

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Modèle de la poche sous-cutanée et réaction inflammatoire chronique: influence sur le cours d'une infection à *Trypanosoma brucei brucei*

Meunier, Jean-Jacques

Award date:
1988

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

Modèle de la poche sous-cutanée
et réaction inflammatoire chronique :
influence sur le cours d'une infection
à *Trypanosoma brucei brucei*.

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

MEUNIER Jean-Jacques

1987-1988

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Facultés des Sciences
rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR
Tél. 081/22.90.61 Télex 59222 Facnam-b

**Modèle de la poche sous-cutanée et réaction inflammatoire chronique :
influence sur le cours d'une infection à *Trypanosoma brucei brucei* .**

MEUNIER Jean-Jacques

RESUME.

Le modèle de la poche d'air sous-cutanée permet une approche intéressante de l'impact d'une réaction inflammatoire chronique sur le cours d'une trypanosomiase à *Trypanosoma brucei brucei* CR ITMAP 1981.

L'injection de dextran dans la poche intensifie la réactivité immunitaire du tissu limitant . Le dextran a un effet irritant et induit dans l'enceinte gazeuse une infiltration cellulaire et l'apparition d'un exudat inflammatoire.

Les poches d'air âgées de un jour sont relativement inertes dans leur réactivité comme le montre la faible réponse des cellules immunitaires. Par contre, les poches de dix jours sont beaucoup plus actives, montrant un net accroissement du nombre de cellules immunocompétantes et du volume de l'exudat.

De plus, le cours d'une parasitémie à *T. b. brucei* est freiné chez les souris qui développent une inflammation chronique. Elles deviennent en effet plus résistantes vis-à-vis des infections à trypanosomes.

Nous avons également recherché la présence d'un facteur sérique pouvant être responsable de cette protection.

ABSTRACT.

The subcutaneous air pouch has been shown to provide a convenient model for studying the effect of a chronic inflammation reaction on the course of an infection due to *Trypanosoma brucei brucei* CR ITMAP 1981.

Injection of dextran inside the air pouch increase the inflammatory reactivity of the newly formed lining tissue.

The dextran has an irritant effect and induced cellular infiltration and fluid exudation in the pouch.

Pouches of 1-day-old in age were relatively inert in their reactivity as judged by the low inflammatory cellular response. In contrast, 10-day-old pouches were highly responsive with a futher increased in cellular number and fluid volume.

Indeed, the course of an infection of *T. b. brucei* is decreased in mice who developed an inflammatory process. They become more resistant to infections with trypanosoma.

Little attention has been paid to explore the possibility of transfer of a seric factor responsible of this protection.

Mémoire de licence en Sc. Biologique
Septembre 88.
Laboratoire de parasitologie
Promoteur : Dr J.M. JADIN

Au terme de ce mémoire, je désire exprimer ma reconnaissance et mes remerciements

au Docteur J.M. JADIN, promoteur de ce mémoire, qui m'a guidé et judicieusement encadré tout au long de cette année;

au Professeur J.P. GIROUD, de l'Hôpital COCHIN à Paris, pour ses bons conseils et indispensables directives de travail;

au Professeur E. FEYTMANS et au Docteur Sc. E. DEPIERREUX, qui ont bien voulu mettre à ma disposition le matériel du laboratoire de Biologie Quantitative;

au Professeur R. LELOUP, responsable du laboratoire interfacultaire de Microscopie Electronique, ainsi qu'à Madame Ch. DEVIGNON et à Monsieur Y. HOUBION qui m'ont aimablement accueilli;

à Monsieur J. COLLET pour l'iconographie;

à M. C. WILEM Lic. Sc., enfin, sans qui je n'aurais pu mener ce mémoire à son terme.

LEXIQUE DES ABREVIATIONS .

ADCC	Cellules cytotoxiques dépendantes des anticorps
Con A	Concanavaleine A
DEAE-cellulose	Diéthylaminoéthyl cellulose
EI	Exudat inflammatoire
IL 1	Interleukine 1
IL 2	Interleukine 2
LPS	Lipopolysaccharide bactérien
PBS	Phosphate buffer saline
PHA	Phytohémagglutinine A
PMN	Polymorphonucléaire
PS	Phosphate saline
PSD	Phosphate buffered saline dextran
PSG	Phosphate buffered saline glucose
SI	Sérum inflammatoire
SN	Sérum normal
RIA	Réaction inflammatoire aiguë
RIC	Réaction inflammatoire chronique

TABLE DES MATIERES .

I. INTRODUCTION.

1.1. <u>Objectif du travail.</u>	7
1.2. <u>Ce qui a déjà été fait.</u>	7
<u>1.2.1.</u> Généralités sur les réactions inflammatoires.	7
<u>1.2.2.</u> Effet d'une réaction inflammatoire aiguë non spécifique.	8
a) à propos des macrophages.	8
b) à propos des polymorphonucléaires (PMN).	9
c) à propos des lymphocytes.	9
<u>1.2.3.</u> Réaction inflammatoire aiguë non spécifique et trypanosomiase.	10
<u>1.2.4.</u> Poche d'air et réactivité.	11
1.3. <u>Objectif détaillé.</u>	12
1.4. <u>Généralités sur les trypanosomes.</u>	13
<u>1.4.1.</u> Les trypanosomatidés.	13
a) <i>T. brucei gambiense</i> et <i>rhodesiense</i> .	14
b) <i>T. b. brucei</i> .	14

<u>1.4.2.</u> Symptomatologie des trypanosomiasés africaines.	16
a) Phase sanguine.	16
b) Phase de polarisation cérébrale.	17
<u>1.4.3.</u> Immunité à l'égard des trypanosomes.	17
a) Variation antigénique.	17
b) Protéines de diversion.	19
c) Immunodépression.	19
c ₁) Altération de l'architecture lymphoïde.	19
c ₂) Fonctions des cellules B.	20
c ₃) Fonctions des cellules T.	20
c ₄) Fonctions des macrophages.	21
II. MATERIEL ET METHODES.	22
2.1. <u>Trypanosomes.</u>	22
2.2. <u>Souris.</u>	23
2.3. <u>Tampon PSG.</u>	23
2.4. <u>Tampon PSD.</u>	24
2.5. <u>NaCl.</u>	24

2.6. <u>Poche d'air, dextran et trypanosomes.</u>	24
a) Injection de dextran.	24
b) Inoculation de trypanosomes.	26
2.7. <u>Courbes de mortalité.</u>	26
<u>2.7.1.</u> Recherche du délai d'infection optimal.	26
<u>2.7.2.</u> Modalités d'infestation.	26
2.8. <u>Sérum inflammatoire (SI).</u>	27
<u>2.8.1.</u> Expériences <i>in vivo</i> .	27
a) Origine du SI.	28
b) Obtention du SI.	28
c) Conservation du SI.	29
2.8.1.1. Transfert en discontinu.	29
2.8.1.2. Transfert en continu.	29
<u>2.8.2.</u> Expériences <i>in vitro</i> .	31
Principe d'isolement des trypanosomes.	31
2.9. <u>Exudat inflammatoire (EI).</u>	33
a) Solution de NaCl témoin.	33
b) Solution de NaCl test.	33

2.10. <u>Microscopie.</u>	34
2.10.1. Microscopie optique des trypanosomes.	34
2.10.2. Histologie de la paroi de la poche d'air.	34
a) Microscopie optique.	34
b) Microscopie à transmission.	34
c) Microscopie à balayage.	36
2.10.3. Etude des cellules libres dans la poche d'air.	37
a) Mise en place de la lamelle.	37
b) Groupes de souris étudiés.	38
c) Etude en microscopie à balayage.	38
III. RESULTATS.	39
3.1. <u>Délai optimal d'infestation.</u>	39
3.2. <u>Modalités d'infestation.</u>	43
a) Trypanosomes par voie intrapéritonéale.	43
b) Trypanosomes par voie intrapéritonéale + air.	43
c) Trypanosomes par voie intrapéritonéale + air + dex.	43
d) Trypanosomes par voie sous-cutanée.	44
e) Trypanosomes par voie sous-cutanée + air.	44
f) Trypanosomes par voie sous-cutanée + air + dex.	45
3.3. <u>Sérum inflammatoire (SI).</u>	47
3.3.1. Expériences <i>in vivo</i> .	47

3.3.1.1. Transfert en discontinu.	47
a) Transfert en conditions "normales" du SI.	48
b) Variation de l'origine du SI.	48
c) Obtention du SI.	49
d) Variation du mode conservation du SI.	49
3.3.1.2. Transfert en continu.	49
a) Transfert en conditions normales du SI.	50
b) Variation de l'origine du SI.	50
c) Obtention du SI.	50
d) Variation du mode de conservation du SI.	51
<u>3.3.2. Expériences <i>in vitro</i> .</u>	51
3.4. <u>Exudat inflammatoire (EI).</u>	52
3.5. <u>Microscopie.</u>	52
<u>3.5.1. Optique.</u>	52
<u>3.5.2. Transmission.</u>	53
<u>3.5.3. Balayage.</u>	53
IV. DISCUSSION.	55
4.1. <u>Délai optimal d'infestation.</u>	55

4.2. <u>Modalités d'infestation.</u>	56
<u>4.2.1.</u> Inoculation intrapéritonéale.	57
<u>4.2.2.</u> Inoculation sous-cutanée.	57
4.3. <u>Sérum inflammatoire (SI).</u>	58
4.4. <u>Exudat inflammatoire (EI).</u>	62
4.5. <u>Microscopie.</u>	63
<u>4.5.1.</u> Optique.	63
<u>4.5.2.</u> Transmission.	64
<u>4.5.3.</u> Balayage.	64
V. CONCLUSION.	65
Bibliographie.	66

I. INTRODUCTION.

1.1. Objectif du travail.

Dans le cadre d'une étude des résistances aux maladies infectieuses parasitaires, nous avons recherché l'impact sur le cours d'une trypanosomiase expérimentale d'une réaction chronique inflammatoire non-spécifique et sous-cutanée chez la souris. Nous l'avons comparé à celui d'une réaction inflammatoire aiguë non-spécifique. La recherche d'un ou de plusieurs facteurs de résistance produits par le système immunologique de l'hôte a également été abordée.

1.2. Ce qui a déjà été fait.

1.2.1. Généralités sur les réactions inflammatoires.

Les recherches effectuées à ce jour dans le domaine des résistances aux pathologies infectieuses ont été envisagées de façon souvent sectorielle, cloisonnée. Cependant, l'analyse des mécanismes gérant le développement de la réaction inflammatoire *sensu stricto* s'est effectuée avec beaucoup d'acuité et a permis l'établissement d'un modèle classique comprenant notamment:

- l'afflux de macrophages et de leucocytes sur le site d'infection;
- la libération de leucotriènes, de prostaglandines, de prostacyclines et de thromboxane, métabolites issus de la cascade de l'acide arachidonique;
- la production d'ions superoxydes O_2 souvent très toxiques pour les cellules mais éminemment germicides;

- l'agrégation plaquettaire et le dépôt de fibrine;
- les phénomènes de coagulation et l'intervention de la voie classique ou alterne du complément;
- la synthèse de protéines dites de l'inflammation dont les interleukines. Il s'agit de monokines exerçant des fonctions essentielles en rapport avec le développement de la réponse immunitaire. Les interleukines constituent un groupe de messagers métaboliques adressé par le foyer inflammatoire au foie, à l'hypothalamus, à la moëlle osseuse, aux lymphocytes et aux fibroblastes.

Ces médiateurs sont de deux types : l'interleukine 1 (IL1) et l'interleukine 2 (IL2), libérées spécifiquement par les macrophages et les lymphocytes T auxiliaires. Ces derniers reconnaissent l'antigène présenté par les macrophages et déclenchent dès lors la production d'IL1. L'IL1 accentue la libération d'IL2 par les lymphocytes T auxiliaires activés (E.L. LARSON et al., 1980). Sous influence mitogénique ou antigénique, les cellules T expriment à leur surface des récepteurs à l'IL2. L'association IL2-récepteurs induit la division de la cellule, sa prolifération. La spécificité de la réponse immunitaire est donc possible en raison de la présence de récepteurs sur les seules cellules à même de reconnaître l'antigène. Notons de surcroît que l'IL1 et l'IL2 jouent aussi un rôle direct sur les lymphocytes B (H.J. LEIBSON et al., 1982; D.C. PARKER, 1982).

1.2.2. Effet d'une réaction inflammatoire aiguë non-spécifique.

D'autre part, dès 1981, l'équipe du professeur Jean-Paul GIROUD (Département de Pharmacologie, Hôpital COCHIN, Paris) s'est attachée à étudier notamment l'effet d'une réaction inflammatoire aiguë non-spécifique sur les réponses immunitaires de l'hôte. Il ressort de ces investigations plusieurs résultats importants dont voici les principaux :

a) à propos des macrophages.

Dès la première heure qui suit le stimulus phlogogène, les macrophages péritonéaux inhibent de façon importante l'incorporation de thymidine tritiée par des cellules tumorales. Cette activité cytostatique atteint un maximum au troisième jour puis décroît lentement, tout en étant encore conséquente cinq jours après le début de la réaction

inflammatoire (I. FLORENTIN et al., 1985).

In vitro, un exudat inflammatoire est capable d'induire la prolifération de macrophages comme l'indiquent les modifications de paramètres tels que la synthèse de DNA, la densité de chromatine ou l'index mitotique.

De plus, des macrophages prélevés à distance du foyer inflammatoire ou du site phlogogène montrent une augmentation de la sécrétion d'interleukine I.

On a également pu mettre en évidence dans les exudats inflammatoires et dans le sérum d'animaux enflammés la présence de facteurs mitogéniques pour les macrophages. Il s'agit de substances de faible poids moléculaire (500 -1500 daltons) (J.P. GIROUD et al., 1977).

L'activation des macrophages en contact avec un exudat inflammatoire a été confirmée par une intensification de la chémoluminescence en réponse à la phagocytose accrue de particules de zymosan opsonisées. Cette stimulation est concomitante à une augmentation de la production d'anions superoxydes résultant en fait d'un accroissement du métabolisme oxydatif des cellules phagocytaires.

Notons en outre une activité cytotoxique anticorps dépendante (ADCC) très augmentée en présence d'exudat inflammatoire (N. KIGER et al., 1979; J.P. GIROUD et al., 1983).

b) à propos des polymorphonucléaires (PMN).

L'incubation de PMN dans le sérum de rats enflammés révèle une inhibition significative de leurs propriétés chémotaxiques et, contrairement, une production accrue d'ions superoxydes (M. ROCH-ARVEILLER et al., 1979; J.P. GIROUD et al., 1983).

Il a pu être montré aussi que les PMN libèrent dans le surnageant de culture des facteurs mitogéniques pour les lymphocytes et les macrophages (J. BIRD et al., 1984).

c) à propos des lymphocytes.

Conséquent à l'action de facteurs mitogéniques et comitogéniques libérés par les PMN, les lymphocytes montrent une prolifération accrue chez les animaux enflammés (J.P. GIROUD et al., 1983).

De plus, *in vitro*, on note une synthèse augmentée d'IL 2 par ces lymphocytes après une stimulation à la concanavaleine A (Con A) (YAO JIN SHENG et al., 1982). Cependant,

l'exudat utilisé à forte concentration inhibe la réponse proliférative tandis qu'il la stimule à faible concentration et ce pour une dose optimale de Con A (M. PELLETIER et al., 1982).

Ces observations suggèrent la présence dans l'exudat inflammatoire aigu non spécifique de deux types de substances à action antagoniste sur la prolifération des lymphocytes et dont les concentrations relatives varient au court du développement du processus phlogogène.

1.2.3. Réaction inflammatoire aiguë non spécifique et trypanosomiase.

Au début des années 1980, le Professeur J.P. GIROUD à Paris et le Docteur J.M. JADIN, à Namur, constatèrent qu'une réaction inflammatoire aiguë non spécifique induite par injection intrapleurale de dextran ou de pyrophosphate de calcium pouvait avoir un effet bénéfique sur l'évolution de la maladie de CHAGAS (trypanosomiase américaine) chez des souris. Leurs observations indiquèrent que cette inflammation provoque des modifications d'ordre physiologique et fonctionnel sur les macrophages, les lymphocytes et les polymorphonucléaires. La plupart de ces effets peuvent être reliés à la libération de facteurs dans les exudats d'animaux porteurs d'inflammation. Ces substances interviendraient pour favoriser une augmentation de la résistance de l'organisme vis-à-vis des infections à *Trypanosoma cruzi* (J.P. GIROUD et al., 1981).

