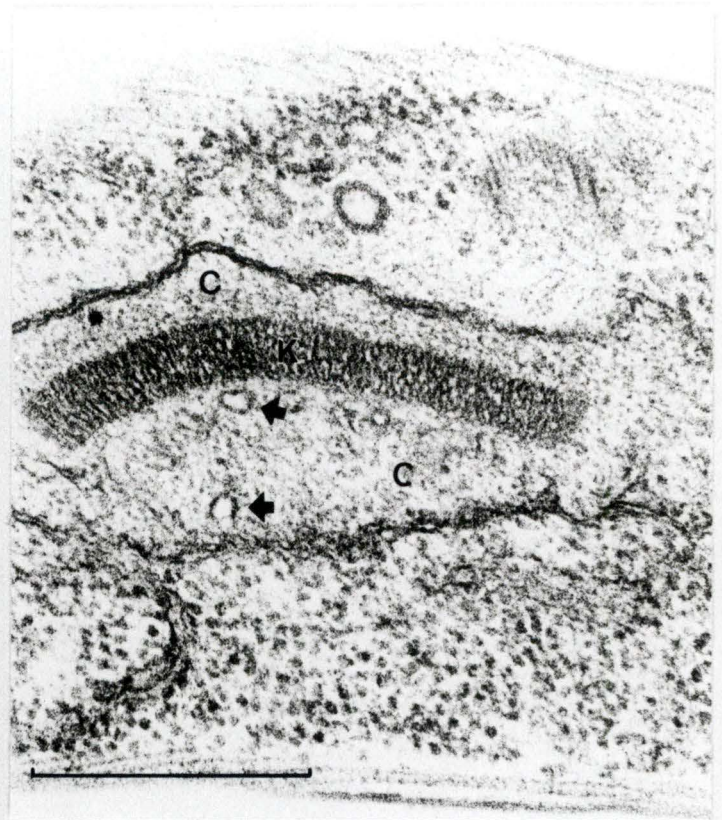


Fig. 4.1.3.2 -- Section de *Trypanosoma brucei brucei*
On y observe le cinétoplaste (C) à double paroi, contenant le kDNA allongé (K).
Notons la présence de quelques crêtes mitochondriales (flèches).
Gross. : 72000X

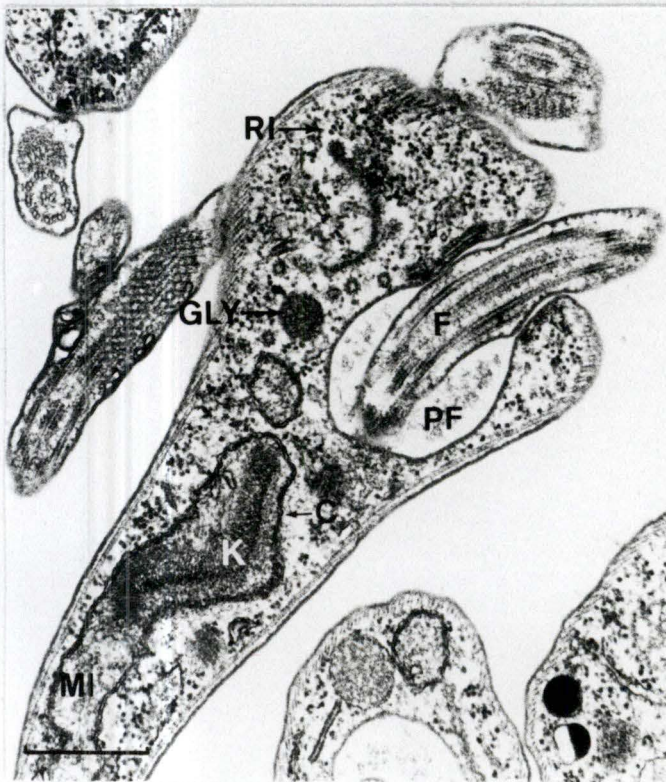


Fig. 4.1.3.3 -- Section de *Trypanosoma brucei brucei*
On y remarque la présence de la poche flagellaire (PF) d'où émerge le flagelle (F). Au pied de la poche flagellaire, on observe l'appareil mitochondrial comprenant le cinétoplaste (C), le kDNA (K) et la mitochondrie (MI).
Le cytoplasme contient des ribosomes (RI) et un glycosome (GLY).
Gross. : 32400X

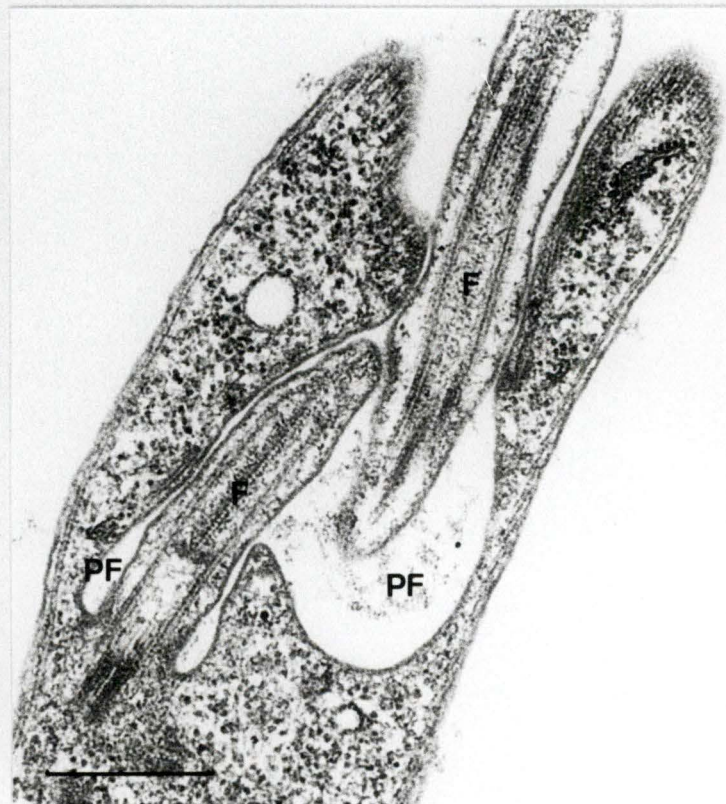


Fig. 4.1.3.4 -- Section de *Trypanosoma brucei brucei* en cours de division
On y observe deux flagelles (F), ainsi qu'une déviation de la poche flagellaire (PF) précédant la séparation en deux poches bien distinctes.
Gross. : 45000X

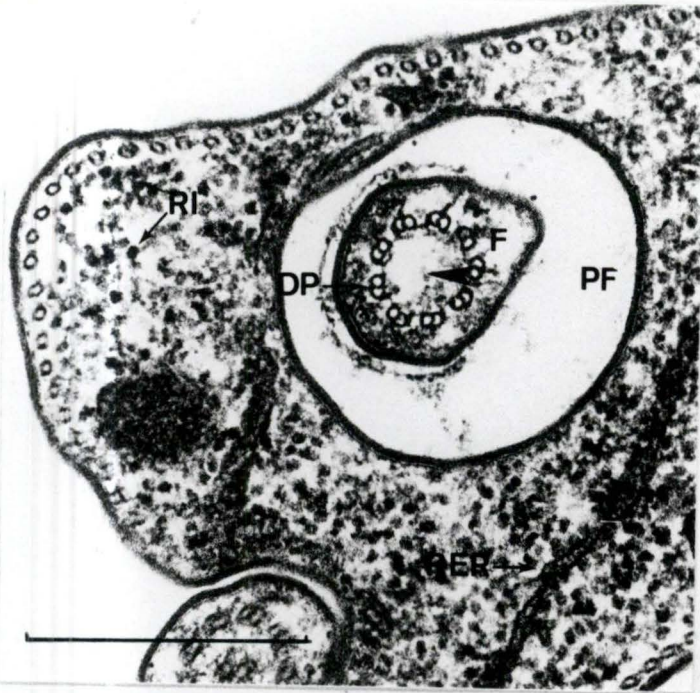


Fig. 4.1.3.5 --Section de *Trypanosoma brucei brucei*

On y observe la poche flagellaire (PF) au sein de laquelle se trouve une section du flagelle (F) au niveau de la zone de transition. On observe les neuf doublets périphériques (DP) et l'absence des tubules centraux (flèche).

Notons la présence de ribosomes (RI) et d'un réticulum endoplasmique rugueux (RER).

Gross. : 72000X

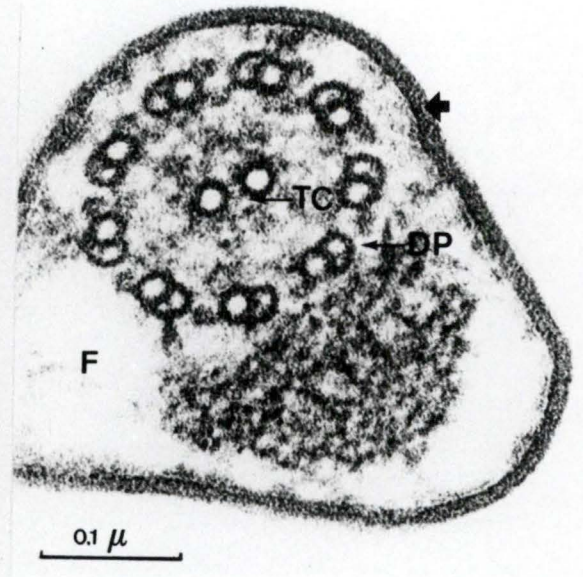


Fig. 4.1.3.6 --Section de *Trypanosoma brucei brucei*

On y observe une section transversale du flagelle (F), les neuf doublets périphériques de fibrilles tubulaires (DP) et les deux tubules centraux (TC).

Remarquons également la présence du glycocalix (flèche).

Gross. : 189000X

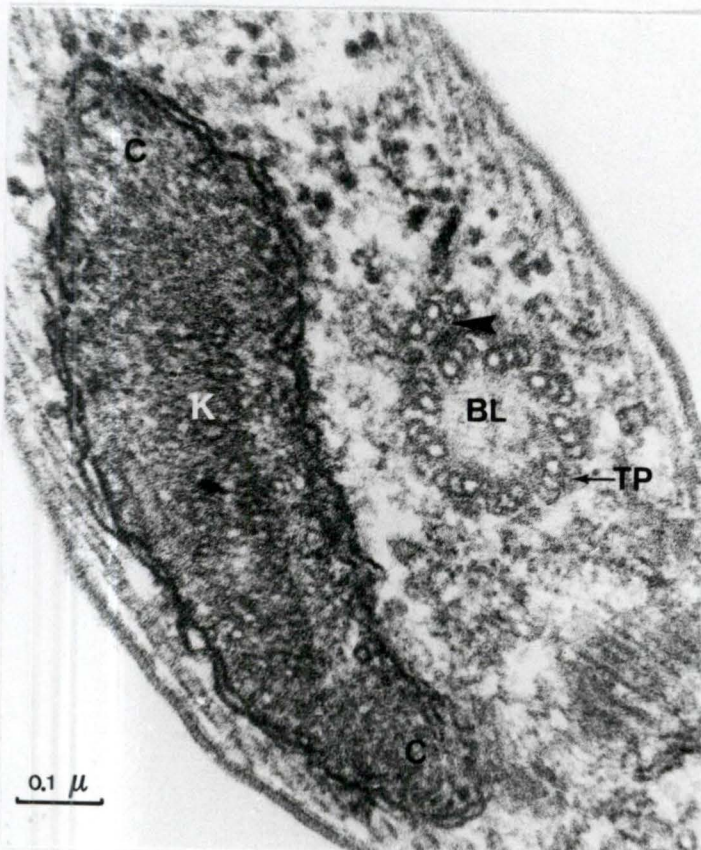


Fig. 4.1.3.7 --Section de *Trypanosoma brucei brucei*

On y observe outre le cinétoplaste (C) et son kDNA (K), une section du flagelle au niveau du biépharoplaste (BL). Sa structure comprend neuf triplets de fibrilles en position périphérique (TP), et un triplet supplémentaire est également visible (flèche).

Gross. : 117000X

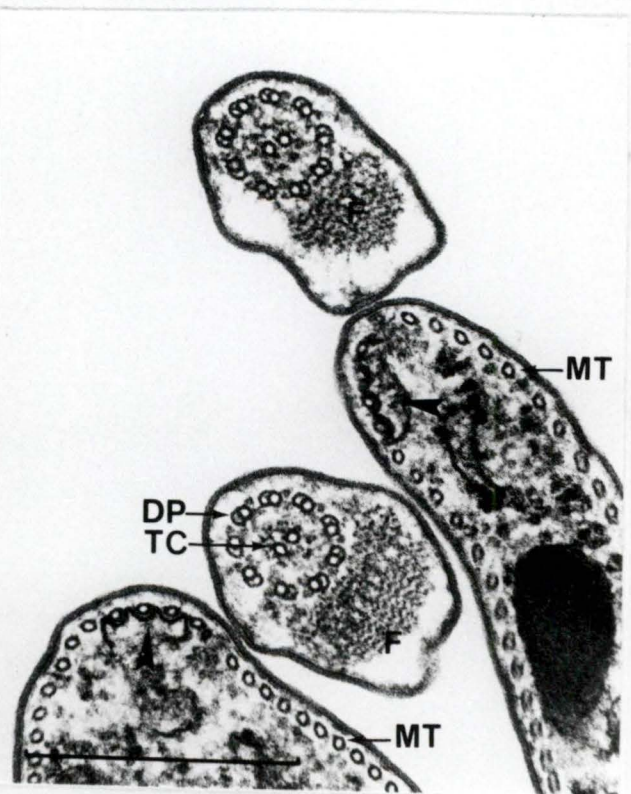


Fig. 4.1.3.8 --Section de *Trypanosoma brucei brucei*

Sur cette figure, on retrouve deux sections de trypanosome ainsi que deux sections de flagelle (F). Les microtubules du périplaste (MT) et les tubules du flagelle (DP et TC) sont bien apparents.

Notons la double présence d'une structure toute particulière (flèche) qui englobe certains microtubules du périplaste (MT).

Gross. : 72000X

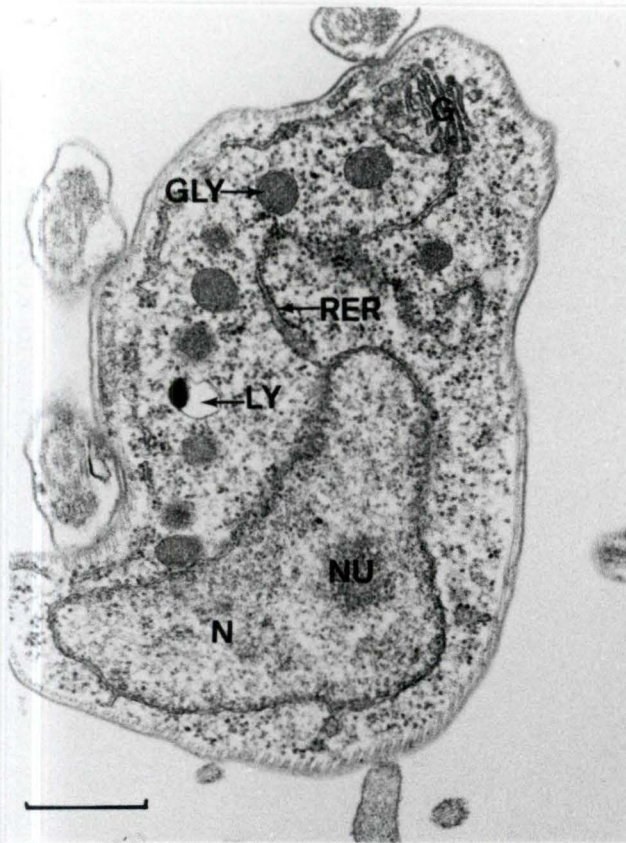


Fig. 4.1.3.9 --Section de *Trypanosoma brucei brucei*

On y observe le noyau (N) avec son nucléole (NU), le RER, le Golgi (G), un lysosome (LY) et enfin plusieurs glycosomes (GLY).
Gross. : 32400X

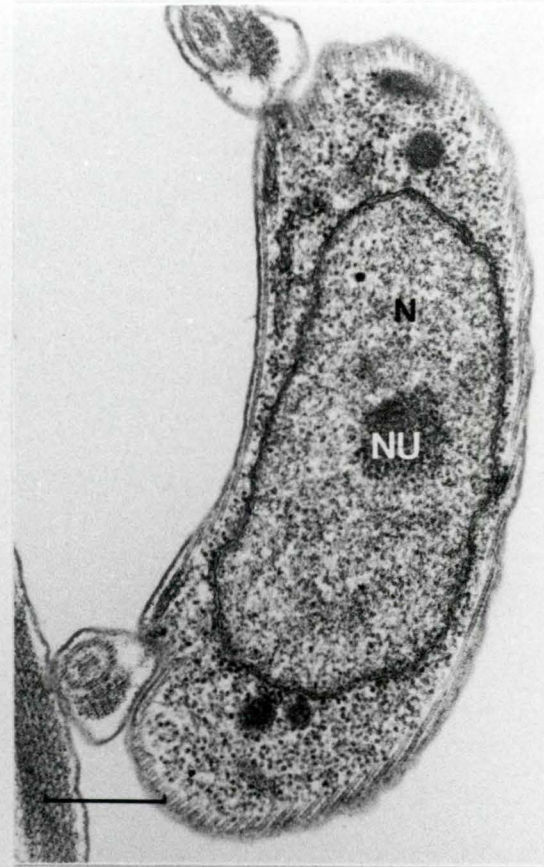


Fig. 4.1.3.10 -- Section de *Trypanosoma brucei brucei*

On y observe le noyau (N) avec nucléole (NU) plus ou moins central.
Gross. : 32400X

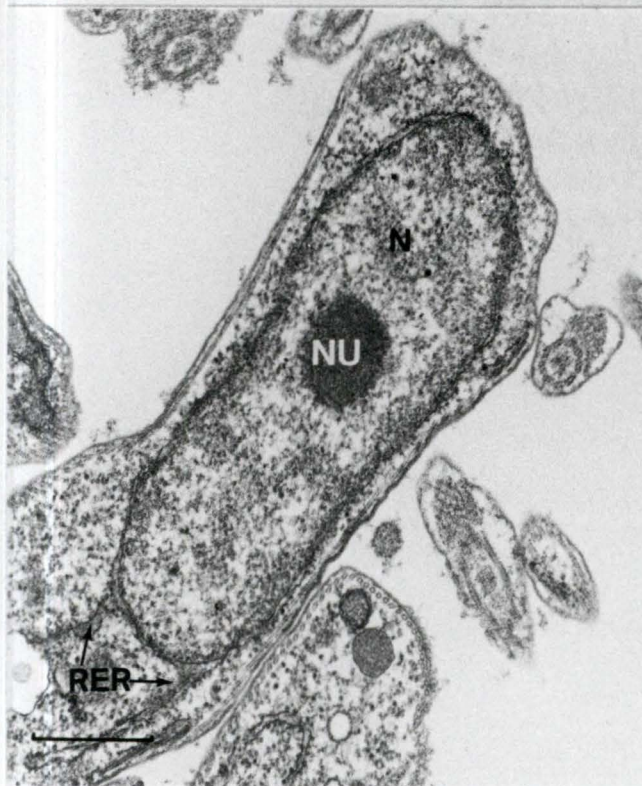


Fig. 4.1.3.11 --Section de *Trypanosoma brucei brucei*

On y observe le noyau (N) avec son nucléole (NU).
De la paroi nucléaire, se détachent deux portions du réticulum endoplasmique rugueux (RER).
Gross. : 32400X

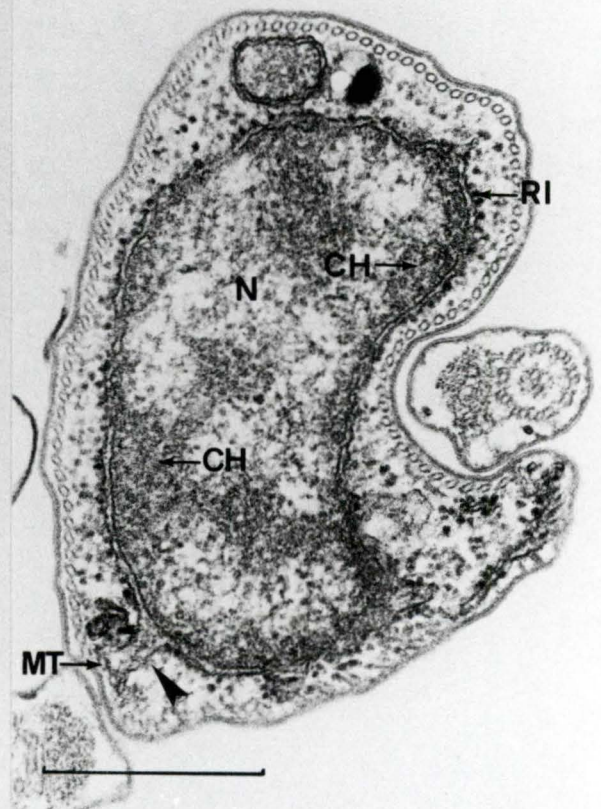


Fig. 4.1.3.12 --Section de *Trypanosoma brucei brucei*

On y observe le noyau (N) à chromatine (CH) plutôt périphérique. Le feuillet externe de la membrane nucléaire est jalonné de ribosomes (RI).
Notons aussi la liaison (flèche) entre le feuillet externe et les microtubules du périplaste (MT).
Gross. : 58500X



Fig. 4.1.3.13 -- Section de *Trypanosoma brucei brucei*

On y observe la poche flagellaire (PF) contenant une section transversale du flagelle (F).
Des éléments figurés occupent également la poche flagellaire (flèches).
Gross. : 45000X



Fig. 4.1.3.14 -- Section de *Trypanosoma brucei brucei*

La poche flagellaire (PF) contient une double section du flagelle (F) ainsi que des éléments figurés (flèches).
Gross. : 45000X

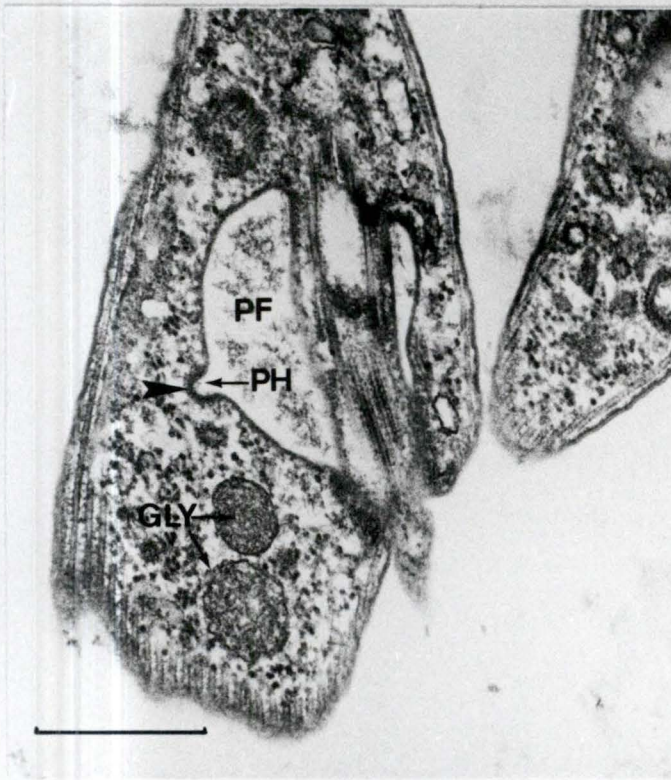


Fig. 4.1.3.15 -- Section de *Trypanosoma brucei brucei*

Au niveau de la poche flagellaire (PF), on remarque un phagosome en formation (PH). Entourant ce phagosome, on peut voir un épaissement caractéristique (flèche).
On observe également deux glycosomes (GLY).
Gross. : 45000X

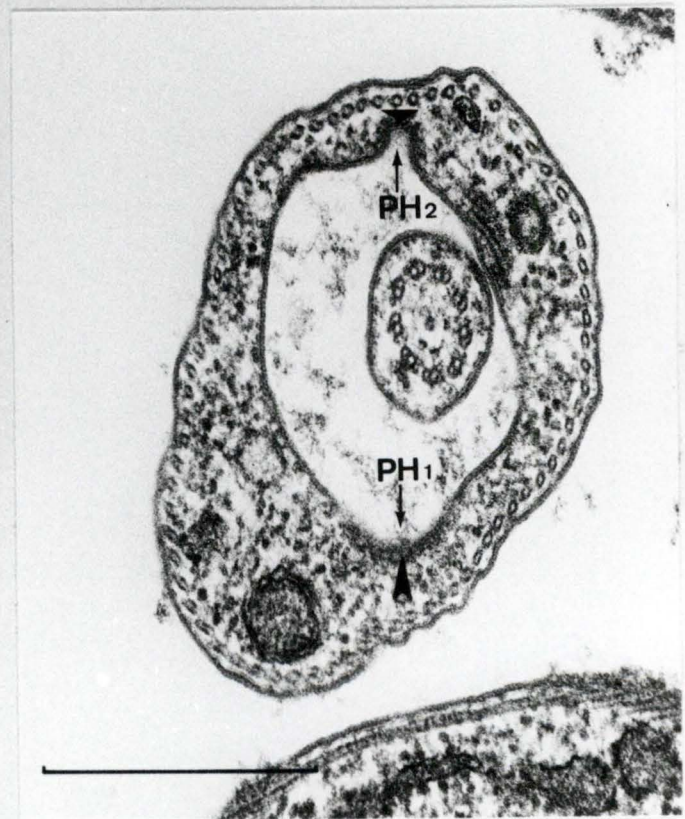


Fig. 4.1.3.16 -- Section de *Trypanosoma brucei brucei*

On y observe deux phagosomes à des stades différents ; l'un est au début de sa formation (PH1), tandis que l'autre est à un stade plus avancé (PH2). Ces deux phagosomes sont entourés de l'épaissement caractéristique (flèches).
Gross. : 72000X

4.2 Action de l'Acriflavine sur *Trypanosoma brucei brucei*

La dose injectée au souris est de 5 mg par kg donnée en une fois par voie intrapéritonéale. Cette dose unique a un effet thérapeutique mais non curatif.

