

GUERISON DE LA TRYPANOSOMIASE EXPERIMENTALE AIGUE ET CHRONIQUE

PAR L'ACTION COMBINEE

DE CHAMPS MAGNETIQUES ET D'ONDES ELECTROMAGNETIQUES MODULES

A. PRIORE

# S O M M A I R E

-----

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES .....	5
1 - ETUDE DU RAYONNEMENT EMIS .....	5
- Le Plasma	
- L'onde UHF	
- L'onde HF	
- Le champ magnétique	
2 - LES PARASITES .....	8
2.1. - Trypanosomes .....	8
2.1.1. - <i>Trypanosoma equiperdum</i>	
a - L'agent pathogène	
b - Variation antigénique	
2.1.2. - <i>Trypanosoma gambiense</i>	
2.2. - Hématozoaires .....	11
3 - LES ANIMAUX HOTES .....	13
4 - LES MODELES PARASITAIRES .....	14
4.1. - Trypanosomiase aigüe à <i>T. equiperdum</i> .....	14
4.1.1. - Caractère de la maladie	
4.1.2. - Variation antigénique	
4.2. - Trypanosomiasés chroniques .....	16
4.2.1. - Trypanosomiase expérimentale du Lapin à <i>T. equiperdum</i>	
a - Evolution de la maladie	
b - Etude histologique des lésions testiculaires	
c - Variation antigénique	
4.2.2. - Trypanosomiase expérimentale de la Souris à <i>T. gambiense</i>	
4.3. - Paludisme de la Souris à <i>P. berghei</i> .....	20
5 - METHODES D'ETUDE DES ANIMAUX-HOTES INFESTES EXPERIMENTALEMENT (IRRADIES ET NON IRRADIES) .....	21
5.1. - Observation clinique .....	21
5.2. - Parasitémie - Négativation .....	21
5.2.1. - Trypanosomiase aigüe de la Souris et du Rat à <i>T. equiperdum</i>	
5.2.2. - Trypanosomiase chronique du Lapin à <i>T. equiperdum</i>	

5.2.3. - Trypanosomiase chronique de la Souris à <i>T. gambiense</i>	
5.2.4. - Paludisme de la Souris à <i>P. berghei</i>	
5.3. - Etude de l'état immunitaire .....	23
5.3.1. - Taux sériques des immunoglobulines G et M (IgG et IgM)	
a - Techniques de dosage des immunoglobulines G et M	
b - Evolution des immunoglobulines G et M au cours de la trypanosomiase aigüe de la Souris et du Rat à <i>T. equiperdum</i>	
c - Evolution des immunoglobulines G et M au cours de la trypanosomiase chronique du Lapin à <i>T. equiperdum</i>	
d - Evolution des immunoglobulines G et M au cours de la trypanosomiase chronique de la Souris à <i>T. gambiense</i>	
5.3.2. - Etat de protection immunitaire	
5.3.3. - Etude de certains anticorps humoraux	
a - Structures antigéniques (en général) de <i>T. equiperdum</i>	
b - Anticorps agglutinants	
c - Anticorps hémagglutinants	
d - Anticorps précipitants	
e - Anticorps séro-protecteurs	
f - Evolution des anticorps humoraux au cours de la trypanosomiase aigüe de la Souris et du Rat à <i>T. equiperdum</i>	
g - Evolution des anticorps humoraux au cours de la trypanosomiase chronique du Lapin à <i>T. equiperdum</i>	
5.4. - Critère de guérison parasitologique .....	32
5.4.1. - Trypanosomiasés expérimentales dues à <i>T. equiperdum</i>	
5.4.2. - Trypanosomiase chronique de la Souris à <i>T. gambiense</i>	
 CHAPITRE II : RESULTATS .....	 33
1 - LES PREMIERES EXPERIENCES D'IRRADIATION .....	34
1.1. - Expériences d'irradiation avec l'appareil N°1 .....	34
- Longueur d'onde HF 19 m : expériences A	
- Longueur d'onde HF 17 m : expériences B	
1.2. - Expériences d'irradiation avec l'appareil N°2 .....	36
: expériences C	
2 - TRYPANOSOMIASE AIGUE A <i>T. EQUIPERDUM</i> : MISE AU POINT DES CONDITIONS EXPERIMENTALES LIEES AU MODELE PARASITAIRE .....	40
2.1. - Durée de l'irradiation quotidienne : expériences D .....	40
2.2. - Importance de l'inoculum : expériences E .....	40
2.3. - Importance du moment du début du traitement : expériences F	41
2.4. - Influence de la splénectomie préalable : expériences G ..	42

2.5. - Comportement de la souche dyskinétoplastique (Bethesda) de <i>T. equiperdum</i> : expériences H .....	42
2.6. - Influence de la durée totale du traitement (nombre de séances d'irradiation) : expériences I .....	43
2.7. - Résultats obtenus chez le Rat : expériences J.....	44
2.8. - Température corporelle des souris traitées par le rayonnement .....	44
3 - <del>TRYPANOSOMIASE AIGUE A-T: EQUIPERDUM</del> : MISE AU POINT DES CONDITIONS EXPERIMENTALES LIEES AU RAYONNEMENT .....	46
3.1. - Influence de la distance par rapport à la face de sortie du tube à plasma : expériences K .....	46
3.2. - Influence de la distance par rapport à l'axe du tube à plasma : expériences L et M.....	47
3.3. - Synergie des constituants essentiels du rayonnement : expériences N, O, P et Q .....	51
3.4. - Influence de la nature du magnétron : expériences R ..	52
3.5. - Action des constituants accessoires du rayonnement : expériences S .....	52
4 - SOURIS ET RATS INFESTES AVEC <i>T. EQUIPERDUM</i> : ETUDE DE L'ETAT IMMUNITAIRE OBTENU A L'AIDE DU TRAITEMENT PAR IRRADIATION .....	54
4.1. - Taux sériques de l'IgG et de l'IgM .....	54
4.2. - Evolution des anticorps humoraux .....	54
4.3. - Etude de l'état de protection immunitaire - Réinfestations .....	55
4.3.1. - Souris ayant présenté des rechutes fatales	
4.3.2. - Souris ayant évolué vers la guérison mais après une rechute parasitémique modérée et temporaire	
4.3.3. - Souris ayant évolué directement vers la guérison : expériences T et U	
4.3.4. - Etat de protection immunitaire chez les Rats infestés par <i>T. equiperdum</i> et traités par le rayonnement : expériences V. Phénomène de facilitation thérapeutique : expérience W	
5 - TRYPANOSOMIASE CHRONIQUE DU LAPIN A <i>T. EQUIPERDUM</i> : ACTION DU RAYONNEMENT .....	61
5.1. - Action du traitement instauré par irradiation 2h après l'infestation : expérience X .....	61
5.2. - Action du traitement par irradiation instauré après un certain temps d'évolution de la maladie .....	63
5.2.1. - Evolution de la maladie pendant 2 semaines : expérience Y	
5.2.2. - Evolution de la maladie pendant 3 semaines : expérience Z	
5.2.3. - Evolution de la maladie pendant 4 semaines : expérience AA	

	<u>Pages</u>
5.3. - Etude histologique des lésions testiculaires et de leur évolution chez les lapins traités par irradiation .....	65
5.3.1. - Traitement instauré 2h après l'infestation	
5.3.2. - Traitement instauré après 2 semaines d'évolution de la maladie	
5.4. - Température corporelle des lapins au cours du traitement .....	67
5.5. - Lapins trypanosomés guéris par le rayonnement : effet d'une réinfestation non accompagnée d'irradiation (expérience AB) .....	68
5.6. - Lapins trypanosomés guéris par le rayonnement : effet de réinfestations accompagnées d'irradiations (expérience AC) .....	68
5.7. - Analyse du pouvoir séro-protecteur : confirmation de sa nature immunoglobulinique (expérience AD) .....	71
6 - <u>TRYPANOSOMIASE CHRONIQUE DE LA SOURIS A T. GAMBIENSE</u> : ACTION DU RAYONNEMENT (expériences AE et AF) .....	74
7 - <u>PALUDISME DE LA SOURIS A P. BERGHEI</u> : ACTION DU RAYONNEMENT (expérience AG) .....	77
 CHAPITRE III : DISCUSSION - CONCLUSION .....	 78
1 - <u>CONSIDERATIONS GENERALES</u> .....	78
1.1. - Contrôle des trypanosomes inoculés - Animaux témoins..	79
1.2. - Commission de Contrôle .....	79
1.3. - Existence éventuelle d'un effet thermique .....	80
1.4. - L'effet du rayonnement n'est pas toujours un effet total .....	80
1.4.1. - Valeur de la longueur d'onde HF	
1.4.2. - Influence de la puissance de l'onde UHF	
1.4.3. - La notion de "limite supérieure de l'action biologique du rayonnement"	
1.4.4. - Souris infestées avec <i>T. equiperdum</i> et mises en traitement après 48h d'évolution de la trypanosomiase aiguë	
1.4.5. - Durée du traitement par irradiation	
1.4.6. - Effet du traitement par irradiation sur la trypanosomiase chronique de la Souris à <i>T. gambiense</i>	
1.4.7. - Effet du rayonnement dans d'autres modèles parasitaires	
2 - <u>MECANISME D'ACTION</u> .....	84
2.1. - Action exclusive sur le trypanosome .....	84
2.1.1. - Propagation des constituants du rayonnement à travers l'organisme	
2.1.2. - La notion de "limite supérieure de l'action biologique du rayonnement"	

2.1.3. - Le phénomène de facilitation thérapeutique	
2.1.4. - Irradiation de trypanosomes maintenus en survie "in vitro"	
2.2 - Stimulation des moyens de défense .....	86
2.2.1. - Evolution de la parasitémie chez les souris infestées avec <i>T. equiperdum</i> et traitées par irradiation	
2.2.2. - Décroissance de la parasitémie jusqu'à la négativa- tion entre 2 séances d'irradiation	
2.2.3. - Influence de la puissance de l'onde UHF	
2.2.4. - Action du traitement par irradiation sur la trypano- somiase de la souris à <i>T. gambiense</i>	
2.2.5. - Propagation des éléments constitutifs du rayonnement dans l'organisme	
2.2.6. - Phénomène de facilitation thérapeutique	
a - Facilitation thérapeutique chez le Rat	
b - Facilitation thérapeutique chez le Lapin	
2.2.7. - Souris infestées avec <i>T. equiperdum</i> et traitées après 48 h d'évolution de la maladie	
2.2.8. - Effet du rayonnement dans d'autres modèles parasi- taires	
2.3. - Combinaison des deux mécanismes précédents .....	91
3 - CONCLUSION .....	92
RESUME .....	94
BIBLIOGRAPHIE .....	101

## INTRODUCTION

---

Au cours des dernières années, un nombre toujours croissant de chercheurs, appartenant aux disciplines les plus variées, s'est intéressé aux effets produits sur certaines manifestations de la vie par des champs magnétiques ou par des ondes électromagnétiques. Ce sujet n'est pas neuf. En effet, l'étude de l'action de champs magnétiques sur la matière vivante remonte à de très nombreuses années. Le premier travail que nous citerons est la publication de D'ARSONVAL en 1882 sur "*Action d'un champ magnétique puissant sur les fermentations*" (15). A cette époque, D'ASTRE (16) étudie lui aussi ce phénomène et publie un travail sur "*Influence physiologique de l'état magnétique*".

D'autres chercheurs poursuivent leurs travaux expérimentaux dans les mêmes voies, mais c'est depuis la seconde guerre mondiale que de telles études prennent de plus en plus d'ampleur (3, 5) .

Ainsi, dès 1958, J.M. BARNOTHY place des souris dans un champ magnétique intense et observe chez elles un retard de croissance (1). D'autre part, en 1964, M.F. BARNOTHY (4) démontre l'action de tels champs magnétiques sur le taux de multiplication des leucocytes sanguins, et J.M. BARNOTHY (2) étudie l'effet d'un champ magnétique sur des souris porteuses de la tumeur T 2146 : la résistance de l'organisme semble accrue, la survie des animaux paraît augmentée mais il est impossible de dire si son action s'exerce sur les moyens de défense de l'animal hôte ou sur les cellules tumorales.

Sur ce problème, un travail de GROSS et SMITH (25) apporte quelques éléments d'informations : le séjour dans un champ magnétique de 3 à 4.000 gauss favorise la cicatrisation de blessures. Les auteurs ne peuvent en donner aucune explication physiologique.

Des chercheurs de plus en plus nombreux essaient de comprendre le mécanisme d'action des champs magnétiques. Pour cela, ils les étudient, non plus sur des êtres vivants dans toute leur complexité, mais sur des ensembles élémentaires (cellules, tissus) maintenus "*in vitro*".

RENO et NUTINI (66) soumettent des cellules rénales d'embryon de souris à un champ magnétique de 7.300 gauss et observent une diminution

du taux de respiration, diminution qui est d'autant plus marquée que l'embryon est plus jeune. Par contre, des cellules adultes, placées dans les mêmes conditions, ne sont pas affectées. Les auteurs pensent que les champs magnétiques puissants agissent sur les tissus dont l'activité mitotique est intense. Ils expliquent ainsi les résultats obtenus sur des tissus sarcomateux (Sarcoma 37) .

Enfin, certains auteurs, reprenant des travaux sur les organismes élémentaires (petits Mollusques et Planaires (6) ) ont noté l'action biologique de très faibles champs magnétiques ou plutôt de leurs variations.

Les géophysiciens ont en effet mis en évidence des variations rythmiques de la direction du champ magnétique terrestre (d'ailleurs faible, de l'ordre de 0,3 gauss en moyenne). Ces variations ont une influence nette sur l'orientation (position dans l'espace) et sur le métabolisme (consommation d'oxygène) de petits Mollusques (*Nassarius obsoletus*) au cours du nycthémère.

Certains auteurs pensent que quelques humains (par exemple les sourciers) peuvent être sensibles à de très légères variations, d'intensité et de direction, de champs magnétiques faibles (ROCARD (72) ).

Parallèlement à ces études sur le biomagnétisme, la découverte à la fin du XIXème siècle des ondes électromagnétiques engage ces recherches sur une voie nouvelle. D'ARSONVAL avait très tôt pensé à utiliser ces ondes en médecine.

Mais dans l'ensemble, l'utilisation de certaines ondes radio(HF) en médecine et en biologie s'est souvent limitée à la diathermie. Pourtant, LAKHOVSKI (30), GOSSET, LAKHOVSKI et coll. dès 1924 (24) obtiennent des résultats assez spectaculaires avec des tumeurs provoquées par *Bacterium tumefaciens* sur *Pelargonium zonatum*.

Par la suite, des progrès technologiques ont permis la mise au point d'émetteurs de rayonnements électromagnétiques aux longueurs d'ondes de plus en plus courtes (UHF). Ainsi il y a environ 35 ans, débutaient les expériences sur les effets biologiques des radars.

Le travail de mise au point, publié en 1972, par MICHAELSON (46) permet de mesurer le nombre important de recherches réalisées dans ce domaine au cours de ce dernier quart de siècle (près de 300 publications).

Les résultats constatés après application d'UHF sont attribués par beaucoup de chercheurs à des effets thermiques (26, 38, 73, 74, 75, 82, 83, 87, 88). Cependant il est admis que, parallèlement à ces derniers, il en existe d'autres qui sont dénommés "*effets spécifiques*" (13, 20, 22, 34, 35, 37, 62).

En France, ce sont des Centres de Recherches Militaires qui se sont intéressés à ce problème, en étudiant d'abord les effets nocifs produits par les émetteurs radars (JOLY et coll.(28) ). Ils ont pu aussi confirmer l'existence "*d'effets spécifiques*" non thermiques. Les résultats de leurs travaux révélèrent entre autres une action sur : les micro-organismes (MIRO (47) ), le système réticulo-endothélial (PLURIEN et coll. (61) ), les perturbations de l'activité électrique cérébrale (SERVANTIE (76) ), (BERTHARION et coll. (10) ), les modifications de la sensibilité à certaines substances chimiques (SERVANTIE et coll. (77) ).

Mais pour l'ensemble de tous ces travaux français et étrangers sur le bioélectromagnétisme, on note une très grande diversité dans l'utilisation des différents paramètres (emploi de rayonnements continus ou modulés, densités de puissance très variable d'un expérimentateur à un autre, durées et conditions d'expositions différentes, etc...). L'analyse et l'étude comparative de toutes ces recherches et de leurs résultats s'avèrent très délicates.

Depuis de nombreuses années, nous poursuivons des études ayant pour objectif d'associer champs magnétiques et ondes électromagnétiques modulés, puis de soumettre un certain nombre de modèles biologiques à leurs actions (8, 17, 45, 53, 54, 55, 56, 57, 67, 68, 69, 70).

C'est ainsi qu'avec la collaboration de MM. BERLUREAU et FOURNIER, nous avons étudié l'effet de ces rayonnements sur la croissance et la différenciation de certains tissus végétaux et animaux. Nous avons également montré que, dans certaines conditions expérimentales, on pouvait bloquer le développement de tumeurs spontanées (7), puis avec

MM. BIRABEN et DELMON de tumeurs greffées. Ces dernières investigations furent poursuivies avec MM. RIVIERE et GUERIN.

Nous exposerons dans le présent travail les résultats obtenus par l'action simultanée de champs magnétiques et d'ondes électromagnétiques modulés, sur des affections parasitaires expérimentales. Il s'agit de Protozooses sanguicoles : Trypanosomiase et Paludisme.

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

---

## 1 - ETUDE DU RAYONNEMENT EMIS

=====

Nous avons été amenés à concevoir et à construire successivement deux appareils : n°1 et n°2 (Fig. 1 et Fig. 2).

Sans vouloir entrer dans les détails de leur réalisation (\*), nous pouvons les schématiser de la manière suivante (Fig. 3) :

Sur un tube à décharge, dans lequel est créé un plasma confiné par un champ magnétique longitudinal, viennent s'adapter 3 antennes situées au même niveau et à 120° les unes des autres.

L'une d'elles émet une onde électromagnétique UHF, alors que les deux autres émettent une onde métrique HF.

Le plasma assure l'intermodulation de ces différentes ondes électromagnétiques, qui se propagent suivant l'axe du tube.

Nous allons décrire succinctement le plasma intermodulateur ainsi que les trois éléments essentiels du rayonnement émis (l'onde UHF, l'onde HF et le champ magnétique).

### I - LE PLASMA

Il est créé dans un tube cylindrique en pyrex de 24cm de diamètre et d'une hauteur d'environ 2 mètres (Fig. 3). Autour de celui-ci viennent s'adapter les différents éléments constituant l'appareil.

Après de nombreux essais, nous avons utilisé le Néon comme gaz de remplissage : il s'avère particulièrement favorable à une intermodulation des ondes UHF par les ondes HF modulées.

Le plasma est créé entre une cathode à chauffage indirect et une anode réalisée en molybdène. Une électrode intermédiaire, tournante, munie

---

(\*) Leur description détaillée a fait l'objet des brevets N°1.342.772 et N°1.501.984 .