Cependant, par opposition apparente à ces résultats, il a été démontré (M. DELCROIX, 1987) qu'une réaction inflammatoire aiguë provoquée sous les mêmes conditions expérimentales influence la résistance des souris vis-à-vis des parasitoses à *T.b.brucei* dans le sens d'une diminution. Dans l'interprétation de ces résultats, il faut se souvenir que *T. cruzi*, l'agent de la maladie de CHAGAS vit en intra- et en extra-cellulaire tandis que *T. brucei* est exclusivement extracellulaire.

Depuis, de nombreux travaux furent entrepris pour tenter d'éluder les mécanismes intrinsèques gérant la résistance au développement de ces pathologies. Les recherches se sont surtout focalisées sur les processus d'altération de production des interleukines. En accord avec les résultats présentés par M. SILEGHEM (1986), M. DELCROIX (1987) a pu montrer une diminution importante de la libération d'IL2 très tôt après le début de l'infection parasitaire à *Trypanosoma brucei brucei*. Le taux d'IL1 ne semble pas affecté, ce qui laisserait supposer le défaut de production d'IL2 localisé au niveau des cellules T et non des

macrophages.

En 1986, M. RENOUX a démontré qu'une réaction inflammatoire aiguë induite par injection intrapleurale de pyrophosphate de calcium provoquait trois jours plus tard une diminution de 50% de la réponse proliférative des cellules spléniques stimulées par mitogènes (PHA, Con A, LPS) par rapport aux témoins. Ces résultats sont en corrélation avec ceux de M. DELCROIX (1987). Les souris enflammées présentent donc un état de déplétion lymphocytaire important s'ajoutant à celui dû à la parasitose, ce qui pourrait expliquer la diminution de la résistance des souris vis-à-vis de l'action parasitaire.

Cependant, YAO JIN SHENG (1982) présente des résultats en contradiction avec ceux exposés ci-dessus, à savoir une augmentation encore significative de la prolifération des cellules spléniques après 72 heures.

Toutefois, d'autres expériences en cours, semblent confirmer la diminution de la réponse proliférative des cellules spléniques trois jours après induction d'une pleurésie, de même qu'une dépression dans le taux de synthèse d'IL2 (I. FLORENTIN, non publié).

Il semble donc bien établi qu'une réaction inflammatoire aiguë intrapleurale est capable de modifier certaines fonctions intervenant dans les mécanismes de défense de l'organisme.

1.2.4. Poche d'air et réactivité.

L'injection sous-cutanée de quelques centimètres cubes d'air provoque une réaction inflammatoire aiguë. Autour de la bulle d'air se forme rapidement tout un réseau cellulaire qui s'organise et l'emprisonne. Ainsi s'édifie une véritable poche gazeuse.

La formation d'une poche gazeuse sous-cutanée est une technique décrite pour la première fois par J.C.W. EDWARDS (1981) dans le cadre de recherches concernant l'effet de substances irritantes telles le Carageenan ou le pyrophosphate de calcium sur l'évolution d'une réaction inflammatoire aiguë.

En 1983, A.D. SEDGWICK proposait un modèle de réactivité des poches d'air en fonction de leur âge vis-à-vis de ces agents irritants. Il ressort que les poches d'un jour sont relativement inertes dans leur réponse à l'irritation. Par contre les enclaves gazeuses effectuées trois jours plus tôt montrent un net accroissement du nombre des cellules dermiques. Au sixième jour, la réponse est intense, le taux cellulaire élevé et le volume de fluide important.

Les différences de réponses en fonction du temps peuvent être expliquées par le développement d'une vascularisation de la poche, la formation d'une couche de cellules phagocytaires contre la paroi interne de l'enceinte ou encore par l'organisation d'une barrière mécanique retenant non seulement les facteurs exogènes mais également les produits de la réaction inflammatoire (A.D. SEDGWICK et al., 1983).

Une étude histologique a montré la formation d'un tissu limitant la poche d'air de plus en plus riche en fibroblastes et macrophages au cours du temps suite à l'injection de Carageenan. Au jour 6, la bulle montre un ensemble de fibres collagènes laminées et densément arrangées avec des fibroblastes.

L'imperméabilisation des couches cellulaires limitant l'enclave gazeuse est clairement montrée par le fait qu'au jour 1 de la formation de celle-ci, une solution saline de carbone pénètre aisément toute la profondeur du derme. Au jour 6, le noircissement cellulaire n'atteint que les couches superficielles.

L'injection de Carageenan dans la lumière de la poche y induit l'afflux de leucocytes (A.D. SEDGWICK et al., 1984).

En outre, les enceintes gazeuses, en l'absence de tout agent irritant, voient se former contre leur paroi des cellules bordantes ressemblant fortement à des cellules synoviales de type A et B (J.C.W. EDWARDS et al., 1981).

1.3. Objectif détaillé.

Il nous a paru intéressant de considérer le problème pour des résistances induites non par des réactions inflammatoires aiguës (RIA) mais chroniques (RIC) non spécifiques en utilisant le modèle expérimental nouveau de la poche d'air. Aucune étude n'avait été réalisée à ce jour dans cette voie.

Notre démarche expérimentale s'inscrit selon un modèle en quatre temps :

- a) analyse des caractéristiques cytologiques de la poche d'inflammation.
- b) étude des interférences possibles de celle-ci sur le cours d'une

parasitémie à trypanosomes.

- c) essais de réponses aux questions : " dans quelle mesure une RIC est-elle capable d'induire des processus de résistance envers des trypanosomiasés? ". " Cette protection est-elle transférable à des souris non enflammées ? "
- d) tentative d'approche et de comparaison des facteurs de résistance issus de la RIC par rapport aux phlogokines des RIA.

Le type d'infection envisagée ici est une trypanosomiase à *Trypanosoma brucei* dont l'avantage est de ne pas être pathogène pour l'homme tout en ayant les mêmes caractéristiques antigéniques et immunologiques que *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* agents de la maladie du sommeil africaine.

1.4. Généralités sur les trypanosomes.

1.4.1. Les trypanosomatidés.

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés pourvus d'un kinétoplaste et appartenant au genre *Trypanosoma*.

Un des systèmes de classification de ces parasites repose sur leur mode de transmission. On distingue ainsi:

- les stercoraria qui se multiplient dans la portion postérieure de l'intestin et sont transmis via les déjections du vecteur invertébré, ils contaminent l'hôte vertébré au niveau des muqueuses et des plaies.
ex.: *Trypanosoma cruzi*, transmis par les réduves d'Amérique Centrale et du Sud, responsable de la maladie de CHAGAS.
- les salivaria : ces trypanosomes se multiplient abondamment dans les glandes

salivaires de l'insecte vecteur, puis sont injectés dans le sang de l'hôte vertébré.
ex: *T. brucei* sp. dont le vecteur est une glossine et qui parasite les mammifères.

a) *T. brucei gambiense* et *rhodesiense*.

Ces trypanosomes africains sont responsables de la maladie du sommeil. Cette pathologie est à l'origine de 20 000 décès par an. Le nombre de personnes exposées est d'environ 50 millions.

T. b. gambiense .

Il s'agit d'une variété inféodée aux zones ouest de l'Afrique et dont le vecteur est essentiellement *Glossina palpalis* . Cette mouche tsé-tsé sévit surtout en région humide et marécageuse.

T. b. rhodesiense .

Sa zone de répartition principale est l'Afrique orientale et le vecteur primordial est *Glossina morsitans* , un diptère hématophage à tendance xérophile. *T. b. rhodesiense* induit une pathologie qui évolue beaucoup plus vite que celle due à *T. b. gambiense* .

b) *T. b. brucei*. (fig.1.4.1. a.)

Ce trypanosome est l'agent du nagana, maladie du sommeil n'affectant pas l'homme, mais responsable de nombreuses pertes dans les stocks de bovidés et d'équidés. La distribution géographique de *T. b. brucei* coïncide avec celle de ses hôtes intermédiaires, des mouches tsé-tsé du groupe *morsitans* (BRUCE, 1902). (fig. 1.4.1. b.).

Fig. 1.4.1.a. Vue en microscopie optique de *T. b. brucei*.
(G : 1000 X)

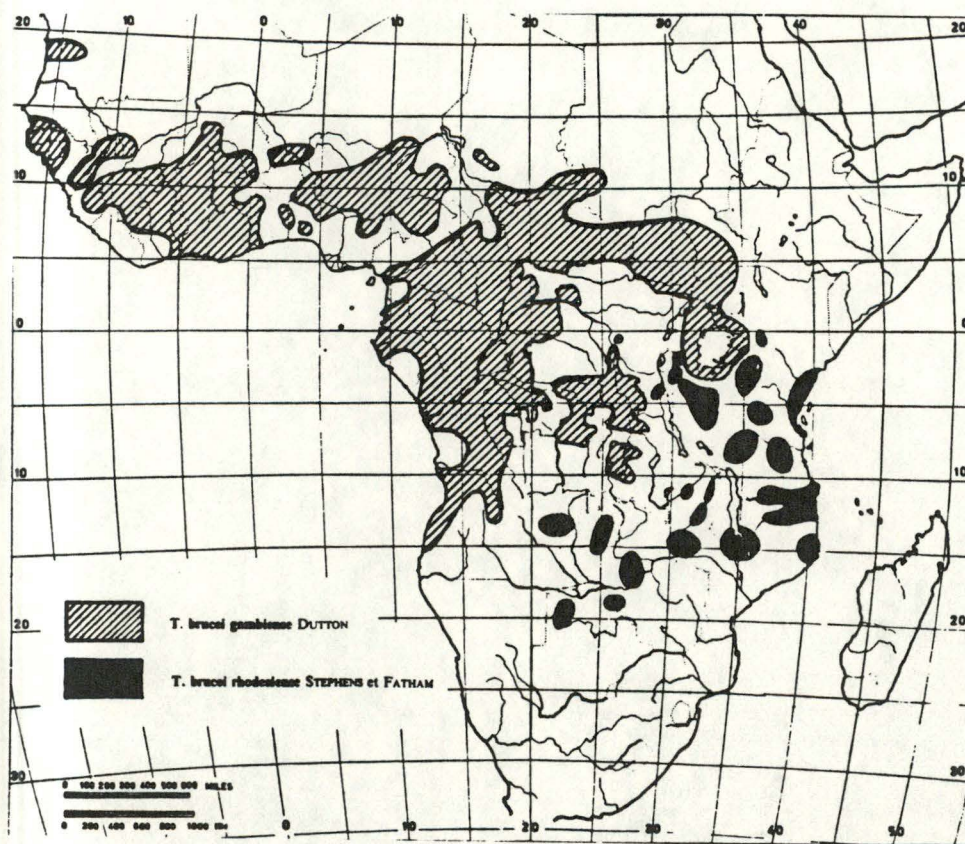


Fig. 1.4.1.b. Zones de répartition géographique de la maladie du sommeil due à *T. b. gambiense* à l'ouest et à *T. b. rhodesiense* à l'est de l'Afrique.
(D'après J.M. JADIN).

Cycle de *T. b. brucei*.

Les formes trypomastigotes, intercellulaires, vivent dans le sang de l'hôte vertébré. Elles existent sous deux formes: trapues (stumpy forms), et les formes allongées (slender forms).

Les formes trapues, apparaissant surtout lors des périodes de rémission, peuvent être ingérées par une glossine. Chez la mouche tsé-tsé, elles s'allongent et se multiplient à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane péritrophique. Elles migrent ensuite vers les glandes salivaires où elles subissent une seconde vague de multiplications, prenant ainsi la forme d'épimastigotes. Ces dernières migrent enfin dans la lumière des conduits excréteurs des glandes salivaires où elles évoluent en trypomastigotes métacycliques infectieux (J.M. JADIN, 1978).

1.4.2. Symptomatologie des trypanosomiasés africaines.

Les trypanosomes appartenant à l'espèce *brucei*, responsable de la maladie du sommeil africaine, comprennent les sous-espèces *T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense* et *T. b. brucei* qui diffèrent peu quant aux symptômes qu'ils induisent chez l'individu parasité.

Après piqûre d'une glossine infestée, une période d'incubation quasi asymptomatique de une à trois semaines s'installe. Ensuite, la parasitose évolue en deux phases.

a) Phase sanguine.

Les trypanosomes se multiplient intensément dans la circulation sanguine et lymphatique et provoquent une série de symptômes parmi lesquels :

- une fièvre importante
- des adénopathies
- une splénomégalie modérée
- une hépatomégalie
- un état anémique
- une hyperesthésie (exagération de la sensibilité)

b) Phase de polarisation cérébrale.

Cette période est marquée par le passage des trypanosomes dans le liquide céphalo-rachidien. La symptomatologie présente lors de la phase précédente se modifie : la fièvre diminue et les ganglions persistent rarement.

Toutefois, cette phase voit apparaître ses symptômes propres :

- troubles psychologiques (confusion mentale, hébétude)
- troubles moteurs (pertes d'équilibre)
- troubles extrapyramidaux donnant des crises subites d'épilepsie.
- troubles du sommeil (rythme nycthéméral inversé dans un premier temps, crises de narcolepsie prolongées ensuite)
- troubles de la faim (cachexie en général)

L'évolution de la maladie conduit inexorablement l'individu vers un état comateux débouchant sur la mort.

1.4.3. Immunité à l'égard des trypanosomes.

La défense naturelle de l'organisme contre des infections à *T.b.brucei* est surtout d'ordre humorale, la lyse des trypanosomes étant due aux anticorps produits. Cependant, au cours d'une infection, le trypanosome est capable de contourner les défenses immunitaires de l'hôte selon deux modalités essentielles :

a) Variation antigénique.

Les trypanosomes sont recouverts d'un manteau glycoprotéique composé de 7.10^6 molécules d'un poids moléculaire moyen de 60 KDa. L'intégrité de ce revêtement de surface peut changer au cours du temps mais à un moment donné un seul variant est exprimé. Ce genre de commutation est régi par environ 1000 gènes représentant 10% de la totalité du génome. Le système immunitaire est capable d'éliminer efficacement n'importe quel variant antigénique par le biais d'anticorps spécifiques, mais une faible proportion de nouveaux variants peut apparaître qui échappent à la défense organique et qui remplacent le variant

précédent. Le parasite a toujours une étape d'avance sur le système immunitaire, ce qui explique la chronicité de la maladie.

Notons que ce n'est pas la pression sélective qui détermine l'apparition de nouvelles souches mais que c'est l'organisme lui-même qui modifie son apparence.

L'étude de la structure antigénique des glycoprotéines de surface a été réalisée grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux produits chez la souris contre une protéine isolée ou certains de ses fragments obtenus par protéolyse (E.N. MILLER et al., 1984). Il ressort que cinq domaines glycoprotéiques sont potentiellement antigéniques, pouvant être reconnus par des anticorps monoclonaux. Ces derniers tombent dans certains groupes qui inhibent totalement la fixation d'autres membres de ce groupe et partiellement celle des anticorps de groupes adjacents. De ces cinq domaines, un seul est exprimé à la surface des parasites intacts. Il est situé en région N terminale de la molécule, c'est-à-dire dans la partie la plus variable. C'est cette portion qui est exposée au système immunitaire (G.A. CROSS, 1984). La glycoprotéine est formée d'un simple peptide qui est glycosilé et ancré dans la membrane du parasite par un acide miristique (fig. 1.4.3.).

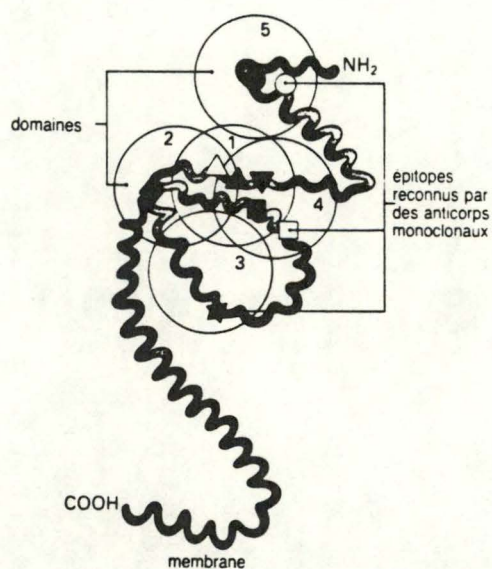


Fig. 1.4.3. Glycoprotéine variable de surface de *T. b. brucei*.

b) Protéines de "diversion".

Un autre facteur est impliqué dans le processus de contour de la réponse immunitaire par les trypanosomes; le parasite peut en effet libérer des antigènes qui "dévient" la réaction immunitaire. Ces antigènes solubles proviennent de la protéolyse de l'extrémité C terminale de la protéine au niveau de la partie antérieure de l'acide miristique. Les antigènes ainsi libérés peuvent agir comme "paravent" en empêchant la fixation d'anticorps sur les glycoprotéines de surface (G.A. CROSS, 1984).

c) Immunodépression.

La compétence immunitaire de l'hôte est grandement affectée par la parasitose. Celle-ci induit principalement des modifications à trois niveaux :

c₁) Altération de l'architecture lymphoïde.