4.2.1 Etude en microscopie optique

Suite à l'action de l'Acriflavine, la morphologie de *Trypanosoma brucei brucei* se modifie. L'examen de frottis permet de mettre en évidence certaines modifications.

C'est ainsi que l'on voit apparaître des trypanosomes de taille supérieure à la normale, présentant un cinétoplaste et un noyau altérés. Leur cytoplasme devient granuleux et de nombreuses vacuoles s'y développent. Nous les avons appelé formes aberrantes (Fig. 4.2.1. 1 ; Fig. 4.2.1.2)

A côté de cela, des formes dyscinétoplastiques apparaissent (Fig. 4.2.1.1).

4.2.2 Evolution du nombre et de la morphologie de *Trypanosoma brucei brucei* en fonction du temps, suite à l'injection d'Acriflavine

L'injection d'Acriflavine est effectuée 46 heures après l'inoculation des trypanosomes aux souris.

Cet intervalle de 46 heures est choisi en fonction de l'action trypanocide de la drogue. En effet, on a réalisé des tests avec des intervalles plus longs et les souris traitées, bien que leur temps de survie soit allongé, mouraient de trypanosomose.

Par contre, avec un intervalle de 46 heures, on parvient à obtenir une disparition des trypanosomes au niveau sanguin. Toutefois, cette disparition n'est que temporaire.

Il est certain que des intervalles plus faibles que 46 heures aboutiraient à des résultats équivalents et même meilleurs.

On a choisi un temps de 46 heures dans le but de disposer d'un nombre déjà élevé de trypanosomes dans le sang.

4.2.2.1 Etude du nombre

Des frottis sanguins sont réalisés à différents moments après l'injection d'Acriflavine.

Les résultats sont présentés au tableau 4.2.2.1 et à la figure 4.2.2.1

Le point - 46 heures correspond à l'inoculation des trypanosomes aux souris.

Le point 0 heure correspond à l'injection d'Acriflavine aux souris.

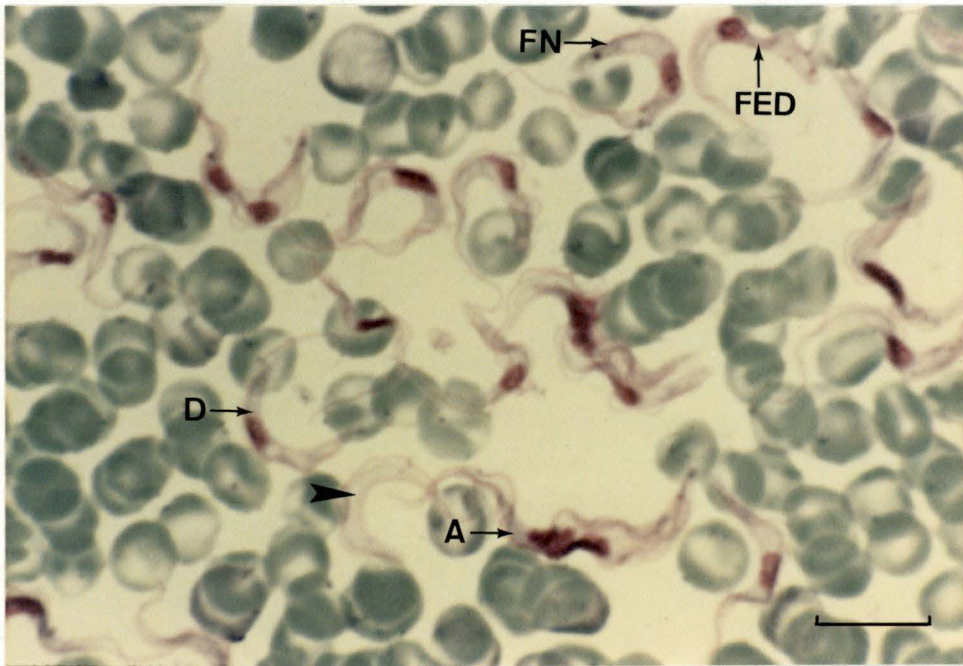


Fig. 4.2.1.1 -- Frottis de sang de souris infestée de *Trypanosoma brucei brucei*, réalisé 28 heures après l'injection d'Acriflavine.

On y observe des formes aberrantes (A), un grand nombre de formes dyscinetoplastiques (D), une forme normale (FN) et une forme en division (FED).

A noter la présence d'un trypanosome dépourvu de cinétoplaste et de noyau (flèche)



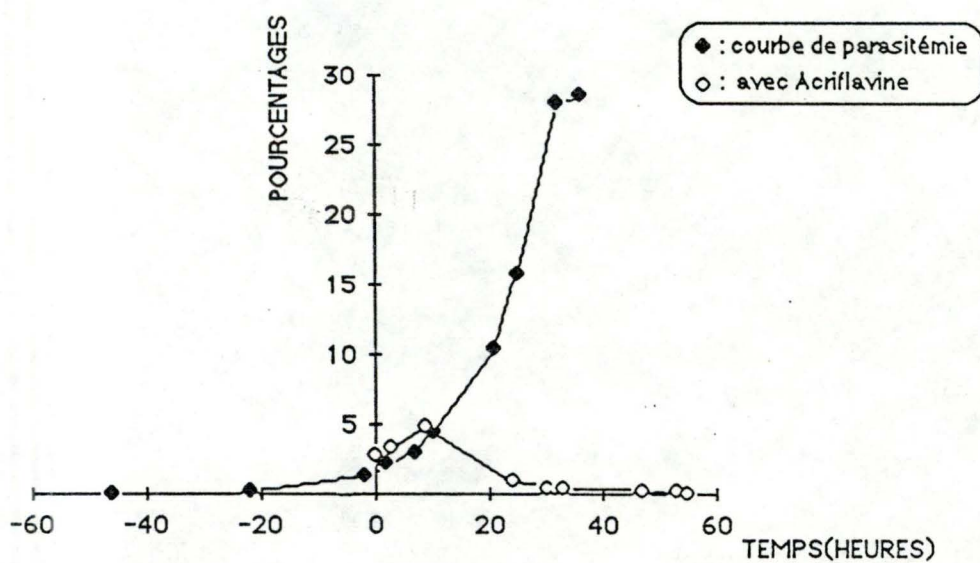
Fig. 4.2.1.2 -- Frottis de sang de souris infestée de *Trypanosoma brucei brucei*, réalisé 10 heures après l'injection d'Acriflavine.

On y retrouve un trypanosome de forme aberrante (A) présentant certaines vacuoles cytoplasmiques.

Deux formes normales sont également visibles (FN).

Tableau 4.2.2.1 : Effet de l'Acriflavine sur le nombre de *Trypanosoma brucei brucei*.

Temps(heures)	Nombre(%)
0	2,7
3	3,2
9	4,8
24	0,8
30	0,3
33	0,25
47	0,17
53	0,1
55	0

Figure 4.2.2.1 : Effet de l'Acriflavine sur le nombre de *Trypanosoma brucei brucei*.

A l'heure - 46 , les trypanosomes sont inoculés aux souris ;l'Acriflavine est pour sa part injectée à l'heure 0.

La courbe de parasitémie est fortement modifiée suite à l'injection d'Acriflavine.

La courbe de la fig. 4.2.2.1 peut être scindée en trois parties:

- Une première partie s'étendant de 0h00 à 9h00 où l'évolution du nombre de trypanosomes suit la courbe normale de parasitémie.
- Une deuxième partie allant de 9h00 à 53h00; durant cette période, on observe une régression du nombre de trypanosomes par rapport au tracé normal
- Une troisième partie correspondant à la disparition des trypanosomes du niveau sanguin. Cette disparition semble survenir entre 53h00 et 55h00.

La disparition des trypanosomes sous l'action d'une seule dose d'Acriflavine ne concerne que ceux présents dans le compartiment sanguin. Il semble que des trypanosomes hébergés dans des compartiments plus cloisonnés (liquide céphalo-rachidien, organe lymphoïdes profonds,) aient été plus ou moins hors d'atteinte du médicament. Ces trypanosomes seraient à l'origine d'une nouvelle parasitémie qui, en l'absence de tout nouveau traitement, sera fatale aux souris.

4.2.2.2 Etude de la morphologie

Les trypanosomes examinés sont répartis dans quatre catégories:

- 1) Formes normales possédant un cinétoplaste et un noyau bien apparent.
- 2) Formes en division : cette catégorie renferme des formes à n'importe quel stade de division.
- 3) Formes aberrantes.
- 4) Formes dyscinétoplastiques.

Les résultats obtenus sont présentés au tableau 4.2.2.2 et à la figure 4.2.2.2.

Le point 0 heure correspond à l'injection d'Acriflavine.

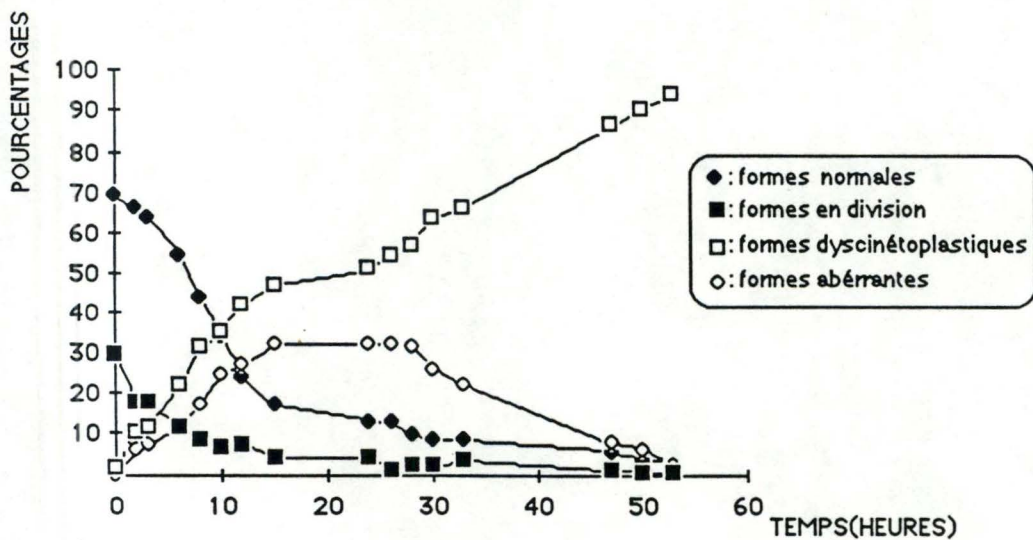
A l'examen de la figure 4.2.2.2, on constate une régression des formes normales et des formes en division en relation avec une augmentation des formes dyscinétoplastiques et des formes aberrantes.

Au bout d'une quinzaine d'heures, le nombre de formes aberrantes se stabilise avant de diminuer.

Les formes dyscinétoplastiques continuent d'augmenter et on en retrouve 94% après 53 heures de traitement.

Tableau 4.2.2.2 : Effet de l'Acriflavine sur la morphologie de *Trypanosoma brucei brucei* .

Temps(heures)	Forme normale	Forme en division	Forme aberrante	Forme dyscinéto.
0	69,3	29,4	0	1,3
2	66	18	6	10
3	63,5	18	7	11,5
6	54,5	11,5	12	22
8	43,5	8,4	17	31,1
10	33,8	6,8	24,6	34,8
12	24	7,1	27,2	41,7
15	17	4,3	31,9	46,8
24	12,9	4	32,2	50,9
26	12,8	1,1	31,9	54,2
28	9,7	2,1	31,5	56,7
30	8,4	2,1	25,9	63,6
33	8,2	3,2	22,3	66,3
47	5,2	0,7	7,7	86,4
50	3,4	0,5	6	90,1
53	3,1	0,4	2,3	94,2

Figure 4.2.2.2 : Effet de l'Acriflavine sur la morphologie de *Trypanosoma brucei brucei*.

L'injection d'Acriflavine est effectuée à l'heure 0.

Dans un premier temps, les formes dyscinétoplastiques et les formes aberrantes augmentent au détriment des formes normales et des formes en division.

Finalement, les formes dyscinétoplastiques représentent 94% des trypanosomes.

4.2.3 Etude en microscopie électronique à transmission

A la lumière du microscope électronique, nous reprenons les différentes structures du trypanosome en décrivant les anomalies apparues.

L'appareil mitochondrial semble être l'organe le plus touché suite à l'action de l'Acriflavine. L'altération du kDNA passe par différents niveaux. Tout d'abord, on observe un repli des filaments (Fig. 4.2.3.2) suivi d'une attaque plus prononcée de la structure interne. (Fig. 4.2.3.4 ; Fig. 4.2.3.6 ; Fig. 4.2.3.7 ; Fig. 4.2.3.8 ; Fig. 4.2.3.9 ; Fig. 4.2.3.10 ; Fig. 4.2.3.20)

On obtient finalement un ou plusieurs résidus arrondis de kDNA. (Fig.4.2.3.12 ; Fig. 4.2.3.13)

La matrice cinétoplastique -- mitochondriale subit une dilatation qui est accompagnée par une altération de la membrane. Les enroulements et les fragments de membrane retrouvés au niveau du cinétoplaste et de la mitochondrie sont des témoins de cette atteinte. (Fig. 4.2.3.9 ; Fig. 4.2.3.10 ; Fig. 4.2.3.12 ; Fig. 4.2.3.13 ; Fig. 4.2.3.14 ; Fig. 4.2.3.15 ; Fig. 4.2.3.16 ; Fig. 4.2.3.17 ; Fig. 4.2.3.18 ; Fig. 4.2.3.20 ; Fig. 4.2.3.21 ; Fig. 4.2.3.22 ; Fig. 4.2.3.23)

Le réticulum endoplasmique se dilate comme le montre la figure 4.2.3.1.

L'Acriflavine induit également une atteinte au niveau ribosomique qui se caractérise par une déplétion (Fig. 4.2.3.19 ; Fig. 4.2.3.20 ; Fig. 4.2.3.23) et par la formation d'aggrégats entourés de membranes (Fig. 4.2.3.5 ; Fig. 4.2.3.17)

Ces enroulements de membranes pourraient être le début d'un autophagosome.

WILLIAMSON dans sa publication de 1979 décrit de tels enroulements, mais comme effet de l'action de la Pentamidine.

Le périplaste, la poche flagellaire et le flagelle conservent leur intégrité.

(Fig. 4.2.3.4 ; Fig. 4.2.3.6 ; Fig. 4.2.3.9 ; Fig. 4.2.3.10 ; Fig. 4.2.3.12 ; Fig. 4.2.3.14 ; Fig. 4.2.3.15 ; Fig. 4.2.3.18 ; Fig. 4.2.3.21 ; Fig. 4.2.3.22 ; Fig. 4.2.3.23)

La figure 4.2.3.10 indique que soit les formes dyscinétoplastiques apparues après l'action de l'Acriflavine sont encore capables de bipartition, soit que l'appareil mitochondrial des formes en division est également touché.

Les anomalies décrites ci-dessus sont bien le résultat de l'action de la drogue et ne proviennent pas d'un défaut de fixation comme le montre la structure normale du globule blanc à la figure 4.2.3.11.

A côté des trypanosomes atteints, d'autres présentent encore une morphologie normale.
(Fig. 4.2.3.18)

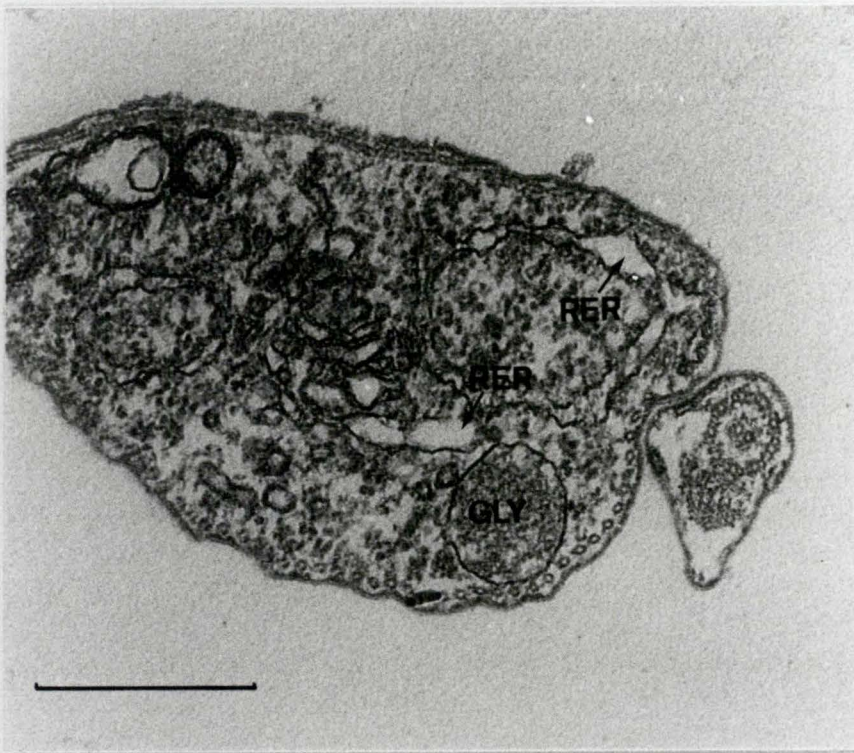


Fig. 4.2.3.1 -- Section de *T.b.b.* 2 heures après l'injection d'Acriflavine
 On y observe une dilatation du RER.
 Un glycosome est également visible (GLY).
 Gross. : 58500X

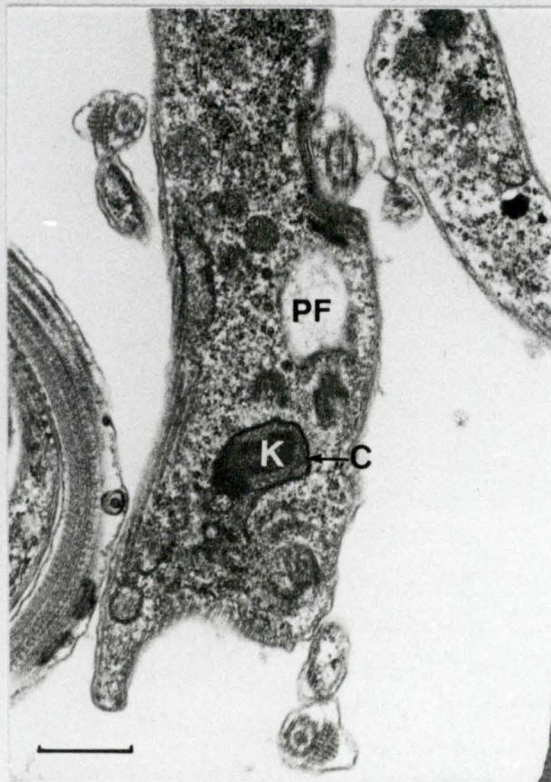


Fig. 4.2.3.2 -- Section de *T.b.b.* 2 heures après l'injection d'Acriflavine
 Sous la poche flagellaire (PF), on peut observer le cinétoplaste (C)
 contenant le kDNA (K).
 Gross. : 24750X

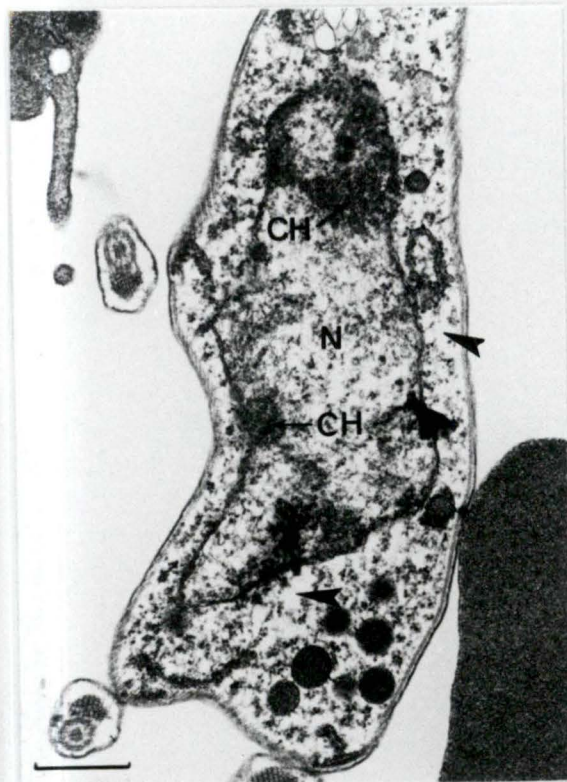


Fig. 4.2.3.3 -- Section de *T.b.b.* 5 heures après l'injection d'Acriflavine
On y observe le noyau (N) à chromatine très dispersée (CH).
On remarque également une déplétion ribosomique (flèches).
Gross. : 24750X

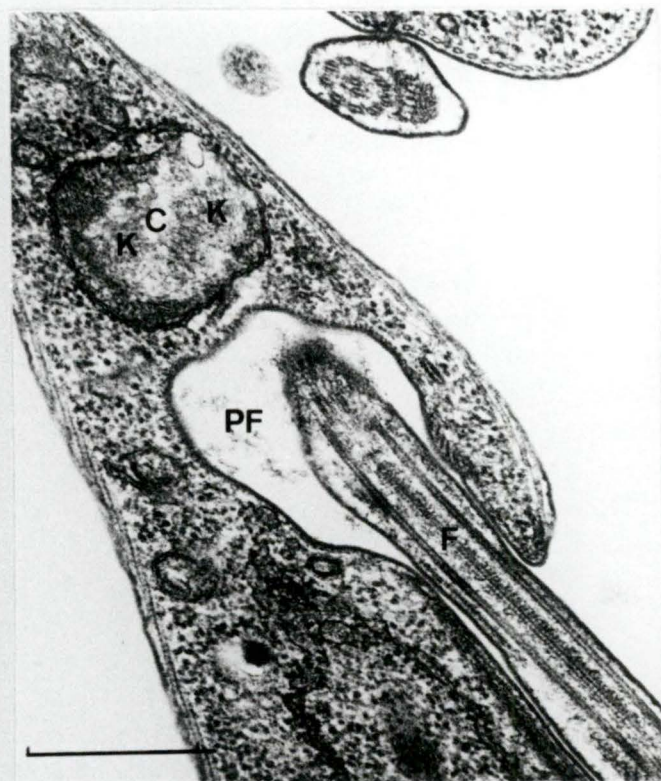


Fig. 4.2.3.4 -- Section de *T.b.b.* 5 heures après l'injection d'Acriflavine
On observe la poche flagellaire (PF) et une portion du flagelle (F).
A l'intérieur du cinétoplaste (C), le kDNA (K) présente un aspect
anormal de raréfaction.
Gross. : 45000X



Fig. 4.2.3.5 -- Section de *T.b.b.* 5 heures après l'injection d'Acriflavine
On y observe un enroulement de membranes entourant un
agrégat de ribosomes (RI).
Cela donne naissance à des formations cytoplasmiques de type
"onions like structures" (flèches).
Gross. : 45000X

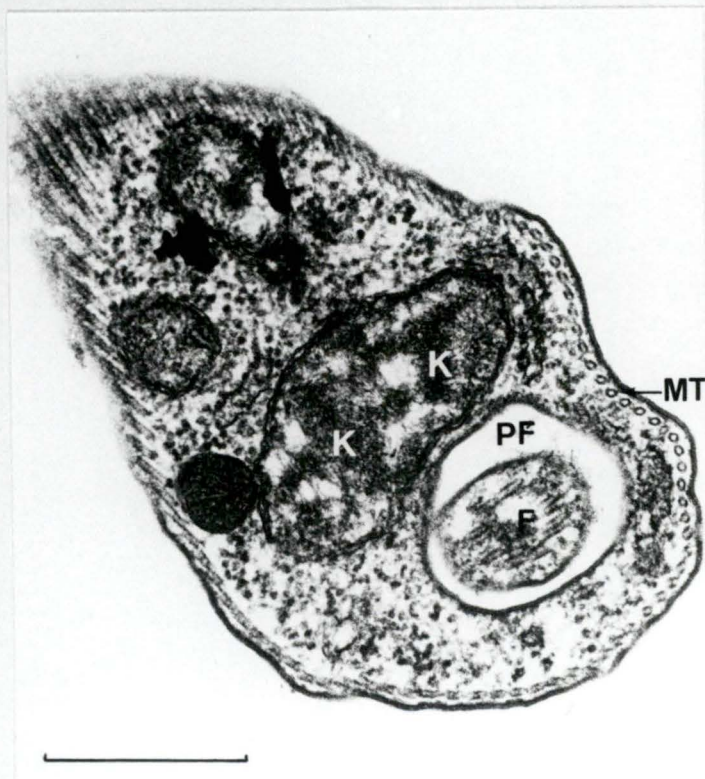


Fig. 4.2.3.6 -- Section de *T.b.b.* 5 heures après l'injection d'Acriflavine
On y retrouve la poche flagellaire (PF) contenant le flagelle (F).
L'aspect du kDNA est anormal (K).
Les microtubules du périplaste sont également visibles (MT).
Gross. : 58500X