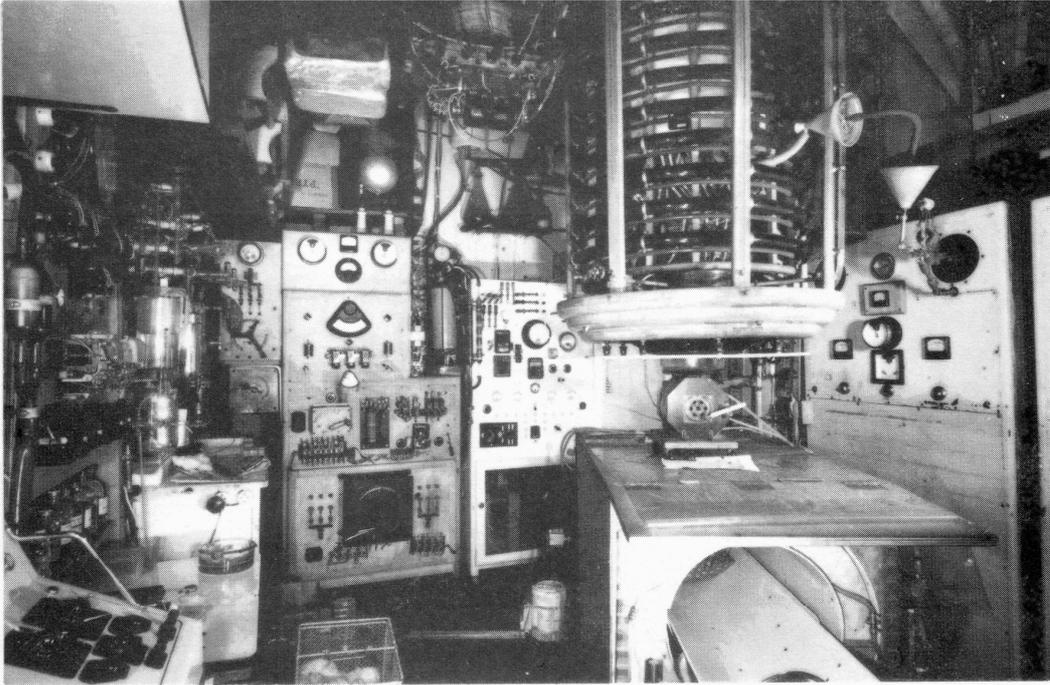


Fig. 1 - Photo de l'appareil N°1

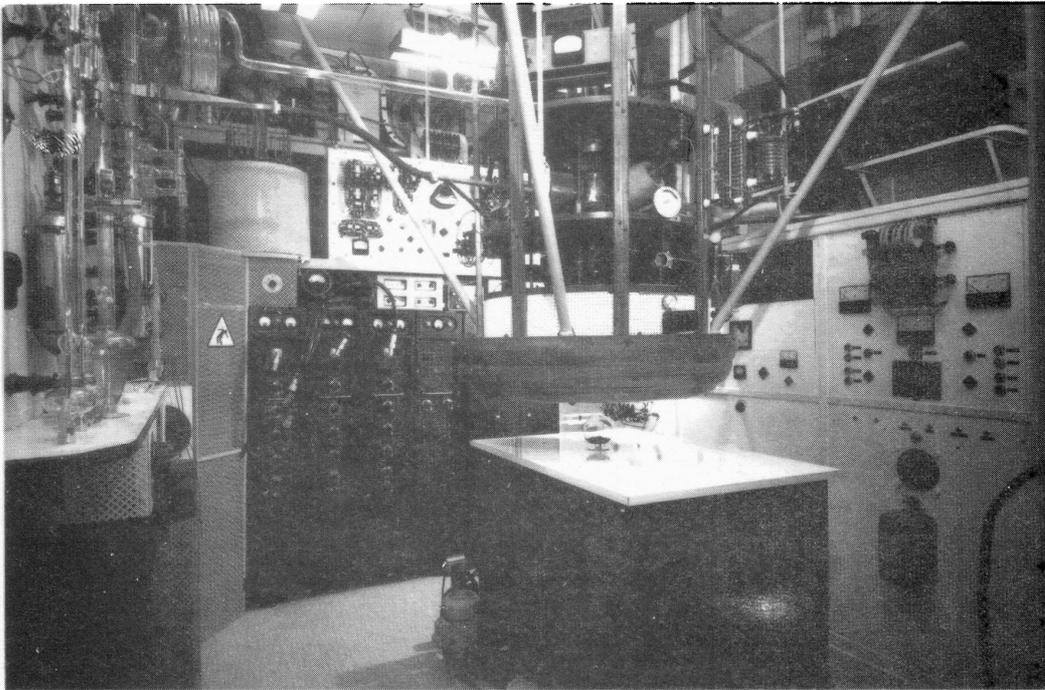


Fig. 2 - Photo de l'appareil N°2

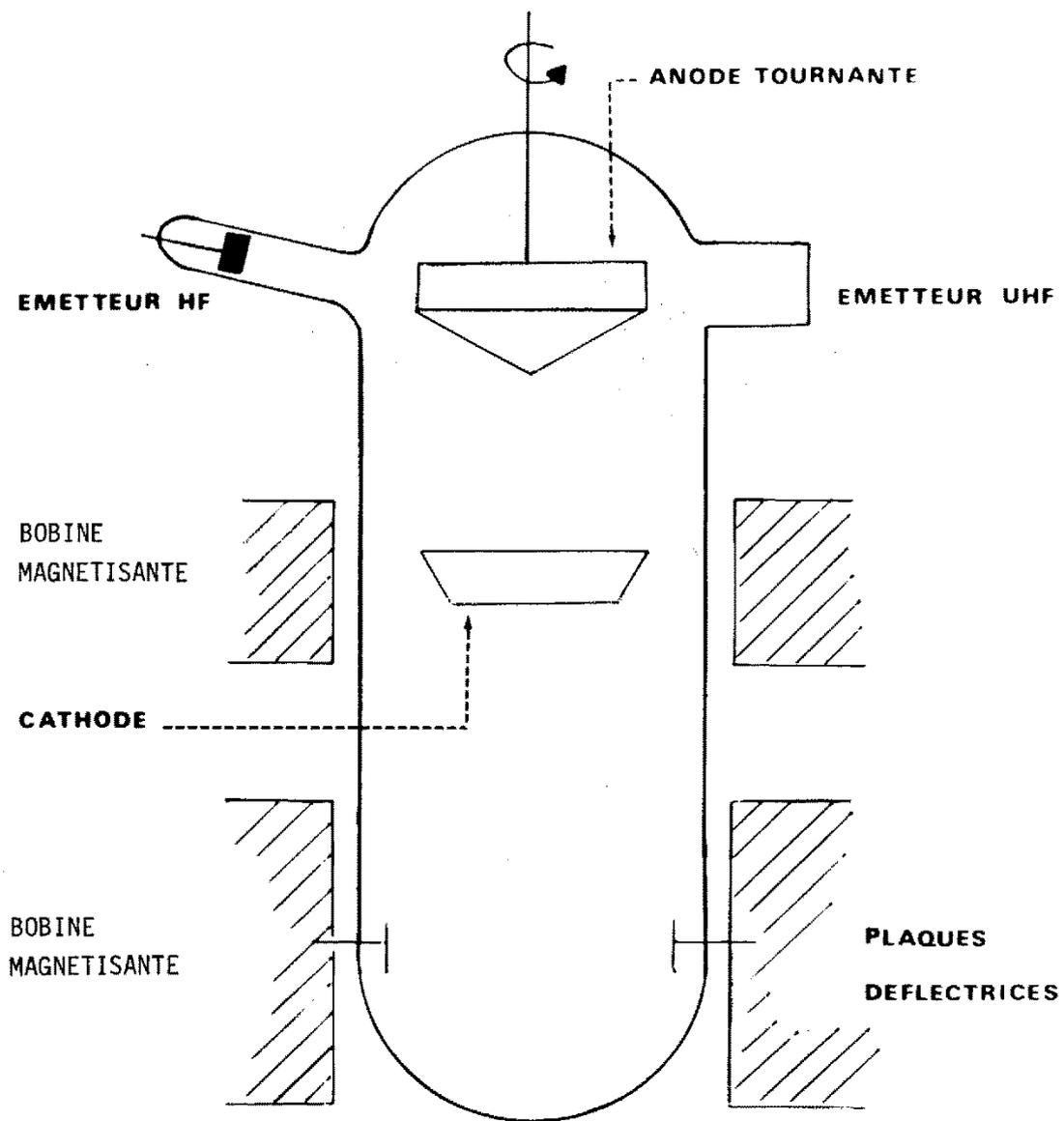


Fig. 3 - Schéma synoptique des appareils

de plans réflecteurs, située au niveau des antennes émettrices, facilite l'intermodulation des ondes et la propagation de celles-ci sur tout l'axe du tube.

La tension de fonctionnement est de l'ordre de 430 V. pour une intensité du courant de décharge d'environ 200 mA.

## II - L'ONDE UHF

---

Celle-ci, d'une fréquence de 9.4 GHz est produite par un magnétron délivrant 40 Kw crêtes.

Après un trajet guidé, elle est émise, par l'intermédiaire d'un cornet à section rectangulaire, dans le tube à plasma, perpendiculairement à l'axe de celui-ci, au niveau de la pièce tournante signalée préalablement. Les différents plans réflecteurs de celle-ci renvoient alors l'énergie UHF parallèlement à l'axe du tube, à travers le plasma.

Cette émission UHF est pulsée à une fréquence de récurrence de 1 KHz. La durée d'impulsion est d'une micro-seconde.

En étudiant sa variation spatiale dans un plan perpendiculaire à l'axe de l'appareil et à une distance de 5cm de la face de sortie du tube, on obtient la courbe de variation donnée par la Figure 4. On constate que dès que l'on s'écarte de l'axe de l'appareil, qui est en fait très sensiblement un axe de symétrie, la diminution de la puissance moyenne est importante. Au niveau de l'axe de symétrie, cette puissance correspond à une densité d'énergie moyenne  $W_m$  égale à  $10 \mu W/cm^2$ .

## III - L'ONDE HF

---

Les 2 antennes HF, situées au niveau de l'électrode intermédiaire, sont à  $120^\circ$  l'une de l'autre et également à  $120^\circ$  du cornet hyperfréquences. Elles sont inclinées de  $15^\circ$  par rapport au plan perpendiculaire à l'axe du tube. Elles émettent chacune (dans l'appareil actuel) une onde métrique modulée en amplitude.

Cette onde HF sert :

- 1) à moduler l'onde UHF par l'intermédiaire du plasma
- 2) à l'entretien du plasma

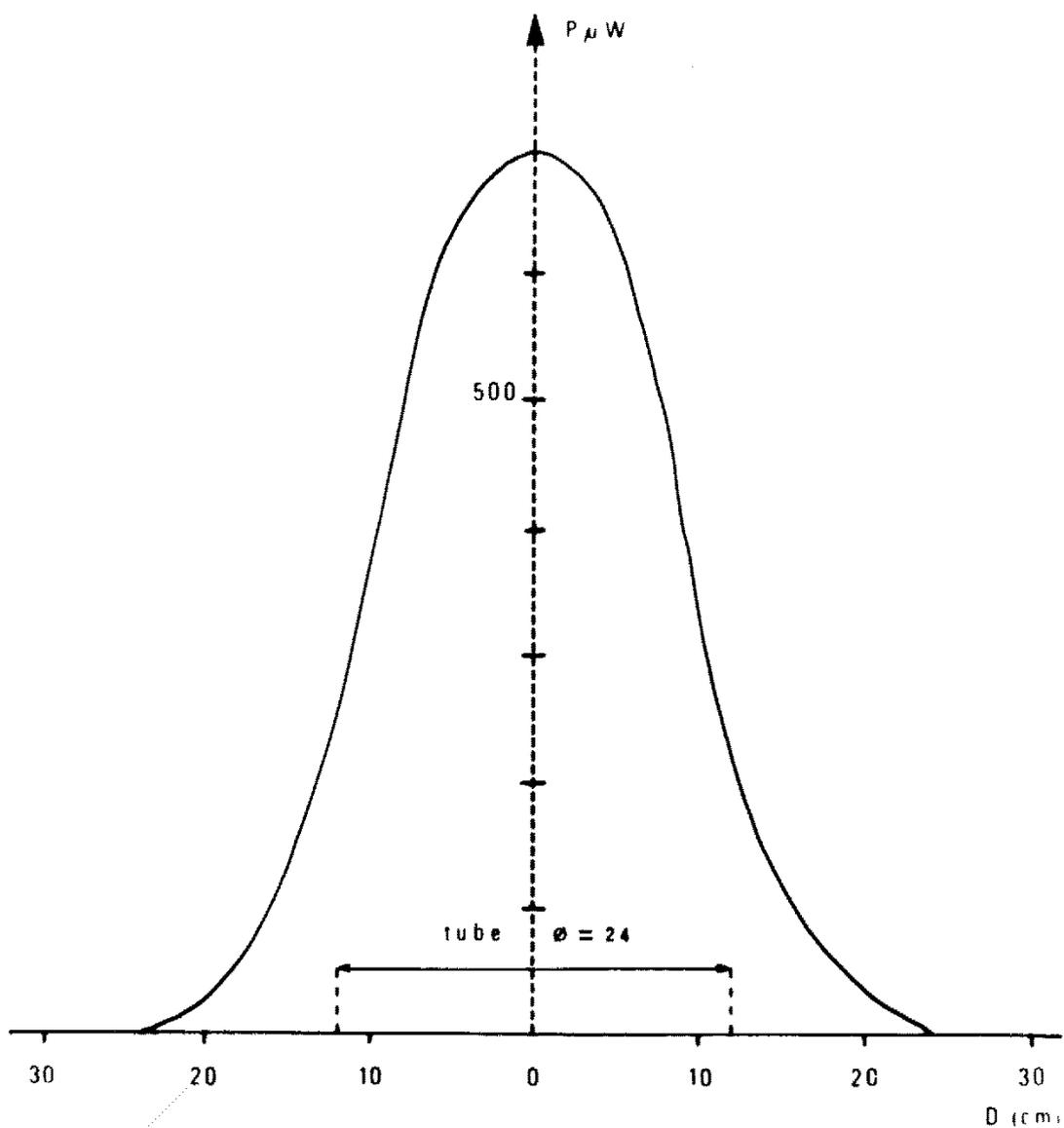


Fig. 4 - Onde électromagnétique UHF. Variation de la puissance du champ dans un plan perpendiculaire à l'axe de l'appareil et à une distance de 5cm de la face de sortie du tube à plasma.  
 - Appareil N°2 -

L'énergie correspondante à l'onde HF est constante dans toute la pièce d'expérimentation.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé deux longueurs d'onde HF, l'une de 19 m., l'autre de 17 m.

#### IV - LE CHAMP MAGNETIQUE

Le champ magnétique longitudinal est créé par une bobine à air, possédant un creux d'environ 30 cm de diamètre et entourant le tube à plasma. Elle produit à son centre un champ magnétique maximum de l'ordre de 1200 gauss. Ce champ magnétique est pulsé à raison de 50 pulsations/minute (Figure 5), par le mouvement linéaire alternatif de charbons plongeant dans une cuve électrolytique; ce mouvement est réalisé par un système bielle et manivelle classique.

Nous avons mesuré les variations spatiales du champ magnétique de deux façons :

1) suivant l'axe du tube à plasma, on obtient la distribution du flux indiquée sur la figure 6. On constate ainsi qu'à une distance de 4,2 cm (distance de la sortie du tube à la table d'expérimentation), la valeur du champ magnétique est voisine de 600 gauss.

2) dans un plan perpendiculaire à l'axe de l'appareil et distant de 4,2 cm de la face de sortie du tube, la distribution du flux est indiquée sur la figure 7. On constate que le champ magnétique est constant sur une distance d'environ 8 cm par rapport au centre.

A côté de ces constituants essentiels du rayonnement, il existe quelques composants accessoires se situant dans le spectre visible.

En effet l'étude des spectres d'émission montre la présence de traces de mercure et de néon. Le premier provient du dispositif de pompage utilisé, le second du gaz de remplissage.

En ce qui concerne les rayonnements X et  $\gamma$ , nous devons préciser que l'absence de toute émission de l'un et l'autre de ces deux rayonnements a toujours été constatée.

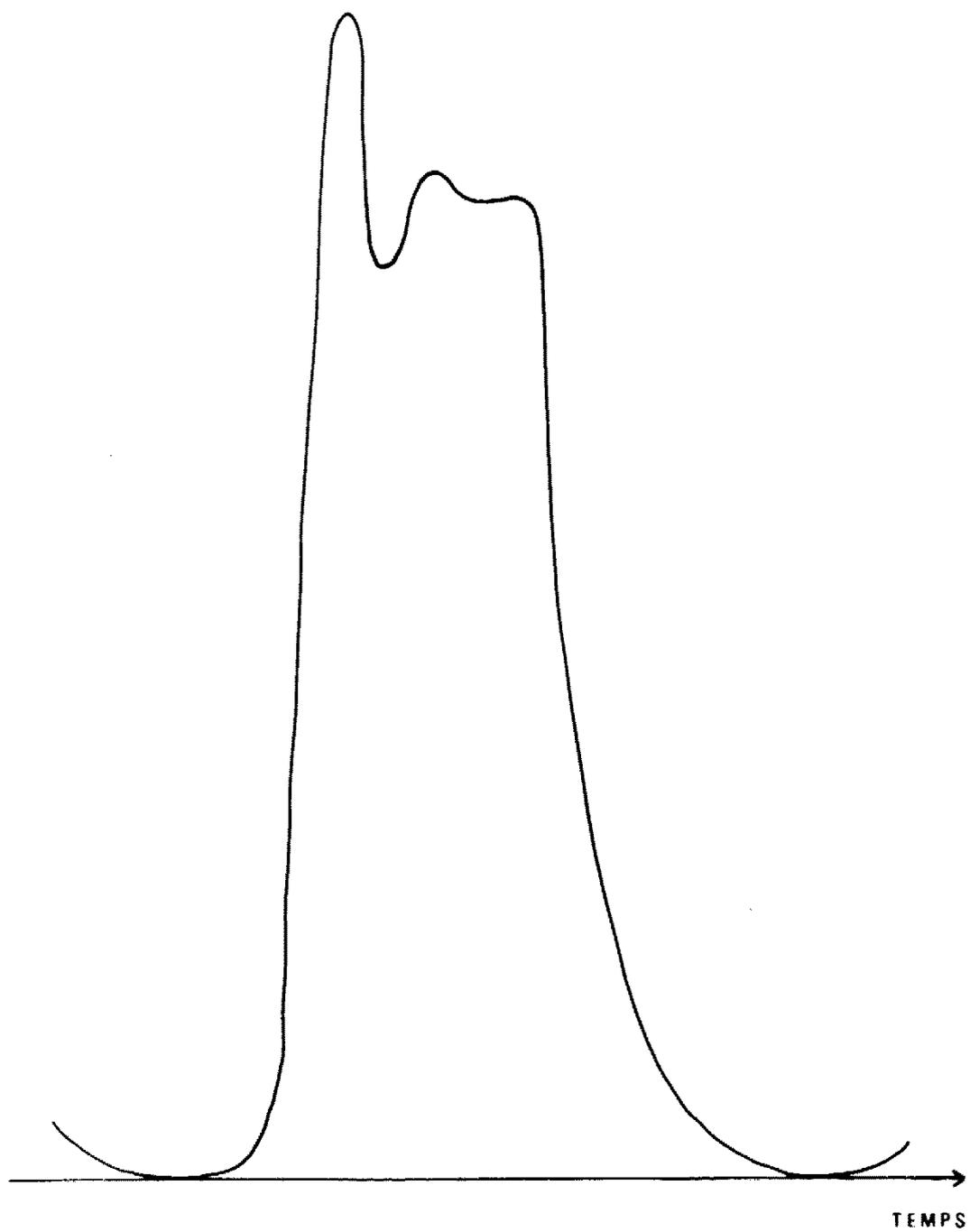


Fig. 5 - Champ magnétique. Evolution au cours d'une pulsation.  
- Appareil N°2 -

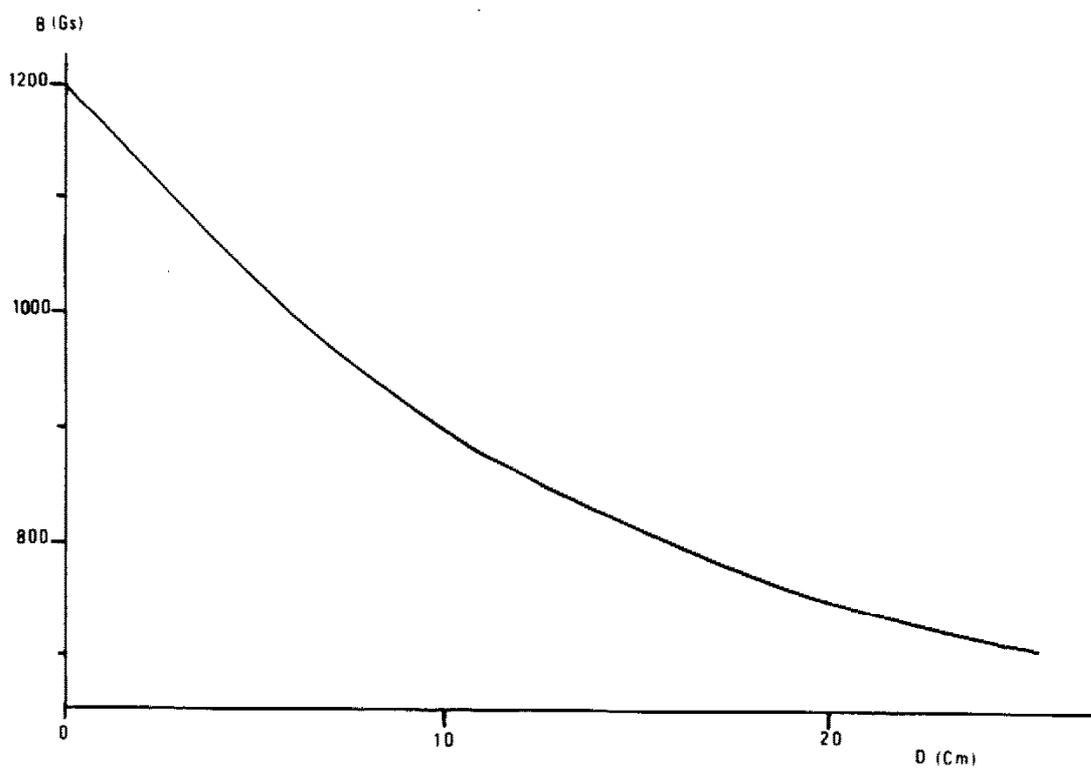


Fig. 6 - Champ magnétique. Distribution spatiale du flux magnétique suivant l'axe du tube à plasma.  $d$  = distance par rapport à la face de sortie du tube.  
- Appareil N°2 -

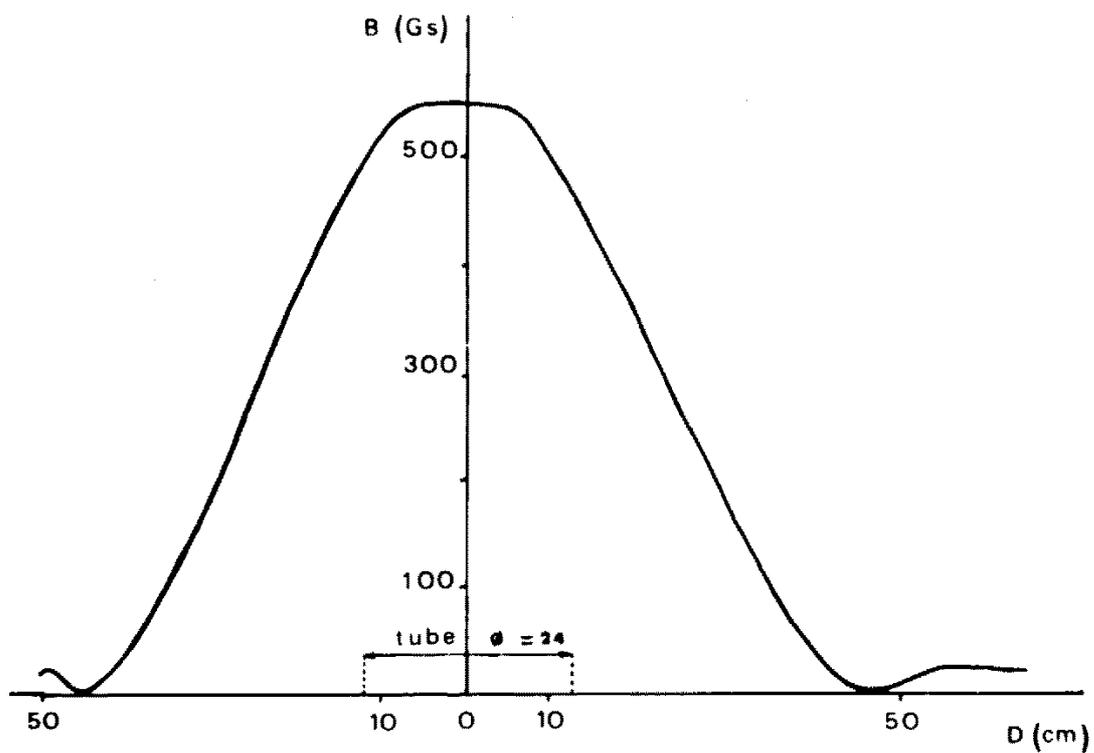


Fig. 7 - Champ magnétique. Variation spatiale dans un plan perpendiculaire à l'axe de l'appareil et à une distance de 4,2 cm de la face de sortie du tube à plasma.  
- Appareil N°2 -

## 2 - LES PARASITES

=====

On a choisi deux sortes de Protozoaires mais dont la biologie est très différente : les uns sont strictement exo-cellulaires (trypanosomes), les autres strictement endo-cellulaires (hématozoaires).

### 2.1. - Trypanosomes

On a utilisé :

- *Trypanosoma (Trypanozoon) equiperdum*
- *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei gambiense*

Le tableau I indique leur position dans la classification récemment proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.) (65).

En pratique, toutefois, ces trinôme et quadrinôme paraissent encombrants. Aussi est-il justifié, selon l'O.M.S. et dans le cadre d'un travail comme celui-ci, de s'en tenir aux simples binômes *Trypanosoma equiperdum* et *Trypanosoma gambiense*.

#### 2.1.1. - *Trypanosoma equiperdum*

##### a. - L'agent pathogène (Fig. 8)

~~C'est l'agent d'une maladie grave des équidés : la douvine. Elle~~  
a comme caractère très particulier de ne se transmettre que par le coït : seuls les équidés reproducteurs sont atteints naturellement.

Le parasite envahit peu à peu tous les tissus et organes de l'animal, en particulier le sang circulant (où il est présent en quantités variables, mais toujours modérées). La mort survient en un temps variable (quelques mois à un ou deux ans) (33).

Comme cela est le cas pour beaucoup de micro-organismes, le comportement dans la nature et le comportement expérimental de *Trypanosoma equiperdum* sont parfois sensiblement différents selon la provenance, c'est-à-dire selon le cas pathologique originel qui a servi à l'isolement. On a l'habitude de parler de "souches" parasitaires.