Un nombre important d'infections par protozoaires se marquent par une altération du taux cellulaire et de la structure de différents organes lymphoïdes.

Les changements consécutifs à la présence de trypanosomes africains sont sévères surtout dans les dernières étapes de l'infection. Des modifications dans la taille des organes lymphoïdes en sont des indices évidents : splénomégalie, lymphadénopathie, atrophie thymique... (J.M. MANSFIELD 1982).

En outre, corrélativement à un élargissement des régions riches en cellules B de la rate, on note une augmentation considérable en cellules lymphoïdes et plasmiques. Par contre, les zones périartériolaires (cellules T) présentent un nombre réduit de petits lymphocytes et sont infiltrées par des macrophages (P.K. MURRAY et al., 1974).

Signalons également un accroissement transitoire du nombre de lymphocytes T dans la rate juste avant le pic de parasitémie (K.S. MAYOR-WITHEY et al., 1978).

Enfin, on constate une disruption histologique plus ou moins étendue de la moëlle osseuse; le nombre de cellules nucléées y étant fortement réduit

(C.E. CLAYTON et al., 1980).

c₂) Fonctions des cellules B.

Les trypanosomiasés, à l'égal de nombreuses autres parasitémies, se signalent par une élévation du taux sérique d'IgM et d'IgG (P.K. MURRAY et al., 1974; A.C. CORSINI et al., 1977). Chez l'homme, cette concentration accentuée d'IgM constitue un des diagnostics possibles de détection de la maladie du sommeil.

Des recherches effectuées sur la spécificité des anticorps synthétisés ont montré que l'activation lymphocytaire était polyclonale, la plupart des anticorps produits n'étant pas spécifiques des antigènes de trypanosomes.

Durant des infections chroniques à *T. brucei*, la réponse IgG contre des antigènes hétérologues diminue plus rapidement que le taux d'IgM (K.M. HUDSON et al., 1979). Cela suggère que la synthèse résiduelle d'IgM est suffisante pour contrôler les vagues de la parasitémie.

D'autre part, on a pu noter une déplétion dans la réponse proliférative des cellules B stimulées avec des mitogènes (LPS) par rapport aux témoins (A.C. CORSINI et al., 1977).

c₃) Fonctions des cellules T.

Il est peu probable que les cellules T cytotoxiques aient un rôle à jouer dans la destruction des trypanosomes extracellulaires. Cependant, on a pu montrer une activation des cellules T helper et T suppressives lors d'infections causées par *T. brucei*, comme l'indiquent l'intensification de la production d'anticorps et l'inhibition qui lui fait suite (A.N. JAYAWARDENA et al., 1978).

Cependant, comme l'infection progresse, tous les types de réponses des différentes cellules T déclinent.

c4) Fonctions des macrophages.

La pathologie à *T. brucei* est aussi accompagnée par une multitude de modifications des fonctions et populations macrophagiques. Les principales se situent au niveau de :

- la phagocytose des parasites.

L'adhésion, l'internalisation et la destruction des trypanosomes ne sont effectives qu'en présence d'anticorps spécifiques du parasite. Mais, d'autre part, l'étude du contrôle des infections parasitaires chez des souris *nude* qui ne peuvent produire des IgG antiparasites, suggère que les IgM sont suffisants pour opsoniser des trypanosomes (G.H. CAMPBELL et al., 1978).

- la médiation de l'immunodépression.

Le transfert à des souris normales de macrophages provenant de souris infestées par *T. brucei* montre une suppression de la synthèse d'anticorps vis-à-vis des antigènes T dépendants (C.M. GROSSKINSKY et al., 1981). Ces expériences permettent d'attribuer aux macrophages un rôle *in vivo* dans le processus d'immunodépression.

II. MATERIEL ET METHODES.

2.1. Trypanosomes.

Nous avons utilisé la souche *Trypanosoma brucei brucei* enregistrée sous la référence *T.b.b. Cr ITMAP 1891* et conservée par cryobiologie au Département de Protozoologie Médicale de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (Prof. Dr. Marc WERY et Dr. Sc. Dominique LE RAY). Il s'agissait d'une souche à croissance lente il y a dix mois après sa décongélation, mais qui suite aux nombreux passages a acquis un pouvoir de croissance rapide; il y a dix mois, ce n'est qu'après quatre à cinq semaines que l'infestation devenait massive et mortelle. Depuis lors ce processus s'est accru au point que dès le troisième jour après l'inoculation des trypanosomes, ceux-ci sont très nombreux et les souris meurent au quatrième jour.

Les parasites sont transmis par passages mécaniques de souris à souris. Quelques gouttes de sang murin infesté sont diluées dans du tampon PBS. On injecte 0,5 ml de cette solution par voie intrapéritonéale à des souris saines.

Tampon PBS (Phosphate buffer saline) :

Deux solutions sont préparées :

Solution A : 21,25 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PM 137,99) pour 1000 ml d' H_2O distillée;

Solution B : 18,3 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (PM 177,99) pour 1000 ml d' H_2O distillée;

Elles sont ensuite mélangées selon les proportions suivantes :

1,36 volume de solution A,
8,64 volumes de solution B.

Le pH est de 7,4.

2.2. Souris.

Nous avons utilisé des souris consanguines de souche NMRI entretenues à l'animalerie de la Faculté des Sciences.

Poids moyen: 30 g

La nature du sexe des souris ne fut pas prise en considération.

2.3. Tampon PSG. (Phosphate-buffered saline - glucose)

- Solution mère dite PS (Phosphate-buffered saline)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	(P.M. 177,99)	16,9 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	(P.M. 137,99)	0,7 g
NaCl	(P.M. 58,44)	4,25 g
H_2O bidistillée		jusqu'à 1000 ml.

- Solution PSG.

On dilue 6 volumes de la solution PS avec 4 volumes d'eau distillée et on ajoute ensuite 1% de glucose. On obtient ainsi une solution de pH 8,0 et de force ionique 0,217.

2.4. Tampon PSD.

La solution PS et le protocole de préparation sont identiques à ceux exposés pour le PSG. Seul le glucose a été remplacé par le dextran à même concentration. Le pH de la solution finale est de 8,0.

2.5. NaCl.

Solution physiologique salée de concentration 9 ‰.

2.6. Poche d'air, dextran et trypanosomes.

La méthode de formation d'une poche d'air sous-cutanée a été décrite par J.C.W. EDWARDS et al. (1981); les souris sont d'abord légèrement anesthésiées à l'éther et subissent ensuite en région dorsale, sous le derme, une injection de 5 ml d'air. Afin de maintenir cette cavité sur une longue période, une nouvelle injection d'air est effectuée tous les trois jours.

On constitue de la sorte une poche, une enclave qui limitera l'infection et par conséquent facilitera la dissection et les recherches ultérieures (fig. 2.6. a.).

a) Injection de dextran.

Une réaction inflammatoire chronique a été déclenchée par injection dans la poche gazeuse de 1 ml de dextran 12%, PM 40 000, trois fois à deux jours d'intervalle. Chaque injection de l'agent irritant a été réalisée sous anesthésie à l'éther (fig. 2.6. b.).

Dextran :

Il s'agit d'un α -D-glucopyronosyl de poids moléculaire 40 000, obtenu soit par dépolymérisation de protéines natives de *Leuconostoc mesenteroides* (D-4133, SIGMA).

Fig. 2.6. a. Vue extérieure de la poche sous-cutanée.

Fig. 2.6. b. Vue interne de la poche. Zone d'inflammation.

b) Inoculation de trypanosomes.

Nous avons prélevé du sang de souris parasitées et l'avons dilué dans du tampon PBS pH 7,4. Des souris furent infectées en inoculant 0,5 ml de cette solution contenant environ 6.10^5 trypanosomes/ml soit par voie sous-cutanée dans la bulle d'air, soit par voie intrapéritonéale.

Les comptages de trypanosomes ont été réalisés sur cellule de BURKER en microscopie optique.

2.7. Courbes de mortalité.

Nous avons réalisé deux types d'expériences dont nous donnons les modalités ci-après.

2.7.1. Recherche du délai d'infection optimal.

Après induction de la réaction inflammatoire avec le dextran, nous avons voulu connaître le délai d'infestation qui conférerait aux souris la résistance globale maximale.

Quatre groupes de quinze souris sont constitués en faisant varier le moment d'infestation (1,2,3, et 4 jours après la dernière injection de dextran). Pour chaque groupe, une injection de 5 ml d'air par voie sous-cutanée est effectuée. Dans l'enceinte ainsi constituée, la réaction inflammatoire est consolidée par l'injection de 1 ml de dextran à deux jours d'intervalle, trois fois de suite.

2.7.2. Modalités d'infestation.

Tenant compte du délai d'infection conférant une résistance optimale, nous avons fait varier les modalités d'inoculation tant du dextran que de l'air ou des trypanosomes. Ainsi furent constitués six groupes de quinze souris et établies des courbes de pourcentages

cumulés de décès en fonction du temps.

Groupe 1: groupe témoin.

Injection unique, intrapéritonéale, d'une solution sanguine trypanosomée (0,5 ml).

Groupe 2: inoculation des trypanosomes par voie sous-cutanée en région dorsale (0,5 ml).

Groupe 3: injection de 0,5 ml d'air suivie 2 jours plus tard de l'injection intrapéritonéale.

Groupe 4: les souris ont subi une injection de 5 ml d'air par voie sous-cutanée et 2 jours plus tard, nous avons inoculé dans la poche gazeuse ainsi constituée 0,5 ml d'une solution trypanosomée.

Groupe 5: nous avons ici aussi délimité une poche de 5 ml d'air et nous y avons injecté par la suite 1 ml de dextran 12%, 3 fois, à 2 jours d'intervalle. Au troisième jour après la dernière injection de dextran, les souris furent infestées par inoculation de trypanosomes par voie intrapéritonéale.

Groupe 6: les modalités concernant l'injection d'air et de dextran sont identiques à celles du groupe 5. Les trypanosomes sont injectés dans la poche d'air.

2.8. Sérum inflammatoire (SI).

2.8.1. Expériences *in vivo*.

Après prélèvement du SI, nous avons réalisé deux types de transferts sériques :

2.8.1.1. En discontinu.

2.8.1.2. En continu.

Pour chacun d'eux, trois paramètres expérimentaux ont été testés :

- origine,
- obtention,
- conservation du sérum.

a) Origine du SI.

- Souris :

Une réaction inflammatoire chronique est déclenchée et entretenue chez 50 souris NMRI par injection de 1 ml de dextran 12%, trois fois successivement à deux jours d'intervalle dans une poche d'air sous-cutanée d'un volume de 5 cm³. Trois jours après la dernière injection de l'agent irritant, soit au moment où les souris sont les plus résistantes à une parasitose potentielle, on réalise des ponctions cardiaques sous conditions stériles.

- Rats :

Nous avons également testé l'effet du sérum enflammé provenant de rats (souche WISTAR, poids moyen : 300 g) sur la résistance de souris trypanosomées. L'induction d'une réaction inflammatoire chronique est réalisée chez 5 rats selon la technique usuelle. Les quantités de dextran et le volume de la poche d'air ont été adaptés en fonction du poids (dextran : 5 ml, vol. d'air : 30 ml).

b) Obtention du SI.

Le sang (de rats ou de souris) recueilli est légèrement hépariné et centrifugé soit à 2500 tours/min., soit à 10 000 tours/min.

Durée de centrifugation : 20'.

Température de centrifugation : 4°C.

c) Conservation du SI.

Nous avons testé deux modes de conservations :

- en chambre froide (4°C)
- en congélation (-20°C)

2.8.1.1. Transfert en discontinu.

Injection simple : Nous avons effectué une injection unique (2 ml) de SI par voie intrapéritonéale chez 10 souris.

30 minutes plus tard, de la même façon, nous avons inoculé 0,5 ml d'une solution sanguine de PSG contenant environ 3.10^5 trypanosomes.

Injection multiple: 10 souris subissent une injection préalable de 0,5 ml de serum enflammé dans la cavité péritonéale. Une demi heure plus tard, elles sont inoculées avec 3.10^5 trypanosomes sous le péritoine. Ensuite, on leur injecte quotidiennement, par aliquot de 0,5 ml et par voie intrapéritonéale, le SI. Les souris sont suivies de cette façon jusqu'à trépas.

2.8.1.2. Transfert en continu.

Pour effectuer ce transfert, nous avons suivi la technique décrite par le Dr P. MALOMBA LOWA (communication personnelle) : un cathéter (I.D. 0,15" - O.D. 0,43") fixé sous anesthésie dans la cavité péritonéale, longe sous la peau le flanc de la souris et émerge au sommet de sa tête; il est gainé à l'extérieur par un ressort métallique souple permettant une liberté de mouvement à la souris tout en protégeant le tube de polyéthylène. Celui-ci est relié à un perfuseur automatique de type Braun Melsungen. Les seringues de perfusion, le perfuseur et la plus grande longueur des cathéters sont placés en chambre froide (4°C). (fig. 2.8.1.2.).

Fig. 2.8.1.2. Installation de la chambre froide.

Souris témoins : - nombre : 2.

- liquide de perfusion : NaCl 9‰.
- débit : 0,19 ml/h.
- temps de perfusion : 72 heures.
- volume total perfusé : 13,6 ml.

Souris tests : - nombre : 2.

- liquide de perfusion : sérum inflammatoire.
- débit : 0,19 ml/h.
- temps de perfusion : 72 heures.
- volume total perfusé : 13,6 ml.

Les deux groupes de souris sont préalablement perfusés durant 60 minutes et subissent par la suite une inoculation par voie intrapéritonéale de 0,5 ml de PSG contenant environ 3.10^5 trypanosomes. La perfusion reprend ensuite son cours normal.

Ces deux types de transferts ont été réalisés deux fois chacun sous les mêmes conditions expérimentales.

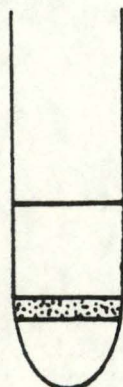
Note: chaque expérience concernant la recherche d'un effet sérum a été réalisée deux fois.

2.8.2. Expériences *in vitro* .

Principe d'isolement des trypanosomes.

- a) Après ponction cardiaque, le sang de souris infestées est placé dans un tube vertical renfermant du milieu PSG + héparine.
- b) Centrifuger à 2500 tours/min. pendant 20' à 4° C.

La répartition obtenue est la suivante :



sérum + plaquettes.

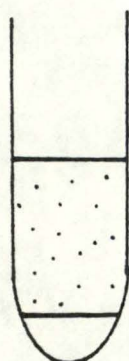
globules blancs + plaquettes + trypanosomes.

globules rouges.

c) Prélever la fraction "globules blancs + plaquettes + trypanosomes" et la diluer dans du PSG.

d) Centrifuger à 2500 tours/min. pendant 20' à 4° C.

Résultat :



globules blancs + plaquettes + trypanosomes.

globules rouges.

e) Passer le surnageant sur colonne DEAE-cellulose (S.M. LANHAM, 1968) et éluer les trypanosomes avec du PSG pH 8.

f) Centrifuger l'éluat à 2500 tours/min. pendant 20' à 4° C.

g) Retirer le surnageant et diluer le culot dans du NaCl 9‰.

h) Centrifuger à 3000 tours/min. pendant 10' afin d'éliminer tout résidu

de glucose.

- i) Mise en suspension du culot de trypanosomes dans la solution physiologique salée.
- j) Comptage des trypanosomes et dilution de la suspension afin d'obtenir une concentration finale de 3.10^5 trypanosomes/0,5 ml.

2.9. Exudat inflammatoire (EI).

a) Solution de NaCl témoin.

1 ml d'une solution de NaCl 9‰ préparée dans de l'eau bidistillée est injectée de façon sous-cutanée en région dorsale à des souris normales.

b) Solution de NaCl test.

Une réaction inflammatoire chronique est provoquée sous le derme des souris par injection de 1 ml de dextran 12%, trois fois, à deux jours d'intervalle.

Trois jours après la dernière injection de l'irritant, on injecte 1 ml de NaCl 9‰ dans la poche d'inflammation.

Les solutions témoins et tests sont récupérées par ponction 30 minutes plus tard et mises séparément en contact avec environ 3.10^5 trypanosomes. Le temps de survie des parasites dans ces deux milieux est comparé, en microscopie optique, par évaluation de leur mobilité.

2.10. Microscopie.

2.10.1. Microscopie optique des trypanosomes.

a) Observation à frais en microscopie à contraste de phase.

b) Frottis sanguins de souris trypanosomées.

Etalement des cellules sanguines et des trypanosomes sur lame porte-objet.

Fixation au méthanol.

Coloration au Giemsa.

2.10.2. Histologie de la paroi de la poche d'air.

Après dissection de la peau, nous avons prélevé la paroi de la poche et nous l'avons étudiée en microscopie optique et en microscopie électronique à transmission et à balayage.

a) Microscopie optique.