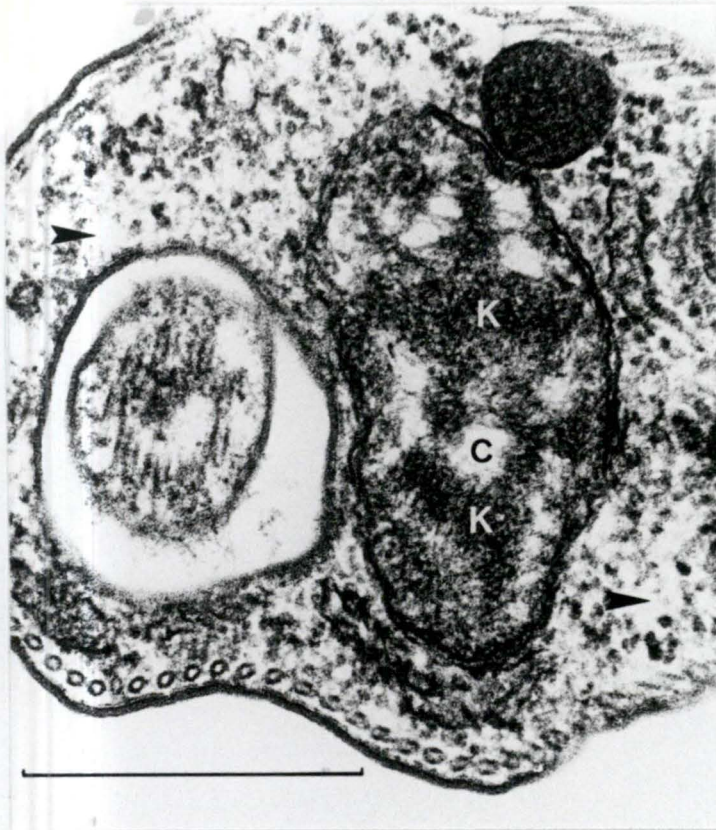


Fig. 4.2.3.7 --Section de *T.b.b.* 5 heures après l'injection d'Acriflavine
 Détail de la figure 4.2.3.6 permettant de mieux se rendre compte de l'aspect déchiqueté du kDNA (K) à l'intérieur du cinétoplaste (C).
 Remarquons également la déplétion ribosomique (flèches).
 Gross. : 90000X

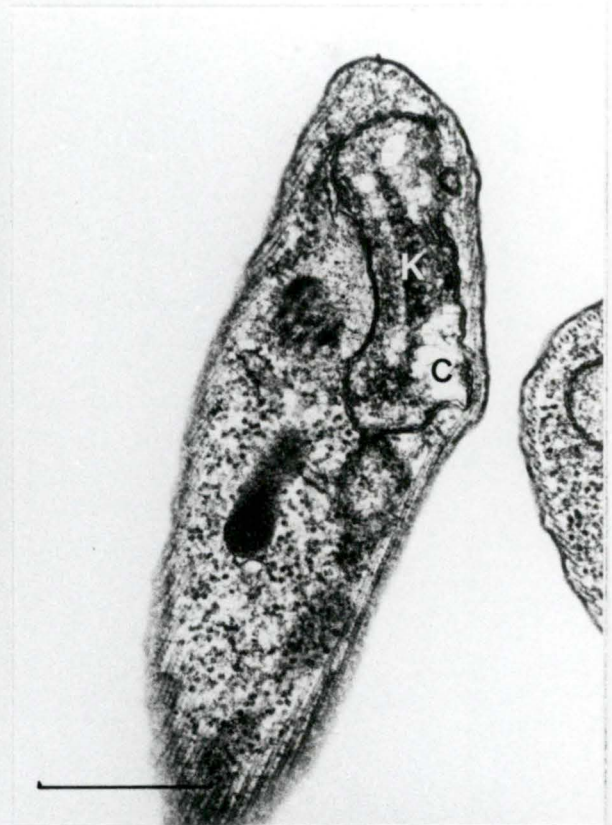


Fig. 4.2.3.8 --Section de *T.b.b.* 5 heures après l'injection d'Acriflavine
 On y observe le cinétoplaste (C) contenant le kDNA (K) en voie de destruction.
 Gross. : 45000X

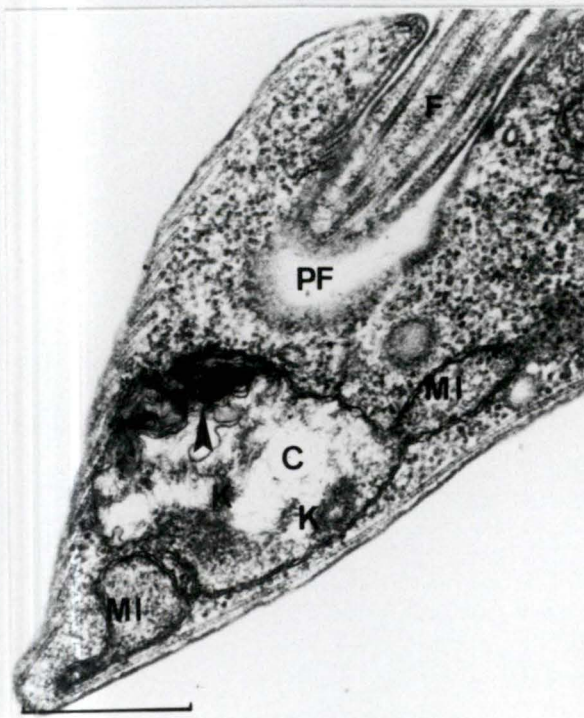


Fig. 4.2.3.9 --Section de *T.b.b.* 5 heures après l'injection d'Acriflavine
 On observe la poche flagellaire (PF) et le flagelle (F). La membrane cinétoplastique est altérée et présente des enroulements (flèche).
 Le kDNA (K) est très réduit et le cinétoplaste dilaté (C).
 Notons également la présence de la mitochondrie (MI) en continuité de part et d'autre du cinétoplaste.
 Gross. : 45000X

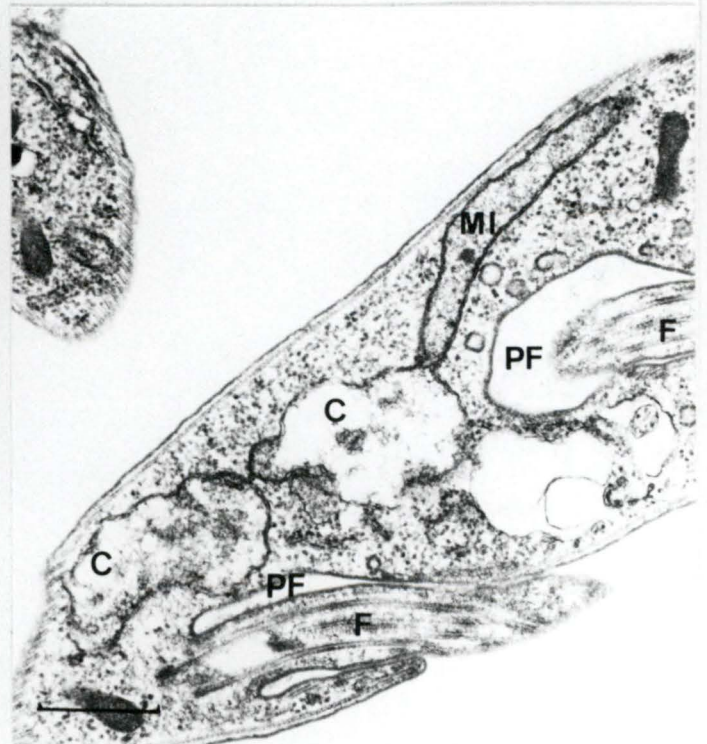


Fig. 4.2.3.10 --Section de *T.b.b.* 5 heures après l'injection d'Acriflavine
 Cette cellule est en voie de division et renferme deux poches flagellaires (PF) avec deux flagelles (F) ainsi que deux cinétoplastes dilatés (C).
 Le kDNA des deux cinétoplastes est très réduit.
 On remarque également la présence d'une mitochondrie (MI) d'aspect encore normal.
 Gross. : 32400X

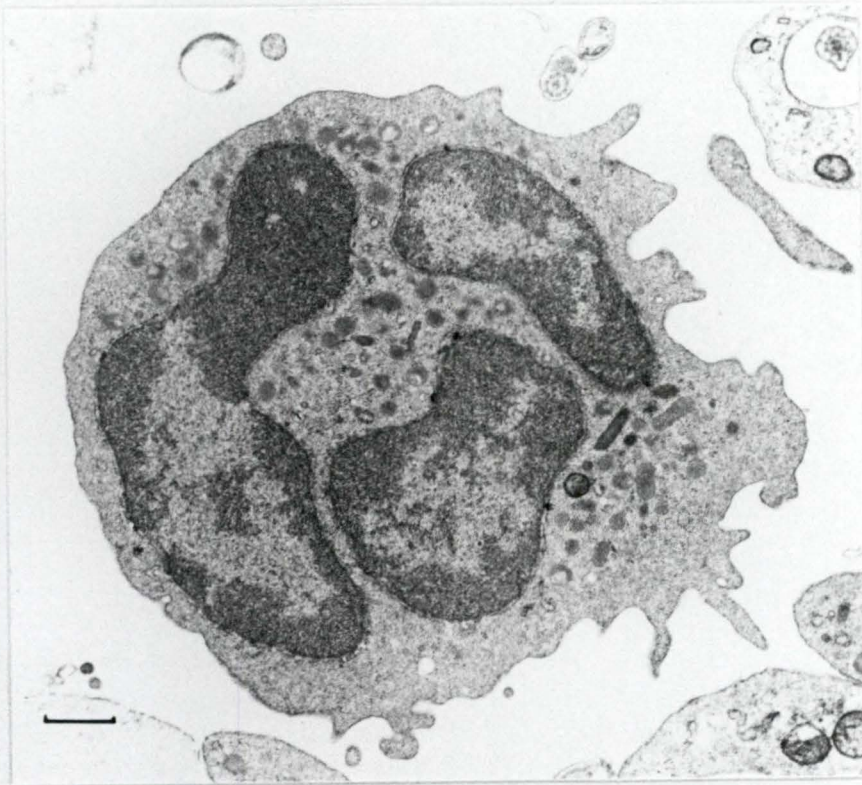


Fig. 4.2.3.11 --Section d'un polymorphonucléaire neutrophile 12 heures après l'injection d'Acriflavine.

On remarque l'aspect morphologique normal de ce globule blanc apparemment non altéré par l'Acriflavine.

Gross. : 18900X

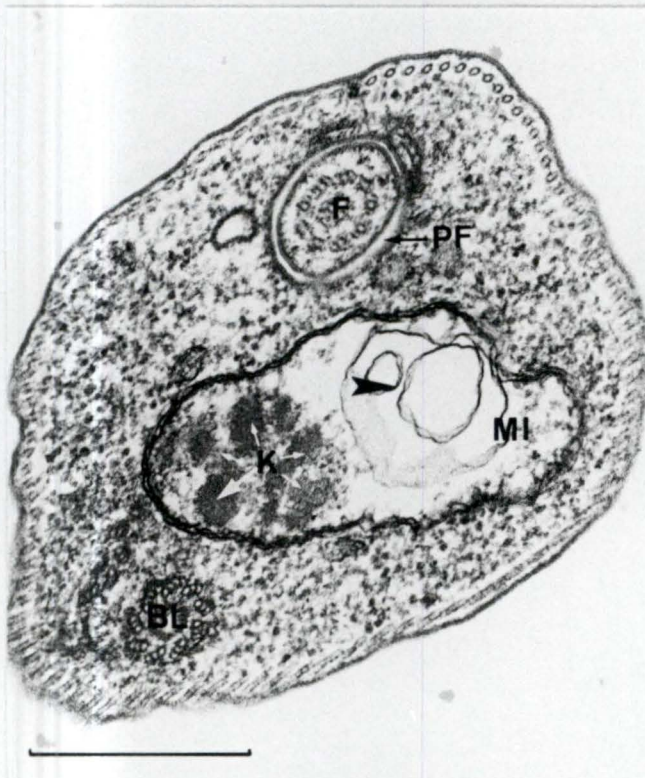


Fig. 4.2.3.12 --Section de *T.b.b.* 12 heures après l'injection d'Acriflavine

On y observe plusieurs condensations arrondies du kDNA (K), une dilatation de la mitochondrie (MI) et une altération de la membrane mitochondriale (flèche).

On remarque la présence du flagelle (F) au sein de la poche flagellaire (PF).

Le blépharoplaste (BL) est visible également.

Gross. : 58500X

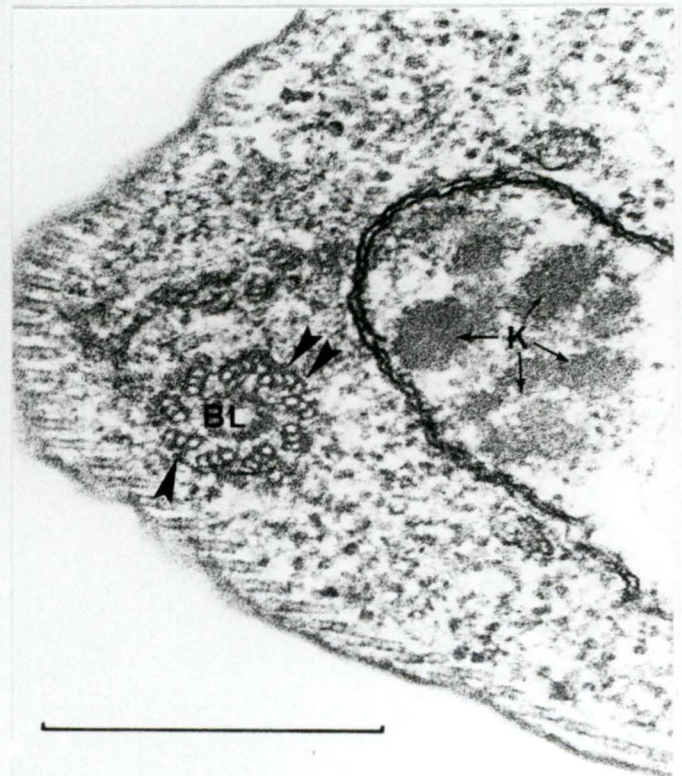


Fig. 4.2.3.13 --Section de *T.b.b.* 12 heures après l'injection d'Acriflavine

Détail de la figure précédente insistant sur la condensation arrondie du kDNA (K) et sur le blépharoplaste (BL) dont les neuf séries de filaments sont soit des triplets (1 flèche), soit des quadruplets (2 flèches)

Gross. : 90000X



Fig. 4.2.3.14 --Section de *T.b.b.* 12 heures après l'injection d'Acriflavine

Cette coupe passe au niveau de la zone de transition du flagelle(F)
On y observe une modification morphologique du kDNA (K)et une
atteinte de la membrane cinétoplastique (flèche)
Gross. : 58500X

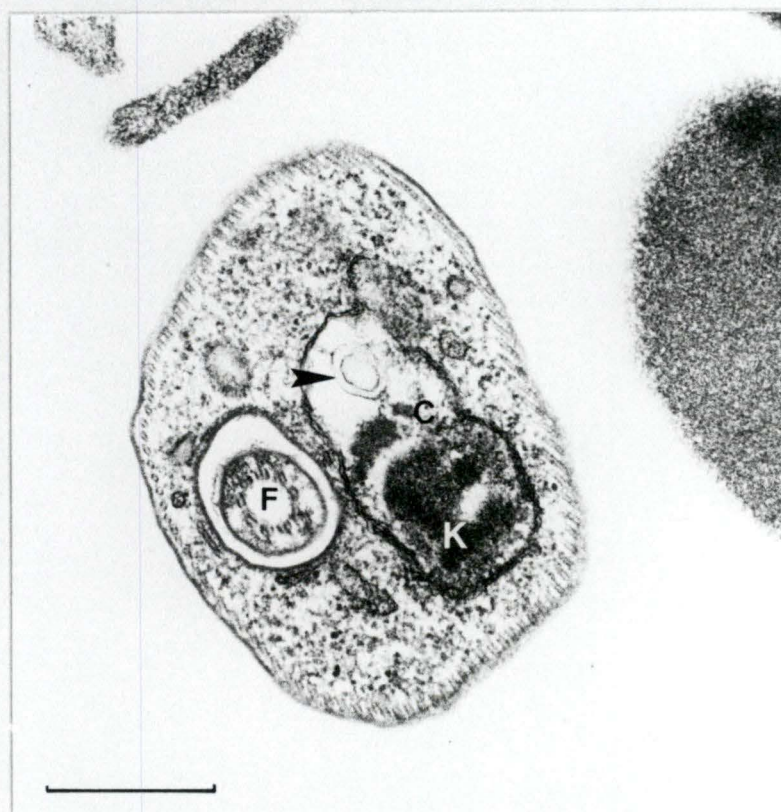


Fig. 4.2.3.15 --Section de *T.b.b.* 12 heures après l'injection d'Acriflavine

On y observe le cinétoplaste (C) dont le kDNA (K) présente une
structure anormale.
Des fragments membranaires (flèche) témoignent d'une
altération de la membrane.
Comme la précédente,cette coupe passe au niveau de la zone
de transition du flagelle (F).
Gross. : 45000X

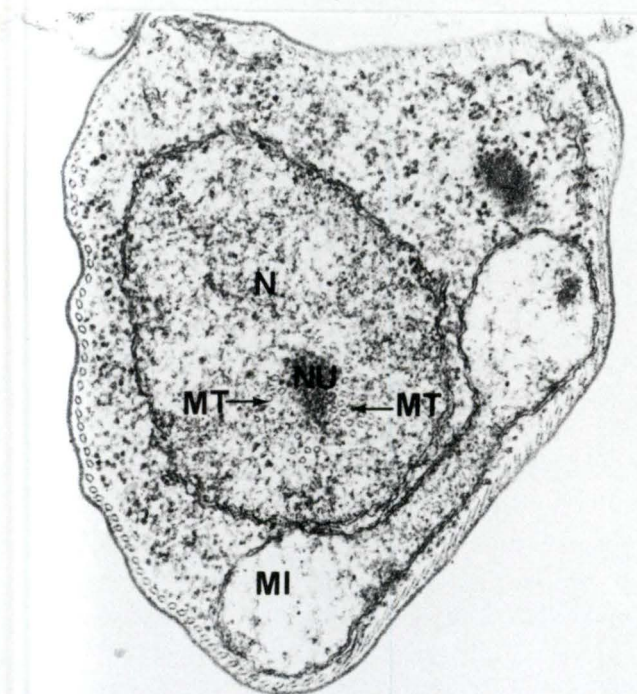


Fig. 4.2.3.16 --Section de *T.b.b.* 15 heures après l'injection d'Acriflavine
 Au niveau du noyau (N), près du nucléole (NU), on remarque la présence d'une série de microtubules (MT) de diamètre constant. La mitochondrie (MI) du fait de la présence du noyau prend une forme en allège. Par ailleurs, il ne s'agit pas d'une cellule en voie de division.
 Gross. : 45000X

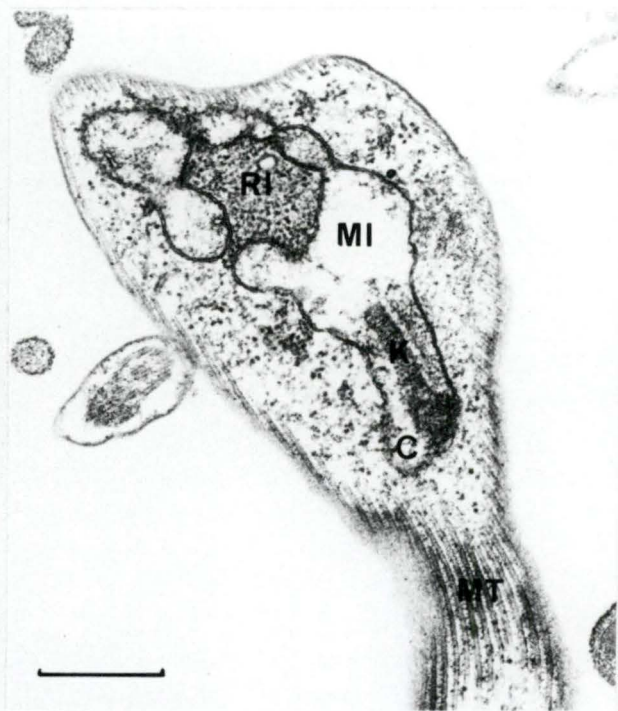


Fig. 4.2.3.17 --Section de *T.b.b.* 15 heures après l'injection d'Acriflavine
 On y observe le cinétoplaste (C) contenant un fragment de kDNA (K) d'aspect normal.
 La mitochondrie (MI) qui fait suite au cinétoplaste est fortement dilatée. De plus, on peut voir un amas de ribosomes (RI) entouré par la mitochondrie.
 Remarquons au passage la disposition normale des microtubules du périplaste (MT) coupés tangentiellement.
 Gross. : 32400X

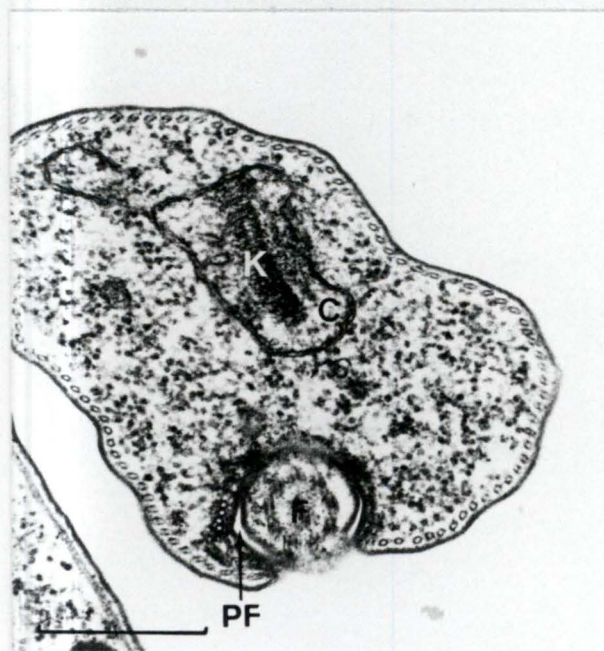


Fig. 4.2.3.18 --Section de *T.b.b.* 15 heures après l'injection d'Acriflavine
 On y observe le cinétoplaste (C) pourvu d'un kDNA d'aspect normal (K).
 On peut voir également le flagelle (F) et un alignement de quatre microtubules à proximité de la poche flagellaire (PF).
 Gross. : 45000X

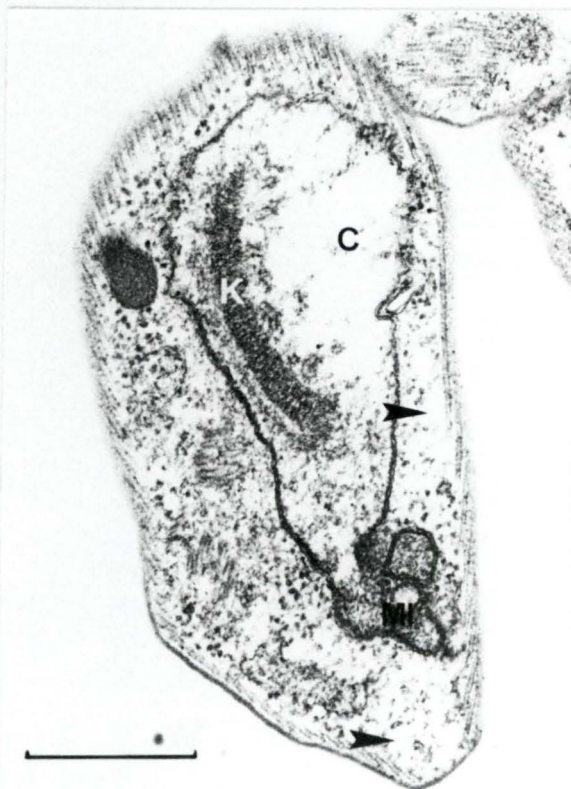


Fig. 4.2.3.19 --Section de *T.b.b.* 15 heures après l'injection d'Acriflavine
 On observe une forte dilatation du cinétoplaste (C); le kDNA (K), pour sa part, est très allongé.
 Notons également l'enroulement de la mitochondrie (MI) et la déplétion ribosomique (flèches).
 Gross. : 45000X



Fig. 4.2.3.20 --Section de *T.b.b.* 15 heures après l'injection d'Acridine
On y observe un arrangement particulier du kDNA (K), un élargissement du cinétoplaste (C) et une déplétion ribosomique (flèches).
Gross. : 72000X

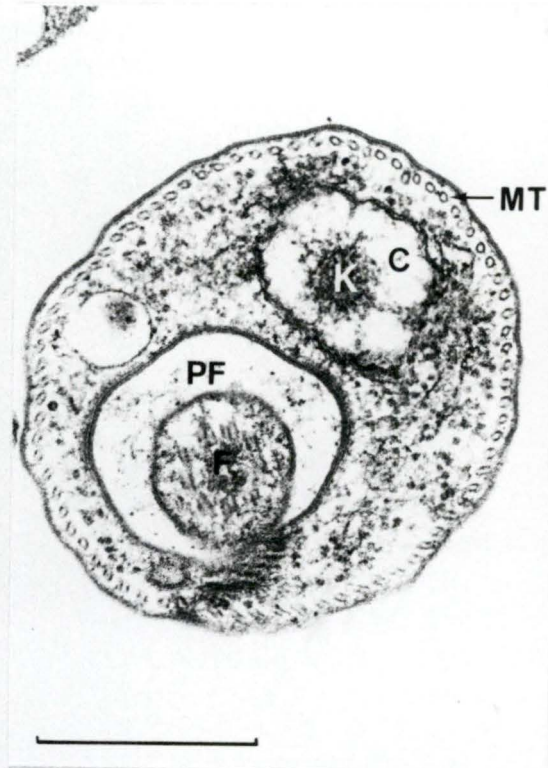


Fig. 4.2.3.21 --Section de *T.b.b.* 15 heures après l'injection d'Acridine
On y observe outre la poche flagellaire (PF) et le flagelle (F), un cinétoplaste (C) dilaté contenant le kDNA condensé (K). Les microtubules du périplaste sont également visibles (MT) et d'aspect normal.
Gross. : 58500X