La grande majorité de nos expériences a été réalisée avec la souche dite "de l'Institut Pasteur de Paris"; cette souche avait été

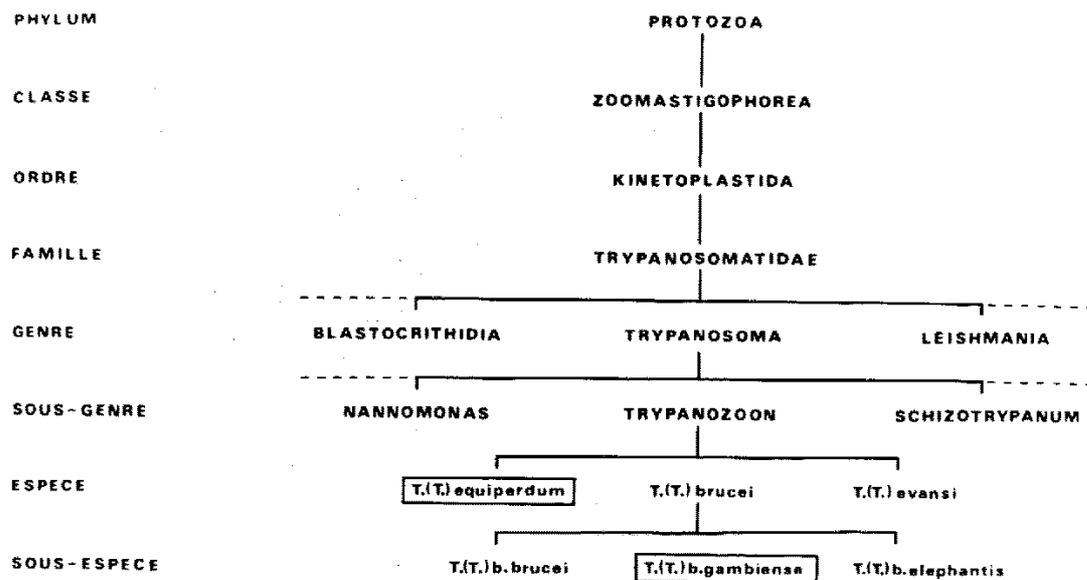


Tableau I - Position de *T. equiperdum* et de *T. gambiense* dans la classification proposée en 1973 par l'Organisation Mondiale de la Santé (65)

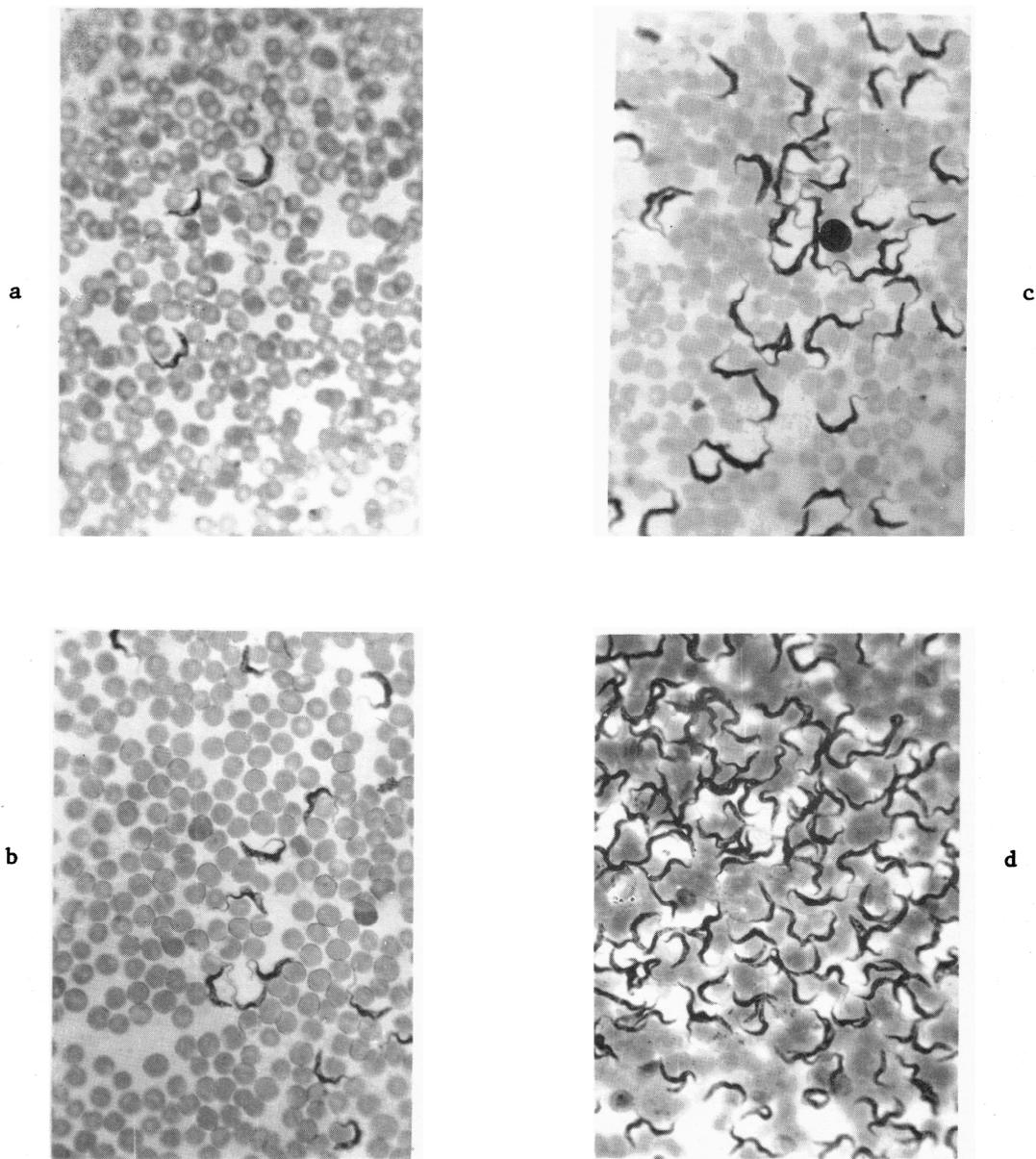


Fig. 8 - Trypanosomiase aiguë de la Souris à *T. equiperdum*. Evaluation semi-quantitative de la parasitémie sur frottis de sang, colorés par la technique de May-Grünwald-Giemsa.

- a : +      correspond à environ  $\leq 10^3$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang  
 b : ++     correspond à environ  $10^4$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang  
 c : +++    correspond à environ  $10^5$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang  
 d : ++++   correspond à environ  $\geq 10^6$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang

fournie à la Faculté de Médecine de Bordeaux (Laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire) en 1961 par le Professeur COLAS-BELCOUR.

Une autre souche, dyskinétoplastique, a été utilisée exceptionnellement; elle nous a été aimablement fournie par le Professeur Von BRAND (Laboratory of Parasitic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Signalons que les deux souches de *trypanosoma equiperdum* peuvent être conservées à basse température ( $\leq -80^{\circ}\text{C}$ ), par exemple sous forme de sang riche en parasites, glycérolé et congelé convenablement (congélation progressive).

#### b. - Variation antigénique

Il nous faut dès à présent évoquer une notion très importante : la variation antigénique. Cette notion, déjà ancienne, mais devenue actuellement d'un abord plus facile grâce à la technologie moderne (en particulier grâce aux procédés de cryoconservation) est nécessaire pour la compréhension des résultats expérimentaux qui seront exposés plus loin.

Tout se passe comme si cette variation antigénique permettait au parasite de résister, si besoin est, aux réponses immunitaires de l'hôte. C'est donc le cas lorsque la maladie (naturelle ou expérimentale) évolue sur un mode suffisamment prolongé ou chronique. Dans de telles conditions, on assiste, chez l'organisme hôte, à une succession dans le temps de types parasitaires, distincts les uns des autres par des caractères immunologiques. On appelle ces types parasitaires (et cela dans le souci de ne pas préjuger de leur mécanisme d'apparition) "*types antigéniques*" ou "*variants antigéniques*".

L'étude analytique précise des types antigéniques peut être réalisée grâce à l'obtention de clones parasitaires, c'est-à-dire de populations homogènes issues d'une cellule parasitaire unique (voir plus loin, même chapitre, paragraphe 4.1.2.). En ce qui concerne la souche "*Institut Pasteur de Paris*" de *Trypanosoma equiperdum*, l'Unité de Recherches sur l'Immunologie des Affections Parasitaires (INSERM) de Bordeaux dispose actuellement de plus d'une centaine de types antigéniques isolés.

Les types antigéniques se distinguent donc les uns des autres essentiellement grâce à des différences immunologiques, ce qui veut dire que des antisérums produits contre ces types antigéniques permettent de les individualiser et de les reconnaître. Ceci revient à constater que certaines structures antigéniques parasitaires apparaissent comme spécifiques de type antigénique. D'autres structures antigéniques, au contraire, apparaissent comme étant communes à tous les types antigéniques d'une même souche.

Parmi les structures antigéniques spécifiques de type antigénique, les plus utilisées sont les antigènes agglutinants; ce sont des antigènes de surface. Les réactions immunologiques qui permettent de distinguer les types antigéniques les uns des autres sont donc essentiellement des réactions d'agglutination. Un anti-sérum spécifique d'un type antigénique déterminé contient donc (au sein de la masse des anticorps antitrypanosomes) des anticorps agglutinant spécifiquement les trypanosomes de ce type antigénique et à l'exclusion de tous les autres types antigéniques. On doit préciser qu'au cours de ces réactions, les trypanosomes restent vivants au sein des agglutinats (persistance des mouvements de la membrane ondulante et du flagelle)(voir plus loin, dans le même chapitre, le paragraphe 5.3.3.b.)

Parmi tous les types antigéniques d'une souche, il existe un type préférentiel appelé type antigénique de base (ou basal); on en reparlera plus loin en diverses occasions. Pour toutes les expériences, réalisées dans le présent travail, on a infesté les animaux (sauf mention du contraire) avec le type basal (appelé  $E_1$ ) de la souche "Institut Pasteur de Paris".

#### 2.1.2. - *Trypanosoma gambiense*

C'est l'agent de la trypanosomiase humaine africaine (ou "maladie du sommeil").

La transmission d'homme à homme se fait par l'intermédiaire d'insectes piqueurs, des mouches appartenant au genre *Glossina* ("mouche tsé-tsé"). Il existe donc un cycle parasitaire évoluant successivement chez deux hôtes naturels, l'homme malade et la glossine.

Chez la glossine vectrice, le parasite parcourt une série de stades évolutifs aboutissant à la forme infectante (dite métacyclique)

qui se localise dans les glandes salivaires et dans la trompe. Ces formes parasitaires existant chez l'insecte vecteur ne nous intéressent pas dans le présent travail.

Chez l'homme malade, on admet classiquement l'existence de la seule forme flagellée (forme trypomastigote). Les parasites sont présents dans le sang, les ganglions lymphatiques, la moëlle osseuse (à des taux très variables, et parfois très faibles) et dans divers organes, en particulier le système nerveux. Cependant, il convient de dire que dès le début de ce siècle, certains auteurs, en se basant sur des critères de pathologie parasitaire comparée, ont soupçonné l'existence chez l'homme de formes parasitaires différentes des formes trypomastigotes, en particulier au niveau des méninges et des plexus choroïdes du cerveau; nous reparlerons brièvement de ce problème ci-dessous.

Dans le cas de *Trypanosoma gambiense*, la notion de souches est également d'une importance primordiale, en particulier en ce qui concerne leur comportement expérimental. Pour les expériences réalisées dans le présent travail, on a utilisé la souche D2/1 qui fut isolée par MATTERN, en 1963 au Sénégal, dans les environs de Rufisque (44).

La conservation au laboratoire peut se faire dans les mêmes conditions que pour *Trypanosoma equiperdum*.

La variation antigénique existe également chez *Trypanosoma gambiense*; elle a été étudiée chez d'autres parasites de l'espèce *brucei*. Mais en ce qui concerne la souche D2/1, l'étude de cette variation antigénique est difficile; nous en verrons les raisons plus loin. On a cependant pu obtenir quelques populations clonées.

## 2.2. - Hématozoaires

On a choisi *Plasmodium berghei* (sous-genre *Winckeia*), agent du paludisme des rongeurs.

Le cycle évolutif des parasites du genre *Plasmodium* se déroule chez deux hôtes : un hôte vertébré (rongeur) et un insecte vecteur (moustique du genre *Anopheles*). Ce cycle comprend deux parties, une partie asexuée et une partie sexuée. La première (éléments diploïdes) a lieu chez le rongeur;

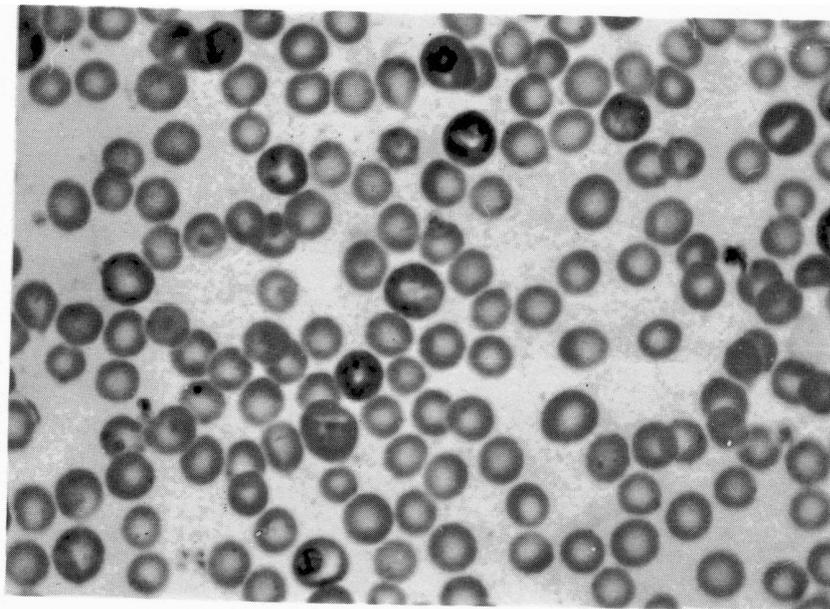
elle aboutit à des éléments sexués, les progamétocytes mâles et femelles qui, absorbés par l'insecte vecteur lors du repas sanguin, vont être à l'origine de la partie sexuée du cycle; celle-ci aboutit en fin de compte à la présence de formes infectieuses, les sporozoïtes, dans les glandes salivaires.

La partie asexuée du cycle, chez le rongeur, comporte en fait 3 sortes d'éléments :

- des éléments exo-érythrocytaires qui vont évoluer dans les cellules de certains organes (foie) et du système réticulo-endothélial. Ces éléments réalisent des schizogonies exo-érythrocytaires primaires et secondaires (11, 81).
- des progamétocytes endo-érythrocytaires, mais en nombre réduit.
- des éléments endo-érythrocytaires, qui évoluent strictement dans les hématies et qui réalisent des séries de schizogonies classiques (Fig. 9).

Dans le cadre du présent travail, seuls sont à considérer les éléments des schizogonies endo-érythrocytaires. Ces éléments sont donc strictement endo-cellulaires, à l'exception toutefois des mérozoïtes entre le moment de leur libération, par éclatement des corps en rosace, et le moment de leur pénétration dans de nouvelles hématies; mais ces stades exo-cellulaires sont de brève durée.

a



b

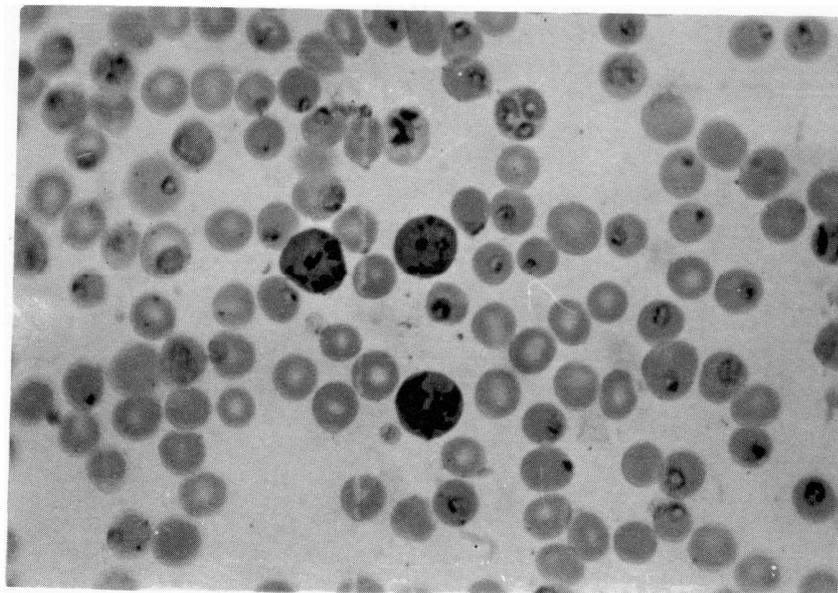


Fig. 9 - Paludisme de la Souris (*P. berghei*). Evaluation semi-quantitative de la parasitémie : la proportion des hématies parasitées est exprimée en %. Frottis de sang, colorés par la technique de May-Grünwald-Giemsa.

- a : environ 5% des hématies sont parasitées
- b : environ 40% des hématies sont parasitées

### 3 - LES ANIMAUX HOTES

=====

Au cours de notre thèse, nous avons utilisé les 3 espèces animales suivantes : Souris, Rat et Lapin.

#### 3.1. - Souris

Celles-ci sont de race SWISS, de sexe femelle, âgées de 4 semaines, d'un poids de 18 à 20 gr.

Leur provenance est la suivante :

FERME D'ELEVAGE D'ANIMAUX SELECTIONNES POUR LABORATOIRE  
(Mr MARTIN) / 33910 St Denis de Pile

#### 3.2. - Rats

Ceux-ci sont de race WISTAR, de sexe femelle, âgés de 5 semaines environ, d'un poids de 120 à 150 gr.

Ils proviennent du même élevage que les souris.

#### 3.3. - Lapins

Ceux-ci sont des FAUVES DE BOURGOGNE, de sexe mâle, âgés de 12 semaines, d'un poids de 2Kg500 à 3Kgs.

Ils proviennent de l'élevage suivant :

Mr et Mme BELLOCQ / 64370 St Médard

=====

#### 4.1. - Trypanosomiase aiguë à *T. equiperdum*

Ce modèle est réalisé par l'évolution de *Trypanosoma equiperdum* chez la Souris et chez le Rat.

##### 4.1.1.- Caractères de la maladie

Dans ce qui suit, on parlera essentiellement de la trypanosomiase aiguë de la Souris. Mais il faut dire d'emblée que chez le Rat infesté avec *Trypanosoma equiperdum*, les phénomènes observés sont tout à fait semblables.

Dès l'inoculation (qui, en général, se fait par voie intrapéritonéale), les trypanosomes se multiplient rapidement. Très vite, ils envahissent le sang circulant, et leur nombre augmente d'une façon continue jusqu'à la mort de l'animal; à ce moment, la parasitémie est voisine de  $10^6$  parasites par  $\mu\text{l}$  de sang (Fig. 8).

Cette progression croissante et inexorable de la parasitémie constitue le signe majeur de la maladie expérimentale chez la Souris. A l'autopsie, on note un foie très congestionné, une rate considérablement augmentée de volume et une hypertrophie des ganglions lymphatiques correspondant au point d'inoculation (ganglions mésentériques). Les parasites sont présents dans le parenchyme de tous les organes.

La rapidité de l'évolution (durée de survie des souris inoculées) dépend essentiellement de la quantité de parasites inoculés. La figure 10 montre la relation assez linéaire qui existe entre d'une part le nombre de trypanosomes inoculés et d'autre part la durée de survie des souris.

Dans les expériences qui seront décrites plus loin, on a souvent utilisé un inoculum de  $2 \times 10^4$  parasites; la figure 11 montre l'évolution de la parasitémie pour un tel inoculum (la mort des souris survient en 90 à 110 heures).