Colorant : Bleu de Toluidine 0,2 % + Na_2CO_3 2,5 %.

Cette étude a été faite sur des coupes semi-fines (1 μm d'épaisseur)

b) Microscopie à transmission.

Nous avons utilisé le microscope Philips EM 301 sous une différence de potentiel de 60 kV.

1) Fixation : Glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon phosphate 0,1M; pH 7,2 ; pendant 2 h 30'; à 4° C.

2) Lavage : On effectue trois lavages de 15 minutes dans du tampon PO_4 0,2 M; pH 7,2.

3) Postfixation: OsO_4 1% dans du tampon PO_4 0,15 M; pH 7,8; durant 1 h, à 4°C.

4) Déshydratation : les spécimens sont placés dans des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes et dans l'acétone absolu.

Ethanol: 25 % --> 60'
50 % --> 60'
75 % --> 60'
90 % --> 60'
100 % --> 2 fois 60'

Acétone:100 % --> 2 fois 60'

5) Enrobage : on procède par mélange en proportions bien définies d'une solution A et d'une solution B; le mélange fait, le spécimen est plongé dedans.

Solution A : Epon + DDSA (Dodécyl Succinic Anhydric)

Solution B : Epon + NMA (Nadic Methyl Anhydric)

On ajoute à ce mélange un accélérateur de polymérisation : le BDA (N, N diméthylbenzylamine). La polymérisation se fait à l'étuve.

37° C --> 12 h.

45° C --> 24 h.

60° C --> 72 h.

6) Colorant : - Acétate d'Uranyl; 2 %; pH 4,8; pour augmenter le contraste du DNA et des protéines tissulaires selon la méthode de G. MILLONIG (1961).

- Citrate de Plomb selon M. REYNOLDS (1963).

On prépare deux solutions :

Solution A : - Nitrate de Pb 1,3 g
- H₂O distillée 15 ml

Solution B : - Citrate de Na 1,76 g
- H₂O distillée 15 ml

On mélange les deux solutions goutte à goutte après adjonction de 8 ml d'hydroxyde de Na. La solution finale est diluée jusqu'à 50 ml.

c) Microscopie à balayage.

Le microscope utilisé est le JEOL JSM 35, sous une différence de potentiel de 35 kV.

1) Fixation : glutaraldéhyde 2,5 % dans du tampon PO₄ 0,1 M; pH 7,2; pendant 2 h 30'.

2) Déshydratation : dans des bains d'éthanol de concentration croissante et dans l'acétone absolu.

3) Point critique : effectué dans l'appareil à CO₂ qui remplace progressivement l'acétone de l'échantillon par du CO₂.

4) Ombrage : selon la technique du "spittering" au moyen d'un appareil Balzers. La couche ultrafine d'or déposée en surface de l'échantillon permet une meilleure conduction électronique.

2.10.3. Etude des cellules libres dans la poche d'air.

a) Mise en place de la lamelle.

Au deuxième jour de sa formation nous avons pratiqué au niveau de la poche d'air, sous conditions stériles, une petite incision et y avons ensuite glissé une fine lamelle de verre. Les deux lèvres de la scissure sont finalement recousues (fig. 2.10.3.).

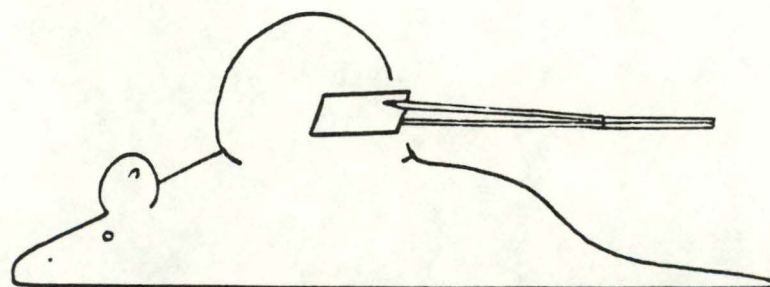


Fig. 2.10.3. Représentation schématique de la mise en place de la lamelle.

b) Groupes de souris étudiés.

- 1) Souris ayant reçu une injection unique d'air.
- 2) Souris ayant subi de surcroît une série de trois injections de dextran 12% à deux jours d'intervalle.

La lamelle est retirée au onzième jour chez les souris du groupe (1) et au troisième jour après la dernière injection de dextran chez les souris du groupe (2).

c) Etude en microscopie à balayage.

Les lamelles de verre sont récupérées sous conditions stériles et suivent ensuite les procédures de préparation propres à la microscopie à balayage : déshydratation, point critique et dorage.

III. RESULTATS.

3.1. Délai optimal d'infestation.

La figure 3.1. nous indique les pourcentages cumulés de décès en fonction du temps.

Le protocole expérimental est exposé dans la partie 2.7.1.

Les trypanosomes sont inoculés par voie intrapéritonéale au jour 0 et l'intervalle de temps entre la dernière injection de dextran et l'infestation des souris varie selon les groupes considérés.

a) Délai : 1 jour

% cumulés de décès	Temps de survie (jours)*
42,9	5
92,9	6
100	7

b) Délai : 2 jours

% cumulés de décès	Temps de survie (jour)*
86,7	5
93,3	6
100	7

c) Délai : 3 jours

% cumulés de décès	Temps de survie (jours)*
20,0	5
73,3	6
80,0	7
86,7	8
100	59

d) Délai : 4 jours

% cumulés de décès	Temps de survie (jours)*
14,3	5
64,3	6
92,9	7
100	10

* calculés à partir du jour de l'inoculation des parasites.

Les valeurs présentées sont des moyennes, cette expérience ayant été répétée trois fois.

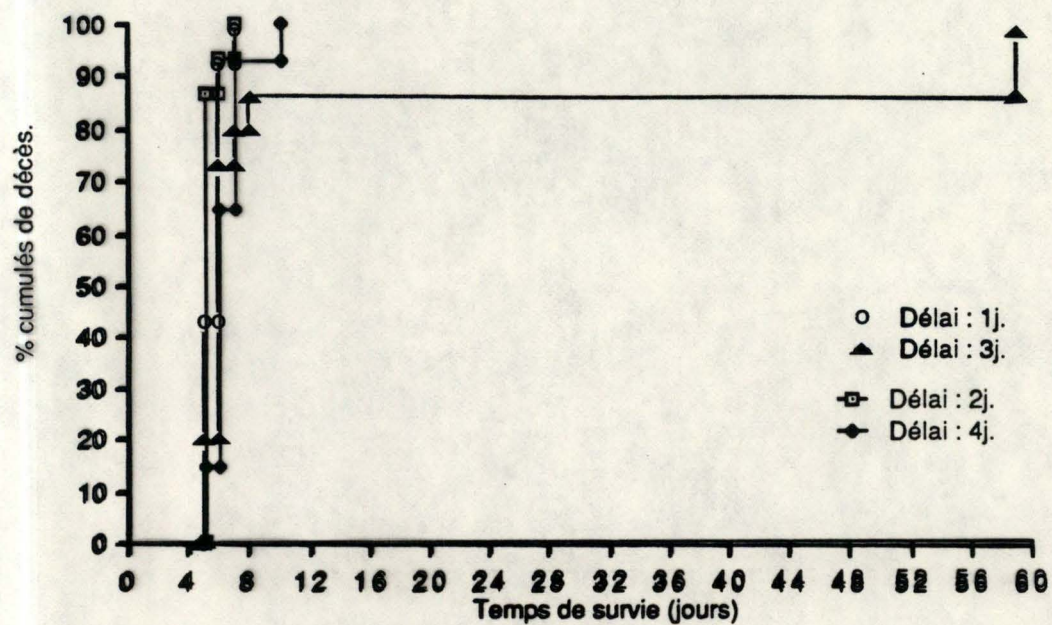


Fig. 3.1. % cumulés de décès en fonction du temps.

Variation de l'intervalle de temps entre la dernière injection de dextran et l'infestation des souris.

3.2. Modalités d'infestation.

Nous avons recherché l'impact de différents modes d'inoculation de trypanosomes sur le taux de mortalité.

a) Injection de trypanosomes par voie intrapéritonéale.

Toutes les souris de ce groupe décédèrent au jour 4, la souche de *T. b. brucei* utilisée étant devenue très stable.

b) Trypanosomes par voie intrapéritonéale + air.

% cumulés de décès	Temps de survie (jours)
93,3	5
100	7

c) Trypanosomes par voie intrapéritonéale + air + dextran.

% cumulés de décès	Temps de survie (jours)
73,3	5
86,6	6
93,3	7
100	8

d) Trypanosomes par voie sous-cutanée.

% cumulés de décès	Temps de survie (jours)
26,7	7
66,7	8
100	9

e) Trypanosomes par voie sous-cutanée + air.

% cumulés de décès	Temps de survie (jours)
6,7	7
80,0	8
100	9

f) Trypanosomes par voie sous-cutanée + air + dextran.

% cumulés de décès	Temps de survie (jours)
33,3	8
60,0	9
66,7	10
80,0	19
86,7	20
93,3	21
100	25

Les résultats exposés ci-dessus sont repris sur le graphique 3.2.

En ordonnée sont inscrits les pourcentages cumulés de décès et en abscisse, le temps de survie exprimé en jours.

A nouveau, chaque valeur ici présentée correspond à une moyenne, l'expérience ayant été réitérée trois fois.

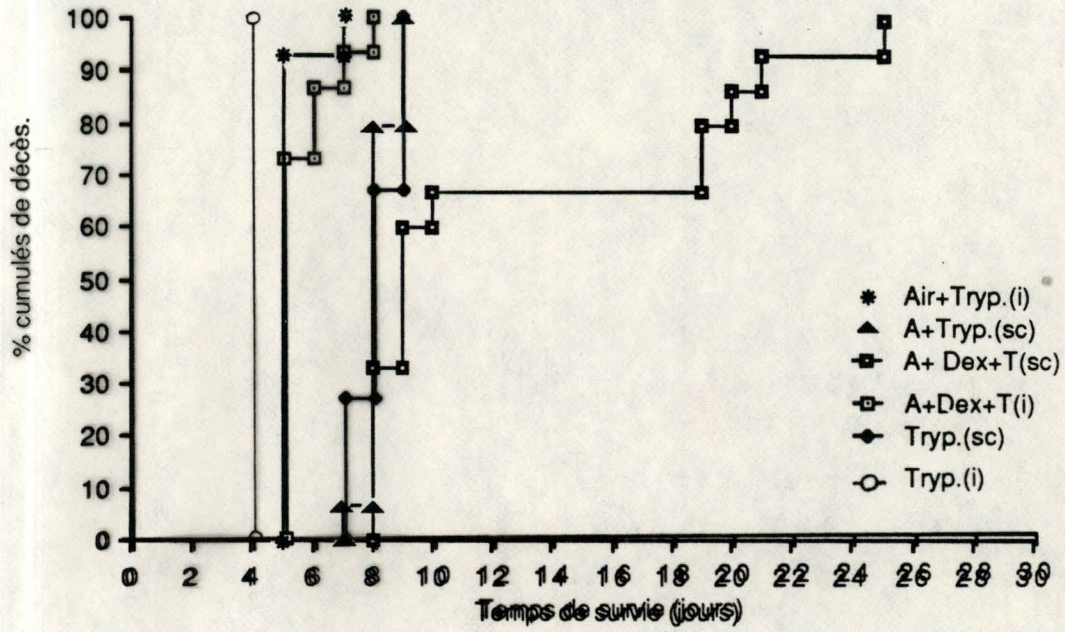


Fig. 3.2. % cumulés de décès en fonction du temps.
Variation du mode d'infestation.

3.3. Sérum inflammatoire (SI).

3.3.1. Expériences in vivo .

Dans les tableaux ci-dessous, nous présentons les valeurs moyennes des résultats concernant les deux expériences qui se rapportent à chaque type de transfert sérique.

3.3.1.1. Transfert en discontinu .

- Injection simple.

Les souris ont subi une injection massive et unique de 2 ml de SI.

Le tableau ci-dessous donne les pourcentages cumulés de mortalité en fonction du temps (jour 0 = jour d'infestation).

<u>Survie (jours)</u>	<u>Témoins</u>	<u>Souris + SI</u>
0	-	-
1	-	100
2	-	
3	-	
4	80	
5	90	
6	100	

- Injection multiple.

Nous avons effectué selon ce modèle quatre types de transferts de sérum. Les résultats sont exprimés en "% cumulés de décès" après le jour d'infestation des souris (jour 0).

a) Transfert en conditions "normales" du SI.

Rappelons que pour récupérer le sérum, le sang de souris est ici centrifugé à basse vitesse (2500 tours/min.) et le surnageant est conservé en chambre froide.

<u>Survie (jours)</u>	<u>Témoins</u>	<u>Souris + SI</u>
4	80	70
5	90	100
6	100	

b) Variation de l'origine du SI.

Le sang provient de rats et le sérum a été récupéré après centrifugation à 2000 tours/min.

<u>Survie (jours)</u>	<u>Témoins</u>	<u>Souris + SI</u>
5	50	45
6	100	100

c) Obtention du SI.

Vitesse de centrifugation du sang (10 000 tours/min.)

<u>Survie (jours)</u>	<u>Témoins</u>	<u>Souris + SI</u>
4	45	60
5	100	100

d) Variation du mode de conservation du SI.

Avant utilisation, le sérum est maintenu à -20°C.

<u>Survie (jours)</u>	<u>Témoins</u>	<u>Souris + SI</u>
4	60	55
5	100	100

3.3.1.2. Transfert en continu.

Les transferts sériques testés ici sont du même type que ceux concernant l'injection en discontinu. Etant donné les fortes contraintes que nous imposait l'injection continue, le nombre de souris a été limité (4 témoins, 4 tests par expérience). Les résultats sont donc exprimés ici non en "% cumulés de décès" mais en "nombre de survivants cumulés" en fonction de la durée d'infestation. Le moment d'infestation est considéré comme étant le jour 0.

a) Transfert en conditions "normales" du SI.

<u>Survie (jours)</u>	<u>Témoins</u>	<u>Souris + SI</u>
4	4	-
10		2
11		3
12		4

b) Variation de l'origine du SI.

<u>Survie (jours)</u>	<u>Témoins</u>	<u>Souris + SI</u>
4	3	2
5	4	4

c) Obtention du SI.

<u>Survie (jours)</u>	<u>Témoins</u>	<u>Souris + SI</u>
4	1	3
5	4	4

d) Variation du mode de conservation du SI.

<u>Survie (jours)</u>	<u>Témoins</u>	<u>Souris + SI</u>
4	2	3
5	4	4

3.3.2. Expériences in vitro .

Les trypanosomes purifiés sont placés dans 1 ml de divers milieux : sérum normal (SN), sérum enflammé (SI), PSG, PSD, NaCl. Leur capacité de survie au cours du temps est évaluée en microscopie optique de 5 en 5 minutes.

- SN, SI, PSG : dans ces trois milieux, les trypanosomes vivent parfaitement et leur mobilité est encore effective après 12 heures.
- PSD : 5 minutes après contact avec le PSD, tous les trypanosomes sont immobilisés. Cependant, leur mobilité est restaurée lorsqu'on ajoute dans ce milieu 1 ml de PSG. Le taux de mouvement augmente alors progressivement jusqu'à un optimum à 75 minutes environ, puis décroît lentement jusqu'à paralysie totale après 150 minutes.
- NaCl : les trypanosomes en contact avec le NaCl meurent dans les mêmes délais que ceux placés dans le milieu PSD.

3.4. Exudat inflammatoire (EI).

Nous présentons ci-dessous le temps de survie des trypanosomes dans les deux solutions de NaCl.

	<u>NaCl témoin.</u>	<u>NaCl test.</u>
Temps de survie (min.)	60	200

Ces valeurs sont les moyennes de trois expériences.

3.5. Microscopie.

3.5.1. Optique.

- a) Coupe témoin : la figure 3.5.1.a. montre une coupe réalisée dans le derme d'une souris normale n'ayant reçu aucune injection préalable.
- b) Coupe de derme en état de réaction inflammatoire : nous avons pu mettre en évidence sur coupes semi-fines de la paroi de poche gazeuse chez des souris enflammées depuis trois jours, des précipités de dextran à l'intérieur de cellules largement vacuolisées (fig. 3.5.1.b.)

Fig. 3.5.1. a. Coupe de paroi sans dextran.

Vue en microscopie optique (G : 1000 X)

Fig. 3.5.1.b. Coupe de paroi avec dextran.

Macrophages vacuolaires (M).

Vue en microscopie optique (G : 1000 X)

3.5.2. Transmission.

Des coupes de paroi de poche sous-cutanée sous réaction inflammatoire chronique non spécifique présentent des cellules vacuolaires du même type que celles révélées par la microscopie optique (3.4.2. a,b,c).