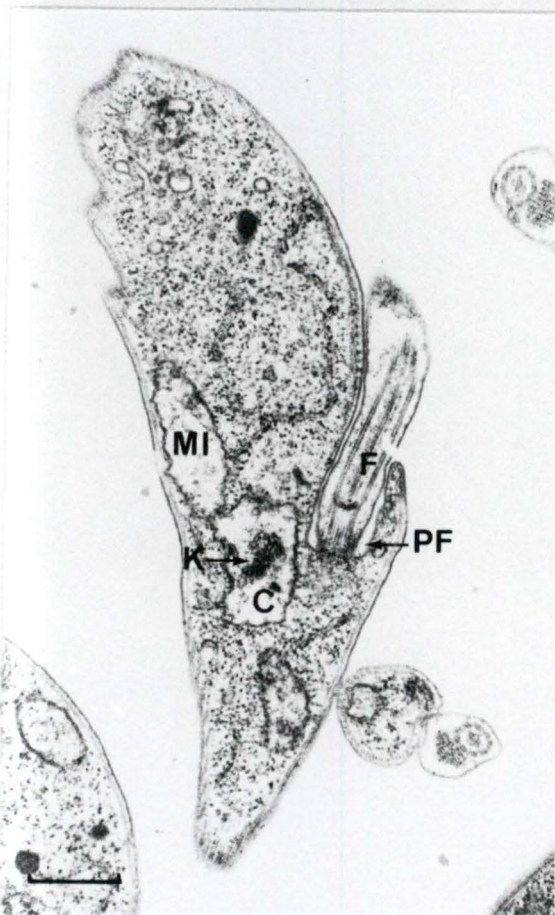


Fig. 4.2.3.22 --Section de *T.b.b.* 15 heures après l'injection d'Acridine
Elle montre la poche flagellaire (PF) d'où émerge le flagelle (F). On remarque que le cinétoplaste (C) et la mitochondrie (MI) qui lui fait suite sont dilatés.
Le kDNA (K) est apparent au centre du cinétoplaste.
Gross. : 24750X

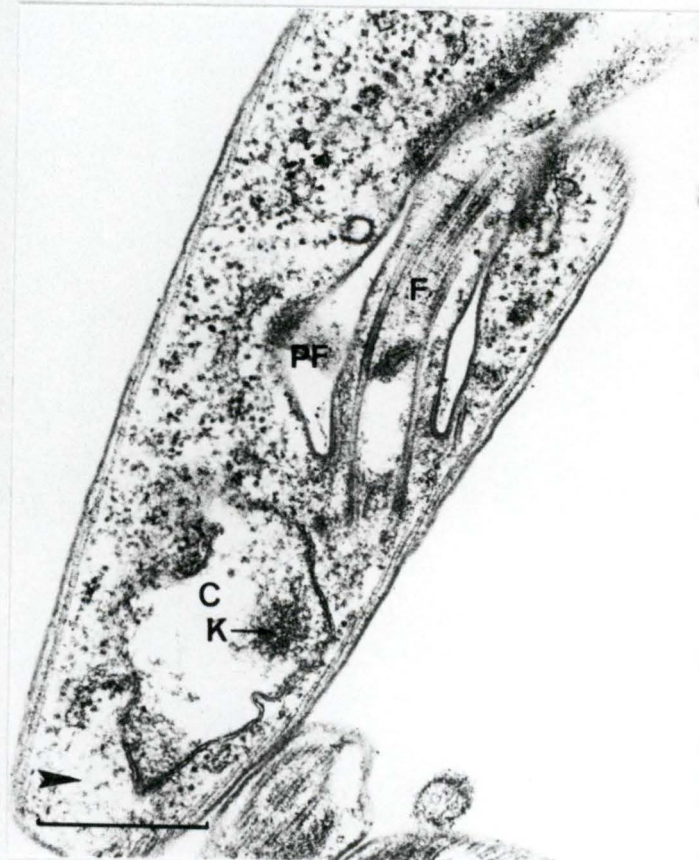


Fig. 4.2.3.23 --Section de *T.b.b.* 15 heures après l'injection d'Acridine
On y observe la poche flagellaire (PF) et le flagelle (F). Au pied de la poche flagellaire, on retrouve le cinétoplaste (C); il présente une forte dilatation et contient le kDNA condensé (K). Notons également la déplétion ribosomique (flèche).
Gross. : 45000X

4.3 Action du Bromure d'éthidium sur *Trypanosoma brucei brucei*

La dose injectée aux souris est de 2,5 mg par kg donnée en une fois par voie intrapéritonéale. Cette dose unique a un effet thérapeutique mais non curatif.

4.3.1 Etude en microscopie optique

Le Bromure d'éthidium (B.E.) induit l'apparition de formes dyscinétoplastiques facilement visibles au microscope (fig. 4.3.1.1 ; fig.4.3.1.2).

4.3.2 Evolution du nombre et de la morphologie de *Trypanosoma brucei brucei* en fonction du temps, suite à l'injection de Bromure d'éthidium

L'injection de Bromure d'éthidium (B.E.) est effectuée 26 heures après l'inoculation des trypanosomes aux souris.

Cet intervalle de 26 heures permet d'obtenir une régression, de courte durée, du nombre de trypanosomes.

Des intervalles plus faibles n'ont pas été testés parce qu', au cours des premières 24 heures, on ne retrouve pas de trypanosomes au niveau sanguin.

Des intervalles plus longs, quant à eux, ne nous ont pas permis d'obtenir une régression du nombre de trypanosomes. Néanmoins, ils provoquent un allongement du temps de survie des souris de l'ordre de 2 à 3 jours.

4.3.2.1 Etude du nombre

Les résultats sont présentés au tableau 4.3.2.1 et à la figure 4.3.2.1

Le point --26h00 correspond à l'inoculation des trypanosomes aux souris.

Le point 0h00 correspond à l'injection de B.E. aux souris.

Dans un premier temps, le nombre de trypanosomes augmente tout en restant inférieur aux valeurs précisées par la courbe de parasitémie.

48 heures après l'injection de B.E., le nombre de trypanosomes régresse quelque peu mais c'est de courte durée car on observe un nouvel accroissement du nombre entraînant la mort des souris.

Il est à noter que la mort des souris ainsi traitées apparaît 6 à 7 jours après l'injection de la drogue, donc 7 à 8 jours après l'inoculation des trypanosomes au lieu de 3 à 4 jours pour une souris non traitée au B.E.

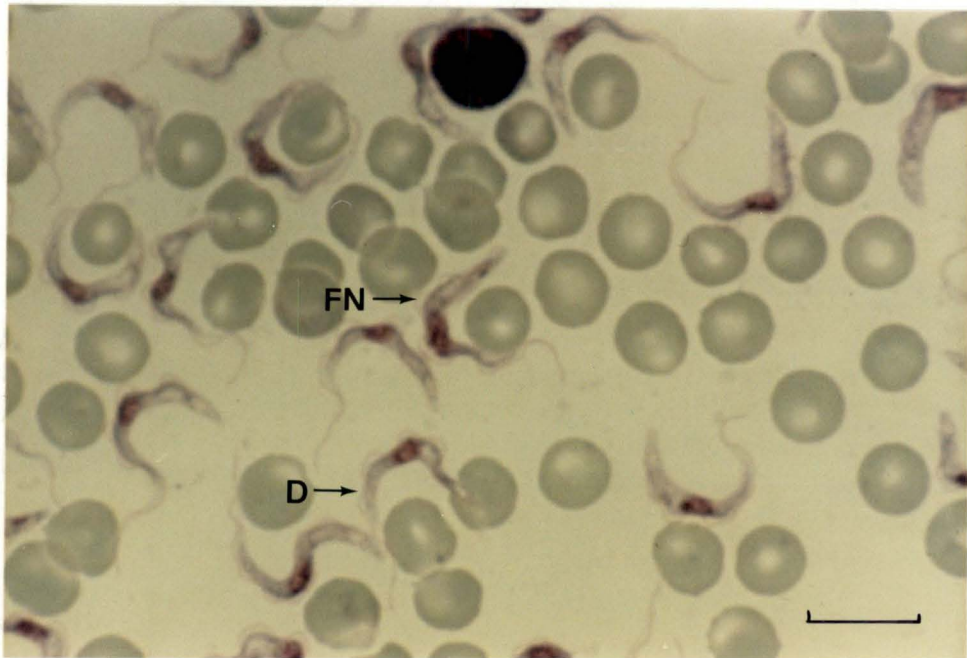


Fig. 4.3.1.1 -- Frottis de sang de souris infestée de *Trypanosoma brucei brucei* , réalisé 46 heures après l'injection de B.E.

On y observe un grand nombre de formes dyscinetoplastiques (D).
Le cinétoplaste peut subsister chez certains trypanosomes (FN).

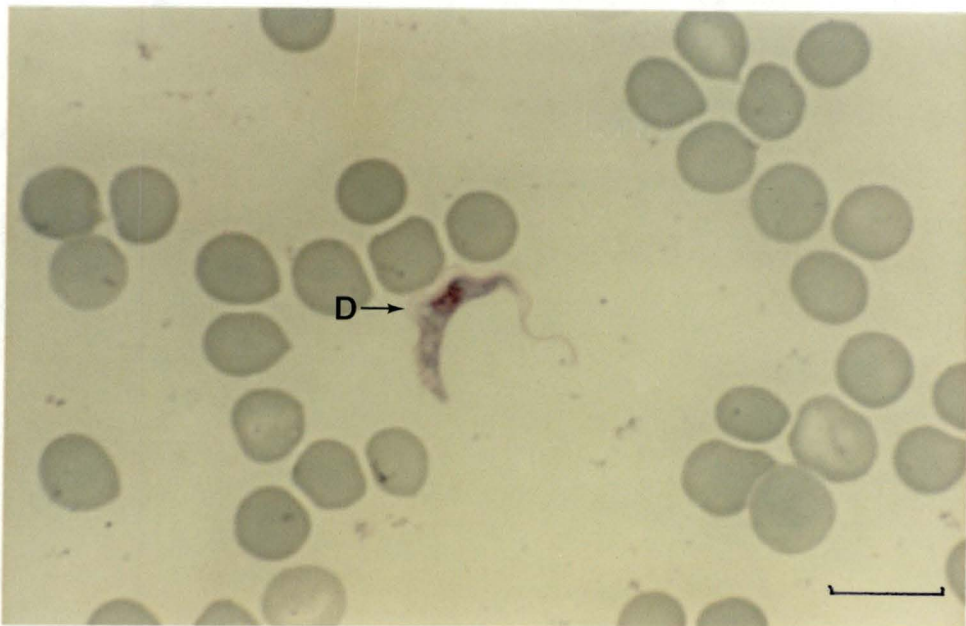
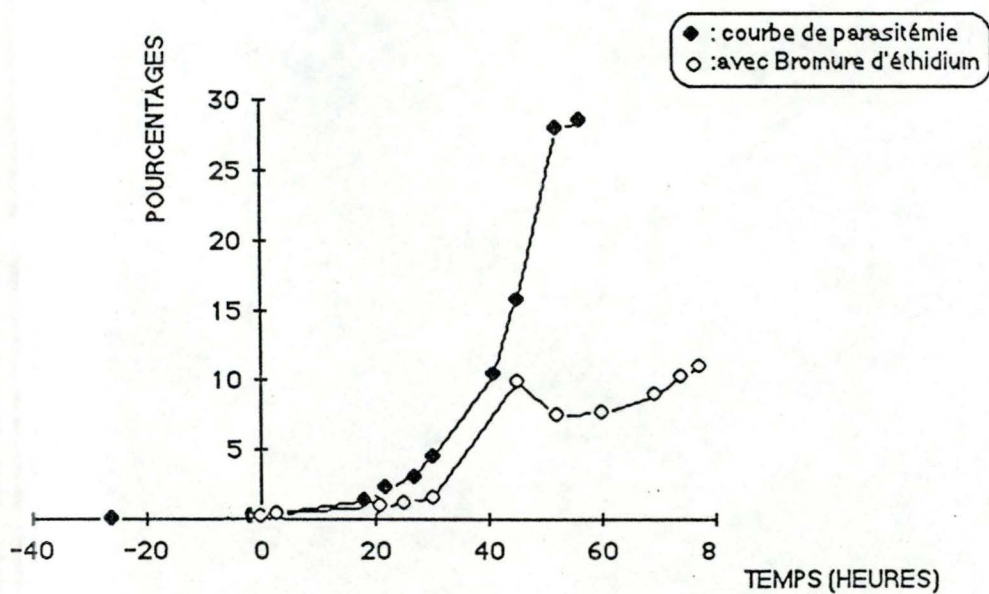


Fig. 4.3.1.2 -- Frottis de sang de souris infestée de *Trypanosoma brucei brucei* , réalisé 30 heures après l'injection de B.E.

On y observe un trypanosome isolé dépourvu de cinétoplaste (D).

Tableau 4.3.2.1 : Effet du B.E. sur le nombre de *Trypanosoma brucei brucei*.

Temps(heures)	Nombre(%)
0	0,1
3	0,2
21	0,9
25	1
30	1,4
45	9,8
52	7,3
60	7,5
69	8,8
74	10,2
77	10,9

Figure 4.3.2.1 : Effet du B.E. sur le nombre de *Trypanosoma brucei brucei*.

L'inoculation des trypanosomes a lieu à l'heure - 26 et l'injection du B.E. à l'heure 0.
La courbe de parasitémie se modifie suite à l'action du B.E.

4.3.2.2 Etude de la morphologie

Les trypanosomes examinés sont répartis dans trois catégories:

- 1) Formes normales possédant un cinétoplaste et un noyau bien apparent.
- 2) Formes en division.
- 3) Formes dyscinétoplastiques.

Les résultats sont présentés au tableau 4.3.2.2 et à la figure 4.3.2.2

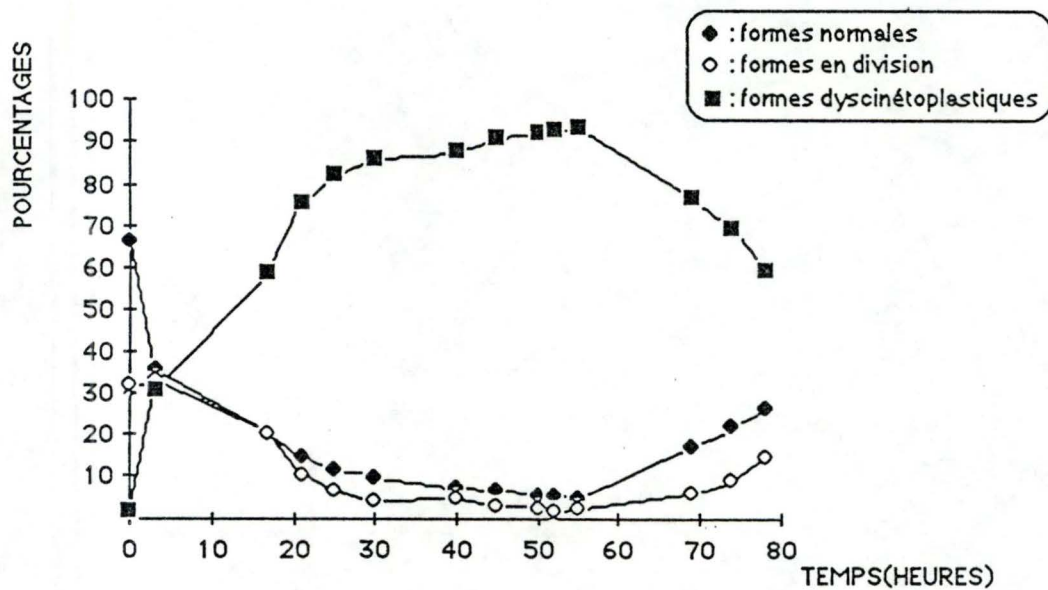
Le point 0h00 correspond à l'injection de Bromure d'éthidium.

Le B.E provoque une diminution rapide des formes normales couplée à une augmentation des formes dyscinétoplastiques. Les formes en division régressent également.

Un parallélisme peut être établi avec le tracé des nombres à la figure 4.3.2.1 : au moment où l'on observe le nouvel accroissement du nombre de trypanosomes, les formes normales et les formes en division augmentent au détriment des formes dyscinétoplastiques.

Tableau 4.3.2.2 : Effet du B.E. sur la morphologie de *Trypanosoma brucei brucei*

Temps(heures)	Forme normale	Forme en division	Forme dyscinéto.
0	66,1	32,1	1,8
3	35,9	33,1	31
17	20,9	20,2	58,9
21	14,7	10,2	75,1
25	11,4	6,6	82
30	9,9	3,9	86,2
40	7,3	4,8	87,9
45	6,4	2,8	90,8
50	5,5	2,4	92,1
52	5,2	1,8	93
55	4,6	2,2	93,2
69	17,3	6	76,7
74	22,1	9	68,9
78	26,1	14,9	59

Figure 4.3.2.2 : Effet du B.E. sur la morphologie de *Trypanosoma brucei brucei*.

Le B.E. est injecté aux souris à l'heure 0

Les formes dyscinétoplastiques supplantent momentanément les formes normales et les formes en division.

Ensuite, les formes normales et les formes en division reprennent le dessus.

4.3.3 Etude en microscopie électronique à transmission

Le B.E. induit un changement morphologique au niveau du kDNA. Cette modification se marque par une condensation amorphe des fibres du kDNA (Fig. 4.3.3.4 ; Fig. 4.3.3.5) qui évolue vers une disparition presque complète.

(Fig. 4.3.3.7 ; Fig. 4.3.3.8 ; Fig. 4.3.3.9 ; Fig. 4.3.3.10)

Le B.E. provoque une dilatation du système mitochondrial. Cette dilatation est toutefois moins nette que dans le cas de l'Acriflavine.

(Fig. 4.3.3.7 ; Fig. 4.3.3.8 ; Fig. 4.3.3.9 ; Fig. 4.3.3.10)

Le B.E. agit également au niveau nucléaire en provoquant un écartement des deux feuillets de la membrane nucléaire.

(Fig. 4.3.3.14 ; Fig. 4.3.3.15)

Le B.E. induit l'apparition de vacuole d'autophagie (MACADAM et WILLIAMSON (1974) en ont décrit après un traitement à la Puromycin sur *Trypanosoma rhodesiense*).

(Fig. 4.3.3.16 ; Fig. 4.3.3.17)

D'autres structures ne présentent pas d'altérations visibles: ce sont la membrane cellulaire (Fig. 4.3.3.3), la poche flagellaire et le flagelle (Fig. 4.3.3.4 ; Fig. 4.3.3.9 ; Fig. 4.3.3.10), l'appareil de Golgi (Fig. 4.3.3.11 ; Fig. 4.3.3.12 ; Fig. 4.3.3.13 ; Fig. 4.3.3.16), et le réticulum endoplasmique. (Fig. 4.3.3.13)



Fig. 4.3.3.1 --Section de *T.b.b.* 13 heures après l'injection de B.E.

Ce trypanosome est en fin de division comme le montre la scission longitudinale (flèche).

Gross. : 18900X



Fig. 4.3.3.2 --Section de *T.b.b.* 13 heures après l'injection de B.E

On observe la présence de deux noyaux (N) chez ce trypanosome en division.

Un lysosome est également présent (LY).

Gross. : 24750X

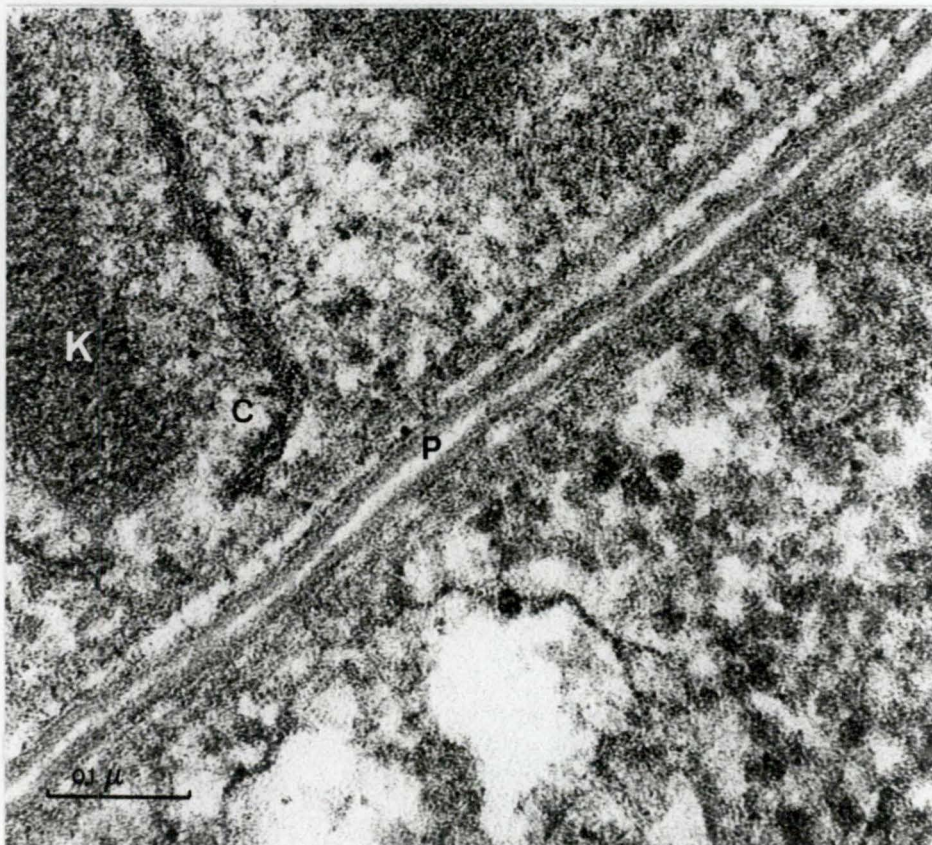


Fig. 4.3.3.3 --Section de *T.b.b.* 13 heures après l'injection de B.E

On y observe le cinétoplaste (C) comprenant le kDNA (K).

Les deux périplastes (P) proviennent de l'accellement de deux trypanosomes.