Signalons que chez le Rat, et pour obtenir une évolution semblable à celle qui a lieu chez la Souris (parasitémie et temps de survie), il

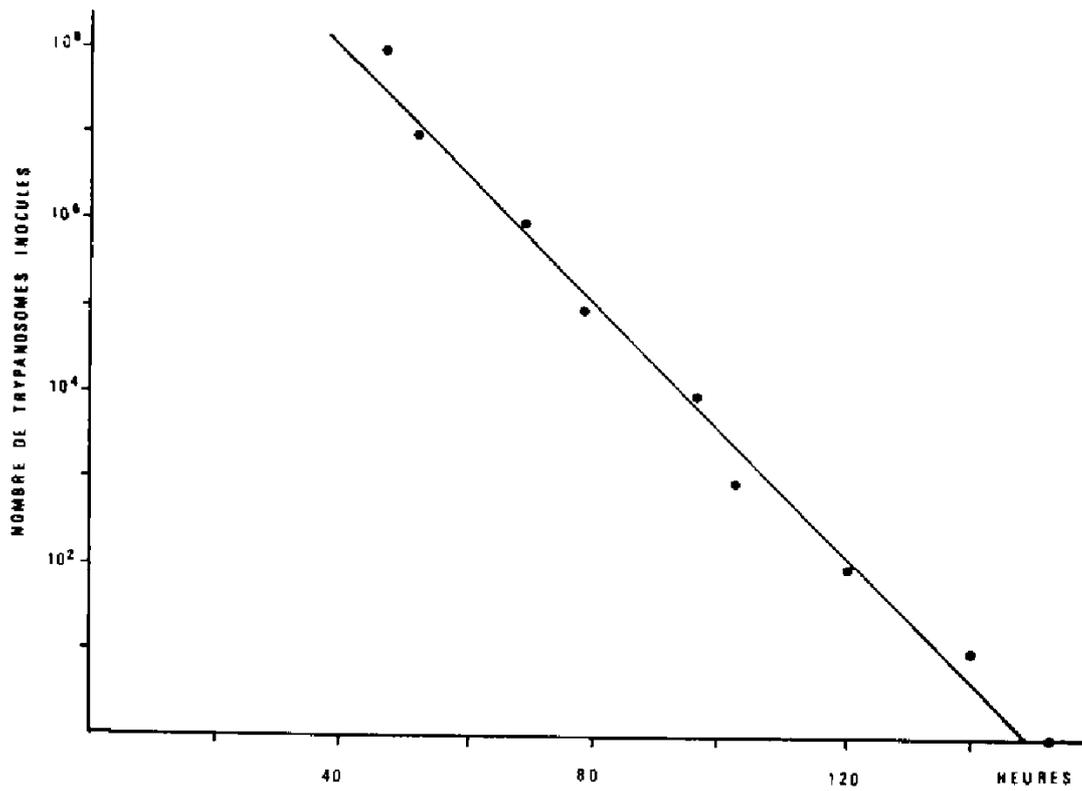


Fig. 10 - Trypanosomiase aiguë de la Souris (*T. equiperdum*).  
 Relation entre le nombre de trypanosomes inoculés  
 (type antigénique de base E<sub>1</sub>) et le temps de survie  
 des animaux. Chaque dose de trypanosomes ( $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ , ...,  $10^8$ )  
 a été inoculée à 6 souris

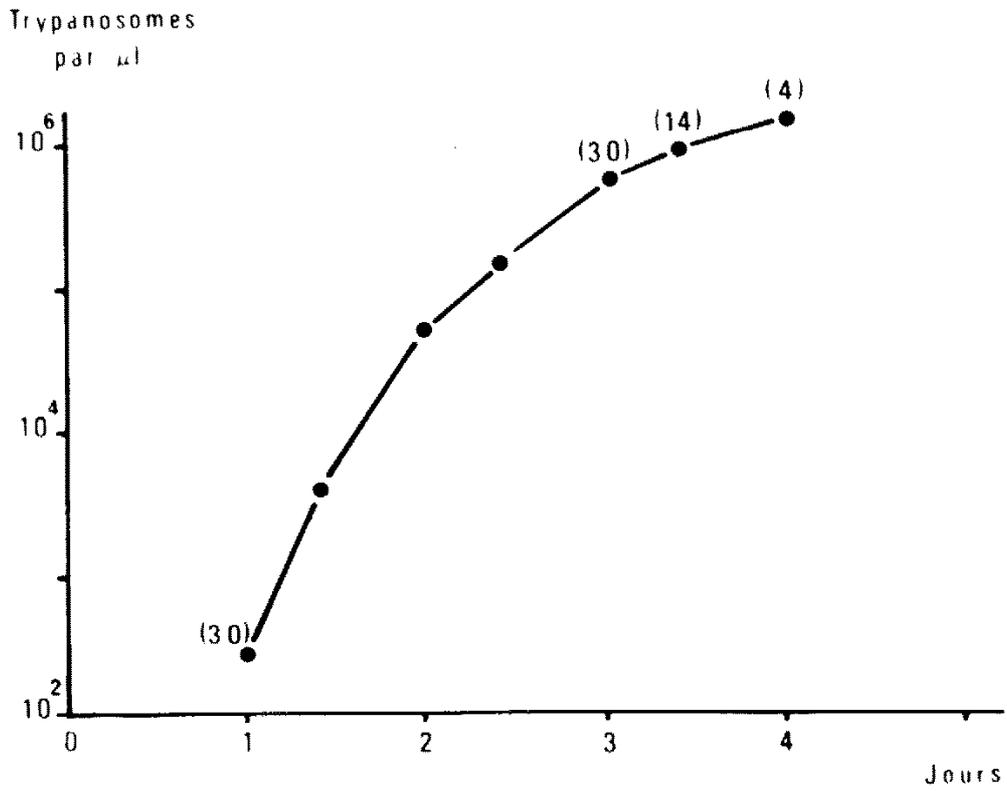


Fig. 11 - Trypanosomiase aigüe de la Souris (*T. equiperdum*). Evolution de la parasitémie (nombre de trypanosomes par µl de sang) chez un lot de 30 souris infestées chacune avec  $2 \times 10^4$  trypanosomes. Entre parenthèses le nombre des souris vivantes au moment de la numération des trypanosomes.

faut en général utiliser un inoculum environ 10 fois plus important.

#### 4.1.2. - Variation antigénique

La figure 10 montre également que l'unité parasitaire est infectante; cette propriété est très importante : elle permet l'obtention de populations homogènes par clonage. L'inoculation d'une cellule parasitaire unique dans la cavité péritonéale de la Souris peut se faire à l'aide de techniques de dilutions minutieuses. L'évolution de la maladie aboutit à la mort en 7 à 10 jours.

C'est grâce à l'obtention de ces clones parasites que l'on a pu récemment aborder l'étude immunologique et même immuno-chimique de la variation antigénique, c'est-à-dire des différents types antigéniques.

Dans la pratique, il faut, bien entendu, éviter que la population clonale, obtenue chez la Souris inoculée avec une cellule parasitaire unique, ne subisse, elle aussi, la variation antigénique au cours de l'évolution de la maladie qui est assez longue (7 à 10 jours). Dans ce cas, la variation antigénique (qui survient en général aux environs du 4ème-5ème jour) se fait toujours vers le type de base E<sub>1</sub>. Pour empêcher cette variation, on peut pratiquer des passages répétés de sang (de l'ordre de 0,25 à 0,5 ml) ~~de souris à souris, par exemple toutes les 48 heures~~ (c'est-à-dire avant l'apparition de défenses immunitaires importantes); mieux, on peut pratiquer ces passages répétés sur des souris traitées avec certaines drogues dites immuno-suppressives (par exemple, le cyclophosphamide, qui ne semble pas avoir d'effet nocif sur les trypanosomes). A chaque passage, le nombre de parasites inoculés augmente, et on arrive finalement à produire des infestations massives (de l'ordre de 10<sup>6</sup> parasites), mortelles en 48 heures, et permettant la récolte de quantités importantes de populations homogènes (ou types antigéniques).

En ce qui concerne les expériences décrites dans le présent travail, nous avons dit avoir inoculé en général des quantités importantes de parasites, 2x10<sup>4</sup> ou même plus. Dans de telles conditions expérimentales, où la maladie évolue toujours dans un temps court (moins de 120 heures), la variation antigénique ne semble pas survenir, la maladie évolue d'un seul tenant au point de vue des types antigéniques.

Mais nous verrons plus loin que dans d'autres circonstances (isolement de types antigéniques à partir du lapin trypanosomé), on peut

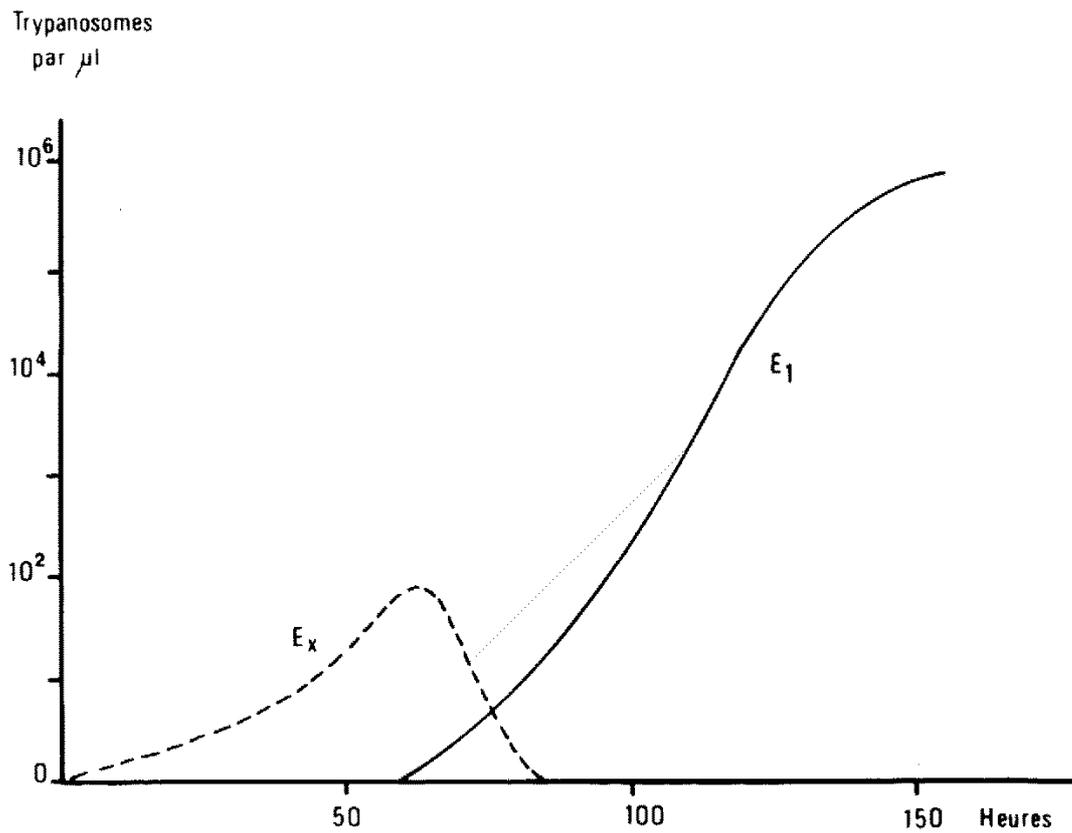


Fig. 12 - Trypanosomiase de la Souris (*T. equiperdum*).  
 Schéma de la variation antigénique dans le cas d'une souris infestée avec un nombre réduit de trypanosomes appartenant à un type antigénique différent du type de base  $E_1$ . La variation se fait toujours vers ce dernier type.

être amené à inoculer à la souris des quantités beaucoup plus faibles de parasites; la mort de la souris survient alors plus tardivement (5ème ou 10ème jour après l'inoculation). La variation antigénique, vers le type de base E<sub>1</sub>, peut alors avoir lieu. Pour l'éviter, on procède comme décrit ci-dessus : passages répétés sur des souris traitées avec des substances immuno-suppressives.

Les phénomènes immunologiques qui surviennent au cours de la trypanosomiase aiguë de la Souris et du Rat sont décrites plus loin.

#### 4.2. - Trypanosomioses chroniques

Il s'agit de parasitoses expérimentales à évolution beaucoup plus longue que celle décrite précédemment. Deux modèles ont été utilisés :

- la trypanosomiase du Lapin à *Trypanosoma equiperdum*
- la trypanosomiase de la Souris à *Trypanosoma gambiense*

##### 4.2.1.- Trypanosomiase expérimentale du Lapin à *T. equiperdum*

###### a. - Evolution de la maladie

Pour les expériences décrites dans le présent travail, on a inoculé aux lapins des quantités importantes de parasites ( $5 \times 10^6$  à  $2 \times 10^8$ ), par la voie intrapéritonéale. Il semble que l'importance de l'inoculum n'ait pas une influence majeure sur le déroulement de la maladie.

Les premiers signes pathologiques apparaissent en général au cours de la 2ème semaine de la maladie. Une fièvre irrégulière s'installe : la température (qui normalement est de l'ordre de 38,5 à 38,8°C) accuse des ascensions brusques et irrégulières à 40-41°C. Des oedèmes se manifestent, en particulier au niveau du museau et des oreilles (qui deviennent chaudes et tombantes). Les troubles s'accroissent. Au niveau des oreilles, la peau devient sèche, couverte de squames; les poils tombent et des escarres se forment. Au niveau des yeux apparaît une conjonctivite mucopurulente. Les animaux peuvent présenter du jetage nasal; les narines se couvrent de croûtes épaisses, au-dessous desquelles les tissus sont détruits. Les membres s'infiltrent et s'ulcèrent; une parésie de l'arrière train peut survenir. L'état général décline, l'amaigrissement est progressif jusqu'à la cachexie fatale. La mort survient en général après 5 à 10 semaines d'évolution, exceptionnellement plus (Fig. 13 et Fig. 14).

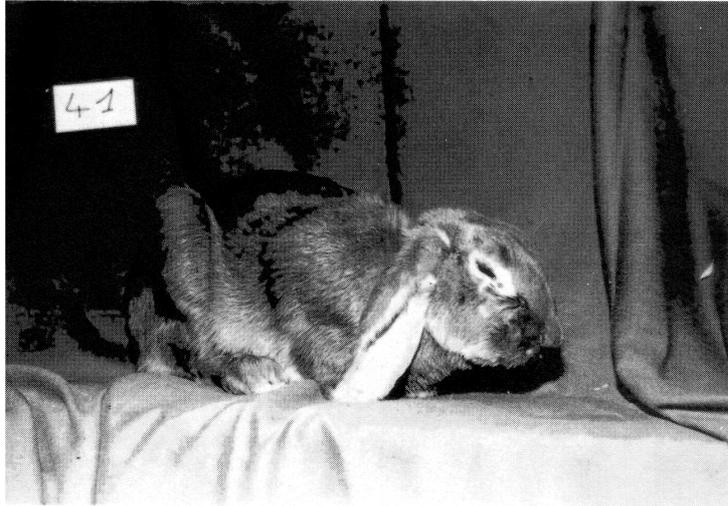


Fig. 13 - Trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*).  
Aspect clinique d'un animal infesté depuis 3 semaines.



Fig. 14 - Même Lapin que sur la figure précédente.  
Aspect clinique du museau, des oreilles et de  
la muqueuse oculaire.

Il faut mentionner l'atteinte des organes génitaux externes. Chez les animaux mâles apparaît environ 2 semaines après l'infestation un oedème au niveau des testicules. Très souvent, l'orchite se propage à la peau du scrotum; la surinfection survient, et l'ensemble de ces phénomènes aboutit à la perte de la glande (Fig. 15).

Les trypanosomes sont présents dans le sang (mais la parasitémie est toujours faible, inframicroscopique), dans les oedèmes et au niveau des muqueuses oculaire et nasale; le parasite existe aussi dans la plupart des organes, en particulier au niveau des lésions testiculaires.

L'autopsie montre en particulier une hypertrophie des formations lymphoïdes.

#### b. - Etude histologique des lésions testiculaires

L'étude histologique des lésions testiculaires est particulièrement intéressante (Fig. 16). Elle permet, en fait, d'évaluer les troubles au niveau des deux fonctions de la glande :

- la fonction exocrine, c'est-à-dire la spermatogenèse (état des divers éléments de la lignée au niveau des tubes séminifères; présence de spermatozoïdes dans la lumière des tubes épидидymaires).

- la fonction endocrine, c'est-à-dire le fonctionnement de la glande interstitielle, grâce à l'aspect des cellules épithéliales épидидymaires.

Déjà, 8 jours après l'infestation, les animaux présentent généralement un début d'orchite. L'histologie montre une infiltration lymphocytaire de l'épididyme. Le parenchyme testiculaire ne présente pas encore d'altérations visibles. Les tubes séminifères ont un aspect normal et contiennent des spermatozoïdes et la glande interstitielle est bien développée. La structure de l'épididyme révèle la présence de spermatozoïdes dans la lumière des tubes et l'existence d'un épithélium épидидymaire palissadique, constitué de cellules prismatiques signant la présence d'hormones androgènes dans l'organisme (Fig. 17).

Quinze à vingt jours après l'infestation : l'orchite a beaucoup évolué. Les tubes séminifères des testicules sont très diminués quant à leur taille, la spermatogenèse y a disparu et leur structure est réduite aux cellules de Sertoli et à quelques spermatogonis. La glande interstitielle

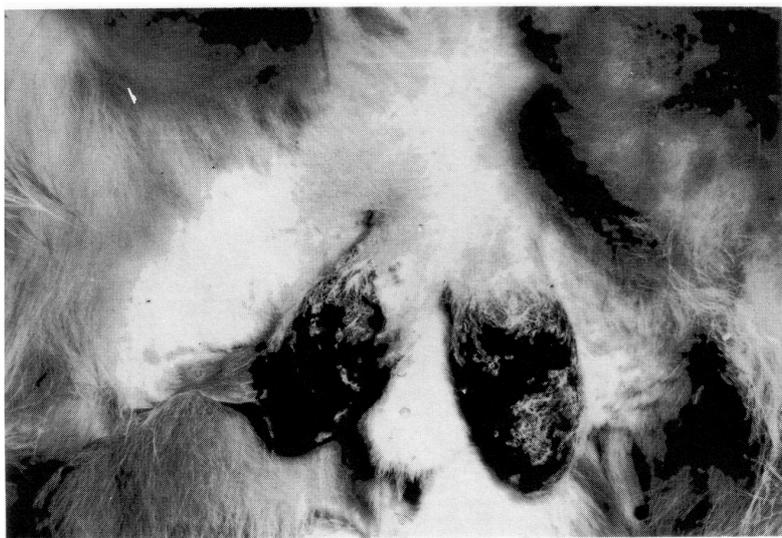


Fig. 15 - Trypanosomiase chronique du Lapin à *T. equiperdum*.  
Aspect clinique de l'atteinte testiculaire chez  
un Lapin infesté depuis 3 semaines.

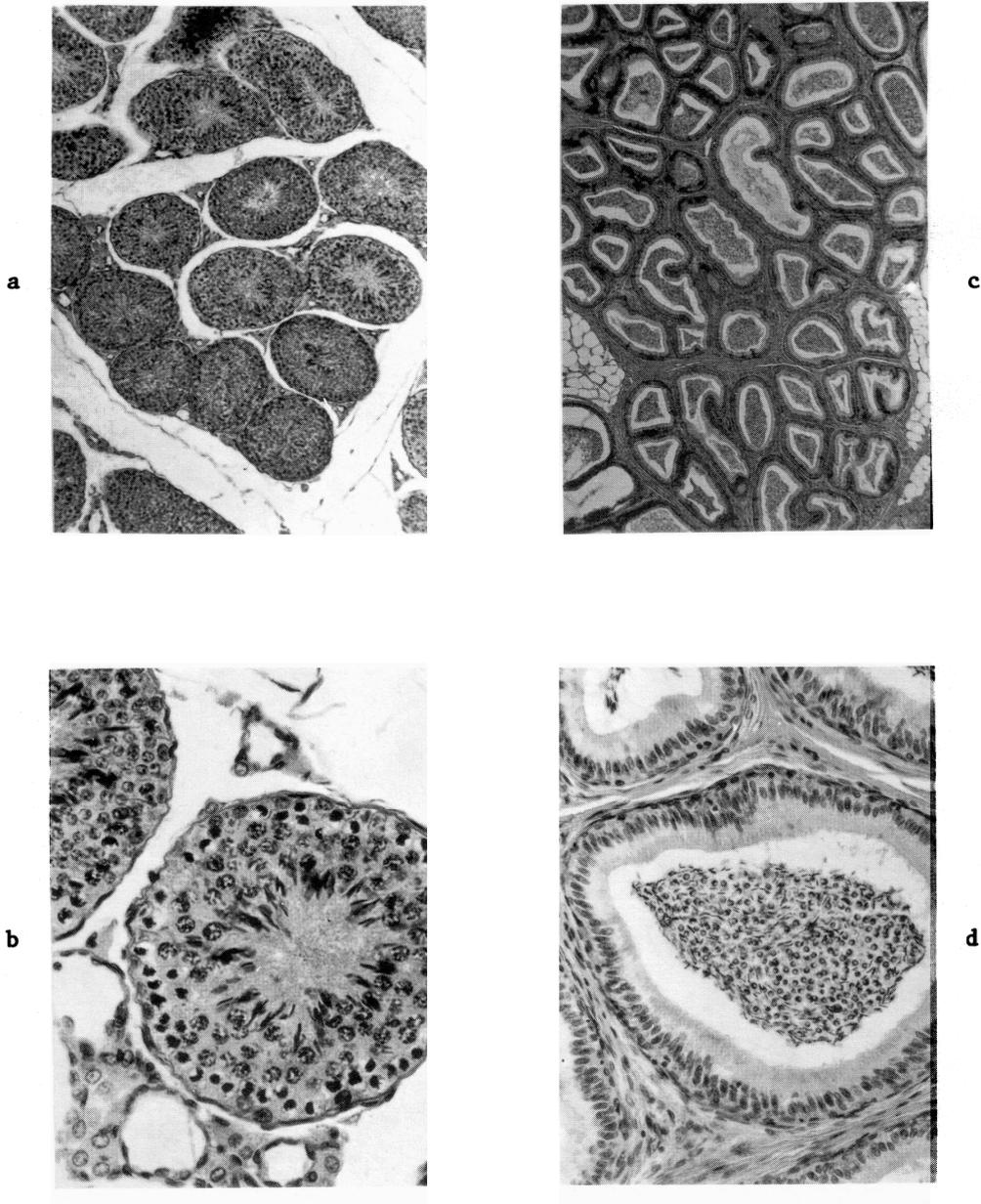


Fig. 16 - Aspect histologique de la glande testiculaire chez un Lapin normal.

- a : tubes séminifères (gross. orig. 10 x 3,2)
- b : tubes séminifères (gross. orig. 40 x 3,2)
- c : tubes épидидymaires (gross. orig. 4 x 3,2)
- d : tubes épидидymaires (gross. orig. 25 x 3,2)

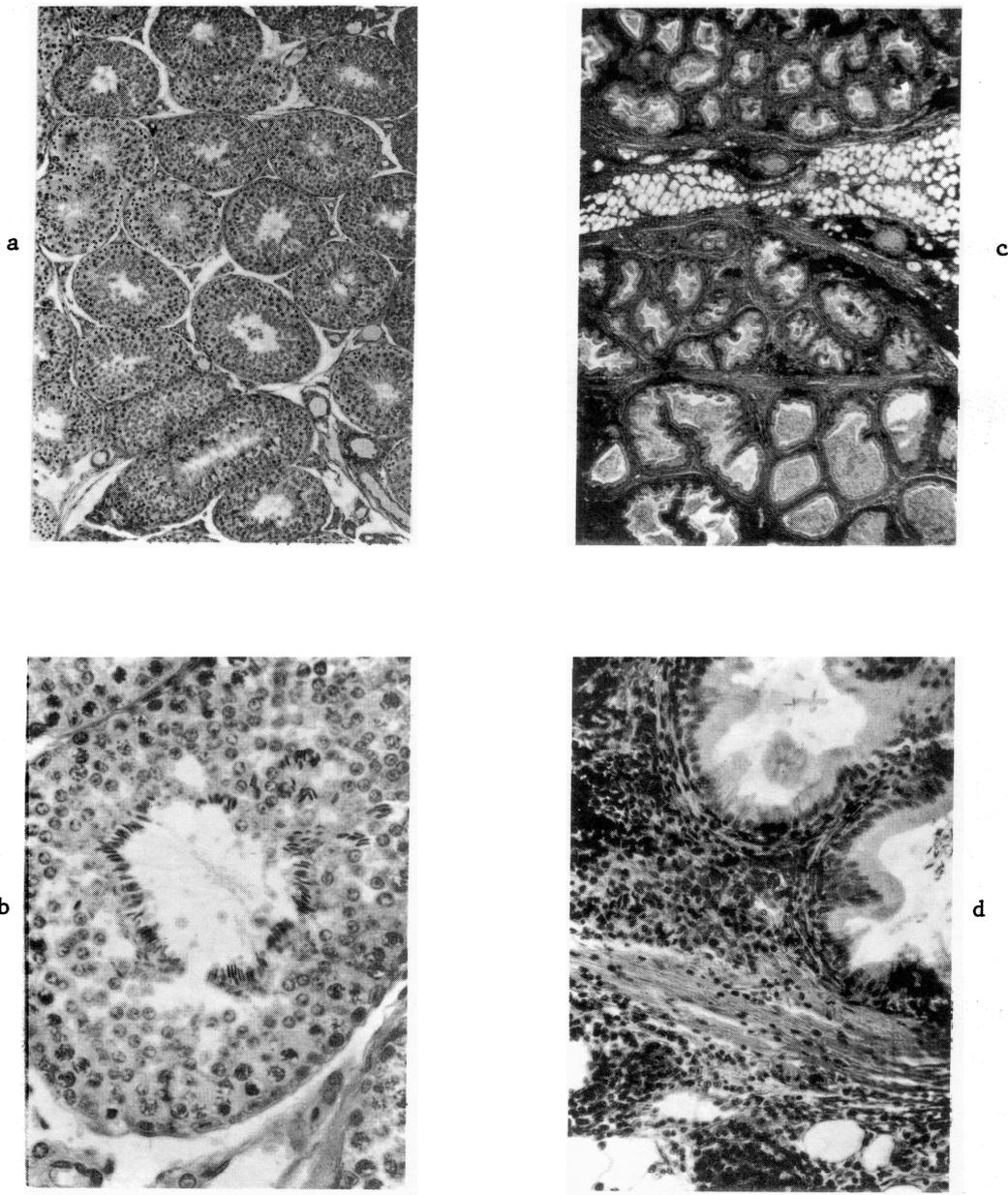


Fig. 17 - Trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*).  
Aspect histologique de la glande testiculaire chez  
un Lapin infesté depuis 8 jours.