3.5.3. Balayage.

a) Coupes.

A nouveau, il a été effectué deux séries de coupes dermiques :

- coupe témoin : les dissections furent réalisées sur souris normales. La figure 3.4.3.a. se caractérise par l'absence de cellules d'inflammation.

- coupe de derme en état de réaction inflammatoire : les photographies de coupes ultra-fines nous montrent la présence de nombreuses cellules de type macrophage (fig. 3.4.3.b₁₋₂). En outre, nous constatons une forte densité de fibres (fig. 3.4.3.b₃₋₄).

b) Lamelles.

Nous avons également étudié en microscopie à balayage des lamelles de verre placées dans la poche d'air avec du dextran. Des cellules immunocompétentes adhèrent à la surface de l'implant lamellaire.

Sur la microphotographie 3.4.3.c₁, on observe un macrophage émettant des pseudopodes. Il faut remarquer ici la frange cytoplasmique frontale mince et étendue, permettant l'adhérence au support.

La figure 3.4.3.c₂ nous montre le même type de cellule à l'état de repos.

Fig. 3.4.2.a :

Vue en microscopie électronique à transmission.

Macrophages fortement vacuolaires localisés autour de la poche sous-cutanée.
Les deux photographies montrent les mêmes structures à des grossissements différents.

(Les traits sur chaque micrographie représentent 0,5 μm).

Vacuoles (V).

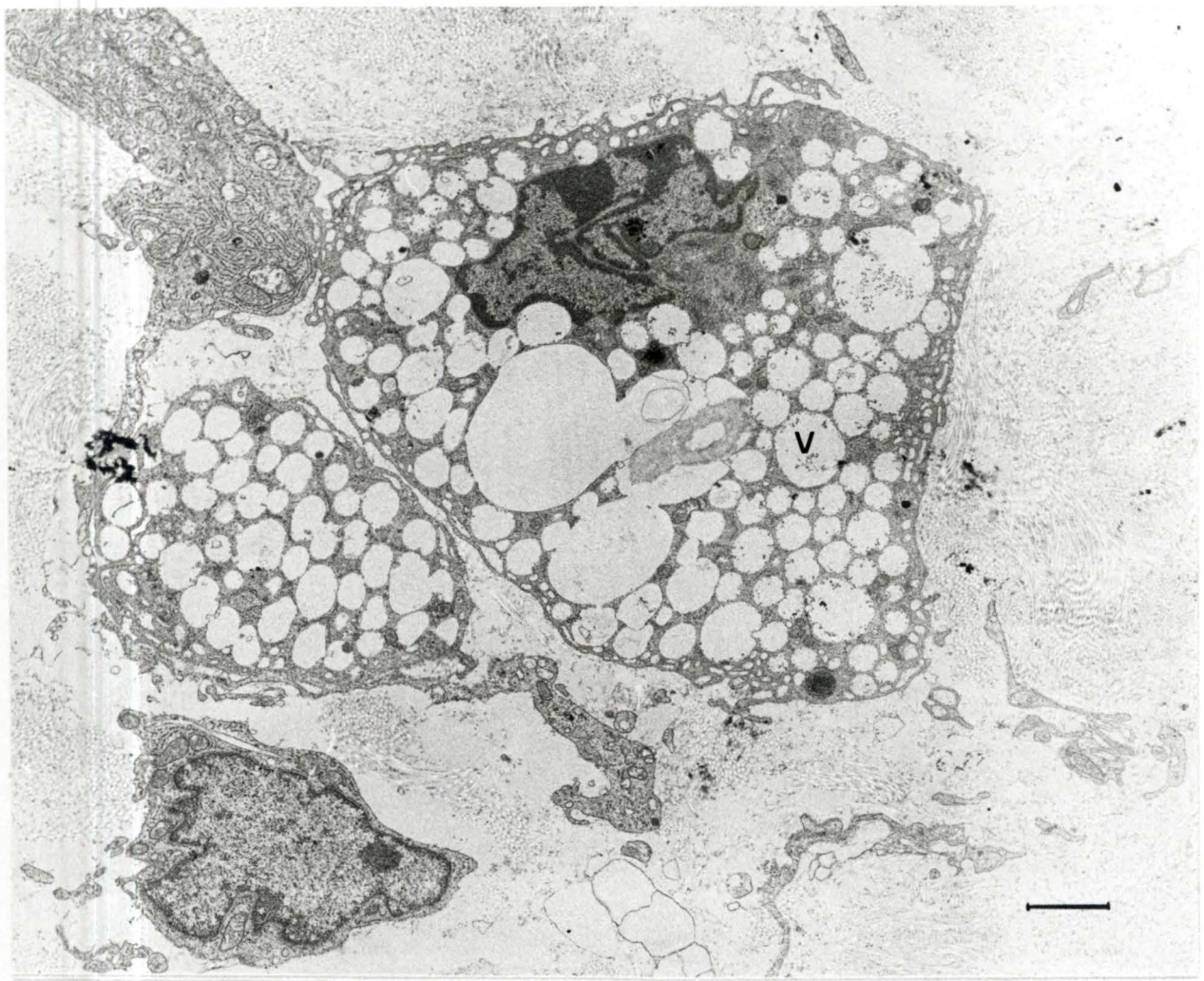


Fig. 3.4.2.a.

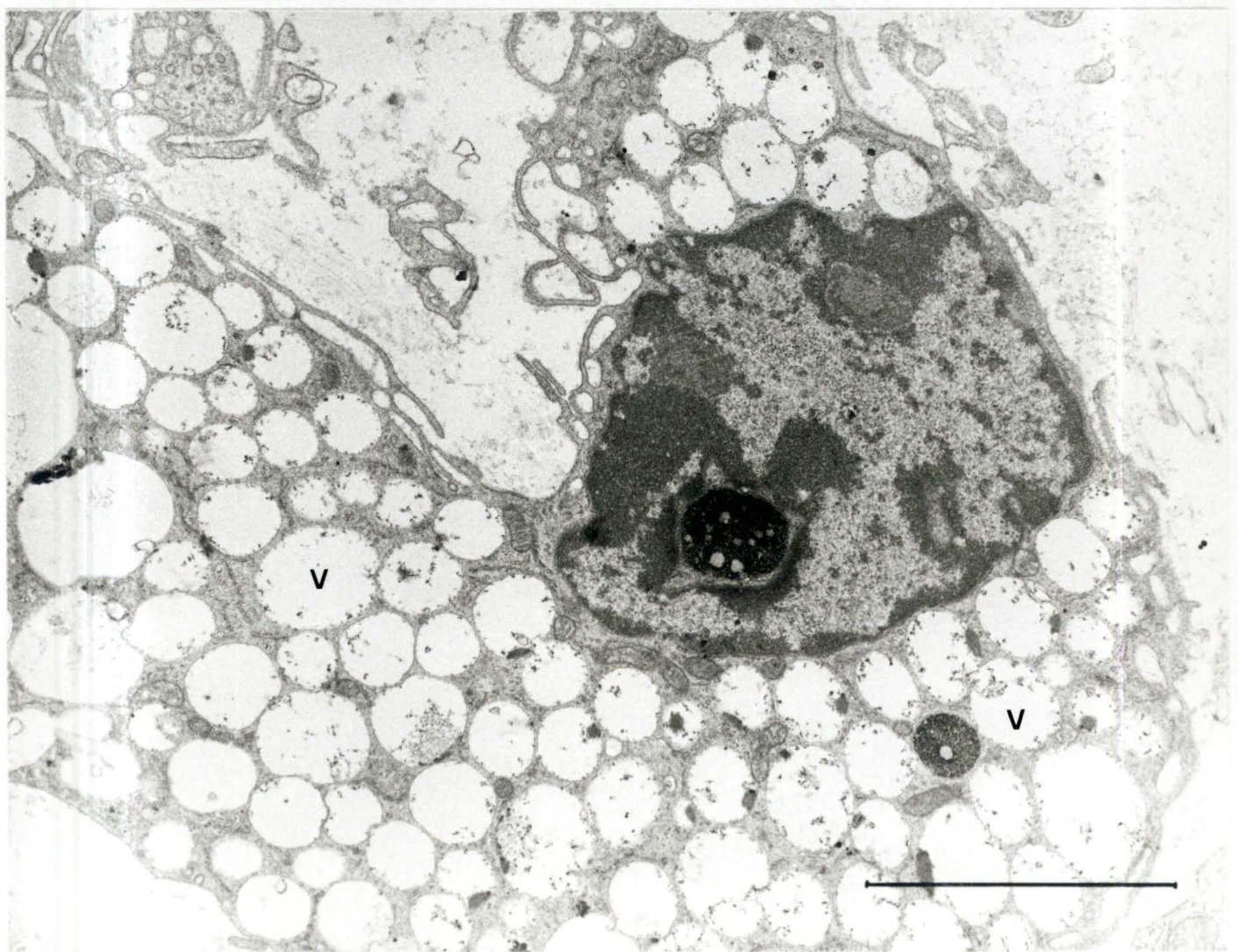


Fig. 3.4.2.b. :

Micrographie électronique en transmission.

Mastocyte autour de la poche d'inflammation.

Noyau à hétérochromatine périphérique (N).

Granulations de structure variant selon le degré de maturation (G).

Pseudopode (P) important à l'opposé du noyau, signant le mode de locomotion amiboïde du mastocyte.

Nombreuses petites digitations périphériques (Dp) permettant l'adhérence au support .

Vacuoles (V).

(Le trait représente 5 μm).

Fig. 3.4.2.c. :

Vue en microscopie électronique à transmission d'un granulocyte éosinophile localisé dans la paroi.

Noyau (N) segmenté en plusieurs parties réunies les unes aux autres par un pont très fin de substance nucléaire (Pt).

La chromatine montre une localisation périphérique.

La membrane cellulaire présente des digitations (D) pouvant être prémices à la formation d'un pseudopode.

(Le trait représente 1 μm).

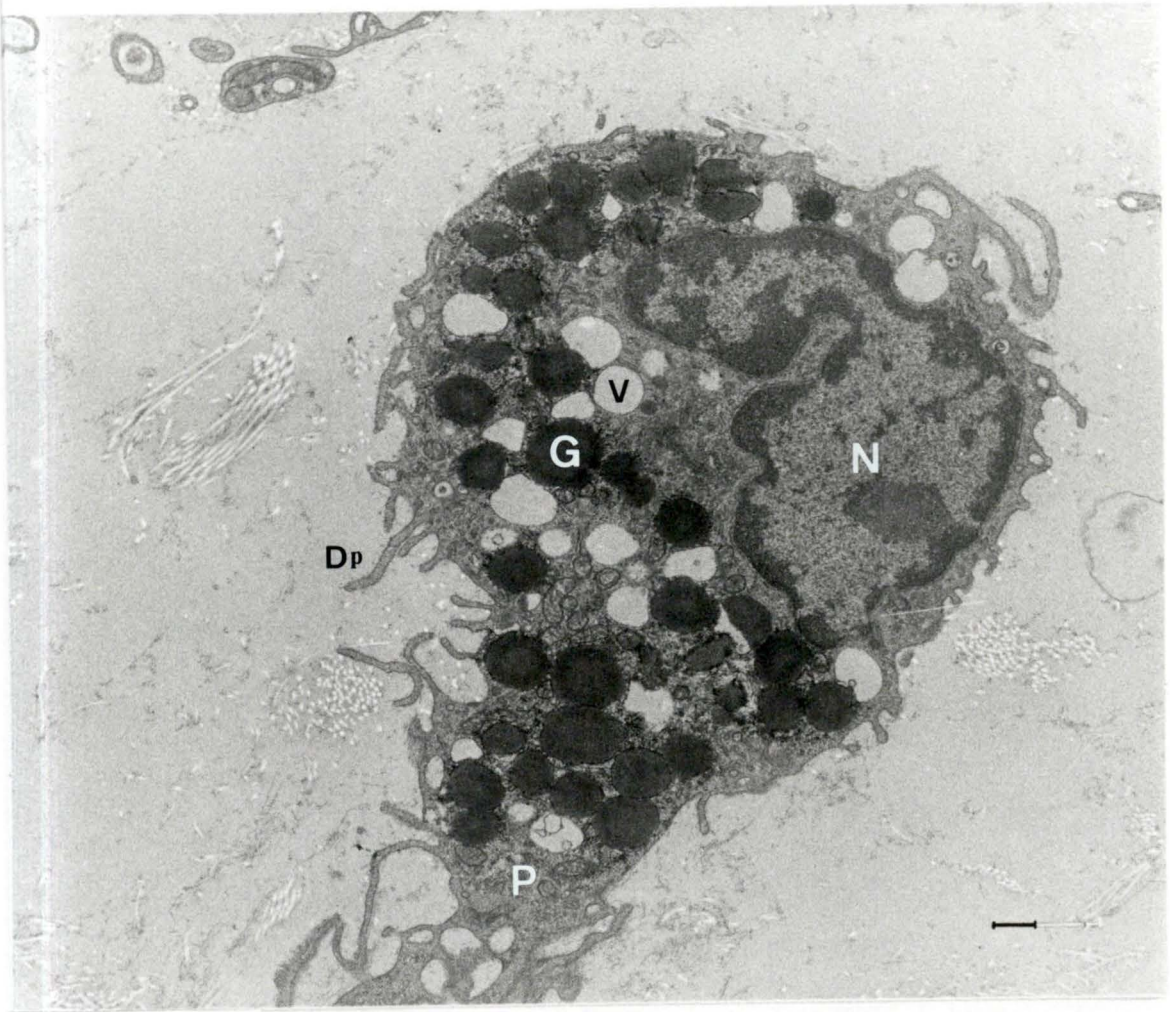


Fig. 3.4.2.b.

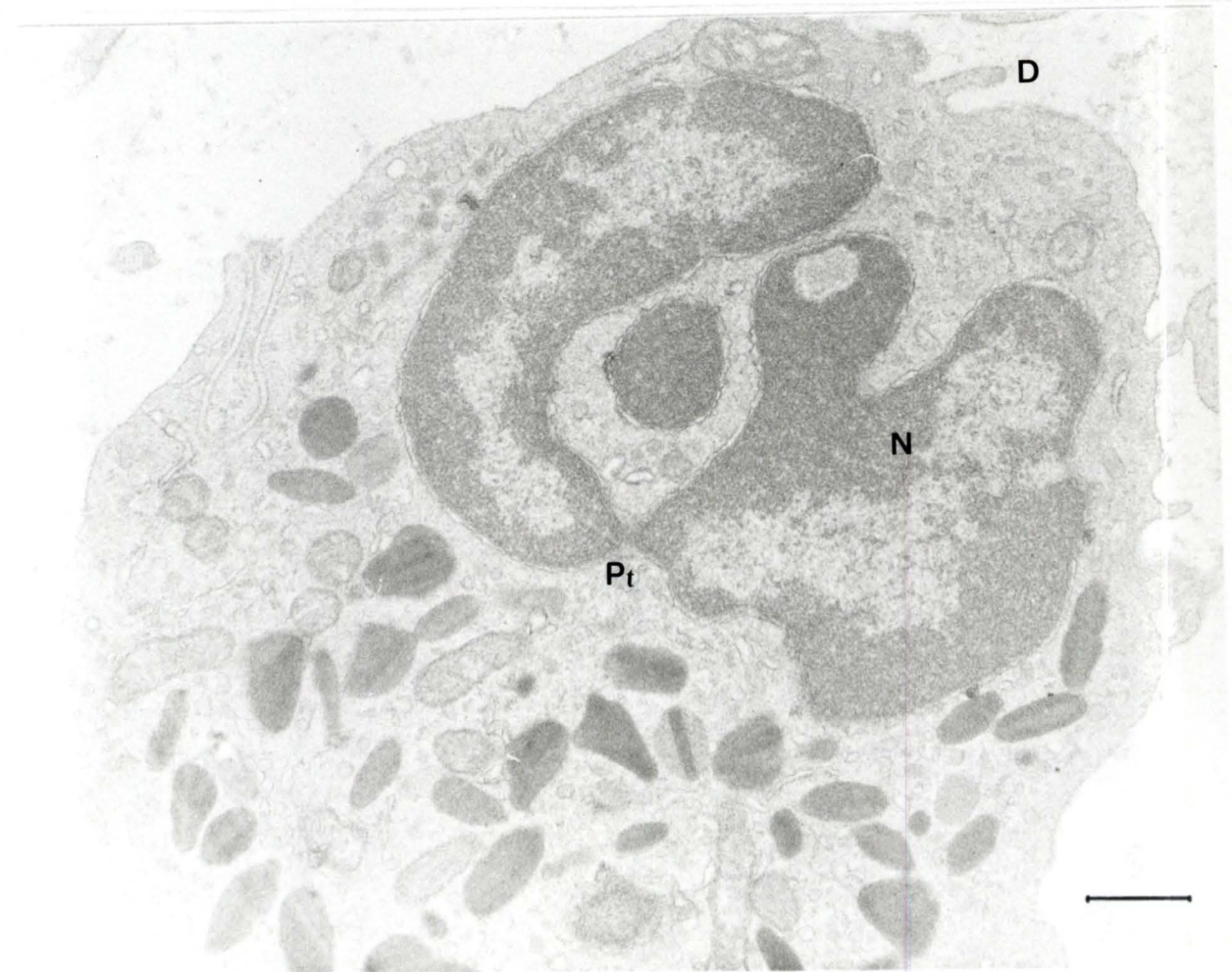


Fig. 3.4.2.c.