Gross. : 189000X

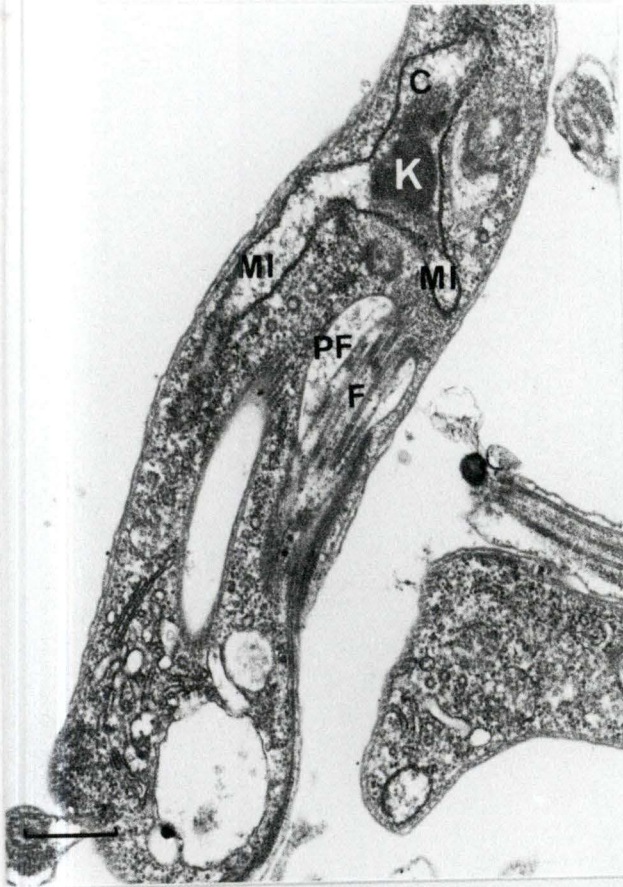


Fig. 4.3.3.4 --Section de *T.b.b.* 13 heures après l'injection de B.E
On y découvre la poche flagellaire (PF) avec le flagelle (F).
On remarque une condensation du kDNA (K) au sein du
cinétoplaste (C); ce dernier est prolongé par la mitochondrie (MI).
Gross. : 24750X

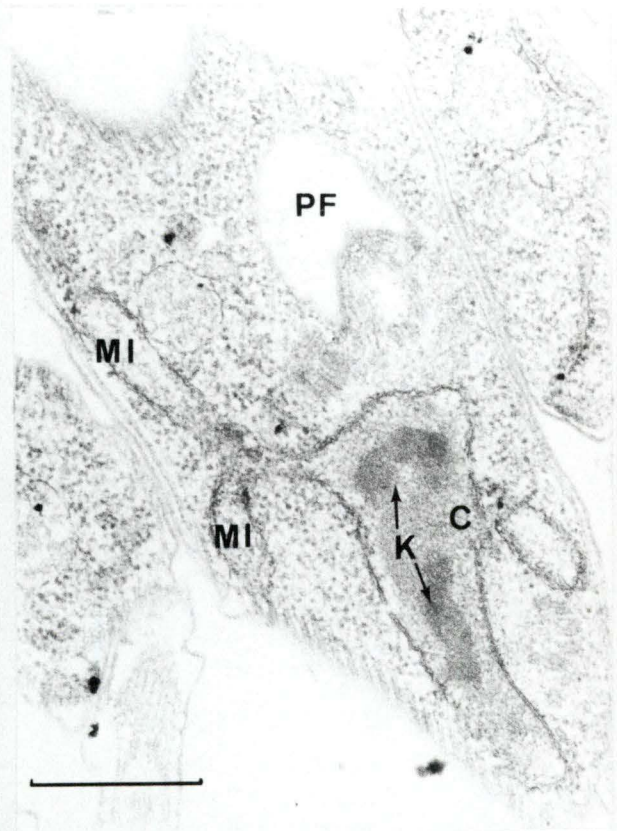


Fig. 4.3.3.5 --Section de *T.b.b.* 22 heures après l'injection de B.E
On remarque la présence de la poche flagellaire (PF), du
cinétoplaste (C) et de la mitochondrie en prolongement du
cinétoplaste (MI).
Notons la condensation amorphe du kDNA (K).
Gross. : 45000X

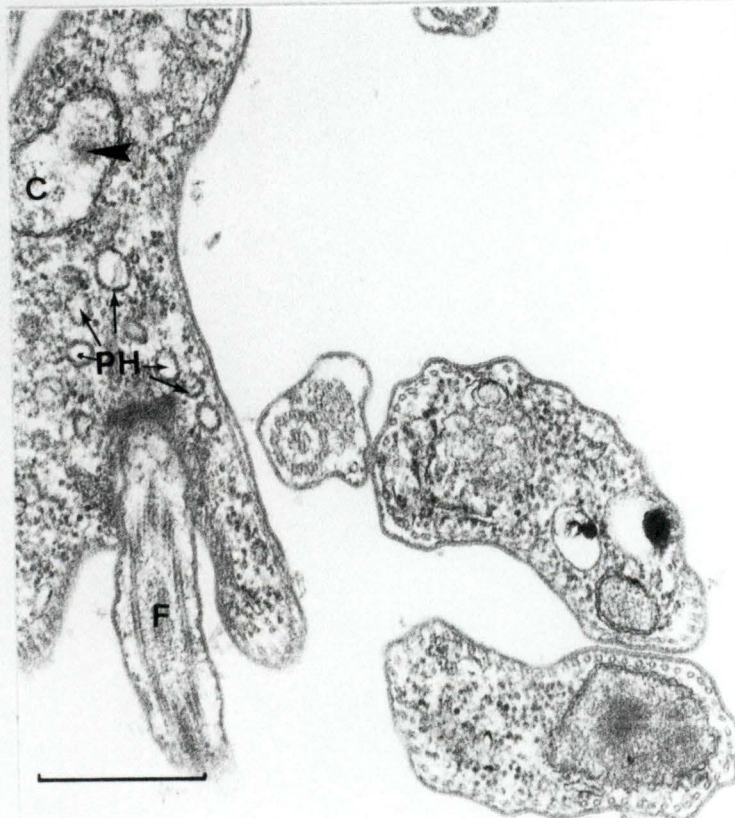


Fig. 4.3.3.6 --Section de *T.b.b.* 22 heures après l'injection de B.E
On y observe le flagelle (F), de nombreux phagosomes (PH) dans
le cytoplasme, et le cinétoplaste (C) contenant un résidu de kDNA
(flèche).
Gross. : 45000X



Fig. 4.3.3.7 --Cette figure rassemble une plaquette sanguine et quelques trypanosomes (*Trypanosoma brucei brucei* 48 heures après l'injection de B.E)
On peut voir des lysosomes (LY) , le noyau (N) , l'appareil de Golgi (G) et l'appareil mitochondrial dilaté et presque optiquement vide (flèche).
Gross. : 24750X

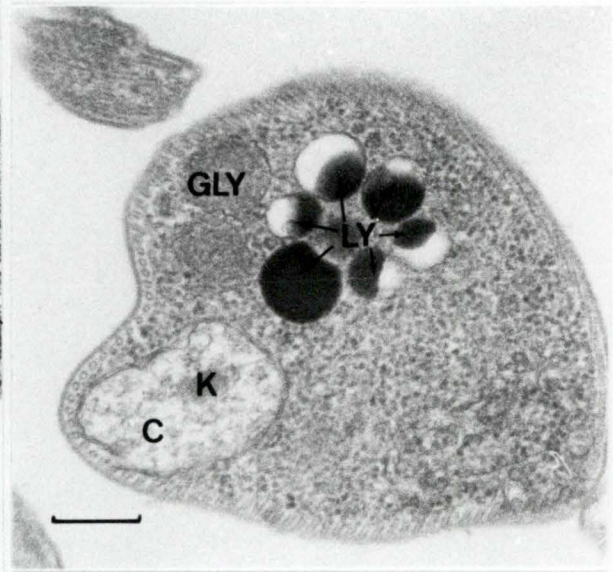


Fig. 4.3.3.8 --Section de *T.b.b.* 48 heures après l'injection de B.E
On y observe un groupe de lysosomes (LY) , un glycosome (GLY) et le cinétoplaste (C) à kDNA condensé et réduit (K).
Remarquons l'aspect très dense du trypanosome.
Gross. : 21600X

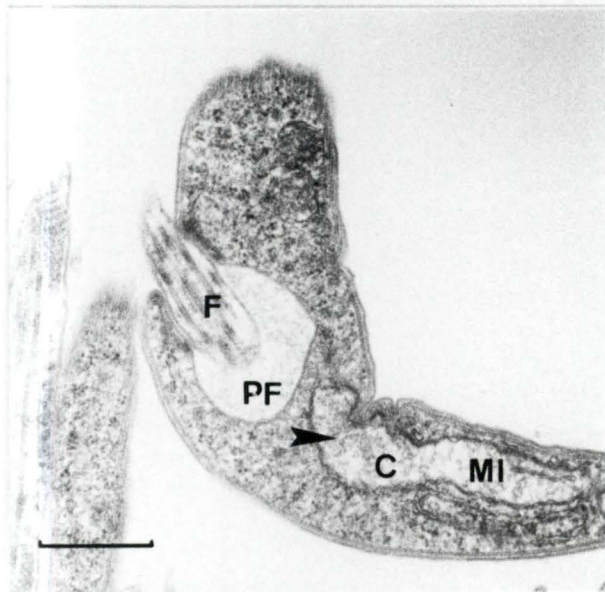


Fig. 4.3.3.9 --Section de *T.b.b.* 48 heures après l'injection de B.E
On y observe outre la poche flagellaire (PF) et son flagelle (F) , le cinétoplaste (C) prolongé par la mitochondrie (MI).
Notons l'absence de kDNA au niveau cinétoplastique (flèche).
Gross. : 30000X

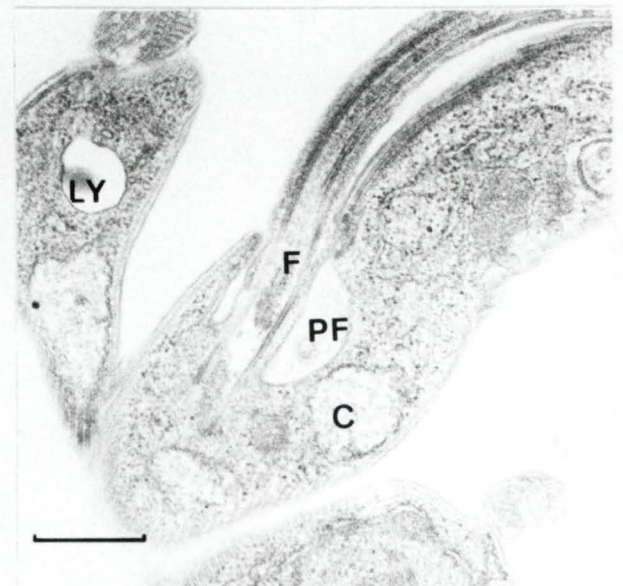


Fig. 4.3.3.10 --Section de *T.b.b.* 48 heures après l'injection de B.E
On y observe la poche flagellaire (PF) et le flagelle (F). Au pied de la poche flagellaire, on remarque la présence du cinétoplaste (C) dépourvu de kDNA.
On peut voir sur l'autre trypanosome un lysosome presque vide (LY).
Gross. : 30000X

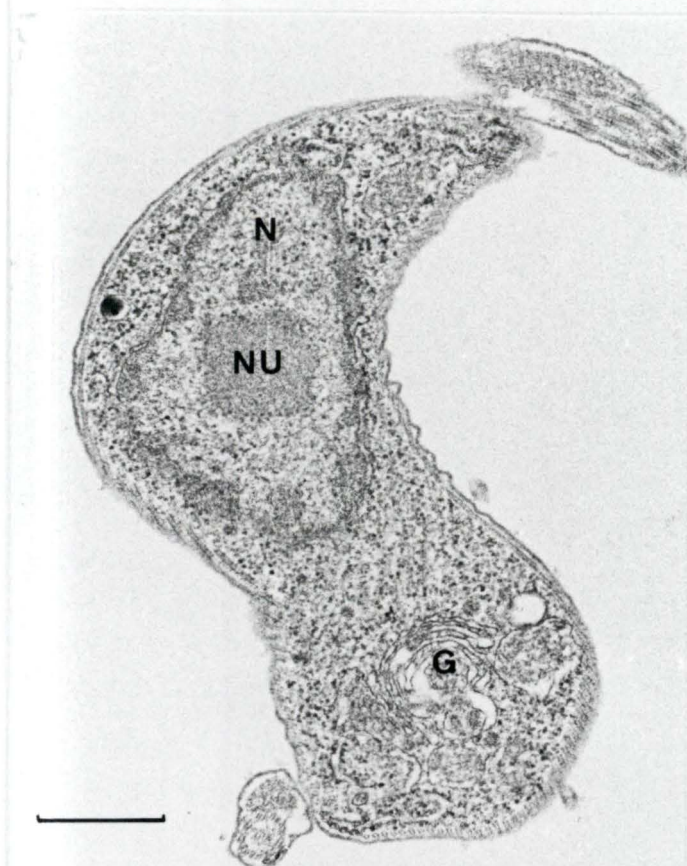


Fig. 4.3.3.11 --Section de *T.b.b.* 48 heures après l'injection de B.E
On y observe le noyau (N) , le nucléole (NU) et l'appareil de Golgi (G).
Gross. : 33000X

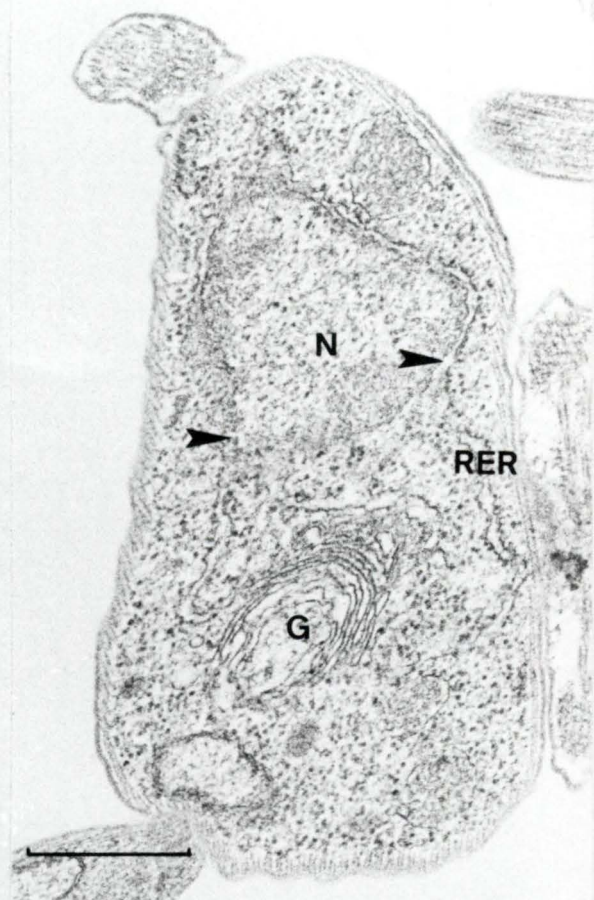


Fig. 4.3.3.13 -- Section de *T.b.b.* 48 heures après l'injection de B.E
On y observe un golgi (G) situé à proximité du noyau (N) , un RER dont une partie est en contact avec le noyau (flèches).
Gross.: 43200X

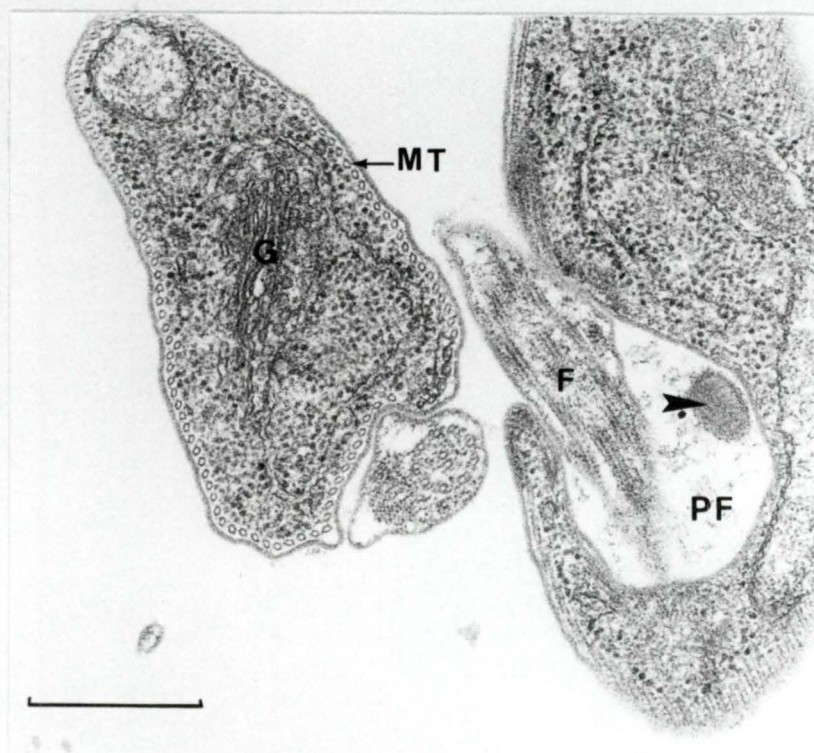


Fig. 4.3.3.12 --Section de *T.b.b.* 48 heures après l'injection de B.E
Cette figure comporte deux trypanosomes: sur l'un, on observe une poche flagellaire (PF) contenant le flagelle (F) et un élément figuré (flèche); sur l'autre, l'appareil de Golgi (G) et les microtubules du périplaste (MT) sont présents.
Gross. : 45000X

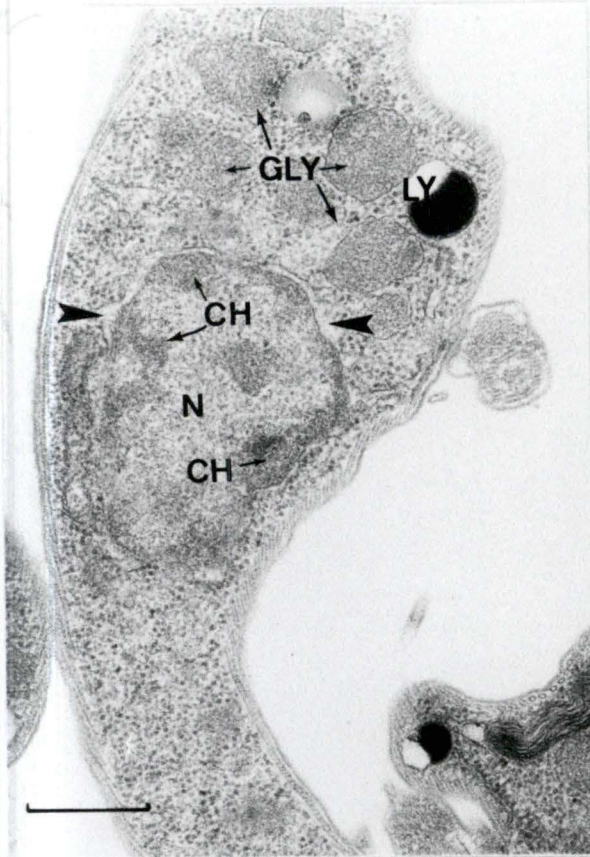


Fig. 4.3.3.14 -- Section de *T.b.b.* 48 heures après l'injection de B.E

On y observe plusieurs glycosomes (GLY), un lysosome presque à moitié vide et un noyau (N) à chromatine périphérique (CH). Notons le début de décollement du feuillet externe de la membrane nucléaire (flèches).
Gross.: 32400X

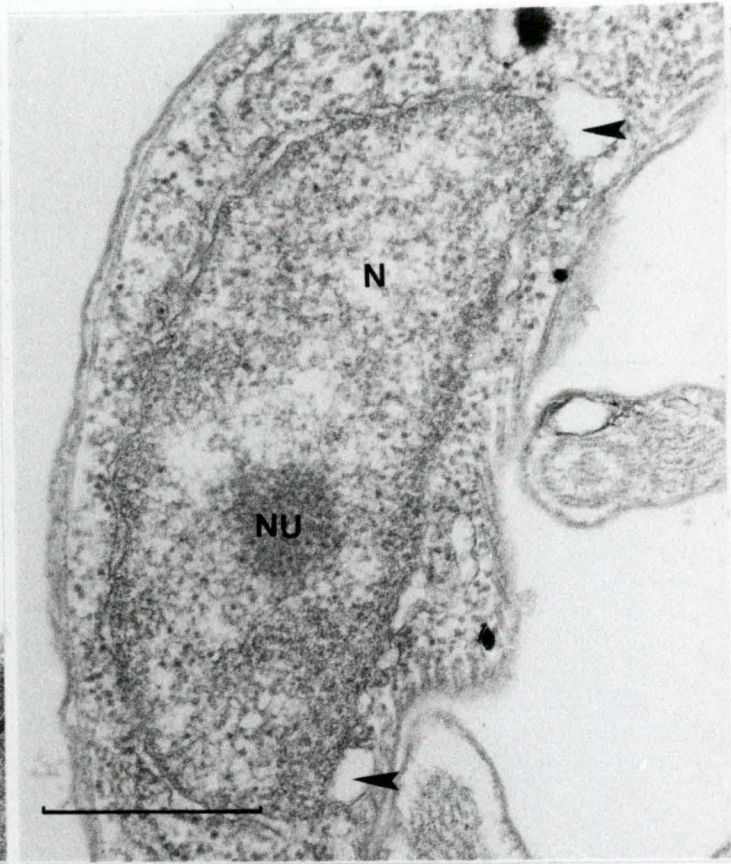


Fig. 4.3.3.15 -- Section de *T.b.b.* 48 heures après l'injection de B.E

On y observe un noyau (N) contenant un nucléole (NU). Remarquons le décollement à certains endroits du feuillet externe de la membrane nucléaire (flèches).
Gross.: 58500X

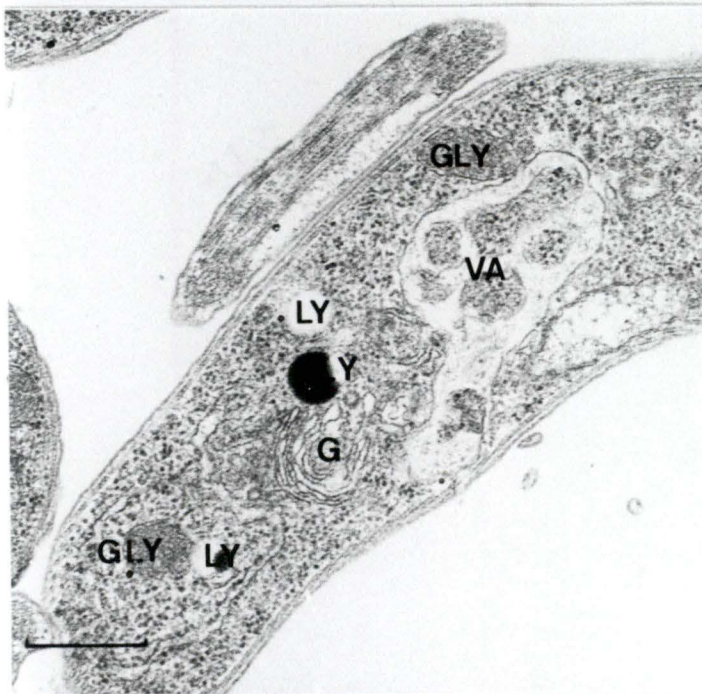


Fig. 4.3.3.16 -- Section de *T.b.b.* 48 heures après l'injection de B.E

On y observe une vacuole d'autophagie (VA), un golgi (G), deux glycosomes (GLY) et trois lysosomes (LY) d'aspect différent.
Gross.: 32400X



Fig. 4.3.3.17 -- Section de *T.b.b.* 48 heures après l'injection de B.E

On y observe une vacuole d'autophagie (VA).
Gross.: 18900X

4.4 Action de l'Antrycide sur *Trypanosoma brucei brucei*

La dose injectée aux souris est de 7,5 mg par kg donnée en une fois par voie intrapéritonéale. Cette dose unique a un effet thérapeutique et curatif.

4.4.1 Etude en microscopie optique

L'Antrycide induit l'apparition de formes aberrantes : elles présentent une taille supérieure à la normale; le noyau et le cinétoplaste ont un aspect fragmenté (fig. 4.4.1.1 ; fig.4.4.1.2). De nombreuses formes dyscinétoplastiques apparaissent également dès les premières heures du traitement (fig. 4.4.1.1 ; fig. 4.4.1.2).

4.4.2 Evolution du nombre et de la morphologie de *Trypanosoma brucei brucei* en fonction du temps. suite à l'injection d'Antrycide

L'injection d'Antrycide est effectuée 72 heures après l'inoculation des trypanosomes aux souris.

Cet intervalle permet une disparition de tous les trypanosomes.

Des intervalles plus faibles provoquent le même résultat.

De plus, l'injection de la drogue s'effectue à un moment où le nombre de trypanosomes est déjà très élevé, ce qui permet une meilleure détermination des pourcentages.

4.4.2.1 Etude du nombre

Les résultats sont présentés au tableau 4.4.2.1 et à la figure 4.4.2.1

Le point -72 h00 correspond à l'inoculation des trypanosomes.

Le point 0h00 correspond à l'injection de l'Antrycide.

L'Antrycide induit un ralentissement très prononcé de la multiplication des trypanosomes. Des valeurs proches du nombre maximal lors d'une trypanosomose normale sont atteints après 36 heures de traitement.

Ensuite, le nombre de trypanosomes diminue et on n'en retrouve plus au niveau sanguin après 62 heures d'action.

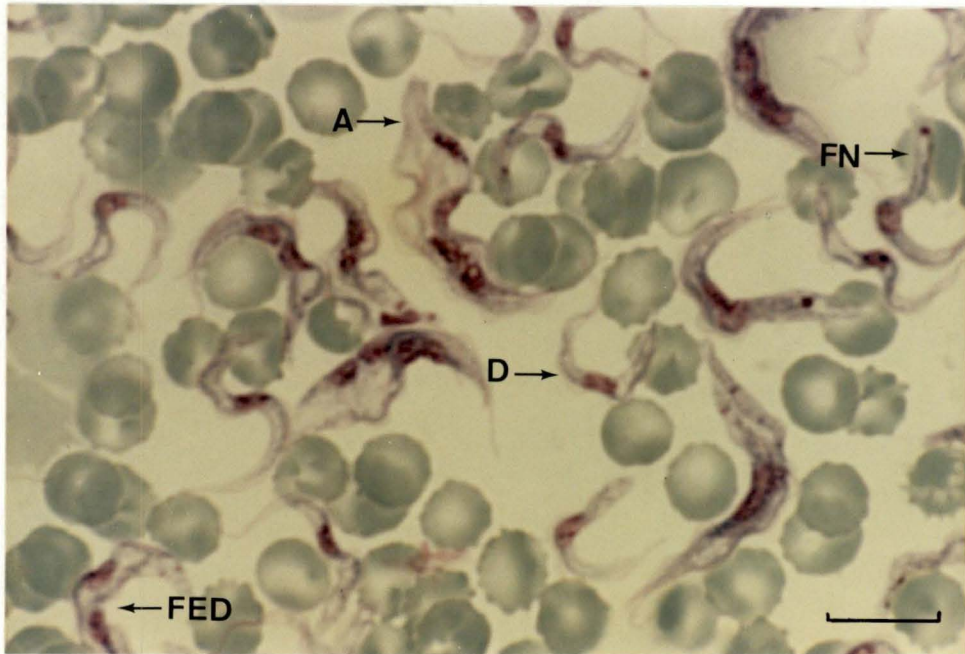


Fig. 4.4.1.1 -- Frottis de sang de souris infestée de *Trypanosoma brucei brucei*, réalisé 56 heures après l'injection d'Antrycide.

On y retrouve bon nombre de formes aberrantes (A) ainsi que des formes dyscinetoplastiques (D).

Il subsiste également des formes normales (FN) et des formes en division (FED).