- a : tubes séminifères (gross.orig. 10 x 3,2)
- b : tubes séminifères (gross.orig. 40 x 3,2)
- c : tubes épидидymaires (gross. orig. 4 x 3,2)
- d : tubes épидидymaires (gross. orig. 25 x 3,2)

est atrophiée, avec infiltration lymphoïde dans le tissu conjonctif inter-tubulaire. Dans l'épididyme, les tubes présentent un épithélium atrophié, cubique bas et leur lumière est vide, ne contenant pas de spermatozoïdes. On trouve de nombreux et volumineux foyers d'infiltration lymphoïde et des images de sclérose du tissu conjonctif de l'épididyme. En somme, le testicule est atteint dans ses deux fonctions gamétogène et hormonogène (Fig. 18).

~~Trente jours après l'infestation, les lésions sont encore plus~~  
accusées. Les testicules sont infiltrés de leucocytes et parsemés de plages nécrotiques. Les quelques tubes séminifères qui subsistent sont réduits au tissu sertolien et la glande interstitielle n'est plus reconnaissable. Les canaux épидидymaires sont vides et leur épithélium très aplati (Fig. 19).

#### c:- Variation antigénique

Au point de vue parasitologique, la maladie est caractérisée par une succession, dans le temps, de types antigéniques différents. Un type donné persiste pendant seulement peu de jours (2 à 3); avant sa disparition, le type suivant prend la relève, et ainsi de suite. Au moment de la relève, les 2 types se succédant peuvent coexister pendant quelques heures (CAPBERN (12) ) (Fig. 20).

Dans les expériences décrites dans le présent travail, les lapins ont été infestés avec le type de base  $E_1$ ; tout comme les autres types antigéniques, le type de base disparaît après 3 jours d'évolution.

Les types antigéniques successifs peuvent être isolés et caractérisés au niveau du sang circulant périphérique, et cela malgré la parasitémie très faible, inframicroscopique. On procède ainsi : du sang est prélevé au lapin (0,25 à 0,5 ml) et inoculé à la souris, chez laquelle les trypanosomes (peu nombreux au départ) vont se multiplier rapidement. Lorsque la population parasitaire sera suffisamment importante, on pratique l'analyse des types antigéniques à l'aide des anti-sérums agglutinants spécifiques de type. Là encore, il faut se mettre bien entendu à l'abri de la variation antigénique et on procède comme décrit ci-dessus pour l'obtention de populations clonées homogènes.

Les phénomènes immunologiques, qui sont très accusés, seront décrits plus loin.

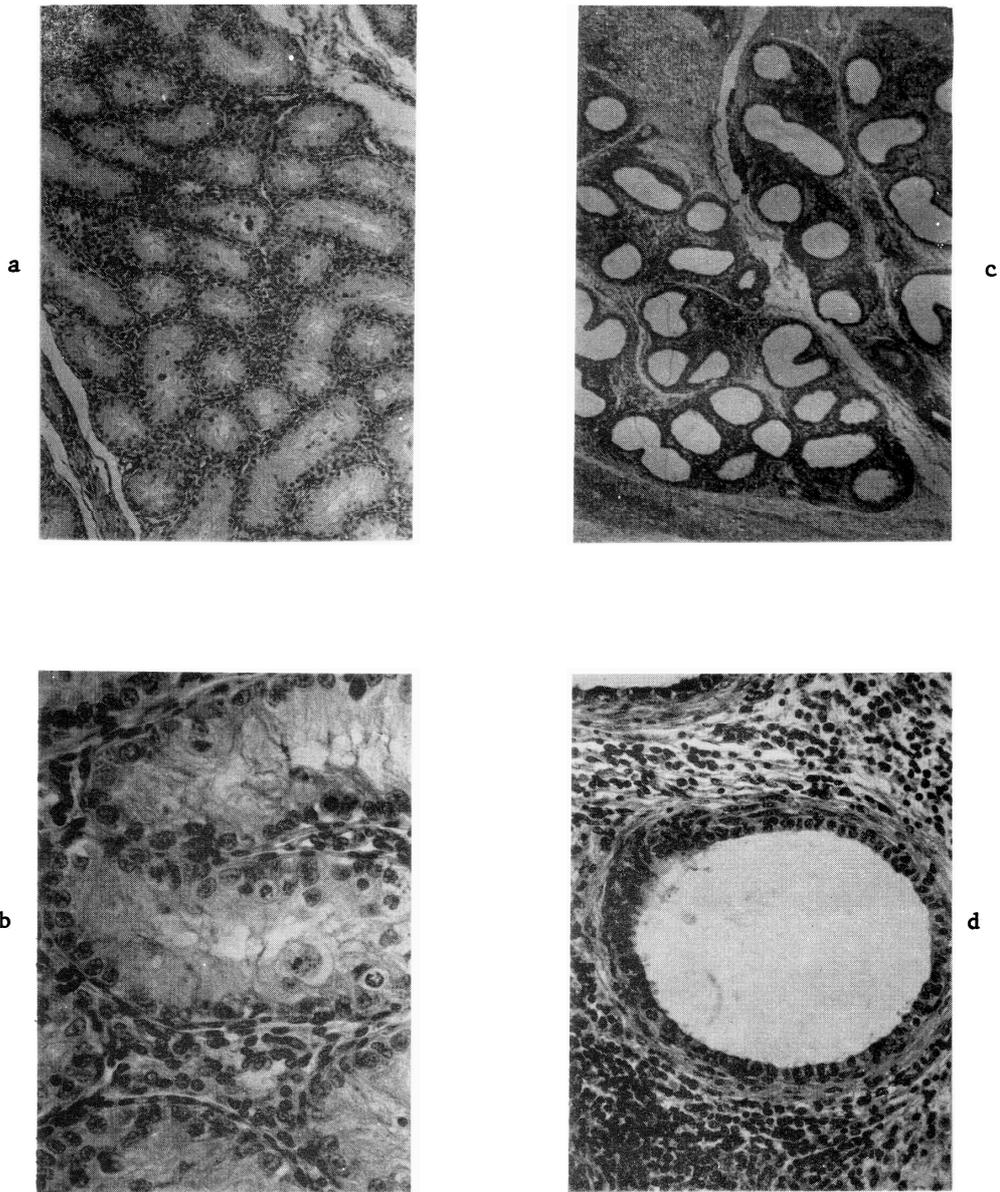


Fig. 18 - Trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*).  
 Aspect histologique de la glande testiculaire chez  
 un Lapin infesté depuis 15 jours.

- a : tubes séminifères (gross. orig. 10 x 3,2)
- b : tubes séminifères (gross. orig. 40 x 3,2)
- c : tubes épидидymaires (gross. orig. 4 x 3,2)
- d : tubes épидидymaires (gross. orig. 25 x 3,2)

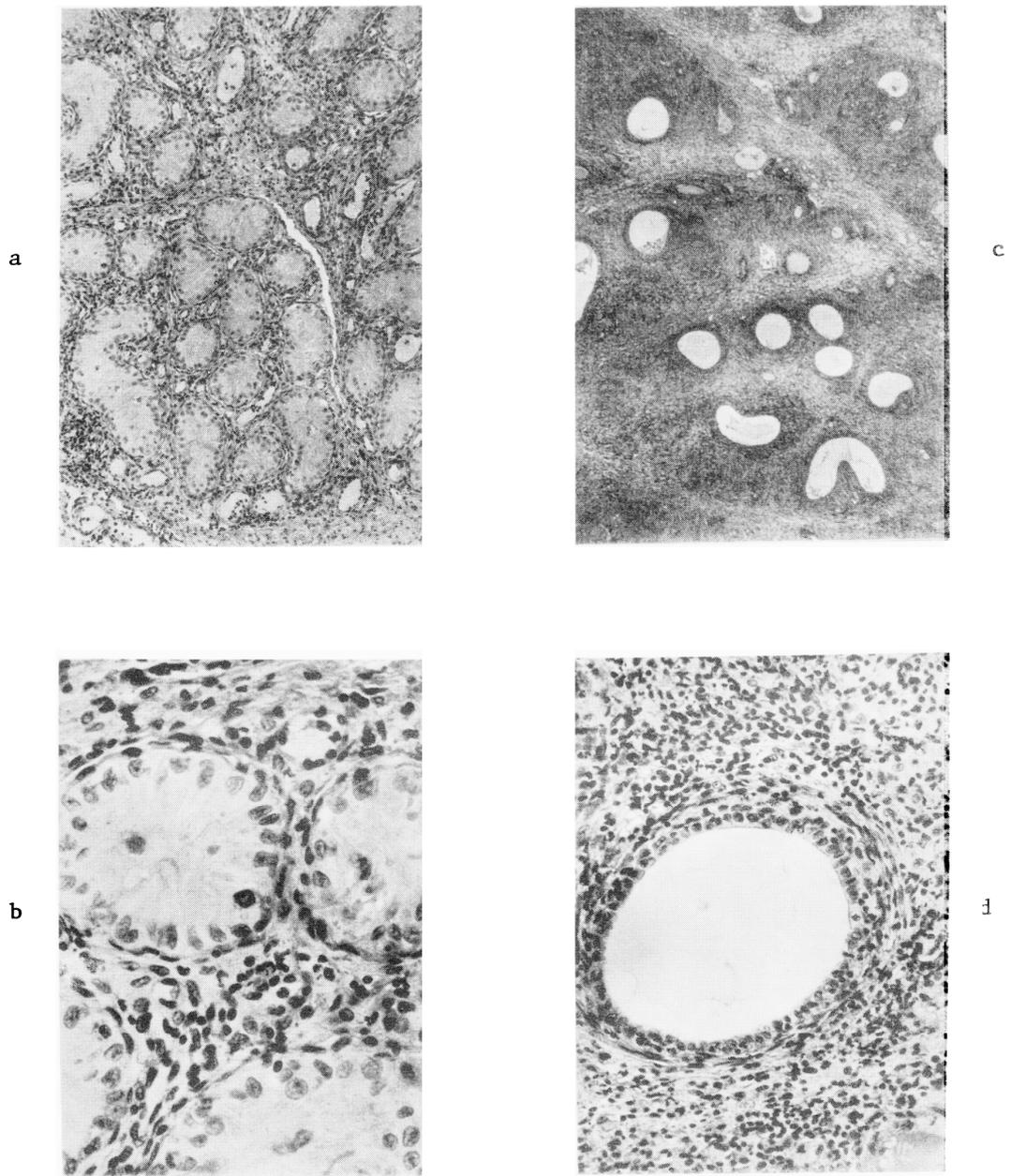


Fig. 19 - Trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*).  
Aspect histologique de la glande testiculaire chez  
un Lapin infesté depuis 30 jours.

- a : tubes séminifères (gross. orig. 10 x 3,2)
- b : tubes séminifères (gross. orig. 40 x 3,2)
- c : tubes épидидymaires (gross. orig. 4 x 3,2)
- d : tubes épидидymaires (gross. orig. 25 x 3,2)

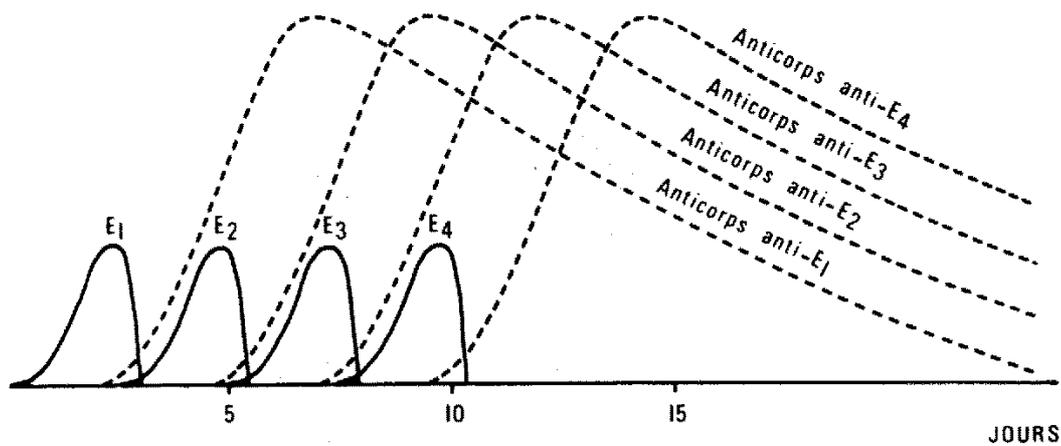


Fig. 20 - Trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*). Schéma de la variation antigénique. L'évolution des types antigéniques successifs induit l'élaboration, par l'animal infesté, d'anticorps dont certains sont spécifiques de ces types antigéniques (c'est le cas des anticorps agglutinants et de certains anticorps précipitants).

#### 4.2.2. - Trypanosomiase expérimentale de la Souris à *T. gambiense* (souche D2/1)

Pour les expériences décrites dans le présent travail, on a inoculé  $10^3$  trypanosomes à chaque souris.

La maladie expérimentale évolue schématiquement de la manière suivante (MATTERN et coll. (44) ). Une première phase, qui dure une quinzaine de jours, est caractérisée par une parasitémie modérée. Deux évolutions sont alors possible (Fig. 21) :

- type  $\alpha$  : environ 70 à 80% des souris présentent une parasitémie croissante, entraînant la mort vers le 20ème jour.
- type  $\beta$  : environ 20 à 30% des animaux survivent. La parasitémie semble négative (on ne décèle pas de parasites à l'examen microscopique). On peut parler de période de latence. Mais après un temps variable d'une souris à l'autre (et pouvant atteindre jusqu'à 7 mois) survient obligatoirement une parasitémie croissante et fatale. Aucune souris ne guérit spontanément.

Au moment de la phase pré-agonique (type  $\alpha$  ou type  $\beta$ ), la parasitémie est massive et peut dépasser  $10^6$  parasites par  $\mu$ l de sang.

Après quelques mois d'évolution du type  $\beta$ , les animaux présentent souvent des signes cliniques, en particulier une parésie des membres postérieurs et une rétention vésicale. A l'autopsie, on trouve une hypertrophie des ganglions lymphatiques, et, souvent, une splénomégalie très importante (le poids de la rate qui, normalement est inférieur à 0,1 g., peut atteindre et même dépasser 2 g.) .

Ces mêmes souris peuvent présenter, après quelques mois d'évolution de type  $\beta$ , des formes parasitaires différentes des formes flagellées trypanomastigotes. Ces formes sont de petite taille ( $1 \mu$ ), rondes ou ovalaires, sans flagelle. On les appelle formes amastigotes. Elles se localisent au niveau des plexus choroïdes du cerveau, en position extra-cellulaire (MATTERN et coll. (44) ).

On a vu que la variation antigénique était difficile à étudier au niveau de ce modèle parasitaire, en raison essentiellement de l'évolution

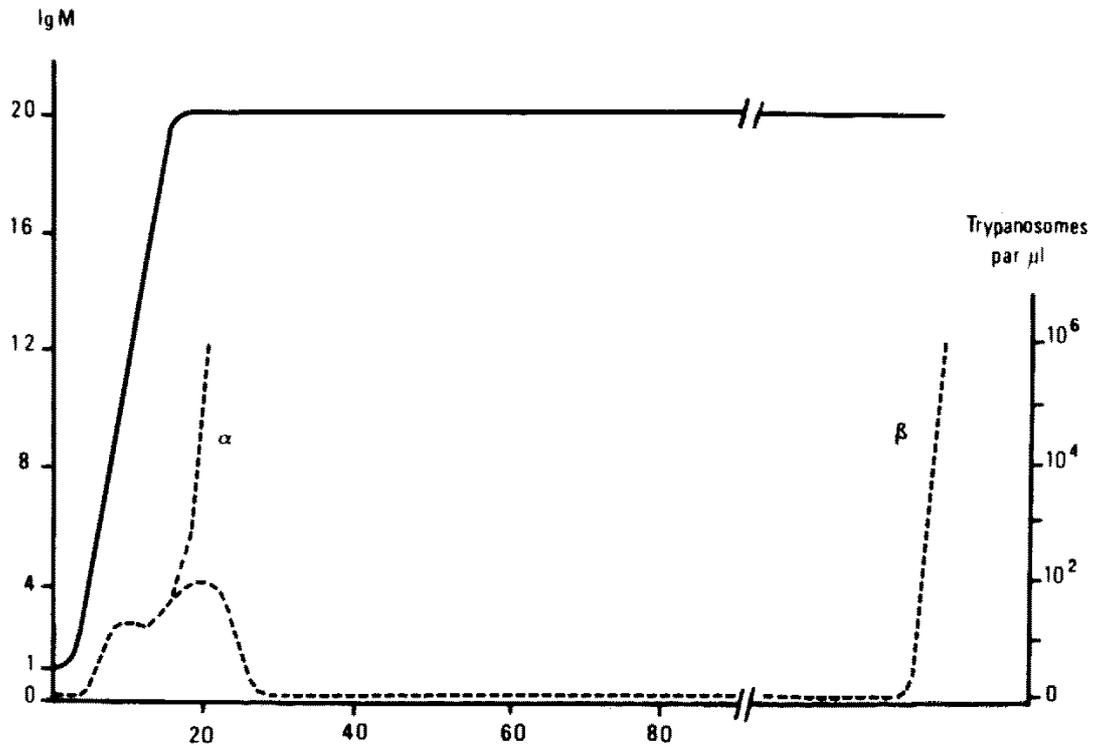


Fig. 21 - Trypanosomiase chronique de la Souris (*T. gambiense*). Schéma de l'évolution de la parasitose chez des souris infestées avec  $10^3$  trypanosomes (souche D2/1). Evolution de la parasitémie (nombre de trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang) et du taux sérique de l'IgM (exprimé en multiples du taux existant avant l'expérience). Sont indiquées également les 2 modalités possibles ( $\alpha$  et  $\beta$ ) de l'évolution de la parasitose chez la Souris.

plus lente de la parasitose.

Les phénomènes immuno-biologiques, très accusés là également, seront décrits plus loin.

#### 4.3. - Paludisme de la Souris à *P. berghei*

Pour les expériences décrites dans le présent travail, on a inoculé  $10^4$  parasites (formes endo-érythrocytaires) à chaque souris, par la voie intra-péritonéale. Durant les cinq premiers jours, les parasites ne sont pas décelables dans le sang circulant périphérique : c'est la phase de latence. Puis, la parasitémie apparaît et croît progressivement. La mort survient aux environs du 15ème jour; à ce moment, 40 à 50% des hématies sont parasitées par des formes endo-érythrocytaires (Fig. 9).

5 - METHODES D'ETUDE DES ANIMAUX HOTES INFESTES EXPERIMENTALEMENT  
=====

(IRRADIES ET NON IRRADIES)

=====

5.1. - Observation clinique

On note l'état général des animaux, leur temps de survie après l'infestation, les signes cliniques qui peuvent apparaître (fièvre, perte de poids, parésie des membres, etc...).

5.2. - Parasitémie - Négativation

La parasitémie, c'est-à-dire la présence des parasites dans le sang circulant, est un signe capital.

5.2.1. - Trypanosomiase aiguë de la Souris et du Rat à *T. equiperdum*

On a vu que la parasitémie pouvait atteindre des valeurs élevées lors de la phase pré-agonique ( $\geq 10^6$  parasites par  $\mu\text{l}$  de sang).

Deux techniques d'évaluation ont été utilisées :

a) une technique quantitative. Le sang, prélevé à la queue de l'animal, est rapidement dilué dans de l'eau physiologique dans une proportion convenable (à l'aide d'une pipette mélangeur de Potain), puis disposé dans une cellule permettant la numération (cellule de Malassez). On calcule ainsi le nombre de trypanosomes présents dans  $1\mu\text{l}$  de sang.

b) une technique semi-quantitative, mais d'une précision néanmoins suffisante pour apprécier rapidement dans bien des cas l'évolution de la parasitémie. La technique revient à compter le nombre de parasites dans le sang déposé entre lame et lamelle (examen à l'état frais) et observé au microscope en utilisant un grossissement constant (400 fois). On exprime les résultats par un nombre de croix, allant de 1 à 4 selon le nombre approximatif de parasites présents dans le champ du microscope.

Ainsi :

- + correspond à environ 1 à 5 parasites
- ++ correspondent à environ 5 à 20 parasites
- +++ correspondent à environ 20 à 100 parasites
- ++++ correspondent à environ  $\geq 100$  parasites

par champ de microscope.

La Figure 8 représente des champs de microscope correspondant aux 4 valeurs.

En comparant les 2 techniques, on trouve :

- + correspond à environ  $\leq 10^3$  parasites/ $\mu$ l
- ++ correspondent à environ  $10^4$  parasites/ $\mu$ l
- +++ correspondent à environ  $10^5$  parasites/ $\mu$ l
- ++++ correspondent à environ  $\geq 10^6$  parasites / $\mu$ l

Dans certaines circonstances, par exemple sous l'effet d'un traitement, la parasitémie peut décroître et devenir nulle; on désigne cette absence apparente de parasites à l'examen microscopique par le terme de "négativation". Cette désignation ne veut pas dire absence réelle de parasites dans le sang circulant périphérique; il est en effet possible que des parasites y soient présents, mais à une concentration trop faible pour être décelée par l'observation microscopique.

Si on veut affirmer l'absence réelle de parasites dans le sang, il faut avoir recours à des techniques plus poussées, en particulier à l'inoculation du sang suspect à des souris neuves. On sait en effet que l'unité parasitaire est infectante. Rappelons que l'on se trouve alors dans les conditions expérimentales d'inoculation d'un petit nombre de parasites et que si on désire éviter la variation antigénique, il faut prendre les précautions ci-dessus (voir, même chapitre, le paragraphe 4.1.2.).

#### 5.2.2. - Trypanosomiase chronique du Lapin à *T. equiperdum*

La parasitémie est toujours faible, inframicroscopique; pour la déceler, on doit avoir constamment recours au passage sur souris. Mais cette parasitémie existe tout au long de l'évolution de la maladie (Fig. 22).