Fig. 3.4.3.a :

Face interne de la paroi de la poche à air après action du dextran.

Vue en microscopie électronique à balayage.

On observe peu de macrophages. La surface tissulaire est relativement lisse.

(Le trait représente 100 μm).



Fig. 3.4.3.a.

Fig. 3.4.3.b₁ :

Face externe de la paroi de la poche après action du dextran.
Vue de la face interne en microscopie électronique à balayage.
Densité importante en macrophages (M).
(Le trait représente 50 μm).

Fig. 3.4.3.b₂ :

Idem que fig. 3.4.3.b₁ à plus fort grossissement.
(Le trait représente 10 μm).

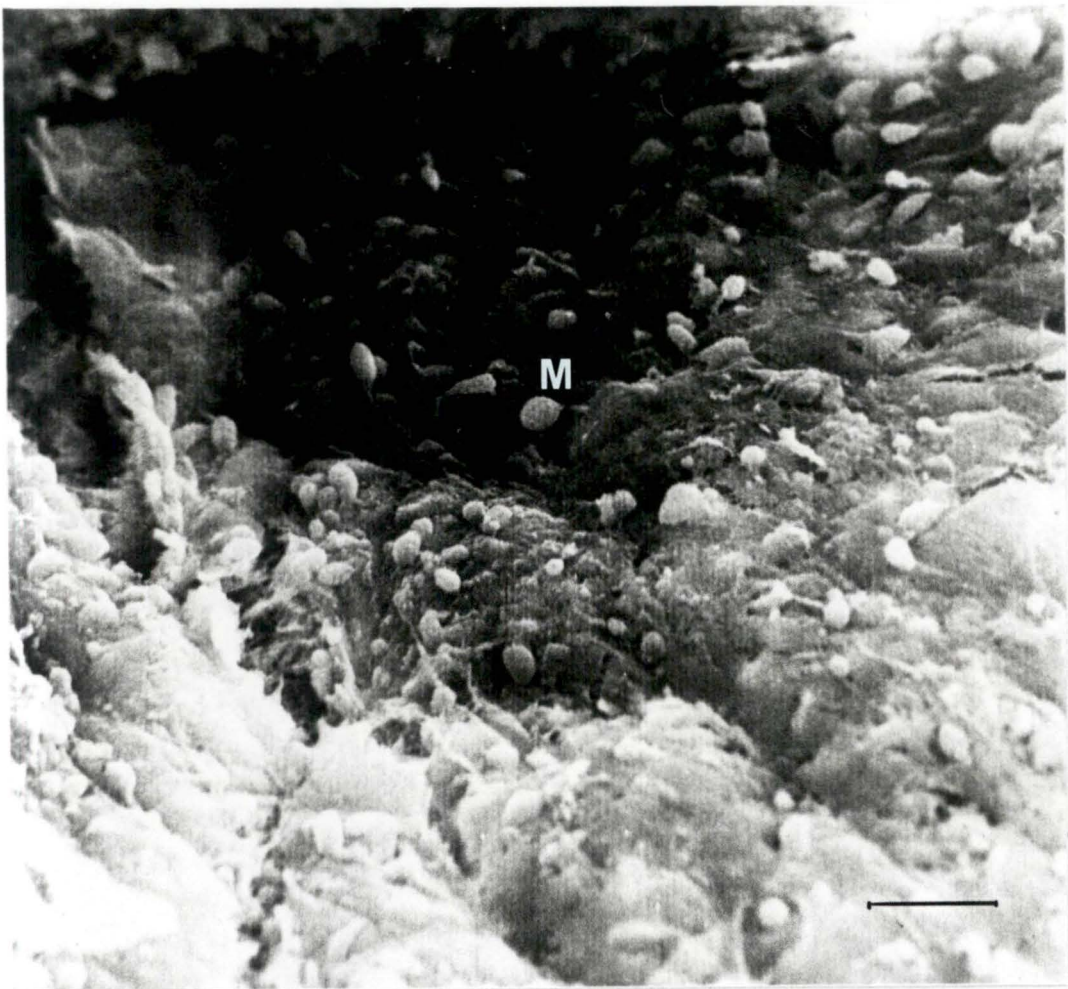


Fig. 3.4.3.b₁.

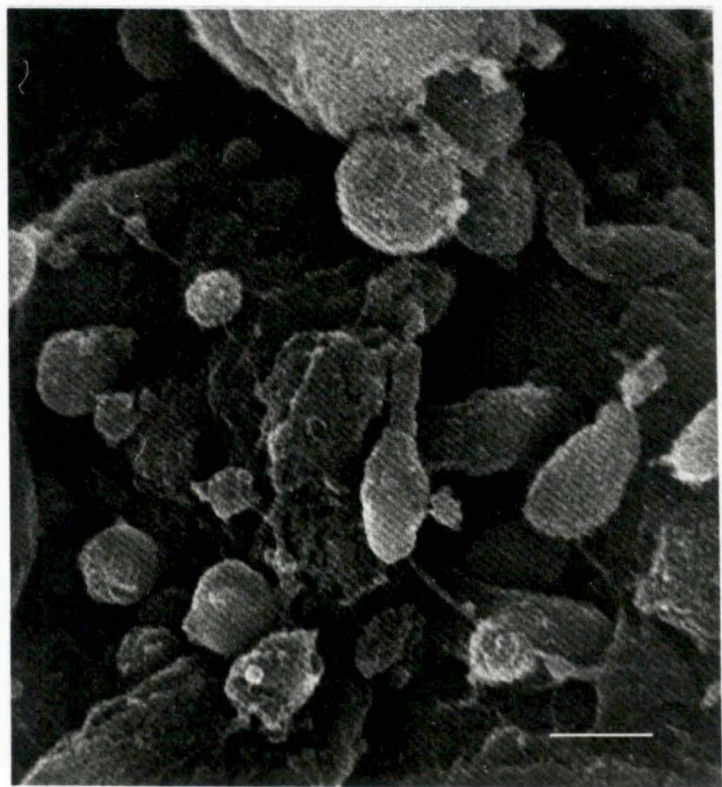


Fig. 3.4.3.b₂.

Fig. 3.4.3.b₃ et Fig. 3.4.3.b₄ :

Face externe de la paroi de la poche à air après action du dextran.

Vue de la face externe en microscopie électronique à balayage.

On peut voir un pourcentage élevé en fibres ainsi que l'ébauche d'une néovascularisation.

(Les traits sur chaque micrographie représentent 10 μm).



Fig. 3.4.3.b₃.

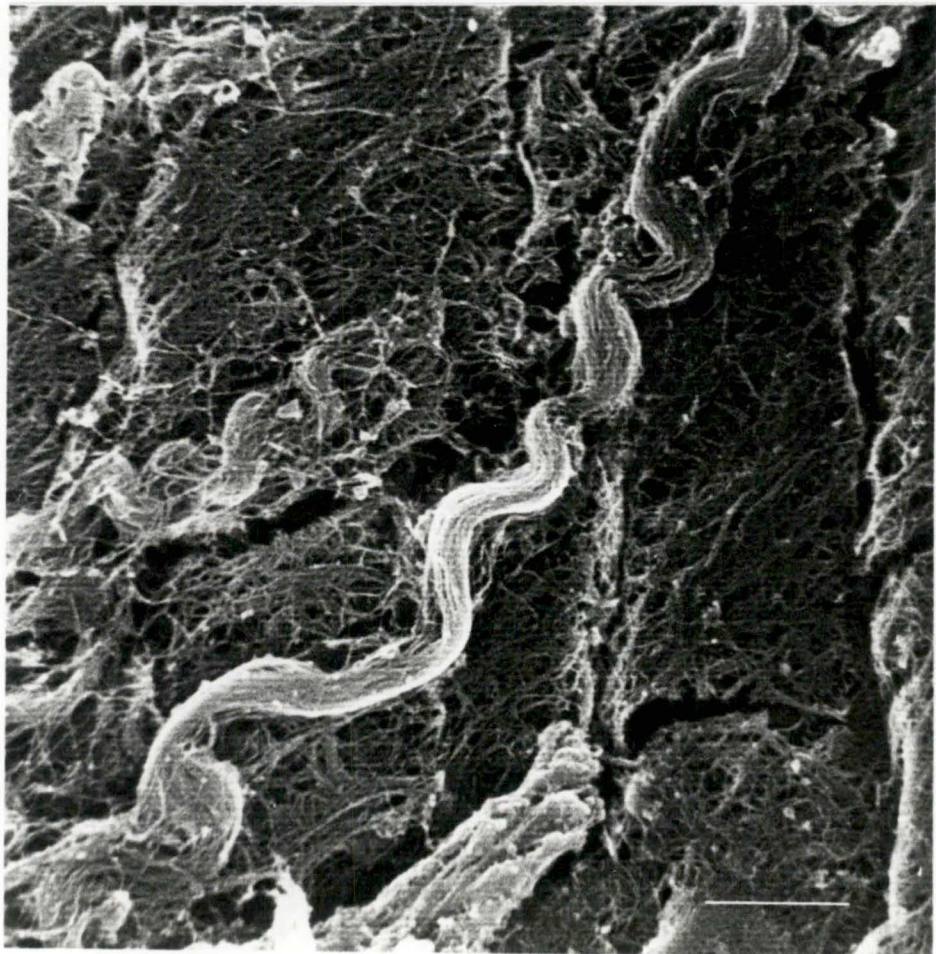


Fig. 3.4.3.b₄.

Culture de cellules *in vivo* sur implant lamellaire.

Vues en microscopie électronique à balayage.

Fig. 3.4.3.c₁ :

Macrophage émettant des pseudopodes.

Il faut remarquer ici la frange cytoplasmique frontale (f) mince et étendue, permettant l'adhérence au support.

(Le trait représente 10 μm).

Fig. 3.4.3.c₂ :

Macrophage immobile.



Fig. 3.4.3.c₁.

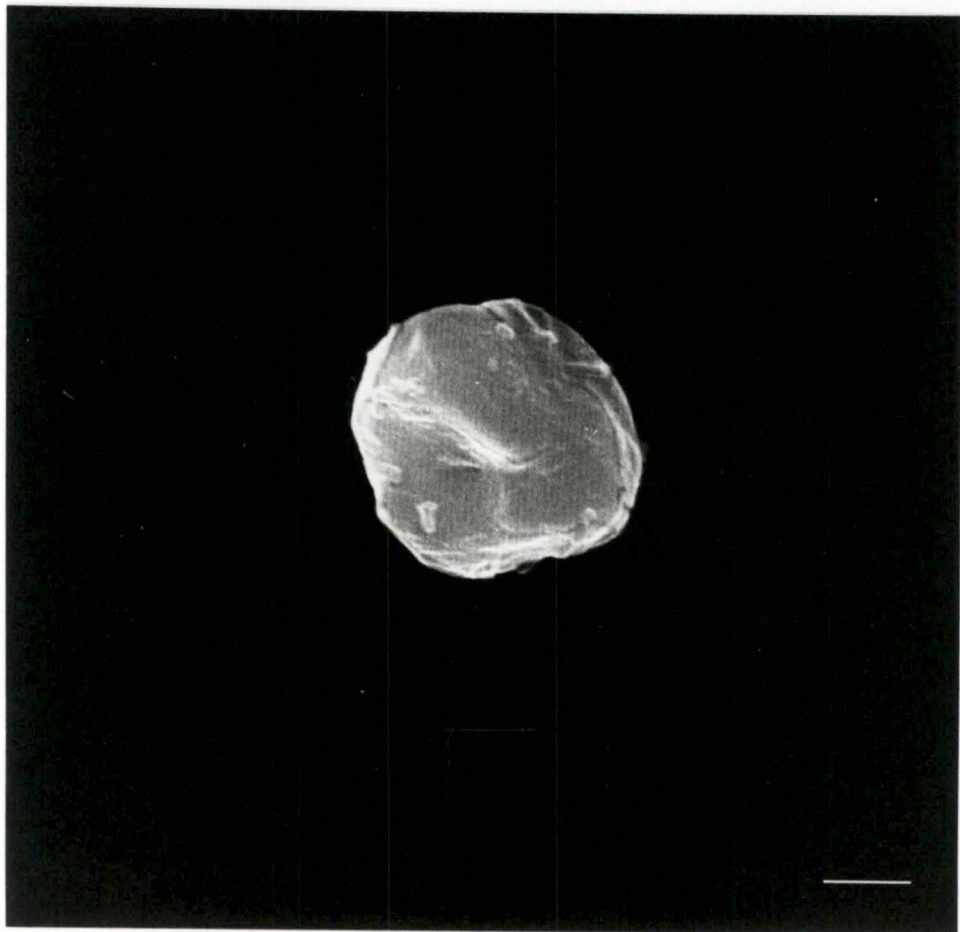


Fig. 3.4.3.c₂.

Un grossissement plus faible (fig. 3.4.3.c₃) permet de mettre en évidence, au vu du nombre de macrophages, l'importance de la réaction immunitaire causée par le dextran.

Notons sur la figure 3.4.3.c₄ la présence d'un macrophage étoilé contigu à un macrophage fixe et à un autre émettant un prolongement cytoplasmique au sommet duquel il existe des boursoufflures et des filaments d'attache au support.

La photographie 3.4.3.c₅ montre plusieurs cellules adhérentes au support.

Culture de cellules *in vivo* sur implant lamellaire.

Micrographies électronique en balayage.

Fig. 3.4.3.c₃ :

Forte densité de macrophages (M) et de fibroblastes (F) due à la consolidation de la réaction inflammatoire causée par le dextran.

(Le trait représente 50 μm).

Fig. 3.4.3.c₄ :

Micrographie montrant trois types de macrophages :

- étoilé (E),
- fixe avec un voile cytoplasmique d'ancrage (F),
- fixe montrant un prolongement cytoplasmique (Pc) d'environ 120 μm).

(Le trait représente 10 μm).

Fig. 3.4.3.c₅ :

Cellules adhérentes à l'implant de verre.

Il s'agit probablement de macrophages.

(Le trait représente 10 μm).

Fig. 3.4.3.c₃.