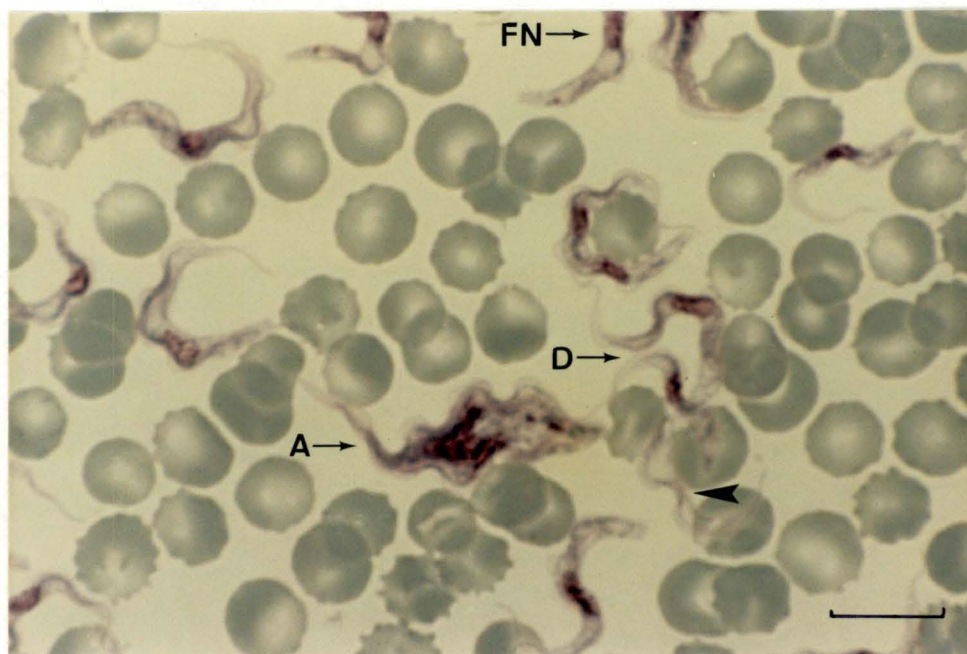


Fig. 4.4.1.2 -- Frottis de sang de souris infestée de *Trypanosoma brucei brucei*, réalisé 56 heures après l'administration d'Antrycide.

On y observe des formes aberrantes (A), des formes dyscinetoplastiques (D), ainsi que certaines formes normales (FN).

A noter la présence d'un trypanosome dépourvu de cinétoplaste et de noyau (flèche).

Tableau 4.4.2.1 : Effet de l'Antrycide sur le nombre de *Trypanosoma brucei brucei* .

Temps(heures)	Nombre(%)
0	16,2
6	16,3
24	21,8
30	24
36	26,9
48	15,3
54	13,8
56	12,1
60	0,4
62	0

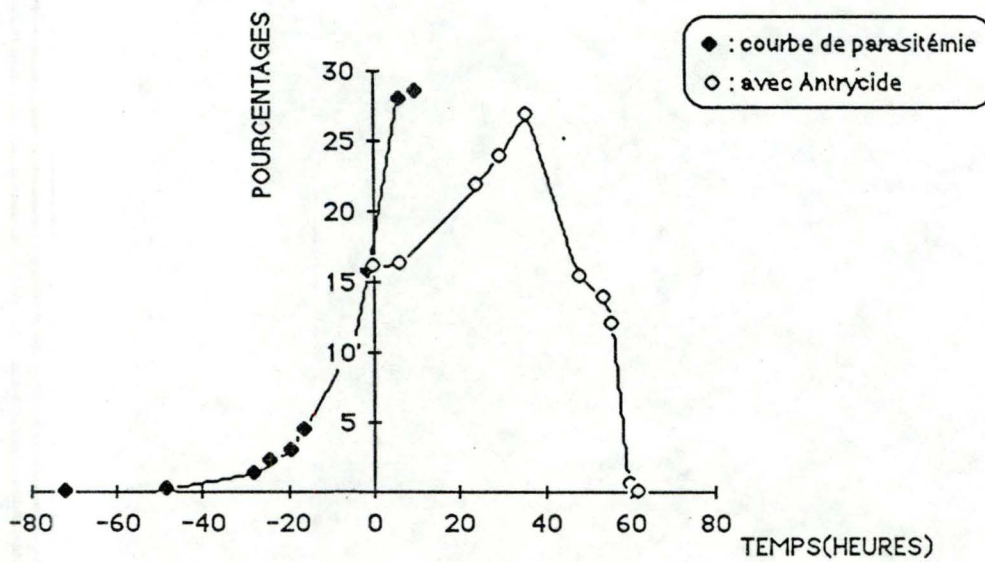


Figure 4.4.2.1 : Effet de l'Antrycide sur le nombre de *Trypanosoma brucei brucei*.
 L'inoculation des trypanosomes a lieu à l'heure - 72 et l'injection d'Antrycide à l'heure 0.
 La courbe de parasitémie se modifie fortement suite à l'action de l'Antrycide.

4.4.2.2 Etude de la morphologie

Les trypanosomes sont répartis dans quatre catégories :

- 1) Formes normales
- 2) Formes en division
- 3) Formes aberrantes
- 4) Formes dyscinétoplastiques

Les résultats sont présentés au tableau 4.4.2.2 et à la figure 4.4.2.2.

Le point 0h00 correspond à l'injection d'Antrycide

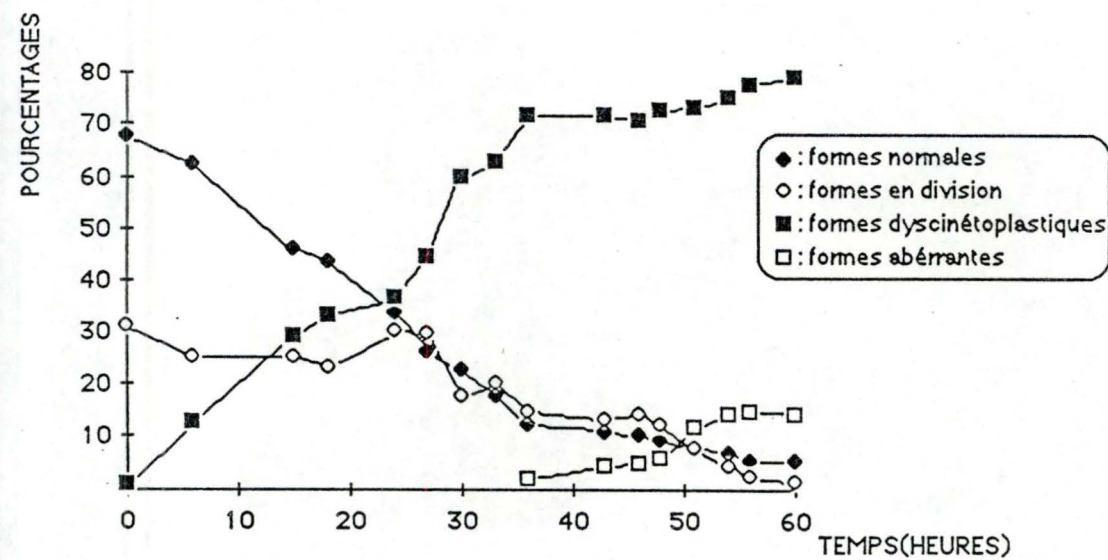
L'Antrycide induit une diminution des formes normales en corrélation avec une augmentation des formes dyscinétoplastiques.

Les formes en division qui se stabilisent jusqu'à 27 heures régressent par la suite. On peut établir un parallélisme avec le tracé des nombres.

Ce n'est qu'à partir de 36 heures que l'on voit apparaître des formes aberrantes.

Tableau 4.4.2.2 : Effet de l'Antrycide sur la morphologie de *Trypanosoma brucei brucei* .

Temps(heures)	Forme normale	Forme en division	Forme aberrante	Forme dyscinéto.
0	68	31	0	1
6	62,5	25	0	12,5
15	46	24,9	0	29,1
18	43,6	23,2	0	33,2
24	33,4	30	0	36,6
27	26,3	29,5	0	44,2
30	22,4	17,8	0	59,8
33	17,5	19,9	0	62,6
36	12	14,9	1,6	71,5
43	10,9	13	4,3	71,8
46	10,3	14	4,9	70,8
48	9,3	12,3	5,8	72,6
51	7,5	7,8	11,5	73,2
54	6,9	4	14,1	75
56	5	2,5	14,6	77,9
60	5,3	1,1	14,2	79,4

Figure 4.4.2.2 : Effet de l'Antrycide sur la morphologie de *Trypanosoma brucei brucei*.

L'Antrycide est injectée à l'heure 0.

Les formes dyscinétoplastiques augmentent au détriment des formes normales et des formes en division.

Les formes aberrantes se manifestent à partir de la 36^{ème} heure.

4.3.3 Etude en microscopie électronique à transmission

L'Antrycide produit un enroulement qui semble provenir de la mitochondrie. Cet enroulement prend l'aspect d'un bourgeonnement.

(Fig. 4.4.3.5 ; Fig. 4.4.3.6 ; Fig. 4.4.3.7 ; Fig. 4.4.3.8)

Le kDNA subit une condensation terminale de forme sphérique. (Fig. 4.4.3.9 ; Fig.4.4.3.11)

On peut retrouver trois cinétoplastes présentant chacun une condensation du kDNA.

(Fig. 4.4.3.12 ; Fig. 4.4.3.13)

L'Antrycide produit une dilatation du système mitochondrial.

(Fig. 4.4.3.16 ; Fig. 4.4.3.17 ; Fig. 4.4.3.18 ; Fig. 4.4.3.19)

Après 60 heures de traitement, des vacuoles subissant un processus d'autophagie ont été découvertes. Ils ne s'agit pas de glycosomes comme le montrent les figures 4.4.3.20 et 4.4.3.21.

Des fragments membranaires sont retrouvés à l'intérieur de ces vacuoles. (Fig. 4.4.3.22)

La division cellulaire semble altérée dans sa phase cinétoplastique. La figure 4.4.3.16 montre un cinétoplaste dont le kDNA présente un aspect morphologique inhabituel.

Le noyau , l'appareil de Golgi , le réticulum endoplasmique et le périplaste conservent leur intégrité.

(Fig. 4.4.3.4 ; Fig. 4.4.3.12 ; Fig. 4.4.3.13 ; Fig.4.4.3.17 ; Fig. 4.4.3.20 ; fig. 4.4.3.21 ; Fig. 4.4.3.22 ; Fig. 4.4.3.23)

La poche flagellaire et le flagelle restent intacts. La poche flagellaire renferme en plus de nombreux éléments figurés.

(Fig. 4.4.3.1 ; Fig. 4.4.3.2 ; Fig. 4.4.3.3 ; Fig. 4.4.3.10 ; Fig. 4.4.3.14 ; Fig. 4.4.3.15 Fig. 4.4.3.16 ; Fig. 4.4.3.23)

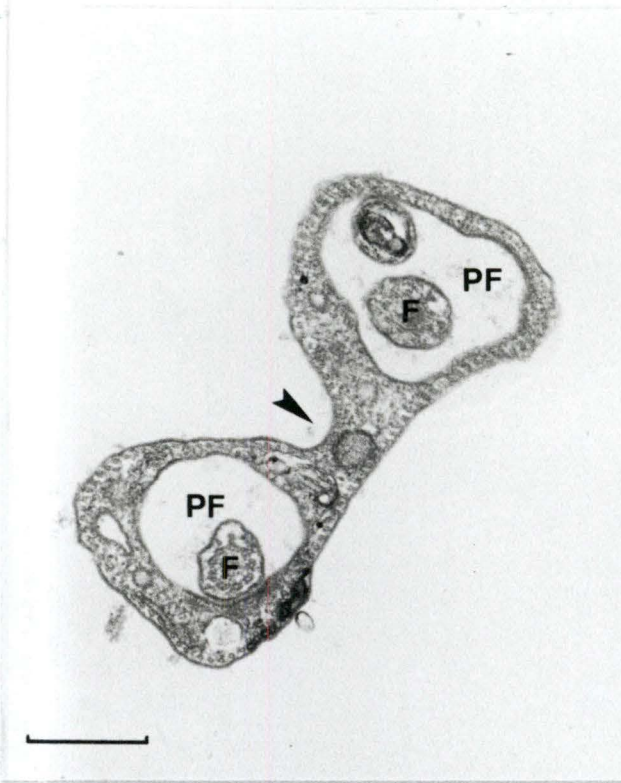


Fig. 4.4.3.1 --Section de *T.b.b.* 24 heures après l'injection d'Antrycide

Ce trypanosome de forme humoristique se trouve à un stade avancé de la division.

On y observe deux poches flagellaires (PF) contenant chacune un flagelle (F); la scission se fera à l'endroit indiqué par la flèche.

Gross. : 32400X

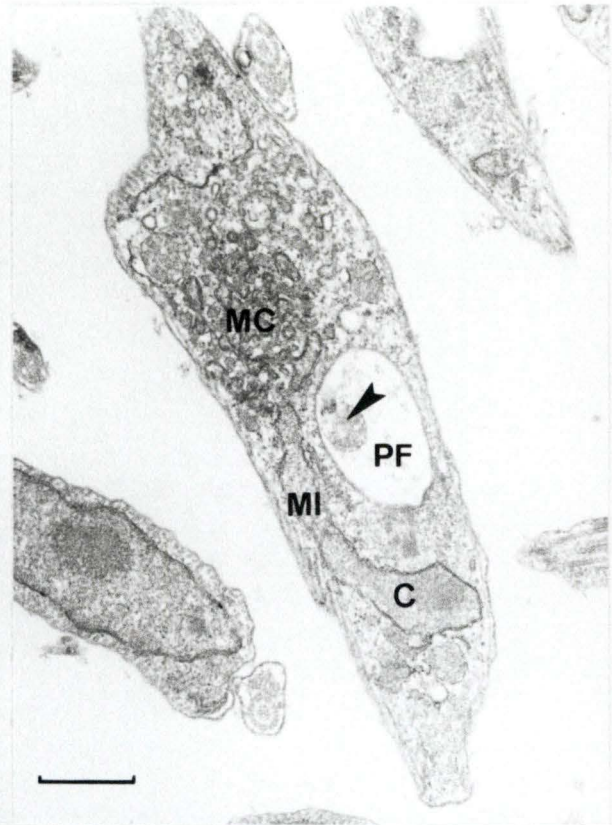


Fig. 4.4.3.2 --Section de *T.b.b.* 24 heures après l'injection d'Antrycide

On y observe la poche flagellaire (PF) contenant un élément figuré (flèche), et le cinétoplaste (C) suivi de la mitochondrie (MI).

Remarquons l'aspect bourgeonnant (MC) de la mitochondrie.

Gross. : 24750X

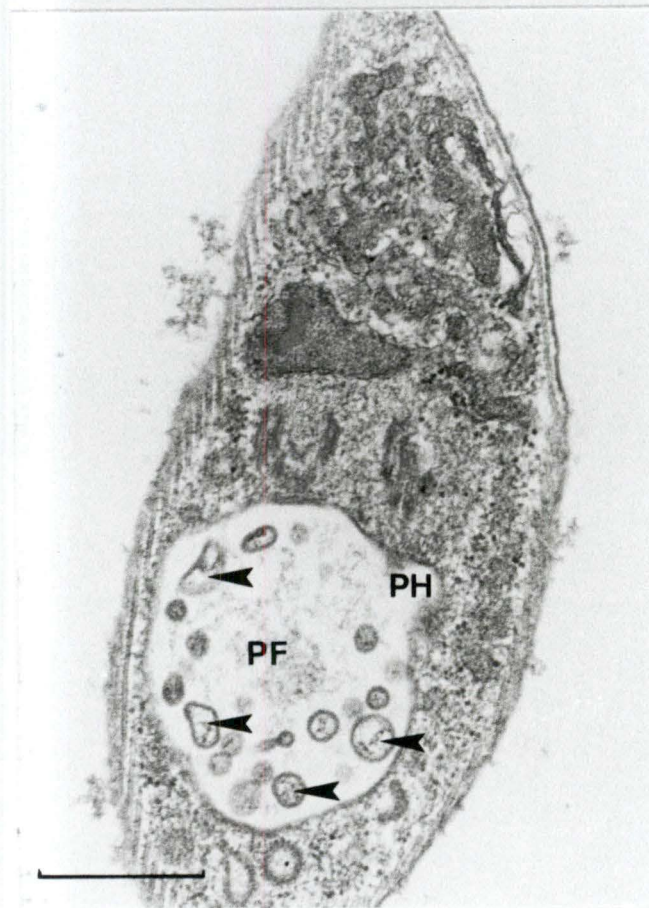


Fig. 4.4.3.3 --Section de *T.b.b.* 24 heures après l'injection d'Antrycide

La poche flagellaire (PF) contient de nombreux éléments figurés (flèches).

Un phagosome est en voie de formation (PH).

Gross. : 45000X

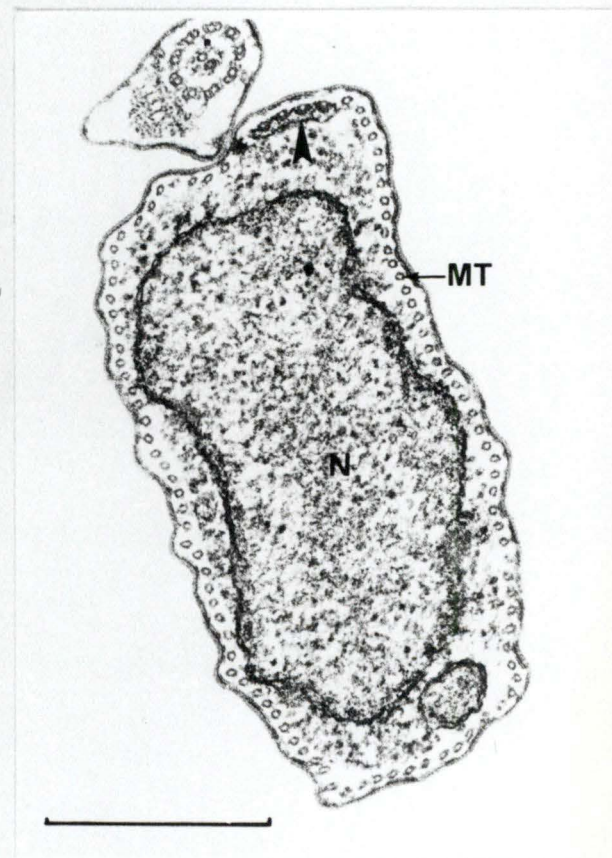


Fig. 4.4.3.4 --Section de *T.b.b.* 24 heures après l'injection d'Antrycide

Cette figure montre l'arrangement normal des microtubules du périplaste (MT). On peut remarquer la présence d'une structure tubulaire s'accrochant à un groupe de microtubules (flèche).

On y observe également le noyau (N) anormal du fait de son contenu granulaire.

Gross. : 58500X

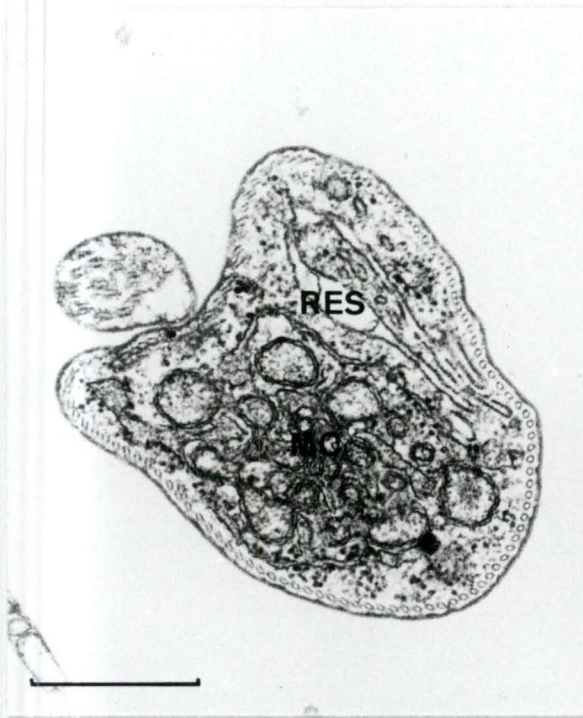


Fig. 4.4.3.5 --Section de *T.b.b.* 30 heures après l'injection d'Antrycide
On y observe un enroulement d'origine mitochondriale (MC) et
une dilatation de certains tubules du RES (flèche).
Gross. : 45000X

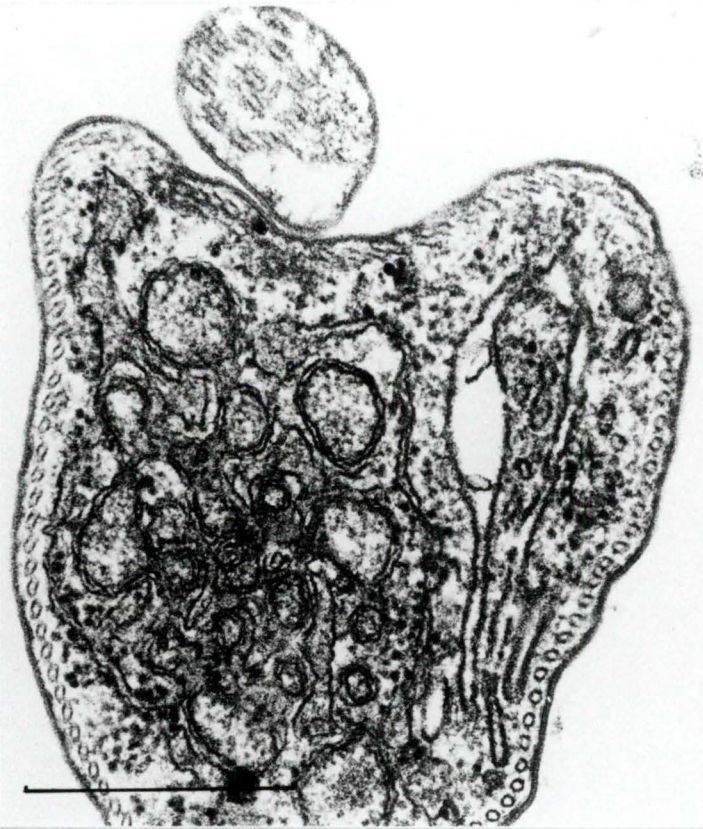


Fig. 4.4.3.6 --Section de *T.b.b.* 30 heures après l'injection d'Antrycide
Détail de la figure précédente.
Gross. : 72000X



Fig. 4.4.3.7 --Section de *T.b.b.* 30 heures après l'injection d'Antrycide
On y observe un enroulement de la mitochondrie (MC) et de part et
d'autre de cet enroulement, on remarque la présence de deux
cinétoplastes (C).
Notons que le point de départ de cet enroulement semble être le
cinétoplaste (flèches).
Gross. : 117000X

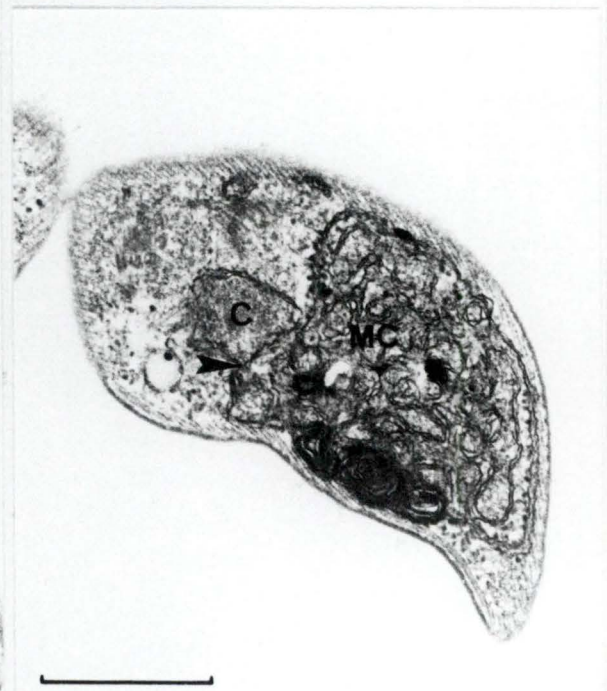


Fig. 4.4.3.8 --Section de *T.b.b.* 30 heures après l'injection d'Antrycide
On y observe un enroulement de la mitochondrie (MC) et un
cinétoplaste (C). Ici aussi le point de départ de cet enroulement
semble être le cinétoplaste (flèche).
Gross. : 45000X

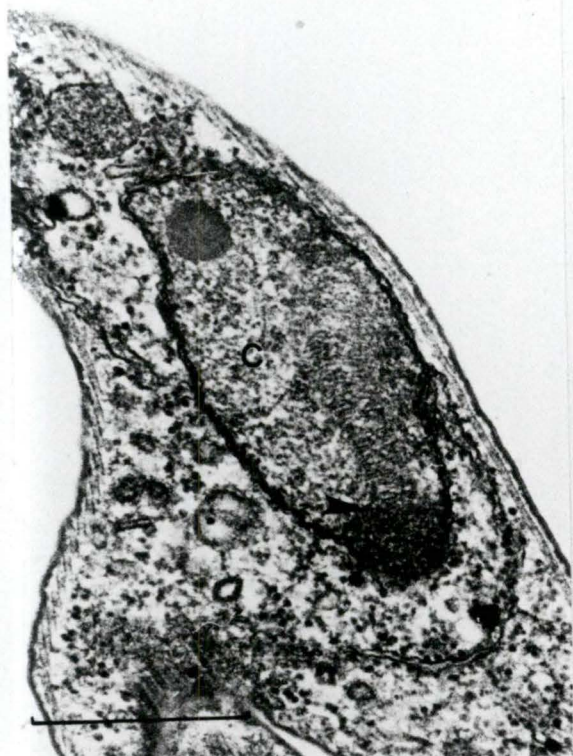


Fig. 4.4.3.9 --Section de *T.b.b.* 30 heures après l'injection d'Antrycide montrant le cinétoplaste anormal (C) et le kDNA (flèche) condensé.
Gross. : 58500X