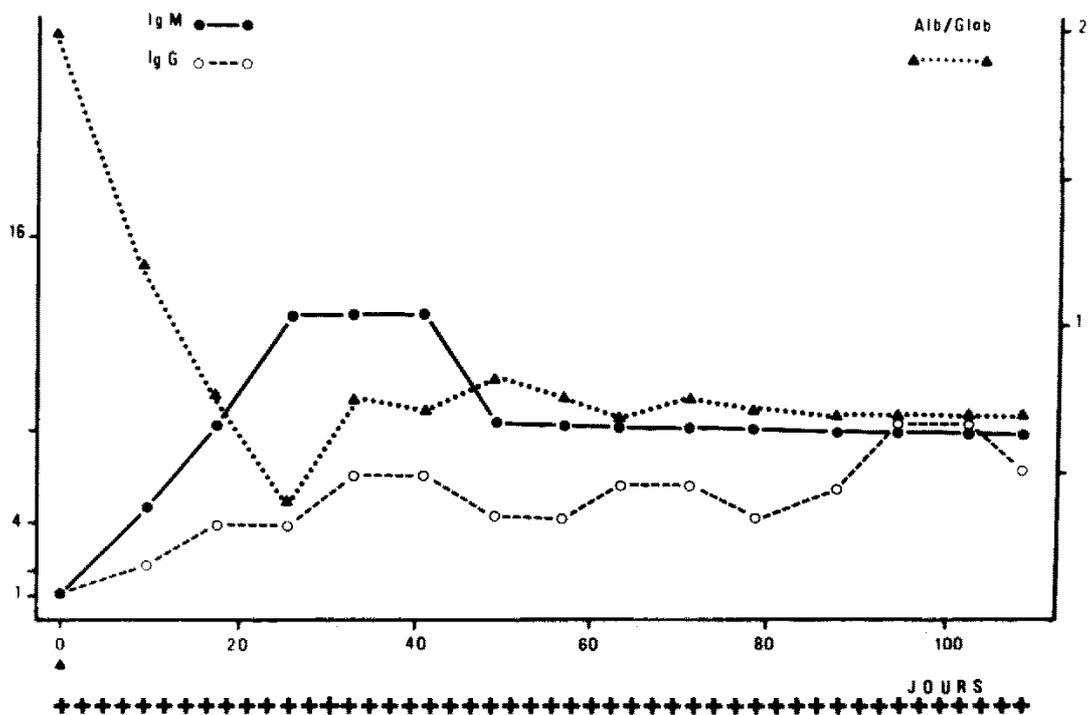


Fig. 22 - Trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*).  
 Lapin RR14 - Infesté avec  $2 \times 10^7$  trypanosomes.  
 Indication de la parasitémie. Evolution du rapport  
 albumine/globulines et des taux sériques des immunoglobulines  
 G (IgG) et M (IgM). Les taux des immunoglobulines sont  
 exprimés en multiples des taux existants avant l'infestation.  
 L'animal meurt 112 jours après l'infestation.

- ▲ infestation
- + présence de trypanosomes dans le sang

On a parlé de l'isolement et de la caractérisation des types antigéniques (voir, même chapitre, le paragraphe 4.2.1.c.).

#### 5.2.3. - Trypanosomiase chronique de la Souris à *T. gambiense*

La parasitémie peut être nulle, du moins en apparence (pendant la phase de latence), modérée (pendant les 15 premiers jours de la maladie) ou massive (à la phase pré-agonique) (Fig. 21).

L'affirmation d'une parasitémie réellement négative nécessite, là aussi, le passage du sang suspect sur des souris neuves; celles-ci devront être examinées selon des critères qui seront définis plus loin (voir, même chapitre, le paragraphe 5.3.1.d. et le paragraphe 5.4.2.) .

#### 5.2.4. - Paludisme de la Souris à *P. berghei*

La parasitémie constitue le signe majeur. Son évaluation a été pratiquée d'une manière semi-quantitative; on détermine la proportion d'hématies parasitées (par des formes endo-érythrocytaires) par rapport au nombre total des hématies et on exprime les résultats en % (Fig. 9).

### 5.3. - Etude de l'état immunitaire

C'est l'étude des réponses de nature immunologique qui surviennent chez des animaux hôtes des divers modèles parasitaires. En fait, une telle étude n'a été réalisée que pour les 3 modèles de trypanosomiasés (nous en verrons les raisons plus loin, au chapitre "RESULTATS", paragraphe 7) .

L'étude des réponses de nature immunologique a été entreprise à trois niveaux :

- répercussion de la maladie expérimentale sur la concentration, dans le plasma, de certaines immunoglobulines
- la recherche d'un état de protection immunitaire
- l'analyse de l'évolution de certains anticorps circulants anti-trypanosomes

#### 5.3.1. - Taux sériques des immunoglobulines G et M (IgG et IgM)

Nous avons étudié particulièrement ces deux immunoglobulines pour les raisons suivantes :

- l'IgG est pondéralement l'immunoglobuline normalement la plus importante (environ 10mg/ml de sérum, aussi bien chez le Lapin que chez la Souris)

- l'IgM pour une raison particulière qui sera exposée ci-dessous (voir, même chapitre, les paragraphes 5.3.1.c. et 5.3.1.d.) .

a.- Techniques de dosage des immunoglobulines G et M  
Ce sont des techniques immuno-chimiques.

On a utilisé, dans le présent travail, essentiellement une technique semi-quantitative, de double diffusion en gel de gélose (à 1,3%) (MATTERN (41) ). Elle consiste à opposer à un immunsérum mono-spécifique (anti-IgG ou anti-IgM de Lapin ou de Souris) des dilutions successives (en progression géométrique de raison 2) du sérum à tester. Des traits de précipitation apparaissent; on note leur intensité et leur position et on les compare à ceux obtenus, soit avec un pool de sérums provenant d'animaux normaux, soit (et cela a été le cas tout au long de ce travail) avec le sérum du même animal prélevé avant l'expérimentation.

Cette technique de dosage permet de dire si un taux d'IgG ou d'IgM est augmenté ou diminué d'un certain nombre de fois. La figure 23 montre le cas d'un lapin où le prélèvement B contient environ 6 fois plus d'IgM que le prélèvement A (effectué avant l'expérimentation). Bien que semi-quantitative, cette technique est sensible et très reproductible. De plus, elle est la seule possible en ce qui concerne en particulier le dosage de l'IgM de Lapin; on a en effet montré (KLEIN et coll. (29) ) que pour cette immunoglobuline, la technique de diffusion simple radiale (technique de MANCINI (40) ) était inapplicable.

Les variations des taux sériques de l'IgG et de l'IgM se répercutent, bien entendu, sur le rapport albumine/globuline du sérum. Le taux de l'albumine ayant en général tendance à varier en sens inverse, il s'ensuit que l'étude du rapport albumine/globuline peut être intéressante. La détermination de ce rapport est simple : électrophorèse par exemple sur acétate de cellulose et évaluation quantitative de l'albumine et des globulines par densitométrie après coloration (43).

b. - Evolution des immunoglobulines G et M au cours de la trypanosomiase aigüe de la Souris et du Rat à *T. equiperdum*  
La maladie évolue en général trop rapidement pour que des

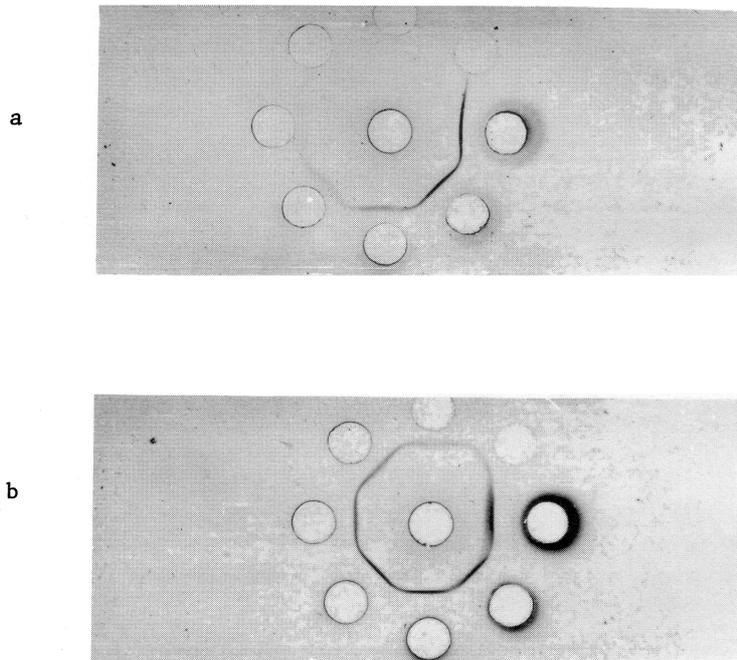


Fig. 23 - Immunoglobuline M - Principe de l'évaluation de son taux sérique. Technique semi-quantitative, par double diffusion dans un gel de gélose. Le trou central reçoit l'immun-sérum monospécifique anti-IgM (7  $\mu$ l). Les trous périphériques reçoivent 7  $\mu$ l du sérum analysé ou de ses dilutions (en progression géométrique de raison 2; le sérum pur se trouve à **droite** du trou central; les dilutions vont dans le sens des aiguilles d'une montre).  
Cas du dosage de l'IgM chez un lapin trypanosomé (*T. equiperdum*)

a : avant l'infestation

b : trois semaines après l'infestation : le taux est augmenté d'environ 6 fois par rapport aux taux précédent

modifications sensibles du taux des deux immunoglobulines puissent être décelées.

Mais lorsque l'inoculum contient très peu de parasites et que la maladie évolue pendant plus de 7 jours, on peut noter une augmentation modérée du taux sérique de l'IgM (4 à 8 fois le taux normal, c'est-à-dire celui qui existait chez le même animal avant l'infestation).

c. - Evolution des immunoglobulines G et M au cours de la trypanosomiase chronique du Lapin à *T. equiperdum*

Dans ce modèle parasitaire, les modifications sont très importantes (Fig. 22).

Le taux de l'IgG augmente chez la plupart des animaux au cours de la maladie. L'intensité de cette augmentation est cependant très variable d'un animal à l'autre (de 2 à 8 fois le taux normal); de plus, pour un même animal, elle peut subir des fluctuations importantes.

Par contre, les variations du taux de l'IgM sérique sont tout à fait stéréotypées. Chez tous les animaux, ce taux s'élève dès la première semaine de la maladie pour atteindre sa valeur maximale environ 15 jours après l'infestation (valeur qui, selon les animaux, est de l'ordre de 6 à 16 fois le taux normal). L'augmentation de l'IgM persiste tout au long de la maladie. Cette augmentation du taux sérique de l'IgM est donc un phénomène absolument constant au cours de la trypanosomiase chronique du Lapin à *T. equiperdum* (MATTERN et coll. (43) ).

Le taux sérique de l'albumine diminue rapidement, également dès les premiers jours de la maladie. Etant donné le comportement des deux immunoglobulines G et M, le rapport albumine/globuline (qui normalement se situe entre 1,5 et 2) peut atteindre des valeurs très faibles (jusqu'aux environs de 0,3) .

d. - Evolution des immunoglobulines G et M au cours de la trypanosomiase chronique de la Souris à *T. gambiense*

Dans ce modèle chronique, la valeur de l'augmentation du taux sérique de l'IgM est encore plus caractéristique, en ce sens que (Fig. 21) :

- le taux augmente dès les premiers jours après l'infestation, pour atteindre une valeur maximale (entre le 15ème et le 20ème jour), qui est ici encore plus élevé que chez le lapin trypanosomé (de 20 à 30 fois le taux normal, selon les animaux).

- ce taux persiste en plafond pendant toute la durée de la maladie (qui peut atteindre 7 mois pour une évolution de type  $\beta$ ); il n'existe pas de fléchissement pendant les périodes de latence parasitologique.

- cette augmentation du taux de l'IgM est vraiment préférentielle : en effet, le taux de l'IgG augmente sensiblement moins ou même pas du tout.

L'étude de l'évolution de l'IgM sérique constitue ainsi une méthode d'investigation de choix (simple et fidèle) dans les modèles de trypanosomiasés chroniques (trypanosomiase du Lapin à *T. equiperdum* et trypanosomiase de la Souris à *T. gambiense*). On peut dire qu'un taux sérique élevé d'IgM est caractéristique d'une trypanosomiase en évolution.

Cette constatation rejoint tout à fait celle faite au cours de la trypanosomiase humaine africaine à *T. gambiense*, affection également de longue durée (MATTEEN (41) ) .

#### 5.3.2. - Etat de protection immunitaire

On peut définir cet état de la manière suivante : il permet à un organisme hôte expérimental de résister plus ou moins, et grâce à ses moyens de défenses immunitaires, à une dose normalement infestante de trypanosomes.

Il est classique de dire que l'état de protection immunitaire est spécifique de type antigénique.

#### 5.3.3. - Etude de certains anticorps humoraux

Dans les expériences décrites dans le présent travail, on a recherché et titré quatre types d'anticorps circulants (ou plutôt quatre propriétés anticorps), à savoir des anticorps :

- agglutinants
- hémagglutinants
- précipitants
- séro-protecteurs

La recherche et le titrage de ces anticorps ont été effectués

principalement dans les modèles expérimentaux où l'agent pathogène est *Trypanosoma equiperdum*, c'est-à-dire où on peut disposer de populations parasitaires homogènes pour la fabrication des réactifs antigéniques. Les titres de ces anticorps sont toujours exprimés par l'inverse de la dernière dilution sérique qui donne encore une réaction immunologique (sérologique) positive.

Avant de décrire les techniques immunologiques permettant la recherche et le titrage de quatre anticorps humoraux, il faut dire un mot bref concernant les structures antigéniques en général de *Trypanosoma equiperdum*.

a. - Structures antigéniques (en général) de *T. equiperdum*

Certaines de ces structures apparaissent liées étroitement à l'état cellulaire (au corps parasitaire). Elles ne sont libérées dans le milieu ambiant que par la désintégration des corps parasitaires : on parle d'antigènes somatiques.

D'autres structures antigéniques, bien qu'élaborées également par les cellules parasitaires, diffusent facilement dans le milieu ambiant, aussi bien "*in vivo*" (plasma de l'animal infesté) qu' "*in vitro*" (par exemple dans une solution qui permet la survie des parasites pendant quelques heures) : on parle d'exo-antigènes. Ces antigènes sont donc présents à la fois dans les cellules parasitaires ou à leur surface et dans le milieu ambiant.

Les structures antigéniques qui correspondent aux anticorps agglutinants et aux anticorps précipitants sont, au moins partiellement, des exo-antigènes. Pour les structures antigéniques qui correspondent aux anticorps hémagglutinants et aux anticorps séro-protecteurs, la question ne semble pas encore avoir été tranchée, du moins à notre connaissance.

Tout comme les structures antigéniques agglutinantes, les structures qui correspondent aux anticorps séro-protecteurs sont spécifiques de type antigénique. Au contraire, les structures antigéniques qui entrent en jeu dans les réactions d'hémagglutination sont communes à l'ensemble des types antigéniques. Les structures antigéniques précipitantes appartiennent à deux types : les unes sont spécifiques de type antigénique, les autres sont communes à l'ensemble des types antigéniques (Tableau II).

Système immunologique	Les antigènes sont :		Les anticorps sont de nature :	
	spécifiques de type antigénique	communs à tous les types antigéniques	IgM	IgG
Agglutination	+	-	+	et +
Hémagglutination	-	+	?	+
Précipitation	+ et -	+ et -	-	+
Séro-protection	+	-	?	+

TABLEAU II - Schéma de quelques caractères des systèmes immunologiques étudiés (trypanosomioses dues à *Trypanosoma equiperdum*)

b. - Anticorps agglutinants

Dans la pratique, on a utilisé la technique de PAUTRIZEL et coll. (51, 84). Le réactif antigénique a toujours été constitué par une suspension homogène du type antigénique de base E<sub>1</sub>. On a donc en fait titré uniquement les anticorps agglutinant spécifiquement le type E<sub>1</sub>.

Rappelons que pendant la réaction, les parasites restent vivants (mobiles).

Le réactif antigénique contient  $2 \times 10^4$  parasites par  $\mu\text{l}$ . Sur une plaque de Kline, une goutte de cette suspension est mise au contact d'une goutte du sérum à analyser et de ses dilutions successives. La lecture est faite, après un temps de contact de 30 à 45 minutes en chambre humide.

c. - Anticorps hémagglutinants

Ils agglutinent des hématies (de Mouton) ayant fixé à leur surface des substances antigéniques de *Trypanosoma equiperdum*.

Ces substances antigéniques sont obtenues de la façon suivante. Des souris ou des rats sont infestés avec le type antigénique de base E<sub>1</sub>. Lorsque la parasitémie est très élevée ( $\geq 10^6$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang), le sang est récolté, mélangé à de l'héparine (1  $\mu\text{l}$  pour 1 ml de sang), puis déposé au-dessus d'une couche de DEAE-cellulose de 3cm d'épaisseur, en équilibre dans un tampon phosphate glucosé pH 8 et placée dans un filtre Büchner. Dans ces conditions, le plasma et les trypanosomes passent rapidement à travers la couche de DEAE-cellulose, alors que les éléments figurés du sang sont retenus (31).

On recueille ainsi les trypanosomes et on pratique trois lavages successifs avec la solution tampon, dans le but d'éliminer les protéines plasmatiques. Le dernier culot de centrifugation est repris par un égal volume de tampon, et cette suspension concentrée de trypanosomes est déposée dans une Hughes' Press placée à une température de - 50°C. La suspension de trypanosomes ainsi congelée est ensuite soumise à une pression de 10 T par  $\text{cm}^2$ , sous l'effet de laquelle le produit se liquéfie et est brutalement expulsé à travers une fente de 0,5 mm de large. Après le passage, le produit, qui n'est plus soumis à cette forte pression, se recongèle aussitôt. Cette liquéfaction à basse température réalise une désintégration des corps parasitaires.

Le produit de désintégration est recueilli, puis débarrassé des particules insolubles par centrifugation pendant 30 minutes à 20.000 g. Le surnageant, qui contient en solution les substances antigéniques parasitaires, constitue en fait le réactif antigénique; il contient à la fois des antigènes somatiques et des exo-antigènes. Il est ajusté à une concentration en protéines totales de 5 mg par ml.

Les protéines du réactif antigénique sont fixées sur la paroi des hématies de Mouton par une liaison chimique, grâce au glutaraldéhyde; pour cette fixation ainsi que pour l'exécution pratique de la réaction (qu'on appelle une réaction d'hémagglutination passive, les hématies ne jouant qu'un rôle passif de support), on s'est inspiré des travaux de TRIBOULEY et coll. (85) concernant des réactions du même type utilisées pour l'étude des distomatoses.

Rappelons que les anticorps hémagglutinants, tout comme les anticorps fixant le complément (52), sont communs à l'ensemble des types antigéniques d'une souche de *Trypanosoma equiperdum* (par exemple, notre souche "de l'Institut Pasteur de Paris") .

#### d. - Anticorps précipitants

On les met en évidence par des techniques d'immuno-précipitation en milieu gélifié (gel de gélose). Dans le présent travail, on a utilisé la double diffusion (type Ouchterlony) et accessoirement l'analyse immuno-électrophorétique (MATTERN (41) et MATTERN et coll. (42) ) (Fig. 24 et Fig. 25) .

Le réactif antigénique est semblable à celui décrit dans le paragraphe précédent mais plus concentré (10 mg/ml de protéines totales).

Avec un sérum déterminé, provenant d'un animal infesté, on peut obtenir plusieurs traits de précipitation (jusqu'à 5); ceci indique bien que les structures antigéniques précipitantes sont multiples et que chacune d'elles induit pour son compte la formation des anticorps correspondants chez l'organisme-hôte.

Il est donc délicat de parler de titre, car il est évident que chaque structure a son titre particulier; cette analyse semble pour le moment impossible. Dans la pratique, il a fallu s'en tenir à un titre global : la dernière dilution donnant encore un trait de précipitation immunologique.

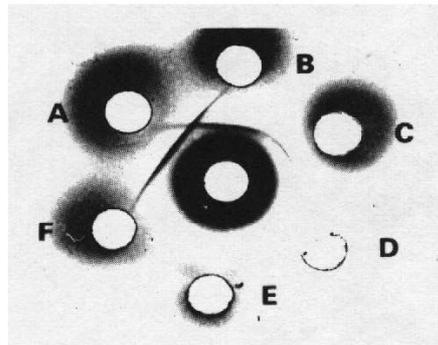


Fig. 24 - Anticorps précipitants anti-trypanosomes. Mise en évidence chez des souris atteintes de trypanosomiase chronique (*T. gambiense* - souche D2/1) par une technique de double diffusion en gel de gélose.

Le trou central reçoit 7  $\mu$ l de réactif antigénique (voir le texte). Les trous périphériques reçoivent les sérums de 6 souris. Les sérums des souris A, B, C et D contiennent des anticorps précipitants. Les sérums des souris E et F n'en contiennent pas. On note une réaction de non-identité totale entre le trait de précipitation correspondant au sérum A d'une part et les traits de précipitation correspondants aux sérums B, C et D d'autre part.

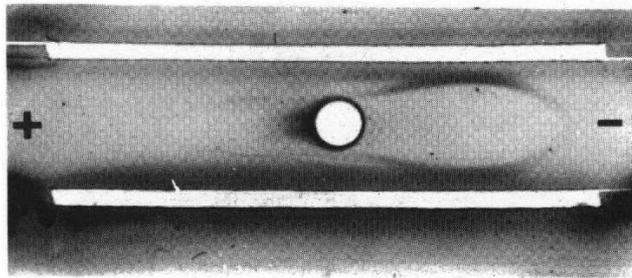


Fig. 25 - Anticorps précipitants anti-trypanosomes. Mise en évidence par analyse immuno-électrophorétique chez un lapin trypanosomé (*T. equiperdum*). Le réactif antigénique (voir le texte pour les détails expérimentaux) est soumis à la migration électrophorétique.

rigole supérieure : sérum prélevé 2 semaines après l'infestation  
rigole inférieure : sérum prélevé 5 semaines après l'infestation  
On note un arc de précipitation majeur dans la zone cathodique. Cet arc a tendance à s'affaiblir au cours de l'évolution de l'affection. Il est dû à l'exo-antigène du type antigénique de base  $E_1$  réagissant avec les anticorps correspondants.

Dans certains cas, où le sérum contient des quantités faibles d'anticorps précipitants, on n'observe apparemment aucun trait de précipitation. Il faut alors avoir recours à la technique des remplissages successifs du réactif anticorps (dès que le godet anticorps est vide, un nouveau remplissage est effectué); on a ainsi été amené à pratiquer 2 ou 3 remplissages successifs. Les titres globaux en anticorps précipitants correspondants sont donc 1/2 ou 1/3 .

e. - Anticorps séro-protecteurs

Le principe de la recherche des anticorps séro-protecteurs est le suivant (PAUTRIZEL (50) ) :

- dans un premier temps, on injecte à un organisme-test, qui est ici une souris normale, 0,50 ml de sérum (ou de ses dilutions) provenant de l'animal qui est supposé produire ces anticorps.

- dans un deuxième temps, et 24 heures plus tard, on inocule à la souris-test une dose infectante définie de trypanosomes, en l'occurrence  $2 \times 10^4$  parasites appartenant au type antigénique de base  $E_1$ . On observe l'apparition éventuelle d'une trypanosomiase chez la souris-test.

Selon la concentration en anticorps séro-protecteurs dans l'échantillon analysé, le pouvoir protecteur peut être total (il empêche le développement d'une trypanosomiase aiguë) ou partiel (la trypanosomiase se développe mais avec un certain retard par rapport à des souris témoins ayant reçu dans le premier temps du sérum normal exempt d'anticorps).