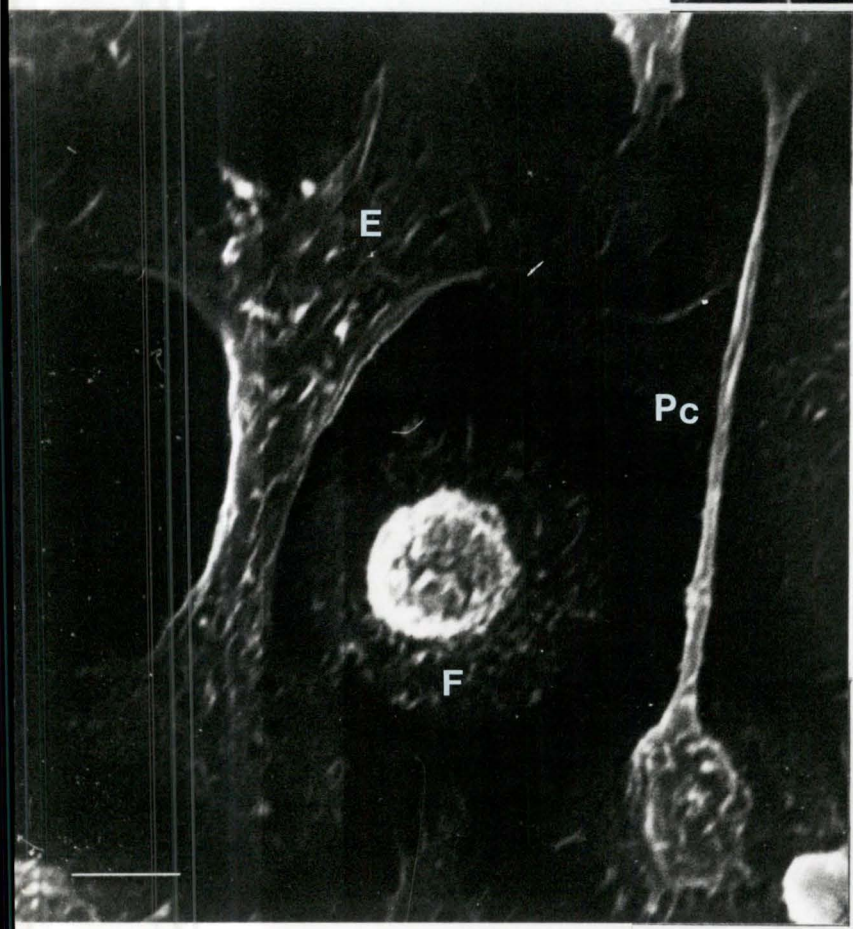
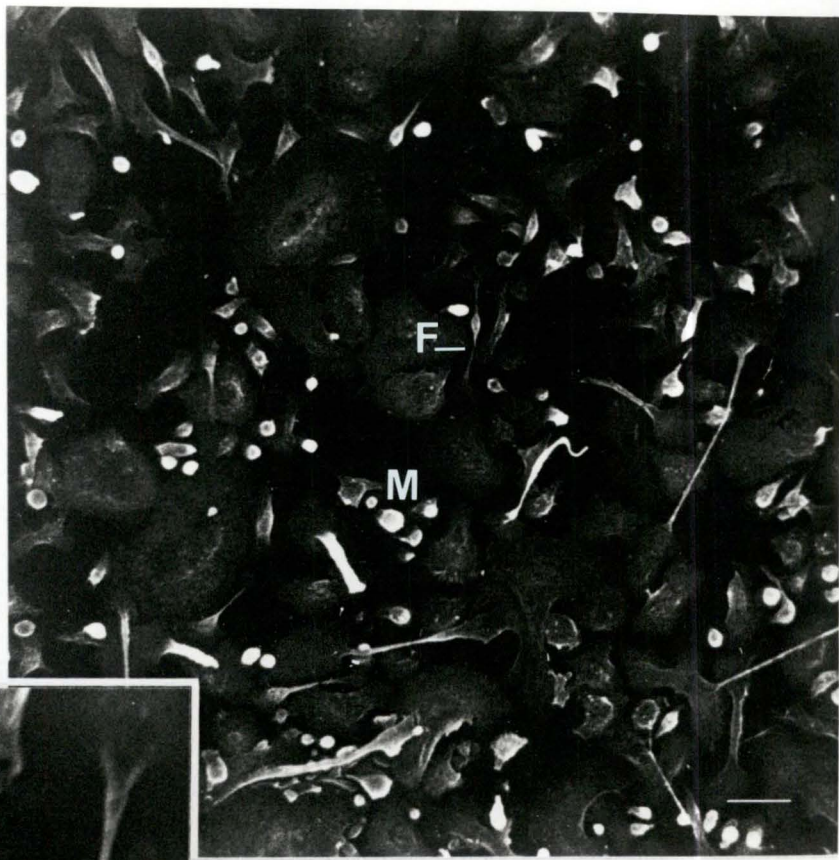


Fig. 3.4.3.c₄.

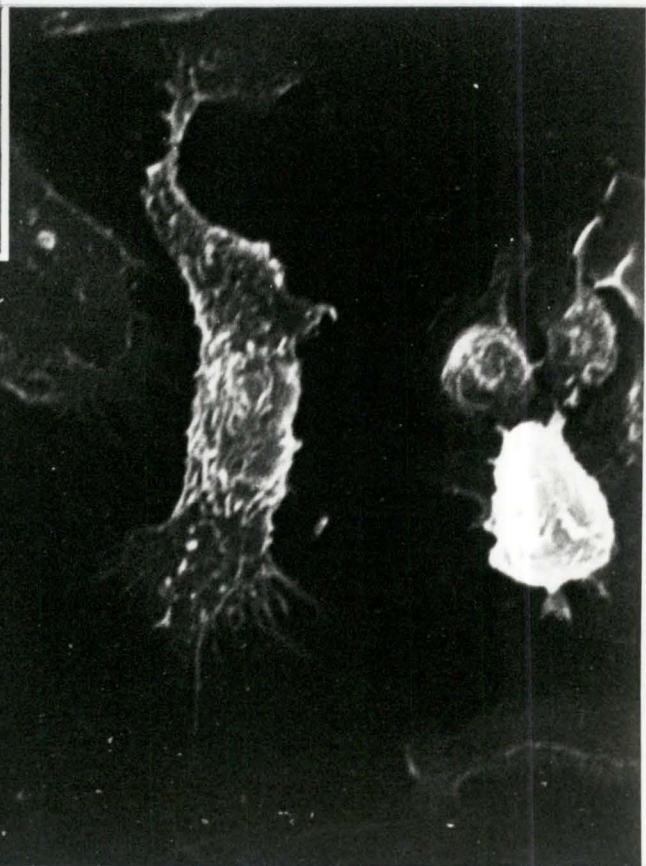


Fig. 3.4.3.c₅.



IV. DISCUSSION.

Au début de ce travail, nous avons dû convenir d'un modèle de stimulation de la réponse immunitaire. Notre choix s'est fixé sur la méthode décrite pour la première fois par J.C.W. EDWARDS et al. (1981). En effet, la formation d'une bulle d'air sous-cutanée dans la région dorsale de souris permet une limitation relative du processus d'inflammation et facilite par conséquent la dissection et les recherches ultérieures.

4.1. Délai optimal d'infestation.

Des travaux précédents ont montré que pour des infections à *Klebsiella pneumoniae* et à *Trypanosoma cruzi*, l'effet protecteur maximal est obtenu pour une induction de la pathologie deux à trois jours après injection de pyrophosphate de calcium dans la cavité pleurale (J.P. GIROUD et al., 1980).

Nos expériences indiquèrent de façon corrélaire (fig. 3.1.) que pour des affections à *T. b. brucei* et pour une réaction inflammatoire chronique non spécifique, l'intervalle de temps qui confère la résistance la plus grande est de trois à quatre jours entre la dernière injection de dextran dans la poche gazeuse et l'infestation parasitaire intrapéritonéale.

Ceci nous conduit à émettre deux hypothèses explicatives :

a) La libération précoce dans le sang des souris de certains facteurs pourrait jouer un rôle dans le phénomène de résistance.

Divers auteurs (J.P. GIROUD et al., 1981; N. KIGER et al., 1979) ont effectivement pu démontrer que différentes fonctions de cellules impliquées dans des réponses immunologiques sont en général fortement stimulées sous l'effet d'un stimulus phlogogène aigu non spécifique. Ceci a, par ailleurs, été reproduit chez des animaux normaux par l'injection de sérum provenant de rats ou de souris développant une réaction inflammatoire aiguë. De plus, il apparaît clairement que ces sérums possèdent des activités semblables à

certaines lymphokines produites par des lymphocytes stimulés par des mitogènes ou sensibilisés lors de réactions d'hypersensibilisation retardée. Néanmoins un certain nombre d'arguments suggèrent qu'il s'agit de facteurs différant des lymphokines par leur cinétique d'action pour l'agent agrégant des macrophages et surtout par leur cinétique de libération puisqu'ils sont détectés dès la première heure après l'induction d'une réaction inflammatoire aiguë non immune. Il a été donné le nom de phlogokines à toute substance apparaissant très précocement après l'application d'un stimulus phlogogène immunologique ou non (J.P. GIROUD et al., 1981).

Il y a dix ans, K. VICKERMAN montrait qu'une des alternatives pour les trypanosomes de contourner les défenses de l'hôte était la variation antigénique. Celle-ci est illustrée par la fluctuation des courbes de parasitémie dont le nombre de vagues successives au cours du temps et leur amplitude est fonction non seulement de la souche de trypanosomes considérée mais aussi de l'état de réactivité dans lequel se trouve l'hôte lors de l'infection. Le rapport "slender forms" / "stumpy forms" joue également. Plus celui-ci est élevé, plus la parasitémie se développera rapidement.

Outre ce phénomène d'évasion des trypanosomes vis-à-vis de la réplique immunitaire, existe aussi l'immunodépression des malades atteints de trypanosomiase. En effet, l'apparente association entre le niveau d'incompétence immunitaire et la virulence du parasite indique que l'immunodépression joue un rôle capital dans la survie du parasite (D.L. SACKS et al., 1980).

b) l'imperméabilisation des couches cellulaires bordant l'enceinte d'inflammation pourrait prendre part aussi au processus de protection. Cette seconde hypothèse est commentée dans la partie 4.5. lors de l'interprétation des résultats de microscopie électronique.

4.2. Modalités d'infestation.

Le délai d'infestation optimal étant établi, il nous parut opportun de tester l'effet de différents modes d'inoculation sur la survie des souris.

4.2.1. Inoculation intrapéritonéale.

Trois lots de souris furent infestés de cette façon :

- a) le groupe témoin (A) subissant uniquement une injection de trypanosomes (tableau 3.2.a.).
- b) groupe (B) préalablement injecté avec 5 ml d'air (tableau 3.2.b.).
- c) souris du troisième groupe (C) ayant reçu dans la bulle d'air trois injections de dextran.

Par comparaison des groupes A et B, il apparaît que la poche gazeuse n'a pas d'effet significatif sur l'évolution de la pathologie.

Considérant à présent les groupes A et C, le temps de survie est doublé.

L'influence du dextran est nette.

4.2.2. Inoculation sous-cutanée.

Le parallèle établi entre les tableaux 3.2.d. et 3.2.e. confirme le fait que la poche d'air n'a pas d'effet protecteur significatif sur la mortalité des souris infestées. Dans les deux cas, toutes décédèrent endéans les 9 jours.

Par contre, lorsqu'une réaction inflammatoire chronique est déclenchée dans la bulle d'air par injection de dextran, il apparaît nettement un phénomène de résistance des souris à l'invasion parasitaire. En effet, les 100% de mortalité ne sont atteints qu'au vingt-cinquième jour d'infestation des souris.

L'évolution progressive du taux de décès au sein de chaque groupe est due à une variabilité individuelle intrinsèque à l'état de réactivité immunitaire dans lequel se trouve les souris au moment de l'inoculation.

Remarque : La différence de mortalité observée par confrontation des groupes injectés par voie intrapéritonéale et sous-cutanée (tableau 3.2.d.) est due à ce que l'invasion des trypanosomes est freinée

par la membrane péritonéale.

L'interprétation des résultats exprimés ci-dessus montre que la durée de survie est maximale pour le groupe "air + dextran + trypanosomes dans la poche sous-cutanée". Le résidu de dextran présent dans la poche d'air lors de l'inoculation des trypanosomes pourrait avoir une action toxique sur ceux-ci. En effet, les expériences de survie des parasites réalisées *in vitro* montrent qu'ils sont rapidement immobilisés en contact avec la solution de PSD 1%. Les trypanosomes, tirant leur énergie de la glycolyse, utilisent le glucose. Cependant, au vu des résultats, ils ne semblent pas capables de tirer parti du dextran dans leurs chaînes énergétiques. Toutefois la mobilité peut être rétablie en ajoutant au milieu quelques gouttes de PSG; le sucre adéquat est à nouveau disponible.

In vivo, lorsque les trypanosomes sont dans la poche d'air en présence de dextran, ils manquent de glucose, ce qui va dans le sens d'une protection accentuée des souris envers la parasitose. Mais le glucose n'est pas totalement absent dans la lumière de la poche d'air; il peut en effet provenir de l'exudat libéré au site d'inflammation. Cependant, le faible volume d'exudat par comparaison au grand nombre de trypanosomes inoculés provoque une rapide diminution des stocks énergétiques. Quelques parasites ont dès lors eu le temps de se libérer de l'enclave dermique et de passer dans la circulation sanguine où ils se multiplient alors intensément mais avec quelque retard par rapport à ceux inoculés par voie intrapéritonéale. La survie des souris est donc prolongée mais non illimitée.

Autre facteur pouvant limiter l'invasion du système circulatoire : l'imperméabilisation des couches de cellules du derme bordant l'enceinte. Ceci sera discuté dans la partie microscopie

Par la suite, nous avons opté pour le modèle d'étude : "air + dextran + trypanosomes dans la cavité péritonéale".

4.3. Sérum inflammatoire (SI).

Divers auteurs (J.P. GIROUD et al., 1981; I. FLORENTIN et al., 1985; M. RENOUX et al., 1986; M. ROCH-ARVEILLER et al., 1979; K. SANTOSH et al., 1981) ont clairement montré qu'une réaction inflammatoire aiguë non immunologique est capable de moduler certaines fonctions des cellules impliquées dans des réactions immunitaires. Cette

modification de la réactivité de l'hôte développant une inflammation aiguë s'accompagne d'un accroissement marqué de la résistance à des infections bactériennes, parasitaires ou fongiques.

De surcroît, cette protection peut être transférée à des souris normales par injection unique de sérum inflammatoire (SI).

Au cours de ce travail, nous avons montré dans un premier temps qu'une réaction inflammatoire chronique est également susceptible d'induire des phénomènes de résistance envers une pathologie (Exp.3.2.).

Dans une seconde démarche, nous avons cherché à savoir dans quelle mesure cette protection est transférable à d'autres souris. Nous avons pu mettre en évidence que l'injection de sérum inflammatoire en discontinu et de façon unique ou multiple, c'est-à-dire échelonnée sur plusieurs jours, n'apportait aucune augmentation de la résistance des souris vis-à-vis de la parasitose à *T. b. brucei*. En outre, l'injection simple de SI se montre fortement délétère envers les souris. Elles décèdent toutes au jour 1 de l'infestation parasitaire.

Malgré leur consanguinité, les souris développent une réaction immunitaire contre les antigènes exogènes présents dans le SI. Lorsque le taux d'antigènes est peu élevé, une maladie sérique aiguë peut survenir, caractérisée par un certain nombre de symptômes qui apparaissent 6 à 10 jours après administration de l'Ag et qui régressent spontanément :

- de la fièvre
- des éruptions cutanées
- des douleurs articulaires
- des troubles neurologiques
- des problèmes cardio-vasculaires
- des glomérulonéphrites.

La guérison survient en général vers la fin de la deuxième semaine après l'injection déclenchante.

La plupart de ces symptômes peuvent être dus à l'apparition d'immuns complexes (IC) constitués de la combinaison d'une ou de plusieurs molécule(s) d'antigène avec une ou plusieurs molécule(s) de leur anticorps spécifique.

La formation d'IC dans l'organisme est un phénomène physiologique normal dans la mesure où il contribue à la neutralisation et à la destruction des antigènes soit par

élimination rénale soit par voie phagocytaire.

Dans certaines circonstances cependant, les IC peuvent avoir des conséquences néfastes pour l'organisme, leur pathogénicité dépendant notamment du nombre d'antigènes présents et de leur taille.

Ainsi, du fait de l'importante quantité de sérum introduite dans la cavité péritonéale des souris (2 ml de SI), les anticorps synthétisés se combinent aussitôt avec les antigènes formant ainsi des IC de petite taille (excès d'Ag). Ces IC diffusent alors et se localisent au niveau des tissus où ils induisent des phénomènes inflammatoires. Des troubles cliniques apparaissent et perdurent tant que se poursuit la destruction des IC.

Les troubles rénaux sont bien souvent plus longs à disparaître car les IC déposés le long de la membrane basale des glomérules sont moins accessibles à la phagocytose que ceux présents au niveau de la peau et des articulations. Toutefois, dans notre expérience, le taux d'Ag injecté dépasse largement la capacité d'adaptation de l'organisme. La néphropathie qui en résulte est soudaine et irréversible. Les souris meurent rapidement.

On peut éviter cet effet en introduisant le SI de façon séquentielle, multiple, par doses plus faibles (0,5 ml/jour) bien qu'aucun processus de résistance ne soit inductible par cette méthode; les souris trépassent dans les mêmes délais que les témoins.

Cependant, lorsque le SI est perfusé en continu dans la cavité péritonéale et dans des conditions que nous avons qualifiées arbitrairement de normales, la résistance des souris par rapport aux témoins est exacerbée. Les souris placées sous perfusion survivent en moyenne trois fois plus longtemps que les témoins et que celles subissant des injections séquentielles de SI.

Ces résultats nous permettent d'affirmer que :

- certains facteurs libérés au site de la réaction inflammatoire chronique sont capables d'induire une intensification de la résistance des souris envers une trypanosomiase à *T. b. brucei*.
- ces facteurs (phlogokines) présentent un optimum dans leur effet lorsque l'inflammation est déclenchée trois à quatre jours avant l'infestation parasitaire.
- les phlogokines existent dans le SI et la protection qu'elles confèrent vis-à-vis des parasitoses peut être transférée sous certaines

conditions à des souris trypanosomées non enflammées.

- les conditions idéales de transfert des propriétés de résistance se trouvent réunies lorsque la perfusion est continue et que le SI n'a subi aucune contrainte expérimentale trop drastique (congélation, vitesse de centrifugation) susceptible d'inhiber l'action des phlogokines.