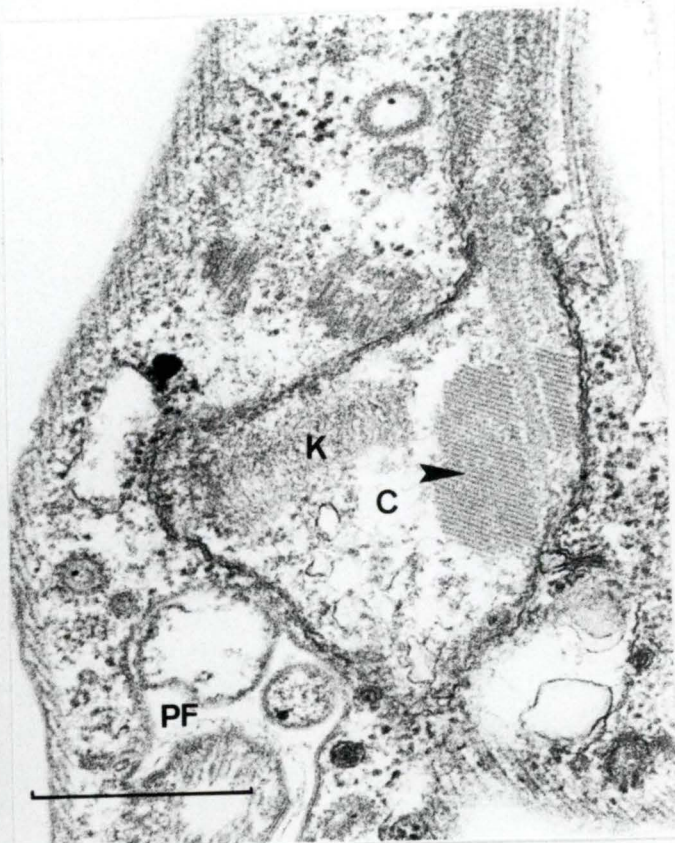


Fig. 4.4.3.10 --Section de *T.b.b.* 30 heures après l'injection d'Antrycide. Accolés à la poche flagellaire (PF), on retrouve le cinétoplaste (C) avec son kDNA (K) et des formations cristallines (flèche).
Gross. : 58500X

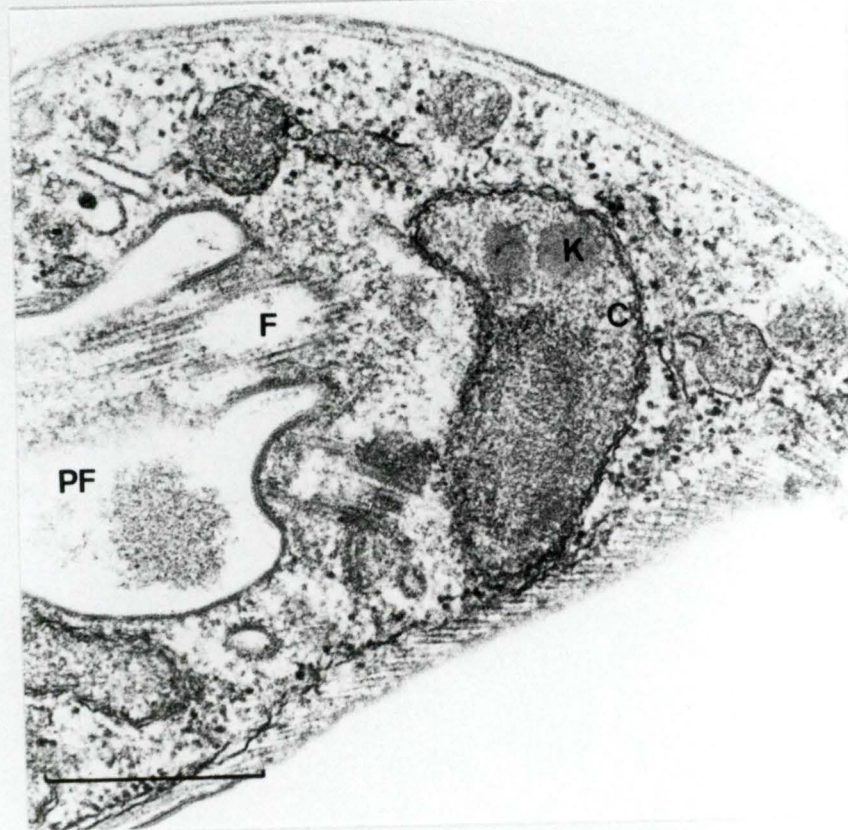


Fig. 4.4.3.11 --Section de *T.b.b.* 30 heures après l'injection d'Antrycide. On y observe la poche flagellaire (PF) avec le flagelle (F). On remarque également la condensation du kDNA (K) au sein du cinétoplaste (C).
Gross. : 58500X

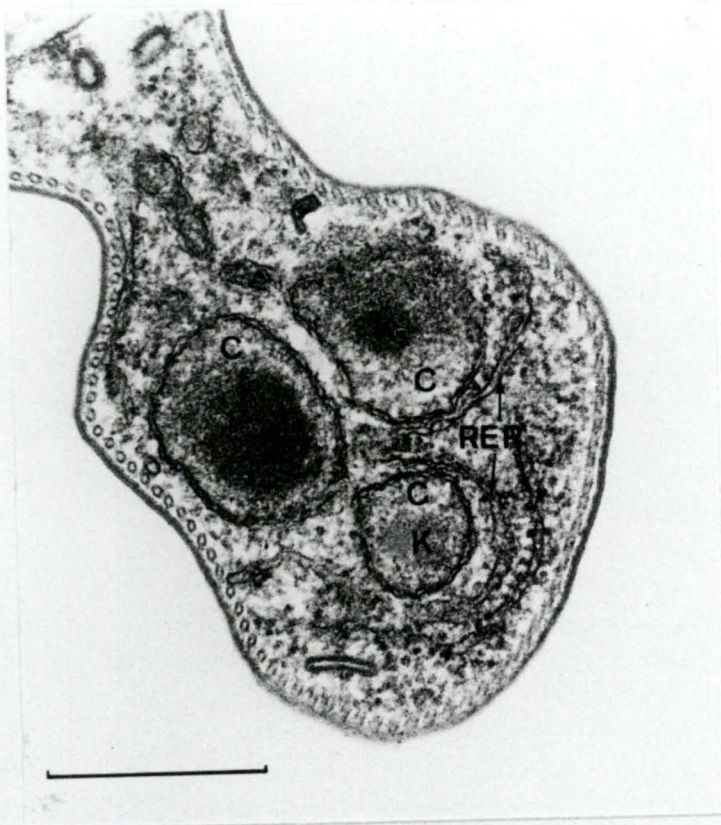


Fig. 4.4.3.12 --Section de *T.b.b.* 53 heures après l'injection d'Antricyde
 On observe la présence de trois cinétoplastes (C) contenant
 chacun un kDNA condensé (K)
 On retrouve également plusieurs tubules du réticulum
 endoplasmique (RER) remarquables par leur longueur.
 Gross. : 58500X

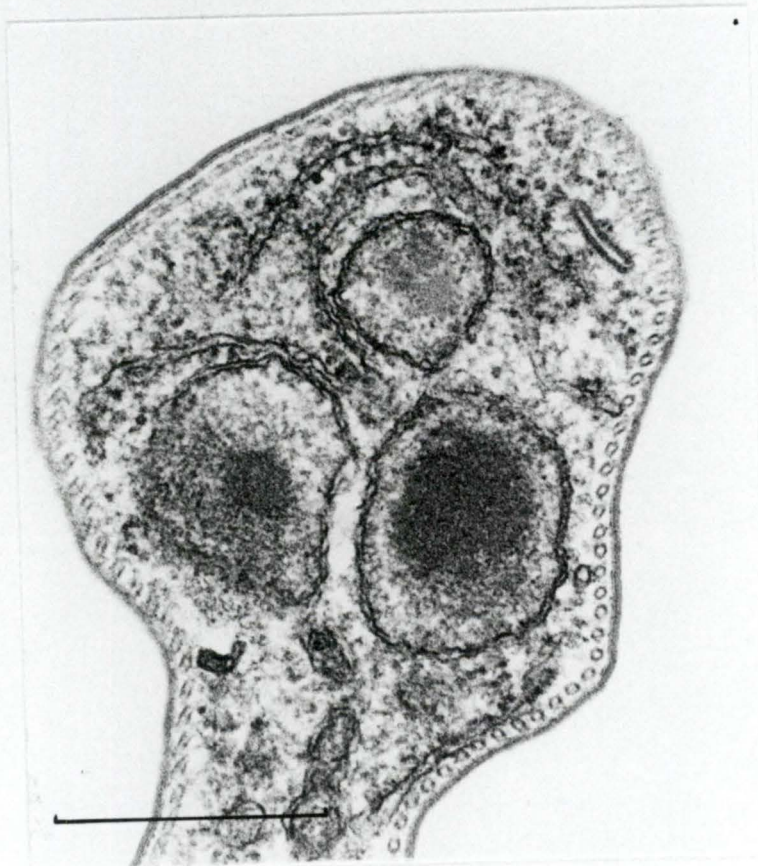


Fig. 4.4.3.13 --Section de *T.b.b.* 53 heures après l'injection d'Antricyde
 Détail de la figure précédente 4.4.3.12.
 Gross. : 72000X

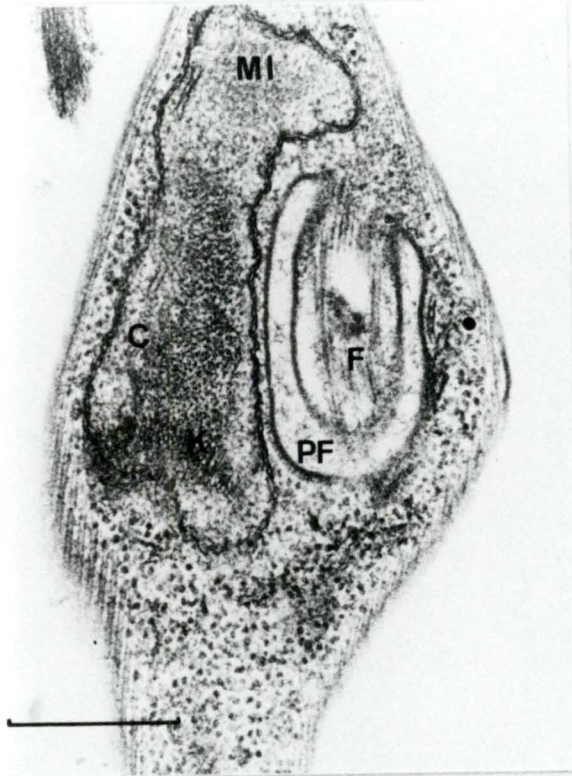


Fig. 4.4.3.14 --Section de *T.b.b.* 60 heures après l'injection d'Antrycide
On y observe la poche flagellaire (PF) contenant le flagelle (F).
Le cinétoplaste (C) et la mitochondrie (MI) sont tous deux dilatés. Le kDNA (K) est peu apparent.
Gross. : 45000X

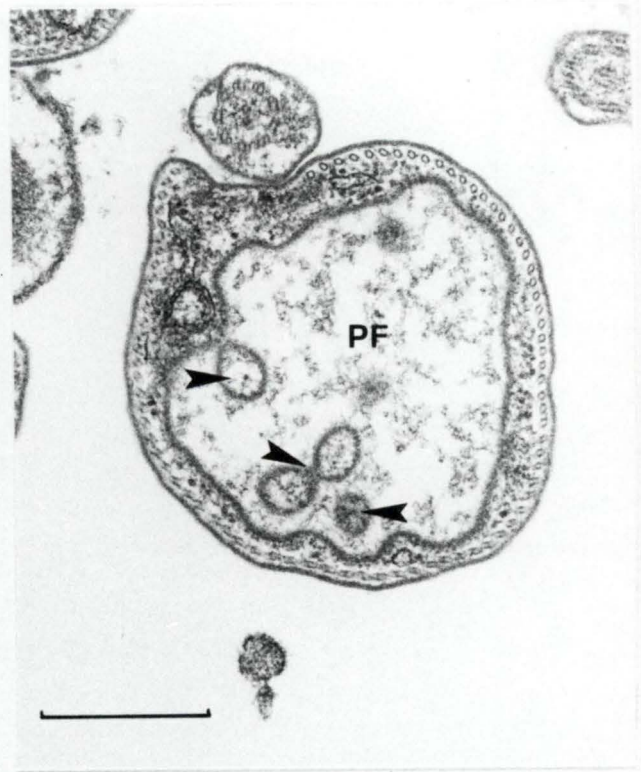


Fig. 4.4.3.15 --Section de *T.b.b.* 60 heures après l'injection d'Antrycide
Cette section se situe au niveau de la poche flagellaire (PF).
Celle-ci présente un contour "bosselé" et contient un certain nombre d'éléments figurés (flèches).
Gross. : 45000X

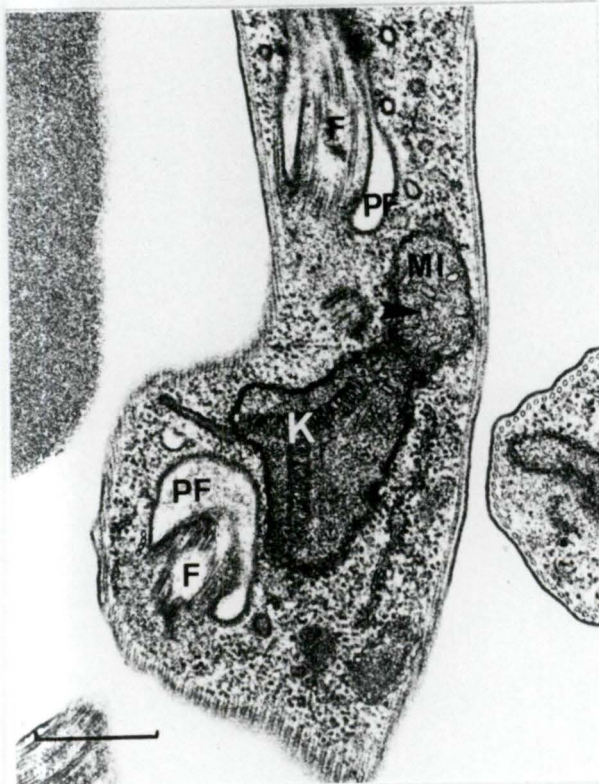


Fig. 4.4.3.16 --Section de *T.b.b.* 60 heures après l'injection d'Antrycide
Ce trypanosome est en cours de division. En effet, on retrouve deux poches flagellaires (PF) ainsi que deux flagelles (F).
Le cinétoplaste contient un kDNA (K) de forme inhabituelle.
Dans la mitochondrie quelque peu dilatée (MI), on peut voir des fragments de crêtes mitochondriales (flèche).
Gross. : 32400X

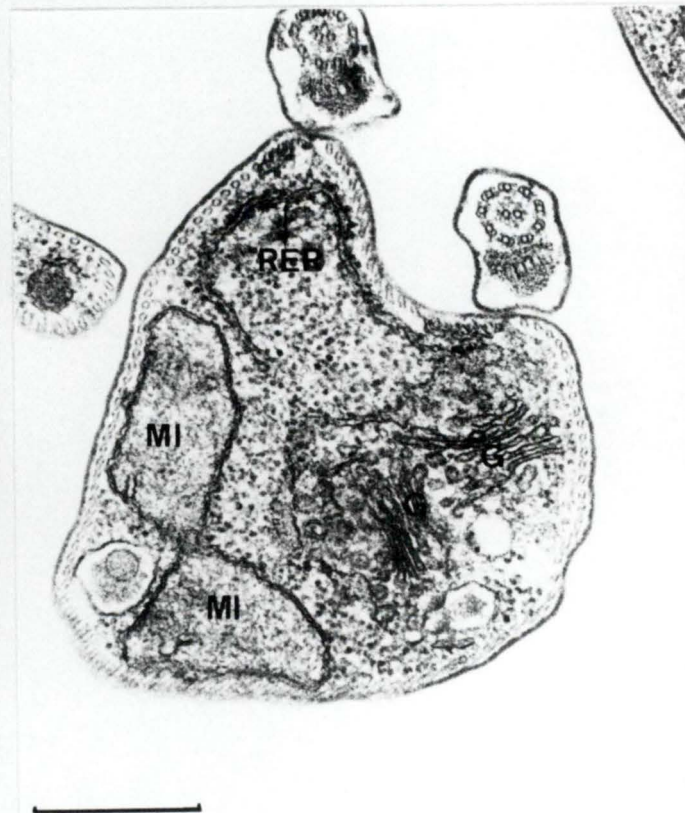


Fig. 4.4.3.17 --Section de *T.b.b.* 60 heures après l'injection d'Antrycide
On y observe le réticulum endoplasmique rugueux (RER), la mitochondrie quelque peu dilatée (MI) et plus spécialement l'appareil de Golgi (G).
Gross. : 45000X

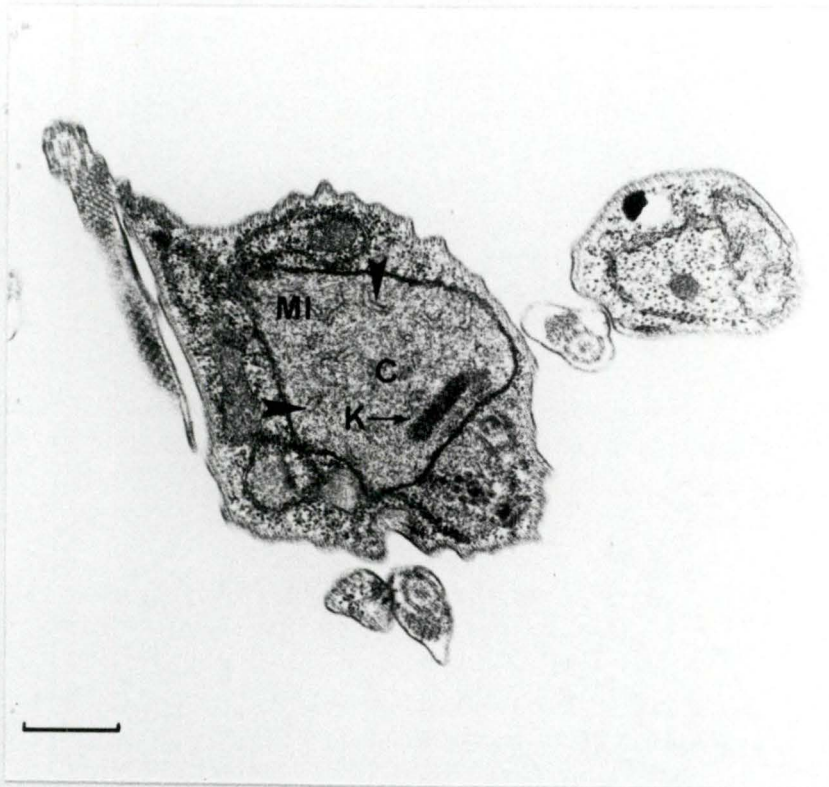


Fig. 4.4.3.18 --Section de *T.b.b.* 60 heures après l'injection d'Antrycide

On y découvre le kDNA (K) isolé au sein du cinétoplaste (C) et de la mitochondrie (MI) qui tous deux présentent une dilatation importante.

Notons la présence de plusieurs crêtes mitochondriales (flèches).

Gross. : 24750X

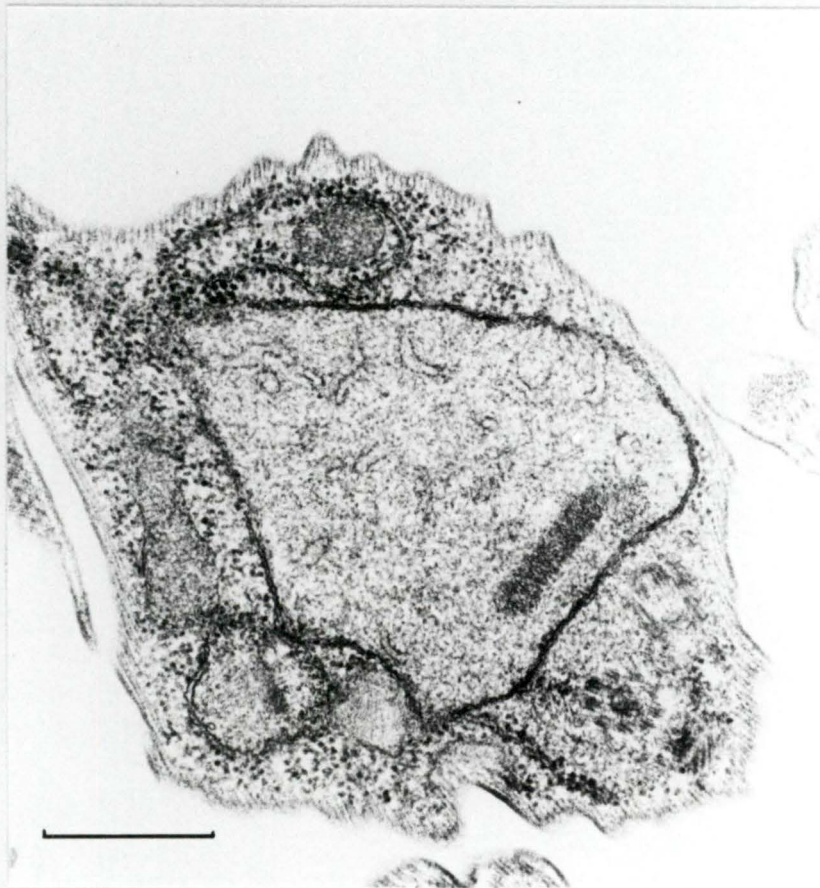


Fig. 4.4.3.19 --Section de *T.b.b.* 60 heures après l'injection d'Antrycide

Détail de la figure précédente 4.4.3.18.

Gross. : 45000X

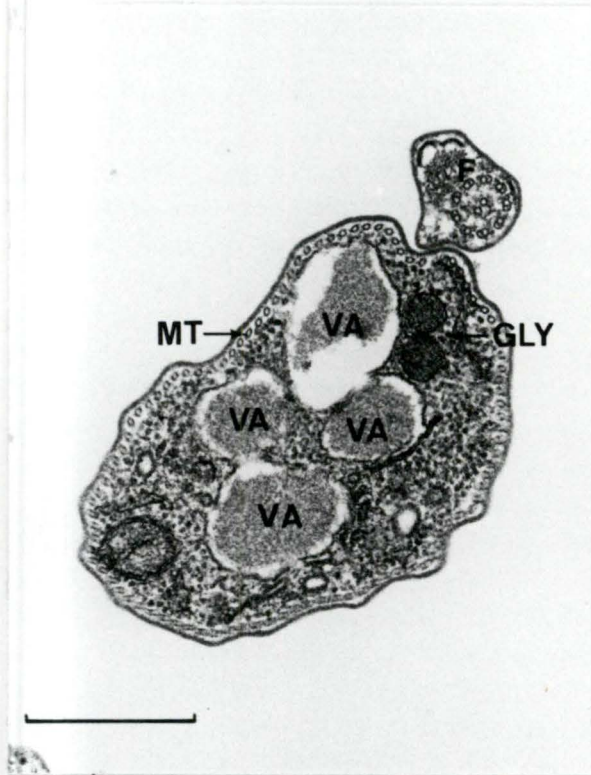


Fig. 4.4.3.20 --Section de *T.b.b.* 60 heures après l'injection d'Antricyde
On y observe quatre vacuoles d'autophagie reliées entre elles (VA), deux sections de glycosomes (GLY) ainsi que les microtubules du périplaste (MT) et le flagelle (F).
Gross. : 45000X



Fig. 4.4.3.21 --Section de *T.b.b.* 60 heures après l'injection d'Antricyde
On y observe plusieurs vacuoles d'autophagie (VA) et des glycosomes (GLY).
Sur un autre trypanosome, on observe le noyau (N) et son nucléole (NU).
Gross. : 32400X

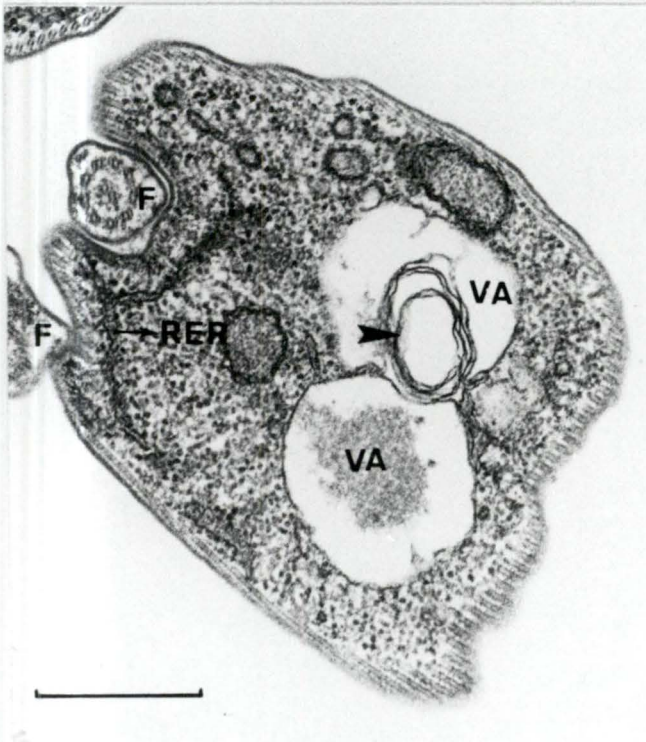


Fig. 4.4.3.22 --Section de *T.b.b.* 60 heures après l'injection d'Antricyde
On y observe deux vacuoles d'autophagie (VA) contenant des fragments membranaires (flèche).
Sont présents également deux sections du flagelle (F) et le RER.
Gross. : 45000X

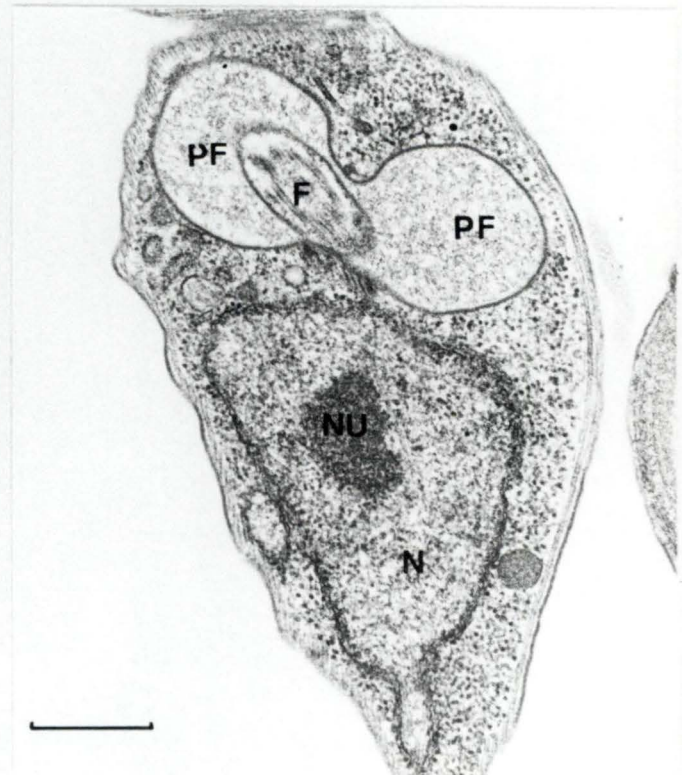


Fig. 4.4.3.23 --Section de *T.b.b.* 60 heures après l'injection d'Antricyde
On y observe le flagelle (F) et une double section de la poche flagellaire (PF) au contenu finement granuleux.
Remarquons la présence du noyau (N) et du nucléole (NU).
Gross. : 32400X

4.5 Pouvoir pathogène des trypanosomes sanguins prélevés après injection des médicaments.

Lors du traitement ,l'étude de la parasitémie sur frottis sanguin fait apparaître qu'à un moment donné,un grand nombre de trypanosomes présente des altérations cytologiques importantes.