Rappelons que les anticorps séro-protecteurs sont spécifiques de type antigénique.

Dans le but de confirmer la nature immunoglobulinique du pouvoir séro-protecteur, on a été amené à pratiquer une technique d'ultra-centrifugation préparative sur gradient continu de saccharose (de 5 à 20%). L'échantillon de sérum analysé était de 0,4 ml; après la centrifugation (24.000 tours/minute, pendant 13 heures; centrifugeuse BECKMAN-SPINCO, Modèle L/L2, rotor SW-40), on a recueilli 12 fractions de 1 ml. On a recherché, au

niveau de chaque fraction :

- la pouvoir séro-protecteur
- le taux des immunoglobulines G et M

f. - Evolution des anticorps humoraux au cours de la trypanosomiase aiguë de la Souris et du Rat à *T. equiperdum*

Au cours de ces trypanosomiasés aiguës, les anticorps humoraux sont pratiquement indécélables, vraisemblablement en raison de la rapidité d'évolution de ces maladies. Tout se passe comme si les anticorps, au fur et à mesure de leur élaboration, s'unissent aux antigènes parasitaires correspondants, en particulier aux exo-antigènes présents dans le plasma des animaux rapidement hyperparasités.

g. - Evolution des anticorps humoraux au cours de la trypanosomiase chronique du Lapin à *T. equiperdum*

Les différents anticorps humoraux sont décelables, souvent à des titres élevés et tout au long de l'évolution de la maladie (Fig. 26).

Les premiers anticorps qui apparaissent sont les anticorps agglutinants dirigés contre le type antigénique de base  $E_1$  qui a servi à l'inoculation. Une semaine après l'infestation, le titre est en général déjà maximal (ce titre est de 25.000 pour le Lapin RR14 de la figure 26). Après ce maximum, le titre *décroit progressivement* et peut devenir très faible (ainsi chez le Lapin RR14, qui a vécu exceptionnellement longtemps, il a atteint le titre de 50). Cette décroissance progressive se conçoit aisément : la stimulation antigénique correspondante, c'est-à-dire l'évolution du parasite du type antigénique de base  $E_1$ , ne s'est produite que durant les tous premiers jours de la maladie, les trois premiers environ à la suite du type de base  $E_1$ , les autres types antigéniques prennent successivement le relai, comme on l'a dit ci-dessus (voir, même chapitre, le paragraphe 4.2.1.) .

Les anticorps hémagglutinants qui apparaissent un peu plus tardivement se comportent au contraire différemment : leur titre maximal (40.000 à 80.000 pour le Lapin RR14) *reste à sa valeur maximale* tout au cours de la maladie. La raison en est que les antigènes correspondants sont communs à tous les types antigéniques qui vont se succéder chez le lapin trypanosomé.

Les anticorps précipitants apparaissent encore plus tardivement et persistent également tout au long de la maladie. La raison en est que

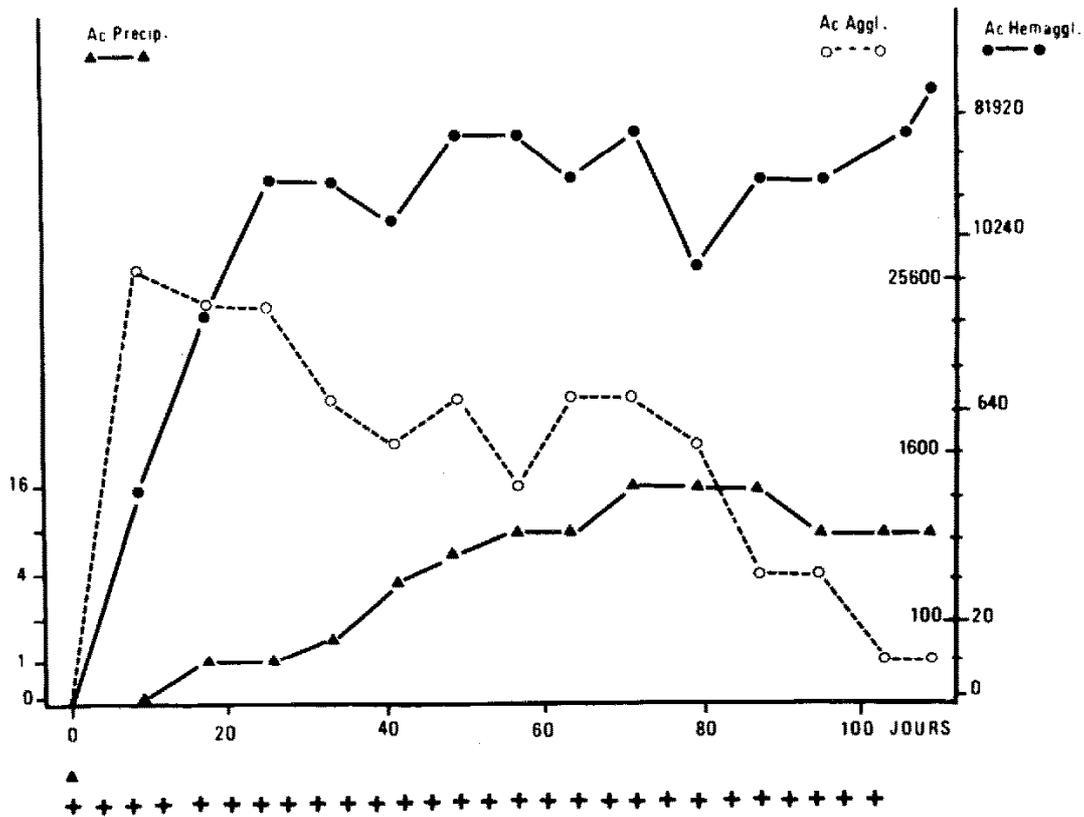


Fig. 26 - Trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*).  
 Lapin RR14. Infesté avec  $2 \times 10^7$  trypanosomes.  
 Evolution des anticorps précipitants (Ac. Précip.),  
 agglutinants (Ac. Aggl.) et hémagglutinants (Ac. Hémaggl.).  
 Leur taux est exprimé par l'inverse de la dilution donnant  
 encore une réaction positive.  
 L'animal meurt 112 jours après l'infestation.

- ▲ infestation
- + présence de trypanosomes dans le sang

certaines structures antigéniques correspondantes sont communes à tous les types antigéniques.

#### 5.4. - Critères de guérison parasitologique

La notion de guérison parasitologique est capitale en ce qui concerne la thèse présentée ici.

##### 5.4.1. - Trypanosomiasés expérimentales dues à *T. equiperdum*

On a dit plus haut (voir, même chapitre, le paragraphe 5.2.) que la négativation de la parasitémie (parasites non décelables à l'examen microscopique), ainsi que l'absence réelle de parasites dans le sang circulant (mise en évidence par inoculation du sang à analyser à des souris normales) ne sont pas des critères absolus de guérison; en effet des parasites peuvent subsister, en nombre plus ou moins important, au niveau de certains organes de l'animal-hôte (rate, foie, moelle osseuse, cerveau, etc...).

Pour affirmer la guérison parasitologique, il faut donc prélever ces divers organes et en faire des broyats qui sont inoculés à des souris neuves. L'absence de trypanosomiase chez des souris neuves peut être considérée comme un critère absolu de guérison parasitologique.

En ce qui concerne la trypanosomiase chronique du Lapin, un bon critère est également constitué par la régression, suivie de la normalisation, du taux sérique de l'IgM. La régression commence immédiatement après la disparition des parasites et la normalisation se fait en général au bout de quatre semaines environ.

##### 5.4.2. - Trypanosomiase chronique de la Souris à *T. gambiense*

Les remarques énoncées dans le paragraphe précédent sont valables là également, en particulier en ce qui concerne l'évolution du taux sérique de l'IgM.

Une remarque particulière s'impose, concernant l'inoculation de matériel suspect (sang ou broyats d'organes) à des souris normales. L'étude de la parasitémie, chez ces souris inoculées, est souvent difficile et fastidieuse, étant donné le petit nombre de parasites présents dans le matériel de passage. Il est alors très commode de surveiller le taux sérique de l'IgM de ces animaux.

## CHAPITRE II : RESULTATS

---

L'appareillage que nous avons mis au point émet un rayonnement dont les composants essentiels sont une onde HF, une onde UHF et un champ magnétique. Nous allons décrire ci-dessous les effets obtenus par l'action de ce rayonnement sur les quatre modèles parasitaires utilisés :

- Trypanosomiase aiguë de la Souris et du Rat à *Trypanosoma equiperdum*
- Trypanosomiase chronique du Lapin à *Trypanosoma equiperdum*
- Trypanosomiase chronique de la Souris à *Trypanosoma gambiense*
- Paludisme du Rat à *Plasmodium berghei*

Une remarque importante doit être formulée dès maintenant. Les résultats, que nous rapportons ici, ne constituent qu'une partie (environ le tiers) de notre expérimentation totale. Souvent, en effet, des expériences ont dû être interrompues pour des raisons indépendantes de notre volonté : des pannes au niveau de divers constituants de nos appareils. Il faut rappeler que nos deux appareils ont été construits dans des conditions financières difficiles.

Nous avons dit ci-dessus (voir chapitre "MATÉRIEL et MÉTHODES", paragraphe 1) que nous avons été amenés à concevoir et à construire successivement deux appareils N°1 et N°2 .

Aussi allons-nous commencer par présenter dans un ordre chronologique les premiers résultats obtenus successivement avec les deux appareils. Ces premiers résultats ont permis de définir et de fixer certaines conditions expérimentales grâce auxquelles la plus grande partie des expériences a pu être réalisée.

## 1 - LES PREMIERES EXPERIENCES D'IRRADIATION

=====

### 1.1. - Expériences d'irradiation avec l'appareil N°1

Elles ont pu être entreprises dès 1966.

#### a. - Caractéristiques de l'appareil

Rappelons quelques caractéristiques essentielles de cet appareil :

- champ magnétique de 600 Gs au niveau de la face de sortie de la lampe.
- puissance de l'émetteur HF : 1,2 kw
- longueur d'onde initiale du rayonnement HF : 19 m.

#### b. - Modèle parasitologique utilisé - Modalités de l'expérience

Le modèle parasitologique utilisé a été la trypanosomiase aiguë de la Souris à *Trypanosoma equiperdum* (souche "de l'Institut Pasteur de Paris").

Vingt souris ont été inoculées, chacune avec  $2 \times 10^4$  parasites par souris (type antigénique de base  $E_1$ ). Dix animaux ne sont pas traités et servent de témoins. Les dix autres sont traités pendant 5 jours, à raison d'une séance journalière de 12 heures; la première séance débute 2 heures après l'infestation. Les animaux sont déposés dans une cage en matière plastique dont le fond est distant de 12,5 cm de la face de sortie du tube à plasma.

#### c. - Résultats de l'expérience (que nous désignerons par le terme d'Expérience A) - Fig. 27 et Tableau III

- Animaux témoins : les dix animaux témoins meurent tous entre la 80ème et la 110ème heure, en présentant une parasitémie massive (courbe T de la Figure 23). L'évolution de la parasitémie, après une infestation avec  $2 \times 10^4$  trypanosomes, a été indiquée plus haut, dans la Figure 11.

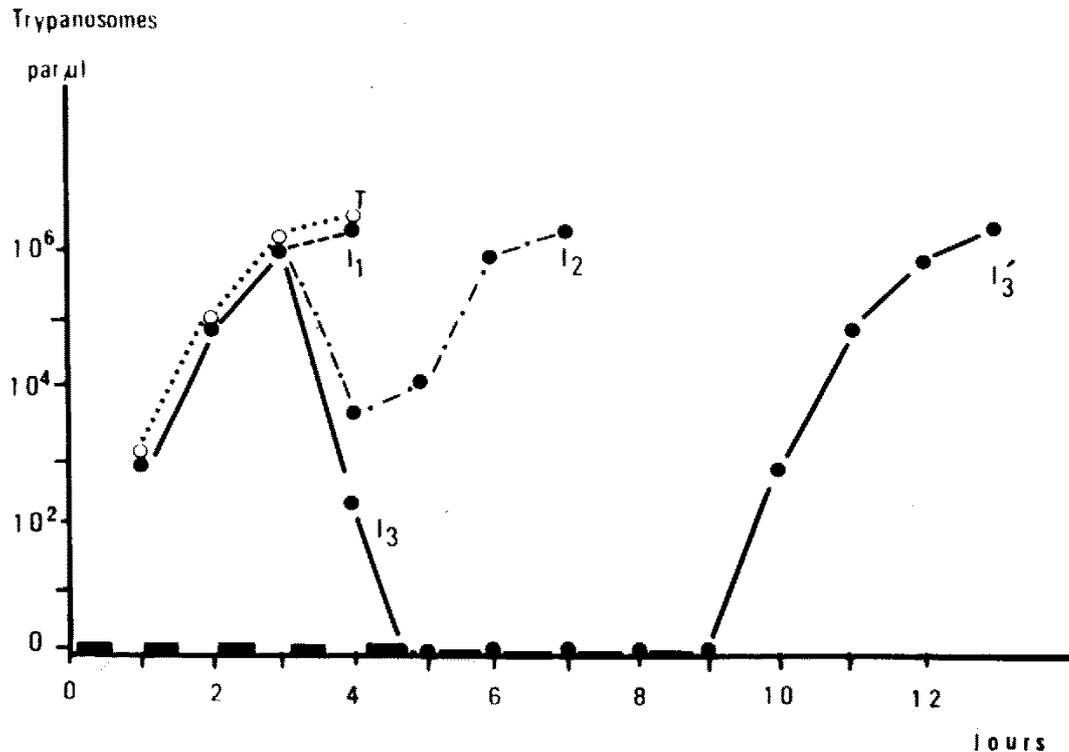


Fig. 27 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase aiguë de la Souris (*T. equiperdum*). Evolution de la parasitémie (nombre de trypanosomes par  $\mu$ l de sang) lors d'une expérience du type A (appareil N° 1 - longueur d'onde HF : 19m - irradiations quotidiennes de 12h pendant 5 jours) chez une souris témoin et chez trois souris traitées présentant des comportements différents :

- T : Souris témoin, non traitée
- I<sub>1</sub> : Souris irradiée, aucun effet sur le développement de la parasitémie
- I<sub>2</sub> : Souris irradiée, passagèrement améliorée
- I<sub>3</sub> : Souris irradiée qui se négative
- I'<sub>3</sub> : Rechute de la Souris I<sub>3</sub> environ 5 jours après la négativation
- : Séance d'irradiation (de 12h)

Nombre de jours après l'infestation

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
T	1	-	+	++	+++	*												
	2	+	++	+++	*													
	3	-	+	++	*													
	4	+	++	+++	*													
	5	+	+++	+++	*													
	6	+	++	+++	*													
	7	+	++	++	*													
	8	+	++	+++	*													
	9	-	+	++	+++	*												
	10	-	+	+++	*													
I	I <sub>1</sub>	1	-	+	++	+++	*											
		2	+	++	+++	*												
	I <sub>2</sub>	3	+	++	++	+	+	++	++	*								
		4	-	+	++	+	+	++	+++	*								
	I <sub>3</sub>	5	+	++	+++	+	+	++	++	*								
		6	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	*		
		7	+	++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	++	++	*		
		8	+	++	+++	+	-	-	-	-	+	++	+++	*				
		9	-	+	++	+	-	-	-	-	+	++	*					
		10	-	+	+++	+	-	-	-	-	-	+	+++	*				

L'intensité de la parasitémie est indiquée ainsi :

- absence de trypanosomes dans le sang
- + environ  $\leq 10^3$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang
- ++ environ  $10^4$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang
- +++ environ  $10^5$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang
- \*\*\*\* environ  $\geq 10^6$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang
- \* souris morte

TABLEAU III - Expérience de type A. Evolution de la parasitémie (évaluation semi-quantitative) chez des souris infestées avec  $2 \times 10^4$  trypanosomes. Dix souris non-traitées servent de témoins (lot T). Dix autres souris sont traitées par irradiation (lot I) et présentent 3 sortes de comportements (I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> et I<sub>3</sub>)

- Animaux irradiés : l'évolution de la parasitose chez les animaux traités peut être schématisée comme suit :

-/ chez certains animaux (2 sur un total de 10), le rayonnement ne semble pas avoir d'action (courbe  $I_1$  de la Figure 27 : la maladie évolue exactement comme chez les témoins).

-/ chez les autres animaux, l'action du rayonnement est nettement décelable. Durant les trois premiers jours de la maladie, la parasitémie croît comme chez les animaux témoins et atteint vers le 4ème jour une valeur voisine de  $10^6$  parasites par  $\mu\text{l}$  de sang. Deux sortes d'évolution de la parasitémie s'observent suivant l'animal considéré : soit une ~~diminution sensible suivie d'une reprise, entraînant la mort dans les~~ jours qui suivent (3 souris sur 10 - courbe  $I_2$  de la Figure 27), soit une diminution progressive aboutissant à la négativation qui survient aux environs de la 120ème heure (5 souris sur 10 - courbe  $I_3$  de la Figure 27).

Si on poursuit l'observation des 5 souris négativées, on constate que la maladie réapparaît à nouveau : la parasitémie redevient positive, de 4 à 7 jours après la négativation, et l'évolution se fait en quelques jours vers la mort (courbe  $I'_3$  de la Figure 27).

Lors de ces premières expériences, l'action du rayonnement s'est donc montrée extrêmement nette, mais limitée : la négativation intervient chez 50% des animaux traités; mais aucun animal n'est guéri.

Plusieurs expériences du même type ont donné des résultats analogues.

On a donc essayé de faire varier, dans les limites du possible, les caractères du rayonnement émis. En fait, le seul paramètre accessible à la variation était constitué par la longueur d'onde du rayonnement HF, cela pour une raison très simple : les moyens précaires disponibles pour construire l'appareil n'avaient pas permis de le réaliser d'une façon telle que l'on puisse faire varier, à volonté et indépendamment les uns des autres, les divers paramètres (onde HF, onde UHF et champ magnétique).

Cependant, à notre grande satisfaction, la variation de la longueur d'onde HF se montra bénéfique. Après de multiples tâtonnements, le choix se porta sur une longueur d'onde de 17 m.

Dans ces conditions nouvelles, les résultats obtenus ont été bien meilleurs. On a refait des expériences absolument identiques à la précédente : même inoculum, mêmes conditions de traitement (nous désignons cette expérience par le terme d'*Expérience du type B* - Figure 28 et Tableau IV). On constate alors les faits suivants :

- la parasitémie évolue là encore, dans un premier temps, sensiblement comme chez les animaux témoins, mais seulement jusque vers la 72ème heure.

- mais par la suite, les dix souris traitées accusent une diminution de la parasitémie qui aboutit dans tous les cas à la négativation entre la 90ème et la 110ème heure. Ainsi les souris traitées sont-elles négativées au moment même où meurent les souris témoins (courbe I de la Figure 28).

Cependant, si on poursuit l'observation des souris négativées, on constate là encore qu'entre le 7ème et le 10ème jour suivant la négativation, les animaux rechutent : les trypanosomes réapparaissent dans le sang et la parasitémie évolue en quelques jours vers la mort (courbe I' de la Figure 28).

On a, dans de rares cas (16 au total) augmenté la durée du traitement, jusqu'au 12ème et même 15ème jour; dans ces conditions, la majorité des animaux (13 sur 16) ne montraient pas de rechutes et leur étude a permis de conclure à leur guérison (57).

## 1.2. - Expériences d'irradiation avec l'appareil N°2

A la fin de l'année 1968, il nous a été possible d'utiliser l'appareil N°2 dont les caractéristiques essentielles, par rapport à l'appareil N°1, sont les suivantes :

- champ magnétique de 1200 Gs au niveau de la face de sortie du tube (appareil N°1 : 600 Gs) .

- puissance de l'émetteur HF : 2 kw (appareil N°1 : 1,2 kw)

- longueur d'onde du rayonnement HF : 17 m. (appareil N°1 : 19m puis 17m.)

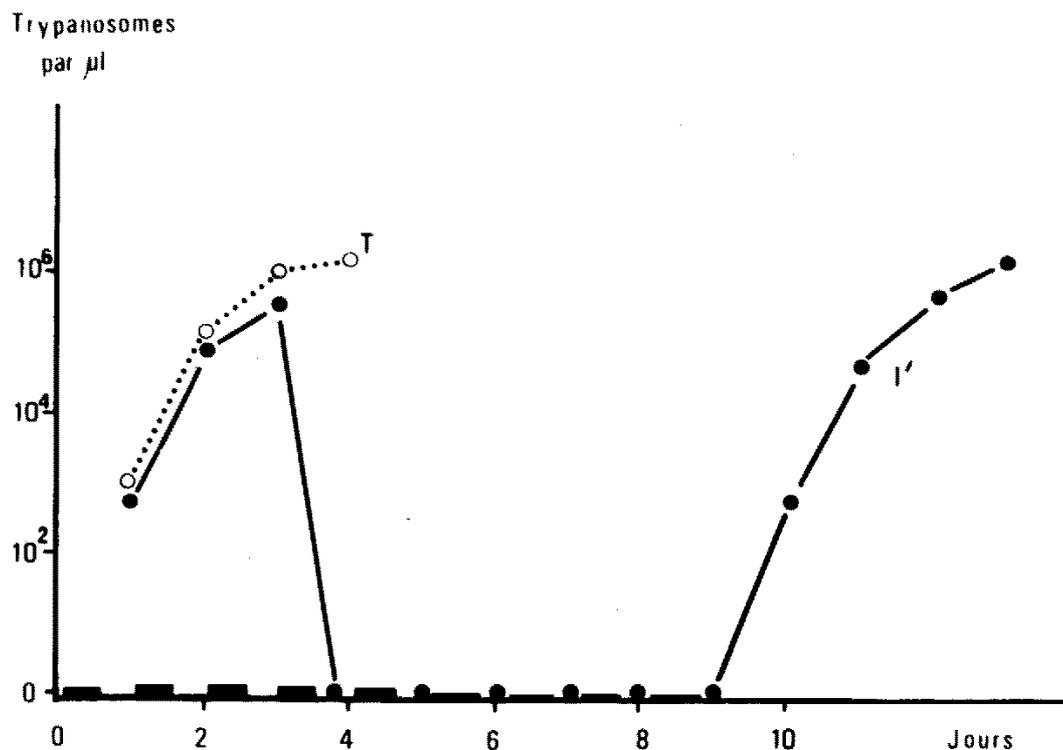


Fig. 28 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase aiguë de la Souris (*T. equiperdum*). Evolution de la parasitémie (nombre de trypanosomes par µl de sang) lors d'une expérience du type B (appareil N°1 - longueur d'onde HF : 17m - irradiations quotidiennes de 12h pendant 5 jours) chez deux Souris :

T : Souris témoin non traitée

I : Souris traitée

I' : Rechute de la souris traitée, environ 5 jours après la négativation

■ : Séance d'irradiation (de 12h)

Nombre de jours après l'infestation

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
T	1	-	++	+++	*												
	2	+	++	+++	*												
	3	-	+	+++	*												
	4	+	++	+++	*												
	5	-	+	+++	+++	*											
	6	+	++	+++	+++	*											
	7	-	++	+++	*												
	8	+	++	+++	*												
	9	+	++	+++	*												
	10	-	++	+++	*												
I	1	+	++	+++	-	-	-	-	-	+	++	+++	*				
	2	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	++	+++	*				
	3	-	+	+++	+	-	-	-	-	-	+	++	+++	*			
	4	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	*			
	5	+	++	+++	+	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	*		
	6	-	++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	*
	7	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	*
	8	+	+	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	*	
	9	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	*			
	10	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	*			

L'intensité de la parasitémie est indiquée ainsi :

- absence de trypanosomes dans le sang
- + environ  $\leq 10^3$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang
- ++ environ  $10^4$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang
- +++ environ  $10^5$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang
- ++++ environ  $\geq 10^6$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang
- \* souris morte

TABLEAU IV - Expérience de type B. Evolution de la parasitémie (évaluation semi-quantitative) chez des souris infestées avec  $2 \times 10^4$  trypanosomes. Dix souris non traitées servent de témoins (lot T). Dix autres souris sont traitées par irradiation (lot I). Toutes les souris traitées rechutent après négativation (I').