Plusieurs travaux, notamment ceux entrepris par le Professeur J.P. GIROUD (1981) ont permis de montrer que l'activité des macrophages, PMN et lymphocytes est fortement affectée lorsque l'organisme développe une réaction inflammatoire aiguë non spécifique. La plupart de ces effets sont dus à la libération dans le sérum d'animaux enflammés de facteurs présentant de fortes similitudes avec des lymphokines libérées lors de réactions immunitaires. Toutefois, ces deux types de substances diffèrent tant par leur cinétique d'action que par leur poids moléculaire.

Corrélativement, nous avons montré qu'une réaction inflammatoire chronique est également capable d'induire une résistance, laquelle est liée à des facteurs sériques transférables de type phlogokine.

Ces substances semblent être très sensibles à des traitements dénaturants tels que le froid ou la vitesse de centrifugation. De plus, à l'état libre, c'est-à-dire *in vitro*, ces phlogokines sont dénuées de tout effet sur les trypanosomes (Exp.3.3.2.). Cependant, *in vivo*, par perfusion continue de SI, les facteurs de résistance recouvrent leur efficacité.

Ceci nous conduit donc à postuler que :

- les phlogokines ne sont pas directement cytotoxiques pour les trypanosomes mais qu'elles agissent par voie détournée en modulant la réponse immunitaire dans le sens d'une plus grande agressivité.
- ces substances de protection sont très instables dans l'organisme et, pour faire preuve de leur efficacité à long terme, elles doivent continuellement être renouvelées au sein de celui-ci comme l'indiquent les expériences de perfusion en continu.

Notons aussi que les facteurs de résistance issus de la réaction chronique sont spécifiques au sens propre du terme. En effet, ces molécules montrent une innocuité marquée

lorsqu'elles sont transférées à une autre espèce (Exp.3.3.1.1.b, 3.3.1.2.b). Cette absence d'effet nous amène à émettre deux hypothèses qui n'ont pu être vérifiées dans le cadre de ce mémoire :

- le transfert sérique interspécifique est ressenti par l'organisme receveur comme une agression; les phlogokines du sérum sont dès lors reconnues comme des protéines étrangères et sont rapidement inactivées, métabolisées.
- L'inefficience des facteurs de résistance chez une autre espèce provient d'une spécificité d'ordre moléculaire vis-à-vis, par exemple, de certains récepteurs avec lesquels ils pourraient interagir.

4.4. Exudat inflammatoire (EI).

La réponse immunitaire qui fait suite à l'agression antigénique du dextran conduit à l'apparition, dans la poche gazeuse, d'un exudat inflammatoire provoquant par son accumulation un oedème tissulaire.

Nous savons que les trypanosomes tirent leur énergie vitale des réactions de glycolyse. En l'absence de sucre métabolisable, leur temps de survie est donc limité. Or, en contact avec la solution de NaCl contenant le EI, les parasites vivent deux à trois fois plus longtemps que ceux présents dans la solution témoin. Il faut en déduire que le EI contient une source énergétique adéquate quant à la survie de ces protozoaires.

Cette vue des choses nous permet de mieux comprendre les conditions qui doivent exister dans la poche inflammatoire.

- Il apparaît dans un premier temps un début d'inflammation qui fait suite à l'injection sous-cutanée de 5 ml d'air non stérile.
- Cet état inflammatoire est ensuite renforcé grâce à l'action du dextran dans la lumière de cette formation gazeuse.

A ce moment, les parois de la poche montrent une forte concentration de cellules immunitaires, contiguës à un EI présent dans la lumière de l'enceinte et dans le tissu

dermique.

En outre, comme l'a indiqué A.D. SEDGWICK (1984) et comme nous le confirme la fibrinisation importante des parois observée en microscopie électronique (fig. 3.4.3.b₃₋₄), un processus d'imperméabilisation de la poche apparaît, tendant à isoler le site inflammatoire du reste de l'organisme.

Les trypanosomes qui sont inoculés dans un tel milieu peuvent y trouver le sucre nécessaire à leur survie et donc résister plus longtemps à la réponse de défense organique, mais ils ne peuvent s'évader qu'avec difficulté de cette sorte de "prison dermique" de plus en plus imperméable au cours du temps. Ceci explique le fait que les souris soient plus résistantes à une infestation parasitaire induite dans la poche d'inflammation que lorsque l'inoculation est sous-cutanée chez des souris non enflammées.

4.5. Microscopie.

La microscopie optique, à transmission et à balayage a permis de mettre en évidence l'imperméabilisation de l'enceinte sous-cutanée ainsi que le déclenchement du processus inflammatoire.

4.5.1. Optique.

Par comparaison à des coupes témoins (figure 3.5.1. a.) les semi-fines de derme de souris enflammées depuis trois jours (figure 3.5.1. b.) montrent des concrétions de dextran à l'intérieur de cellules fortement vacuolaires ressemblant à des macrophages. Ceci confirme la présence d'un terrain d'inflammation sous-cutané.

En outre, le dextran apparaît pénétrer le derme de façon profonde, ce qui plaide en faveur d'une perméation importante de la poche au troisième jour. Cette vue des choses avait déjà antérieurement été rapportée par A.D. SEDGWICK qui marqua au carbone les poches d'air d'âges différents après injection de Carageenan.

4.5.2. Transmission.

Cette technique nous apporta confirmation de la présence intradermique de macrophages comprenant des particules de dextran à l'intérieur des vacuoles chez les souris enflammées (fig. 3.4.2.a).

4.5.3. Balayage.

a) Coupes.

Grâce à cette approche, nous avons pu analyser deux régions importantes du derme :

- la face interne montre chez les souris sous réaction inflammatoire un taux élevé en macrophages (fig. 3.4.3.b₁, b₂) par rapport au témoin (3.4.3.a).
- les régions moyenne et externe présentent une forte densité de fibres (fig.3.4.3.b₃, b₄).

Cette augmentation du taux de macrophages et de fibres chez des souris sous inflammation indique que la réaction inflammatoire chronique non spécifique est bien engagée au troisième jour et que le processus d'imperméabilisation se met progressivement en place.

b) Lamelles.

Sur lamelle de verre implantée au sein de la poche d'inflammation, on a pu observer que de très nombreuses cellules de types différents viennent adhérer au support. Ces lamelles examinées après fixation en microscopie électronique à balayage montrent la présence de macrophages, de fibroblastes, de cellules immunocompétentes (fig. 3.4.3.

c₁₋₂₋₃₋₄₋₅).

V. CONCLUSION.

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'impact d'une réaction inflammatoire chronique non spécifique (RIC) sur le cours d'une parasitose à *T. b. brucei*.

Nous avons effectué cette démarche au travers d'un nouveau modèle d'induction et d'entretien de l'inflammation : la poche gazeuse sous-cutanée.

Nous avons constaté que :

- la poche d'inflammation n'est pas une structure statique. Au cours du temps, en effet, il apparaît que les conditions qui y règnent se modifient et peuvent interférer avec la trypanosomiase.
 - Apparition d'un EI
 - présence de cellules de l'immunité
 - fibrinisation des parois.

- la RIC, provoquée dans l'enceinte sous-dermique, est capable d'induire des phénomènes de résistance envers la pathologie à trypanosomes surtout lorsque l'infestation a lieu trois à quatre jours après la dernière injection de l'agent irritant.

D'autre part, nous avons montré que cette protection est transposable à d'autres souris par transfert sérique sous certaines conditions. Le sérum inflammatoire chronique contient des substances de résistance qui diffèrent des phlogokines issues de réactions inflammatoires aiguës (RIA) essentiellement par leur cinétique d'action.

Ce travail pourrait trouver des prolongements intéressants *via* des études immunologiques complémentaires abordant particulièrement le rôle que pourraient tenir les interleukines dans le cadre des RIC et ce en corrélation avec des travaux actuels concernant les RIA et les résistances vis-à-vis des pathologies.

Bibliographie .

- **BIRD J., YAO JIN SHENG, GIROUD J.P., 1984.**
Effects of supernatants and lysates of polymorphonuclear leukocytes :
macrophage stimulatory factors.
Br. J. Exp. Path., 65.

- **BRUCE D., 1902.**
Note on the discovery of a new *trypanosoma* .
Lancet, 1, 664; Proc. roy. Soc., 69, 496.

- **CAMPBELL G.H., ESSER K.M., PHILLIPS S.M., 1978.**
Trypanosoma rhodesiense infection in congenitally athymic (nude) mice.
Infect. Immun., 28, 714.

- **CLAYTON C.E., SELKIRK M.E., CORSINI C.A., OGILVIE B.M., ASKONAS
B.A., 1980.**
Murine trypanosomiasis : cellular proliferation and functional depletion in
the blood, peritoneum and spleen related to changes in bone marrow stem
cells.
Infect. Immun., 28, 824.

- **CORSINI A.C., CLAYTON C., ASKONAS B.A., OGILVIE B.M., 1977.**
Suppressor cells and loss of B cell potential in mice infected with
Trypanosoma brucei.
Clin. Exp. Immunol., 29, 122.

- **CROSS G.A., 1984.**
Structure of variant glycoprotein and surface coat of *T. brucei*.
Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), 307 ,3.

- **DELCROIX M., 1987.**
 Etude de l'évolution de l'effet immunodépresseur d'une infection par *Trypanosoma brucei brucei* chez la souris.
 Influence d'une réaction inflammatoire aiguë.
 Mém. Lic. Sci. Zool., FNDP Namur, 33-75.

- **EDWARDS J.C.W., SEDGWICK A.D., WILLOUGHBY T.A., 1981.**
 J. Pathol., 134, 147-156.

- **FLORENTIN I., BIRD J., LE GAREC Y., CHUNG V., GIROUD J.P., 1985.**
 Modification of host defence mechanisms by an acute non immunological inflammatory reaction.
 Br. J. Exp. Path., 66, 257-270.

- **GIROUD J.P., FONTAGNE, ADOLPHE, BLODELON, DRUM, WILLOUGHBY D.A., LEHAT, 1977.**
 Stimulation of macrophage DNA synthesis in culture by different types of acute non immunological inflammatory exudates.
 Biomedicine, 27, 19-22.

- **GIROUD J.P., BOREL J.P., CAM Y., CHEDID L., FLORENTIN I., JADIN J.M., NOLIBE B., PARANT M., PELLETIER M., ROCH-ARVEILLER M., TISSOT M., 1981.**
 Acute inflammation and modulation of cell functions. Isolation and role of serum factors (phlogokines).
In Pharmacology of Inflammation and Allergy, eds. Russo-Maria B., Vergaftig B., Beveniste J., INSERM, 100, 223-250.

- **GIROUD J.P., YAO JIN SHENG, PELLETIER M., FLORENTIN I., BIRD J., 1983.**
 Acute non specific inflammation and modifications of macrophages and lymphocytes functions.
 Brit. J. Dermatol., 109, (Suppl. 25), 41.

- **GROSSKINSKI C.M., ASCONAS D.A., 1981.**
Macrophages as primery target cells and mediators of immune dysfunction in african trypanosomiasis.
Infect. Immun., 33, 149.

- **HUDSON K.M., TERRY R.J., 1979.**
Immunodepression and the course of infection of a chronic *Trypanosoma brucei* infection in mice.
Parasite immunol., 1, 317.

- **JADIN J.M., 1978.**
Trypanosomes et leishmanies africains.
Cercle hydrobiologique de Bruxelles.

- **JAYAWARDENA A.N., BYRON H., WAKSMAN B.H., EARDLEY D.D., 1978.**
Activation of distinct helper and suppressor T cells in experimental trypanosomiasis.
J. Immunol., 121, 622.

- **KIGER N., PELLETIER M., GIROUD J.P., 1979.**
Effect on a non specific acute inflammatory stimulus on antibody-dependent cellular cytotoxicity : role of serum factor.
Int. J. Immunopharmacol., 1, 127.

- **LANHAM S.M., 1968.**
Separation of trypanosomes from the blood of infected rats and mice by anion-exchangers.
Nature, 218, 1273-1274.

- **LARSON E.L., ISCOVE N.N., COUTINHO A., 1980.**
Two distinct factors are required for instruction of T cell growth.
Nature, 283, 664.

- **LEIBSON H.J., MARRACK P., KAPPLEER J., 1982.**
B cell helper factors. II. Synergy among three helper factors in the response of T cells and macrophages.
J. Immunol., 129, 1398.

- **MALE D., CHAMPION B., COOKE A., 1988.**
Immunologie : le système immunitaire et ses régulations.
Ed. Medsi/McCRAW-HILL, 9.10.

- **MANSFIELD J.M., 1982.**
Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis.
In "Parasitic Diseases, The immunology", 1, Mansfield J.M., Ed., Marcel Dekker, New-York, 167.

- **MAYOR-WITHEY K.S., CLAYTON C.E., ROELANTS G.E., ASKONAS B.A. 1978.**
Trypanosomiasis leads to extensive proliferation of B, T and null cells in spleen and bone.
Clin. Exp. Immunol., 34, 359.

- **MILLER E.N., ALLAN L.N., TURNER M.J., 1984.**
Mapping of antigenic determinants within peptides of variant surface glycoprotein of *T.brucei*.
Mol. Biochem. Parasitol., 13, 309.

- **MILLONIG G., 1961.**
A modified procedure for lead staining of thin sections.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 736-739.

- **MURRAY P.K., JENNINGS F.W., MURRAY M., URQUHART G.M., 1974.**
The nature of immunosuppression in *Trypanosoma brucei* infections in mice.
1. The role of macrophage.
Immunology, 27 , 815.

- **MURRAY P.K., JENNINGS F.W., MURRAY M., URQUHART G.M., 1974.**
The nature of immunosuppression in *Trypanosoma brucei* infections in mice.
II. The role of the T and B lymphocytes.
Immunology, 27, 825.

- **MURRAY P.K., MURRAY M., MORRISON W.I., WALLACE M., McINTYRE W.I.M., 1977.**
Trypanosomiasis in N'dama and Zebu cattle.
In "Proc. Int. Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control",
15th Meeting, 470.

- **PARKER D.C., 1982.**
Separable helper factors support B cell proliferation and maturation to Ig
secretion.
J. Immunol., 129, 469.

- **PELLETIER M., FLORENTIN I., NOLIBE D., ROCH-ARVEILLER M.,
JADIN J.M., GIROUD J.P., 1982.**
Relationships between acyte non specific inflammation and specific and non
specific defence mecanisms of the host.
(Ed) Allen R.C., Bienvenu J., Laurent P.H., Suskind M.R.
Markers proteins in inflammation, W. de Gruyter & Co, New-York.

- **RENOUX M., GIROUD J.P., FLORENTIN I., GUILLOMIN J.M., DEGENNE
D., RENOUX G., 1986.**
Early changes in immune parametres induced by an acute antigenic
inflammation in mouse : influence of imuthiol.
Int. J. Immunopharma., 8 (1), 107.

- **REYNOLDS E.S., 1973.**
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in elecron
microscopy.
J. Cell. Biol., 17, 208-212.

- **ROCH-ARVEILLER M., BRADSHAW, GIROUD J.P., 1979.**
Relationships between inhibition of rat PMN chemotaxis and variant inflammatory reaction.
Agent and Actions, 9 (3), 27.

- **SACKS D.L., ASKONAS B.A., 1980.**
Trypanosome induced suppression of anti-parasite responses during experimental african trypanosomiasis.
Eur. J. Immunol., 10, 971.

- **SANTOSH K.K., ROELANTS G.E., MAYOR WITHEY K.S., PEARSON T.W. 1981.**
Immunodepression in trypanosome infected mice.
VI. Comparison of immune response of different lymphoid organs.
Eur. J. Immunol., 11, 100.

- **SEDGWICK A.D., SIN Y.M., EDWARDS J.C.W., WILLOUGHBY D.A., 1983.**
Increased inflammatory reactivity in newly formed lining tissue.
J. Path., 141, 483-495.

- **SEDGWICK A.D., MOORE A.R., SIN Y.M., AL-DUAIJ A.Y., LANDON B. WILLOUGHBY D.A., 1984.**
The effect of therapeutic agents on cartilage degradation *in vivo*.
J. Pharm. Pharmacol., 36, 709-710.

- **SILEGHEM M., HAMERS R., DE BAETSELIER P., 1986.**
Active suppression of interleukin 2 secretion in mice infected with *Trypanosoma brucei* Antat 1.1.E.
Parasite immunology, 8, 641.

- **VICKERMAN K., 1978.**
Antigenic variation in trypanosomes.
Nature (London), 273, 613.

- YOA JIN SHENG, FLORENTIN I., BIRD J., ESNOUS D., POMPIDOU A.,
GIROUD J.P., 1982.

The enhancement of interleukin 2 like production after *in vivo* stimulation of rat lymphoid cells by an acute non specific inflammatory process.

Biomedicine, 36, 436.