A ce moment , de tels trypanosomes sont prélevés et injectés à des souris saines dans le but de tester ce qui reste du pouvoir pathogène de ces parasites.

Lors des différents essais que nous avons réalisés pour les trois médicaments,les souris sont toutes mortes de Nagana.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous avons utilisé la souche *Trypanosoma brucei brucei* Lump 127 dont le pouvoir pathogène a une action létale entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour.

L'étude approfondie de la morphologie de *Trypanosoma brucei brucei* s'est avérée nécessaire pour bien localiser les différents organites susceptibles de subir l'action des médicaments.

Cette étude fut réalisée au moyen du microscope optique et du microscope électronique.

Les observations en microscopie électronique de *Trypanosoma brucei brucei* nous ont permis de confirmer les caractéristiques générales de ce parasite ,publiées antérieurement . Nous avons eu l'occasion de préciser qu'au niveau de la poche flagellaire , là où ont lieu les processus d'endocytose , des phagosomes peuvent se former aussi bien près du sommet qu'au fond de cette poche flagellaire. (Fig. 5.1)

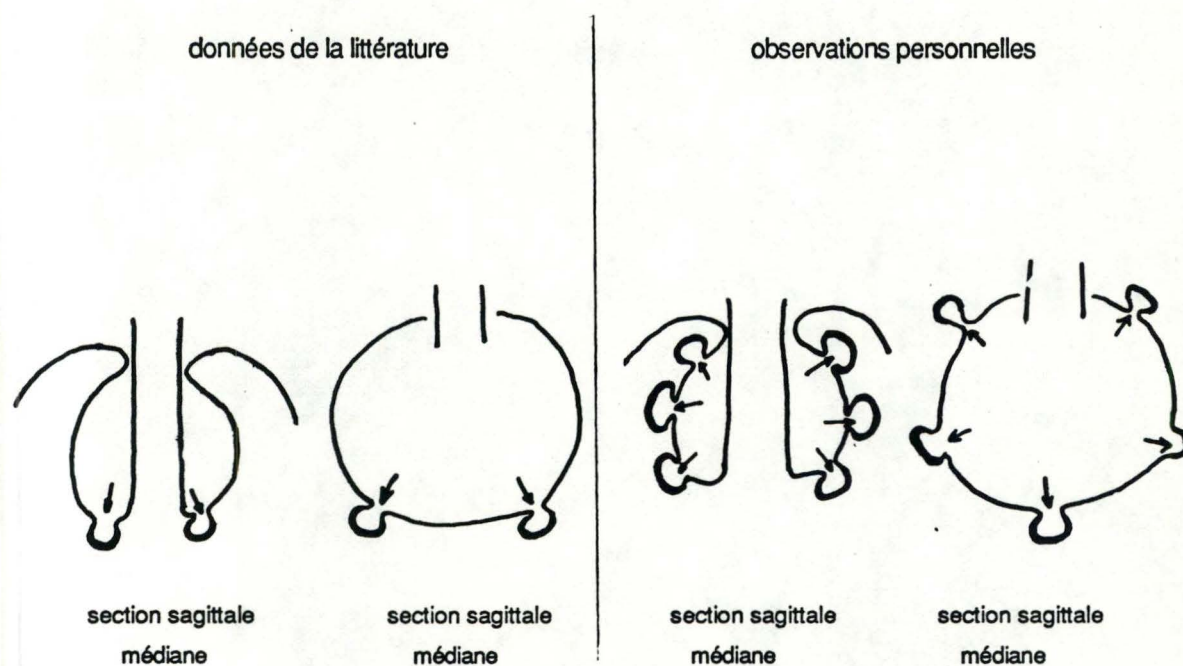


Fig. 5.1 Processus d'endocytose au niveau de la poche flagellaire

Notre étude s'est ensuite tournée vers les modifications que différents médicaments (Acriflavine , Bromure d'Ethidium , Antrycide) peuvent entraîner au sein de l'organisation du trypanosome.

Certaines structures sont altérées à des degrés divers. La synthèse des résultats figure au tableau 5.1.

Il aurait été intéressant d'associer des études biochimiques à notre étude morphologique en microscopie électronique pour mieux cerner les altérations apparues au sein du trypanosome.

Au cours de nos travaux , une étude comparative des trois drogues utilisées a été réalisée. L'Antrycide s'est avérée être la plus active parce que , seule des trois , elle fait disparaître complètement les trypanosomes , et ce malgré une injection très tardive du médicament. En effet , l'Antrycide est administrée aux souris à la 72^{ème} heure après l'inoculation des trypanosomes , donc à un moment où le nombre de parasites est déjà très élevé et la pathologie avancée .

Le Bromure d'Ethidium s'est avéré d'une efficacité bien moindre ; il ne provoque qu'une diminution temporaire du nombre de trypanosomes malgré une injection précoce, 26 heures après l'inoculation des trypanosomes , donc au début de la parasitémie.

Une nouvelle dose serait nécessaire pour obtenir de meilleurs résultats.

L'Acriflavine, administrée 46 heures après l'inoculation des souris, provoque une disparition des trypanosomes qui semble localisée au compartiment sanguin ; mais des formes dissimulées à d'autres endroits pourraient être à l'origine d'une nouvelle parasitémie à un moment où le médicament n'agit plus; diverses hypothèses peuvent l'expliquer : ces trypanosomes peuvent être localisés à des endroits inaccessibles à l'Acriflavine par défaut de perméabilité ou par manque de transport .

On peut prendre en considération le fait que les médicaments après leur injection dans l'organisme sont transformés en dérivés ou en conjugués à demi - vie très courte avant d'être éliminés par voie biliaire .Ce sont peut-être ces dérivés - là qui ont une action trypanocide.

il faut noter également que les différents médicaments employés agissent au niveau du foie et modifient le taux de certaines protéines sériques ainsi que M.F. MERLEVEDE en 1981 l'a démontré : le B.E. augmente considérablement le taux des transaminases , l'Acriflavine ne modifie aucun taux de façon significative et l'Antrycide provoque une augmentation des

Tableau 5.1: Tableau récapitulatif

	Acriflavine	Bromure d'éthidium	Antrycide
dose (mg/kg)	5	2,5	7,5
temps(heures)entre inoculation des trypanosomes et du médicament	46	26	72
disparition des trypanosomes sanguins	* + -	-	+
microscopie optique:	(1)et(2)	(2)	(1)et(2)
microscopie électronique:			
<u>Appareil mitochondrial</u>			
kDNA altéré	++	+++	+
dilatation	+++	+	+
altération membrane	+++	-	-
enroulement mito.	+	-	+++
<u>Cytoplasme</u>			
dilatation RER	+	-	-
ribosomes			
déplétion	++	-	-
agrégats	+	-	-
<u>Noyau altéré</u>	+	++	-
<u>Vacuoles d'autophagie</u>	-	++	+++
<u>Périplaste altéré</u>	-	-	-
<u>Flagelle et P.F.altérés</u>	-	-	-
<u>Phagocytose</u>	-	-	-
<u>Golgi</u>	-	-	-
pouvoir pathogène du trypanosome après traitement	+	+	+

* disparition momentanée.

(1) formes aberrantes.

(2) formes dyscinétoplastiques.

transaminases uniquement.

Ces modifications de même que la stimulation du système lymphoïde par les trypanosomes contribueront à la destruction d'une partie ou de la totalité des parasites (WERY et al., 1982).

Le pouvoir pathogène des trypanosomes prélevés au cours du traitement semble être conservé après l'action des différentes drogues. Pour l'expliquer, trois hypothèses peuvent être envisagées:

- 1) Il se peut que les anomalies cytologiques observées n'ont pas fait perdre leur potentiel de division aux trypanosomes.
- 2) Il se peut que, lorsqu'il n'y a plus de molécules médicamenteuses dans le liquide péricellulaire, les trypanosomes puissent rapidement récupérer leur état initial. Dans ce cas, leur système lysosomal est apte à détoxiquer rapidement les cellules des déchets des organites atteints.
- 3) Il se peut enfin que tous les trypanosomes ne soient pas atteints par les molécules trypanocides parce qu'au moment de l'administration unique du médicaments, ils n'étaient pas tous au même niveau de la phase de division sensible à l'action de la substance administrée.

Il est probable que ces trois hypothèses sont intriquées, ce qui nous permet de dire qu'il faut administrer plusieurs fois les médicaments trypanocides suivant un schéma qui permette d'atteindre tous les trypanosomes.

BIBIOGRAPHIE :

- ALLISON A.C. , 1968.
The role of lysosomes in the action of drugs and hormones.
Adv. Chemother. , **3** , pp.253 - 302.
- BACCHI C.J. ; NATHAN H.C. ; HUTNER S.H. ; Mc CANN P.P. and SJOERDSMA A. , 1982.
Novel combination chemotherapy of experimental trypanosomiasis by using bleomycin and DL - a - difluoromethylornithine : Reversal by polyamines.
Biochemical Pharmacology , **31 (17)** , pp.2833 - 2836.
- BARNICOAT A.J. ; VAN'T HOFF W.G. ; MORRISON P.J. and ROGERS H.J. , 1981.
Observation on salicyl hydroxamic acid , an expérimental trypanocide.
Experientia , **37** , pp.1290 -1291.
- BENARD J. and RIOU G.F. , 1980.
In vivo effects of intercalating and nonintercalating drugson the tertiary Structure of Kinetoplast Deoxyribonucleic Acid.
Biochemistry , **19** , pp.4197 - 4201.
- BORST P. ; WEIJERS P.J. and BRAKENHOFF G.J. , 1982
Analysis by electron Microscopy of the variable segment in the maxi-circle of Kinetoplast DNA from *Trypanosoma brucei*.
Biochimica et Biophysica Acta , **699** , pp.272 - 280.
- BROWN K.N. ; ARMSTRONG J.A. and VALENTINE R.C. , 1965.
The ingestion of protein molecules by blood forms of *Trypanosoma rhodesiense*.
Exp. Cell. Res. , **39** , pp.129 - 135.
- BROWN R.C. ; EVANS D.A. and VICKERMAN K. , 1973.
Changes in oxidative metabolism and ultrastructural differentiation of the mitochondrion in *Trypanosoma brucei*.
Int. J. Parasitol. , **3** , pp.691 - 704.

- DELAIN E. ; BRACK C. ; RIOU G. and FESTY B. , 1971.
Ultrastructural alterations of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast induced by the interaction of trypanocidal drug (hydroxystilbamidine) with the Kinetoplast DNA.
 J. Ultrastruct. Res. , **37** , pp.200 - 218.
- EECKHOUT Y. , 1972a.
Studies on acid hydrolases and on catalase of the trypanosomatid *Crithidia lucilliae* in : VAN DEN BOSSCHE (H.) ,ed. Comparative Biochemistry of Parasites. Acad. Press. New.York , London , pp.297 - 315.
- EECKHOUT Y. , 1972b.
Digestion and lysosomes in Zooflagellates in : DINGLE (J.T.) ,ed. , Lysosomes in Biology and Pathology. Publ. North Holland-Amsterdam. Vol.3 , pp.3 - 17.
- FAIRLAMB A.H. , OPPERDOES F.R. and BORST P. , 1977.
New approach to screening drugs for activity against African trypanosomes.
 Nature , Vol **265** , N°5591 , pp.270 - 271.
- FROMENTIN H. , 1973.
Souches normales et souches dyskinétoplastiques de trypanosomes chez la souris expérimentalement infectée.Consommation comparée d'oxygène.
 Protistologica , T. IX , fasc.3 , pp.353 - 357.
- FROMENTIN H. ; THAITHONG S. et ADRIAN M. , 1974.
Ultrastructure comparée de souches dyskinétoplastiques de *Trypanosoma gambiense* et de *Trypanosoma evansi*.
 C. R. Acad. Sc. Paris , T.278 , pp.1859 - 1861.
- GIFFIN B.F. ; Mc CANN P.P. ; BITONTI A.J. and BACCHI C.J. , 1986.
Polyamine Depletion Following Exposure to DL - a - Difluorométhylornithine Both In Vivo and In Vitro Initiates Morphological Alterations and Mitochondrial Activation in a Monomorphic strain of *Trypanosoma brucei brucei*.
 J. Protozool. , **33** (2) , pp.238 - 243.
- GUTTERIDGE W.E. and COOMBS G.H. , 1977.
Biochemistry of Parasitic Protozoa.
 Published by THE MACMILLAN PRESS LTD , pp.121 - 145.

- HECKER H. and BOHRINGER S. , 1977.
Morphometric analysis of the life cycle of *Trypanosoma (T.) brucei*.
Ann. Soc. belge Méd. Trop. , 57 , 4-5 , pp.465 - 470.
- HERION - DELAUNEY , 1965.
Quelques données autoradiographiques sur le cinétoplaste de *Trypanosoma cruzi*.
Ann. Histochem. , 10 , pp.25 - 34.
- ITARD J. , 1981:
Les Trypanosomiasés Animales Africaines.
Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des pays tropicaux.
Tome II , pp.307 - 316.
- JADIN J.M. et CREEMERS J. , 1970.
Etude en microscopie électronique des localisations des hydrolasés acides chez les *Trypanosomatidae*.
Arch. Int. Physiol. Biochim. , 78 , pp.1001 - 1002.
- JADIN J.M. , 1978.
Trypanosomes et leishmanies africains.
Ed. J.J. Symoens. Cercle Hydrobiol. Brux. , Vol10 , fascicule1 , pp.1 - 205.
- KLEINSCHMIDT A. et KINDER E. , 1950.
Elektromenoptische Befunde an Matten trypanosomen.
Zbl. Bakter. , I. Abt. Orig. , 156 , pp.219 - 224.
- KRANWELD F.C. ; HOUWINK A.L. and KREIDEL H.J.W. , 1951.
Electron microscopical investigations on trypanosomes. I. Some preliminary data regarding the structure of *Trypanosoma evansi*.
Proc. Kon. ned. Akad. Wet. , 54 , pp.393 - 399.
- LANGRETH S.G. and BALBER A.E. , 1975.
Protein uptake and digestion in bloodstream and culture forms of *Trypanosoma brucei*.
J. Protozool. , 22 , pp.40 - 53.

- LAVERAN A. et MESNIL F. , 1902.
Recherches sur le traitement et le prévention du Nagana.
Ann. Inst. Pasteur ,16 , pp.785 - 817.
- LUMSDEN W.H.R. ; HERBERT W.J. and McNEILLAGE G.J.C. , 1973.
Techniques with Trypanosomes.
Churchill Livingstone Edinburgh & London. pp.1 - 183.
- MACADAM R.F. and WILLIAMSON J. , 1974a.
The effect of drugs on the fine structure of trypanosomes.
Parasitology , 57 , pp.21 - 22.
- MACADAM R.F. and WILLIAMSON J. , 1974b.
Drug effects on the fine structure of *Trypanosoma rhodesiense* : acriflavine , éthidium and antrycide.
Ann. Trop. Med. Parasitol. , 68 , pp.291 - 299.
- MACKINNON D.L. and HAWES R.S.J. , 1961.
An introduction to the study of Protozoa.
Oxford: Clarendon. Press.
- MERLEVEDE M.F. , 1980 - 1981.
Importance des modifications des taux de certaines protéines sériques au cours des trypanosomoses expérimentales.
Mem. Lic. Sci. Zool. , FNDP Namur , pp.1 - 148.
- MESHNICK S.R. ; CHANG K.P. and CERAMI A. , 1977.
Heme lysis of the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*.
Biochemical Pharmacology , vol.26 , pp.1923 - 1928.
- MESHNICK S.R. ; BLOBSTEIN S.H. ; GRADY R.W. and CERAMI A. , 1978.
An approach to the development of new drugs for African trypanosomiasis.
Journal Exp. Med. pp.569 - 579.

- MESHNICK S.R. ; GRADY R.W. ; BLOBSTEIN S.H. and CERAMI A. , 1978.
Porphyrin - induced lysis of *Trypanosoma brucei* : a role of Zinc.
J. Pharmacol. Exp. Ther. Vol.207 , N°3 , pp.1041 - 1049.
- MESHNICK S.R. , 1984.
The chemotherapy of African Trypanosomiasis.
Mansfield Parasitic Disease Tome II : Chemotherapy , pp.165 - 199.
- MILLONIG G. , 1961.
A modified procedure for lead staining of thin sections.
J. Biophys. Biochem. Cytol. , II , pp.736 - 739.
- MILTGEN F. and CANDAU I. , 1979.
Trypanosoma (Megatrypanum) *lizae* n-sp.un trypanosome ayant des formes géantes chez les Microchiroptères Hipposideros Cyclops au Gabon.
Ann. de Parasitologie (Paris) , T.54 , n°2 , pp.163 - 169.
- MUELLER M. , 1975.
Biochemistry of Protozoan microbodies : peroxisome , α -glycérophosphate oxidase bodies , hydrogénosomes.
Ann. , Rev. Microbiol. , 29 , pp.467 - 486.
- NEWTON B.A. , 1957.
The mode of action of phénanthridines : the effect of éthidium bromide on cell division and nucleic acid synthesis.
J. Gen. Microbiol. , 17 , pp.718 - 730.
- NEWTON B.A. ; CROSS G.A.M. and BAKER J.R. , 1973.
Differentiation in Trypanosomatidae , in SMITH J.E. , ASHWORTH J.M. eds. , Microbiol. Differentiation , 23 rd Symposium , Soc. gen. Microbiol. , Cambridge University Press , pp.339 - 373.
- OPPERDOES F.R. ; BORST P. and FONCK K. , 1975.
The potential use of inhibitors of Glycérol -3 - phosphate oxidase for chemotherapy of african trypanosomiasis.
FEBS Letters , 62 , pp.169 - 172.

- OPPERDOES F.R. ; AARSEN P.N. ; VAN DER MEER C. and BORST P. , 1976.
Trypanosoma brucei : an evaluation of Salicylhydroxamic Acid as a Trypanocidal Drug.
Experimental Parasitology , 40 , pp.198 - 205.
- OPPERDOES F.R. and BORST P. , 1977.
Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody - like organelle in Trypanosoma brucei : the glycosome.
FEBS Letters , vol.80 , N°2 , pp.360 - 364.
- RECKER L. ; SYKES L.A. and CHAN H. , 1976.
Further studies on the mammalian cell nucleolus.
J. Ultrastruct. Res. , 56 , pp.152 - 163.
- REYNOLDS E.S. , 1963.
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J. Cell. Biol. , 17 , pp.208 - 212.
- RIOU G. et PAOLETTI C. , 1966.
Fractionnement et caractérisation de l'acide désoxyribonucléique (DNA) de trypanosome (Trypanosoma equiperdum).
C. R. Acad. Sc. Paris , Sér. D. , 262 , pp.2376 - 2379.
- RIOU G. et PAUTRIZEL R. , 1967.
Fractionnement et caractérisation de 2 bandes satellites de DNA chez Trypanosoma gambiense.
C. R. Acad. Sc. Paris , 265 , pp.61 - 63.
- RIOU G. , 1970.
Specific inhibition by ethidium bromide of the incorporation of ³H thymidine into the Kinetoplastic DNA of Trypanosoma cruzi.
Biochem. Pharmac. , 19 , pp.1524 - 1526.
- RIOU G.F. ; BELNAT P. and BERNARD J. , 1980.
Complete loss of Kinetoplast DNA Sequences Induced by Ethidium Bromide or by Acriflavine in Trypanosoma equiperdum.
The journal of Biological Chemistry , Vol.255 , N°11 , pp.5141 - 5144.

– RIOU G. and BARROIS M. , 1981.

The Kinetoplast DNA of *Trypanosoma gambiense* : Comparison with the kDNA of *Trypanosoma equiperdum*.

Biochimie , 63 , pp.755 - 765.

– SEED J.R. ; BYRAM J. and GAM A.A. , 1967.

Characterization and localization of acid phosphate activity of *Trypanosoma gambiense*.

J. Protozool. , 14 , pp.117 - 125.

– STECK E.A. , Ph.D. , 1972.

The Chemotherapy of Protozoan Diseases.

Division of Medicinal Chemistry , Vol.II . Section 3A . Chapter XI. pp.1 - 221.

– STEIGER R.F. , 1973.

On the ultrastructure of the *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei* in the course of its life cycle and some related aspects.

Acta Trop. , 30 , pp.64 - 108.

– STEINERT M. , 1965.

The Morphogenesis of trypanosomes.

Progression Protozoology . Excerpta Medica Foundation , London , pp.40 - 41.

– STEINERT M. , 1971.

Effects of pharmacological agents on mitochondrial and Kinetoplasmic DNA.

In : Advances in cytopharmacology , pp.229 - 240 , CLEMENTI F. et CECCARELLI B. (eds). Mave Press , New York.

– THOMAS H.W. , 1905.

Some experiments in the treatment of trypanosomiasis.

Brit. Med. J. i , pp.1140 - 1142.

– TOURE S.M. , 1971.

Etude ultrastructurale des effets produits par diverses drogues trypanocides sur des trypanosomes.

Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop. , 24 , pp.381 - 392.

- VAN HOOFF L. ; JADIN - NYSSSENS M. and JADIN J.M. , 1977.
Compared study of digestive enzymes in Kinetoplastidae .
Abstr. fifth. Int. Congr. Protozool. , p.386.
- VICKERMAN K. , 1962.
The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *trypanosoma brucei* sub-group : an hypothesis based on ultrastructural observations.
Trans. Roy. Soc. trop. Med. hyg. , 56 (N°6) , pp.487 - 495.
- VICKERMAN K. , 1965.
Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes.
Nature , 208 (N°5012) , pp.762 - 766.
- VICKERMAN K. , 1969.
On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes.
J. Cell. Sci. , 5 , pp.163 - 194.
- WERY M. ; MULUMBA P.M. ; LAMBERT P.H. and KAZYUMBA L. , 1982.
Hematologic manifestations, diagnosis and immunopathology of African trypanosomiasis.
Seminars in Hematology, 19 (2) , pp.83 - 92.
- WIJERS D.J.B. and WILLET K.C. , 1960.
Factors that may influence the infection rate of *Glossina palpalis* with *Trypanosoma gambiense* . II. The number and the morphology of the trypanosomes present in the blood of the host at the time of the infected feed.
Ann. Trop. Med. Parasitol. , 54 (N°3) , pp.341 - 350.
- WILLIAMSON J. , 1970.
Review of chemotherapeutic and chemoprophylactic agents.
In : the African Trypanosomiases , pp.125 - 221.
- WILLIAMSON J. , 1976.
Chemotherapy of African trypanosomiasis.
Trop. Dis. Bull. , 73 , pp.531 - 542.

– WILLIAMSON J. and MACADAM R.F. , 1976.

Drug effects on the fine structure of *Trypanosoma rhodesiense* : Puromycine and its aminonucleoside , Cordycepin and Nucleocidin.

Trans. of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiène , vol.70 N°2 , pp.130 - 137.

– WILLIAMSON J. , 1979.

Effects of trypanocides on the fine structure of target organisms.

Pharmac. Ther. vol.7 , pp.445 - 512.

ERRATA :

Page 9 : lire : Une autre différence exploitée pour le développement de drogues est l'incapacité du protozoaire à synthétiser l'hème (MESHNICK et al., 1977 ; 1978).

au lieu de : protozoaire à synthétiser l'hème (MESHNICK et al., 1977 : 1978)

Page 11 : ne pas lire la dernière phrase.