On a refait des expériences absolument identiques aux précédentes (même inoculum, mêmes conditions de traitement) mais en opérant en général sur des lots d'animaux plus importants.

Les résultats de l'une de ces expériences (que nous désignerons par le terme d'*Expérience du type C*) sont donnés par la Figure 29 et le Tableau V; ils concernent dix animaux témoins et trente animaux traités. Ces résultats sont quelque peu différents de ceux obtenus avec l'appareil N°1. En effet :

- la parasitémie chez les animaux traités augmente sensiblement comme chez les animaux témoins, mais pendant les 50 premières heures seulement.

- après la 50ème heure a lieu un décrochage; la parasitémie reste à peu près stationnaire pendant une vingtaine d'heures, puis elle décroît rapidement et on assiste à la négativation de tous les animaux (trente sur trente) entre la 80ème et la 90 ème heure après l'infestation (courbe I de la Figure 29).

L'action du rayonnement semble donc plus intense. Une autre constatation va dans ce sens. En effet, bien que chez la plupart des souris négativées (vingt et une sur un total de trente), on observe l'apparition de rechutes parasitaires 4 à 10 jours après la négativation (courbe I de la Figure 29), une minorité appréciable de souris (neuf sur trente) ne rechute pas. Les souris ont été gardées au laboratoire pendant un an; les épreuves pratiquées ensuite ont permis d'affirmer leur guérison parasitologique complète.

On peut donc dire que d'une façon globale l'action de l'appareil N°2 est plus intense que celle de l'appareil N°1, du moins sur le modèle constitué par la trypanosomiase aiguë de la Souris, pour les raisons suivantes :

- d'une part, le parasitisme s'élève à un niveau moins élevé (moins de  $10^5$  parasites par  $\mu\text{l}$  de sang) et la négativation est réalisée dans un temps moindre (80 à 90 heures).

- d'autre part, une proportion appréciable de souris s'avère définitivement guérie.

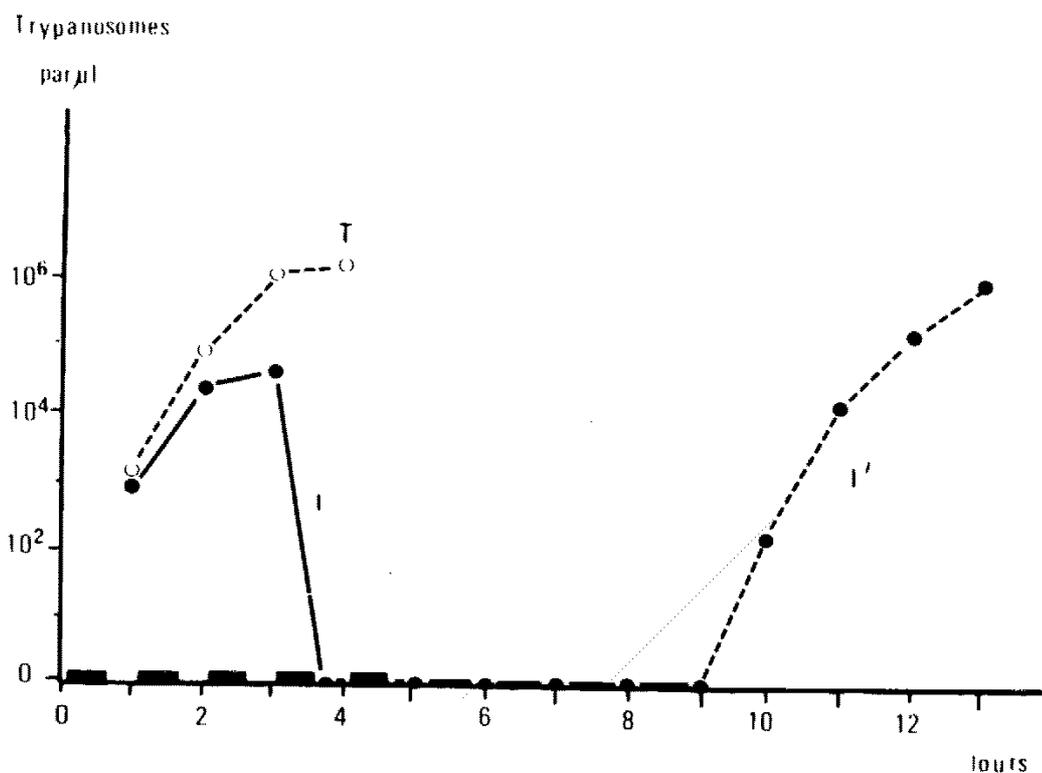


Fig. 29 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase aiguë de la Souris (*T. equiperdum*). Evolution de la parasitémie (nombre de trypanosomes par  $\mu$ l de sang) lors d'une expérience de type C (appareil N°2 - longueur d'onde HF : 17m. - irradiation quotidienne de 12h pendant 5 jours) chez deux Souris :

T : Souris témoin non traitée

I : Souris traitée

I' : Rechute éventuelle de la souris traitée

■ : Séance d'irradiation

En fait, environ 1/3 des souris traitées et négativées ne rechutent pas : elles sont définitivement guéries.

Nombre de jours après l'infestation

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
T	1	-	+	++	+++	*											
	2	+	++	+++	*												
	3	-	+	+++	*												
	4	+	++	+++	*												
	5	+	++	+++	*												
	6	+	++	+++	*												
	7	+	++	+++	*												
	8	+	++	+++	*												
	9	-	+	+++	+++	*											
	10	+	++	+++	*												
I	1	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	+	-	-	-	-	+	++	+++	*						
	5	+	+++	-	-	-	-	+	++	+++	*						
	6	-	+++	-	-	-	-	+	++	+++	*						
	7	+	+++	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	*				
	8	+	++	-	-	-	-	-	++	+++	+++	*					
	9	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	*	
	10	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	*	

L'intensité de la parasitémie est indiquée ainsi :

- absence de trypanosomes dans le sang
- + environ  $\leq 10^3$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang
- ++ environ  $10^4$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang
- +++ environ  $10^5$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang
- +++ environ  $\geq 10^6$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang
- \* souris morte

TABLEAU V - Expérience de type C. Evolution de la parasitémie (évaluation semi-quantitative) chez des souris infestées avec  $2 \times 10^4$  trypanosomes. Dix souris non-traitées servent de témoins (lot T). Trente souris sont traitées par irradiation (lot I). Environ 2/3 seulement des souris rechutent après négativation (I').

(N.B. - Pour des raisons typographiques, on a fait figurer les résultats de seulement 10 souris traitées, choisies au hasard)

On a donc adopté cet appareil N°2, et toutes les expériences relatées ci-dessous ont été réalisées avec lui.

Avant de continuer, il nous faut signaler un fait intéressant et qui sera évoqué au chapitre DISCUSSIONS.

Au cours d'*Expériences du type C*, il est assez fréquent d'observer des souris présentant une parasitémie encore importante à la fin de la 4<sup>ème</sup> séance de traitement; cette parasitémie va en régressant, donc hors de l'exposition au rayonnement, et la négativation peut alors intervenir avant le début de la 5<sup>ème</sup> séance de traitement.

Un autre fait, d'ordre pratique, doit être évoqué.

L'*Expérience C*, décrite ci-dessus, a été réalisée en fait à 5 reprises différentes. Les résultats obtenus sont sensiblement superposables; cependant des différences d'intensité existent. Ainsi :

- le décrochage, qui a lieu en général vers la 50<sup>ème</sup> heure (à la fin de la phase de multiplication intense) peut se faire parfois plus tôt, aux environs de la 40<sup>ème</sup> heure.

- en outre, la phase de parasitémie stationnaire est parfois abrégée, et même presque inexistante, mais toujours suivie d'une phase de décroissance rapide.

Dans ces conditions, la négativation parasitaire a pu être obtenue parfois avant la 80<sup>ème</sup> heure, exceptionnellement même dès le 3<sup>ème</sup> jour après l'infestation, entre la 60<sup>ème</sup> et la 72<sup>ème</sup> heure (voir plus loin l'*Expérience M* : influence de la distance des animaux par rapport à l'axe de l'appareil) .

Ces variations de l'intensité de l'action globale du rayonnement sur le modèle parasitaire sont, à notre avis, essentiellement dues au fait que certaines pièces de notre appareil peuvent se trouver dans un état d'usure plus ou moins prononcé (les lampes des émetteurs, par exemple); il faut répéter que cet état de chose est imputable aux conditions de construction de notre appareil.

Nous avons cherché à préciser les conditions expérimentales de l'action du rayonnement. Ces conditions sont, les unes liées au rayonnement lui-même, les autres au modèle parasitaire. Par un souci de clarté de l'exposé, nous commençons par les secondes.

2 - TRYPANOSOMIASE AIGUE A T. EQUIPERDUM : MISE AU POINT  
=====

DES CONDITIONS EXPERIMENTALES LIEES AU MODELE PARASITAIRE  
=====

La majeure partie de l'expérimentation a été entreprise sur la Souris, et cela pour des raisons de commodité (maniabilité des animaux, possibilité d'en traiter un grand nombre simultanément).

2.1. - Durée de l'irradiation quotidienne

Pour les 3 expériences précédentes (A, B et C), on a irradié journallement pendant 12 heures. On a essayé de réduire le temps d'exposition.

A cet effet, on a réalisé des expériences (expériences que nous désignerons par le terme d'*Expériences D*), analogues à la précédente : inoculum de  $2 \times 10^4$  parasites, traitement pendant 5 jours, mais avec des séances quotidiennes de durée variable (5, 3 et 2 heures; 3 lots de vingt souris). Les résultats sont les suivants :

- des séances quotidiennes de 5 heures donnent d'aussi bons résultats que ceux exposés pour l'expérience précédente C : toutes les souris se négativent, et environ un tiers d'entre elles s'avère définitivement guéri.

- des séances quotidiennes de 2 et 3 heures sont insuffisantes : elles n'arrivent pas à enrayer l'évolution fatale de la parasitose.

Pour la suite des expériences, la durée des séances quotidiennes a été fixée à 6 heures.

2.2. - Importance de l'inoculum

On peut se demander quelle est la limite supérieure de l'action du rayonnement, en d'autres termes quelle est la quantité maximale de trypanosomes dont l'inoculation à la Souris n'aboutit pas, grâce au rayonnement, à une parasitose mortelle.

A cet effet, on a réalisé des expériences (que nous désignons par le terme d'Expérience E - Fig. 30) au cours desquelles les souris ont été infestées avec des doses plus importantes de trypanosomes ( $2 \times 10^5$  et  $2 \times 10^6$ ) et traitées pendant 5 jours (séances quotidiennes de 6 heures, la première séance débutant 2 heures après l'infestation).

Pour un inoculum de  $2 \times 10^5$  trypanosomes, on constate que les souris non traitées meurent en 70-80 heures, et que les souris traitées accusent pendant 50 heures une phase de parasitémie croissante analogue à celle des témoins; puis la parasitémie reste en plateau pendant environ 20 heures, puis décroît rapidement; la négativation intervient vers la 120ème heure.

Par contre, pour un inoculum de  $2 \times 10^6$  trypanosomes, l'action du rayonnement est incapable d'enrayer l'évolution de la parasitose aiguë mortelle; on observe simplement un retard d'une dizaine d'heures.

La limite supérieure de l'action du rayonnement semble donc être, dans les conditions actuelles, la suivante : la possibilité d'enrayer et même de guérir une trypanosomiase aiguë chez une souris ayant été infestée avec  $2 \times 10^5$  trypanosomes, dose qui provoque irrémédiablement la mort de toutes les souris en 80 à 90 heures.

### 2.3. - Importance du moment du début du traitement

Il s'agit en somme d'étudier l'action du rayonnement sur la trypanosomiase aiguë de la Souris ayant évolué depuis un certain temps.

A cet effet, sont réalisées des expériences semblables à celles décrites ci-dessus (voir, même chapitre, paragraphe 2.1.) mais la première des 5 séances d'irradiation a lieu respectivement après 24, 48 et 72 heures d'évolution de la maladie (nous désignons ces expériences par le terme d'Expériences F - Fig. 31).

Les souris dont le traitement débute 24 heures après l'infestation se comportent sensiblement comme des souris traitées immédiatement. Simplement, le décrochage, par rapport à l'évolution de la parasitémie chez les souris témoins, se fait un peu plus tardivement, vers la 60ème heure; ainsi la parasitémie atteint un maximum légèrement plus important;

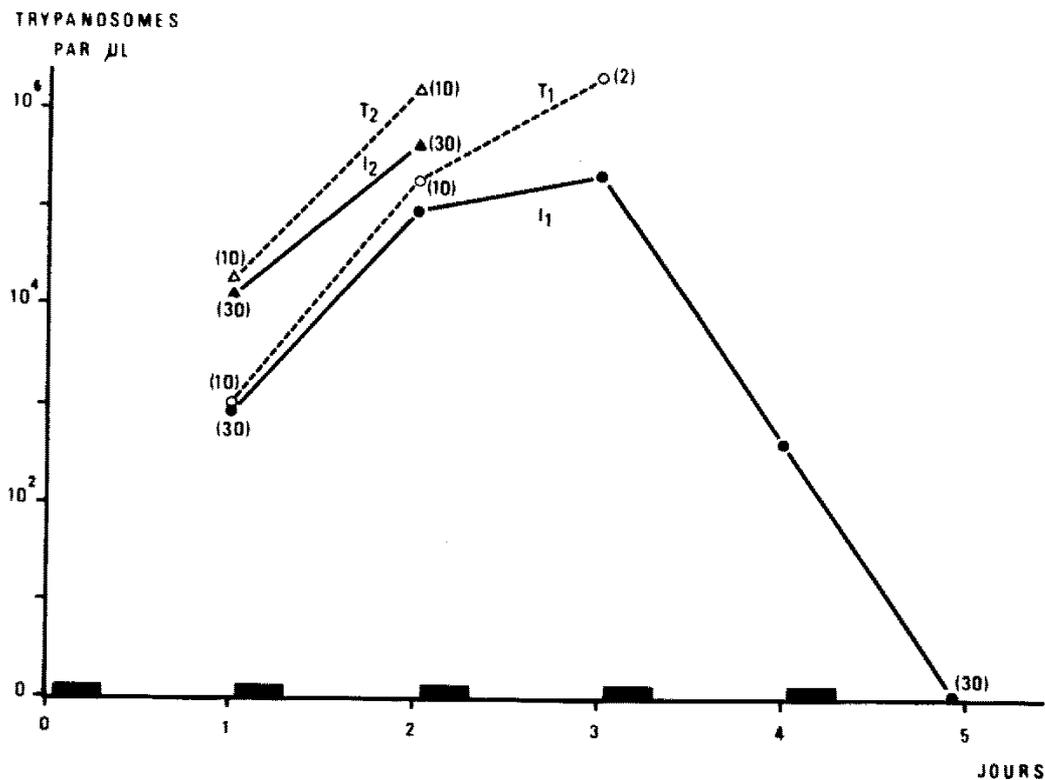


Fig. 30 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase aiguë de la Souris (*T. equiperdum*).  
Influence de la dose infestante - Expérience E .  
Evolution de la parasitémie (nombre de trypanosomes par µl de sang) chez 4 lots de Souris :

T <sub>1</sub>	: Dix souris témoins	Y	
I <sub>1</sub>	: Trente souris irradiées	Y	infestées avec 2x10 <sup>5</sup> trypanosomes
T <sub>2</sub>	: Dix souris témoins	Y	
I <sub>2</sub>	: Trente souris irradiées	Y	infestées avec 2x10 <sup>6</sup> trypanosomes

Entre parenthèses figurent le nombre de souris vivantes lors des examens, au début et en fin d'expérience .

■: une séance d'irradiation (de 6h)

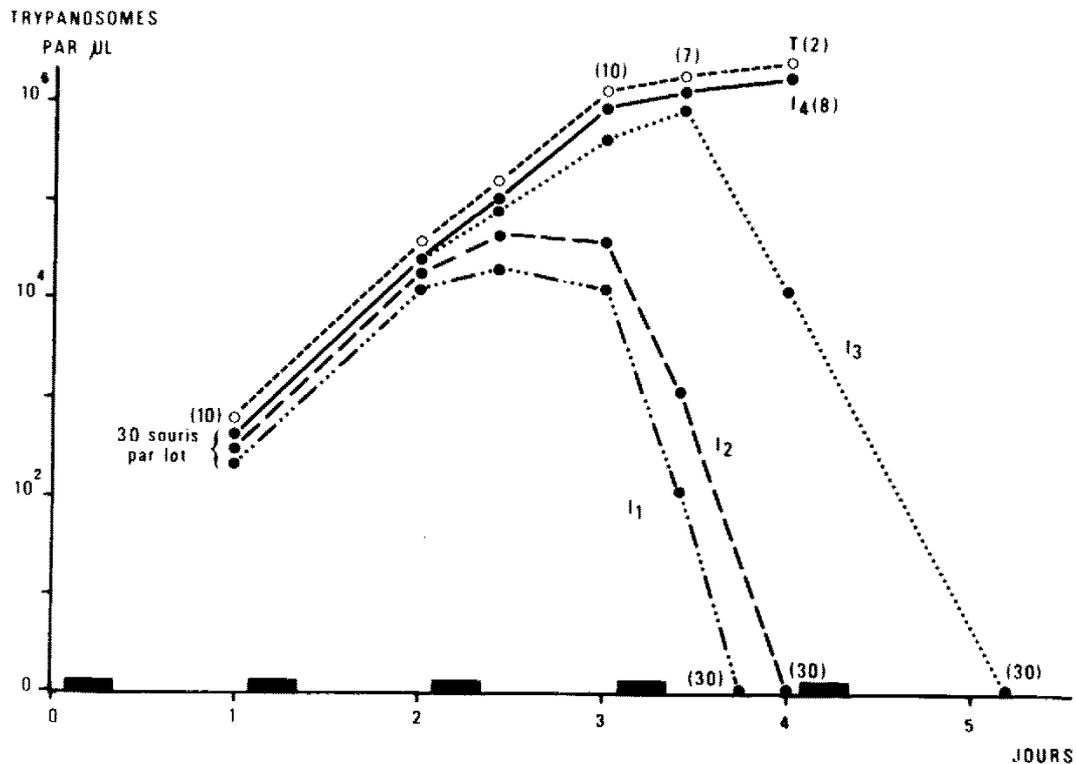


Fig. 31 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase aigüe de la Souris (*T. equiperdum*).  
Influence du moment du début du traitement. Expérience F.  
Evolution de la parasitémie (nombre de trypanosomes par µl de sang) chez 5 lots de souris infestées avec  $2 \times 10^4$  parasites (lots T, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub> et I<sub>4</sub>).  
Appareil N°2. Séances quotidiennes d'irradiation de 6h.

T : 10 souris témoin non traitées

I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub> et I<sub>4</sub> : quatre lots de 30 souris traitées. Les premières séances d'irradiation débutent respectivement 2, 24, 48 et 72 heures après l'infestation.

Entre parenthèses figurent le nombre de souris vivantes lors des examens en début d'expérience, en fin d'expérience, et en cours d'expérience en cas de variation.

■ séance d'irradiation (de 6h)

mais la négativation se fait également entre la 90ème et la 110ème heure.

Chez les souris mises en traitement 48 heures après leur infestation, on a noté des résultats quelque peu différents selon les expériences. Dans certaines expériences, la totalité des souris arrivaient à se débarrasser de leur parasitose; dans d'autres expériences, seulement 70% des animaux survivent. Dans tous les cas, le décrochage et la négativation se font plus tardivement (vers la 70ème heure d'une part, entre la 120ème et la 130ème heure d'autre part).

Chez les souris mises en traitement 72 heures après l'infestation, la parasitémie est de l'ordre de  $10^6$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang au moment où commence le traitement : l'évolution se fait vers la mort, sensiblement comme chez les témoins.

On a dit au chapitre précédent (voir le paragraphe 4.1.1.) que lorsque la Souris meurt de trypanosomiase aiguë à *Trypanosoma equiperdum*, sa rate était augmentée de volume : elle pèse fréquemment 250 à 300 mg (alors que le poids normal se situe à moins de 100 mg). Aussi avons-nous voulu étudier l'action du rayonnement sur des souris privées de leur rate.

#### 2.4. - Influence de la splénectomie préalable

Nous avons pratiqué une expérience (que nous désignons par le terme d'Expérience G) comportant 3 lots de quinze souris : 1 lot de souris témoins non traitées, 1 lot de souris normales traitées et 1 lot de souris traitées splénectomisées 24 heures avant l'infestation. Les autres conditions sont les mêmes que celles des expériences décrites ci-dessus (voir Expériences type D). Les résultats ne montrent pas de différences sensibles entre l'action du rayonnement, que les souris possèdent ou ne possèdent pas de rate.

#### 2.5. - Comportement de la souche dyskinétoplastique (Bethesda) de *Trypanosoma equiperdum*

Toutes les expériences décrites ci-dessus (Expériences de type A, B, C, D, E, F et G) ont été réalisées avec la souche dite "de l'Institut Pasteur de Paris". On peut, bien entendu, se demander si une

autre souche de *Trypanosoma equiperdum* pourrait avoir son évolution interrompue chez la Souris sous l'action du rayonnement émis par notre appareil. Aussi a-t-on réalisé des expériences avec la souche dyskinétoplastique (expériences que nous désignons par le terme d'*Expériences H*).

Les résultats montrent que l'action du rayonnement sur la trypanosomiase aiguë de la Souris, due à cette souche dyskinétoplastique, est exactement la même que celle décrite pour la trypanosomiase aiguë de la Souris due à la souche dite "*de l'Institut Pasteur de Paris*".

#### 2.6. - Influence de la durée totale du traitement (nombre de séances d'irradiation)

Toutes les expériences décrites jusqu'ici comportaient un traitement de 5 jours, avec une séance quotidienne d'irradiation de 12 ou 6 heures. Cette durée de 5 jours avait été initialement choisie pour des motifs en quelque sorte économiques : le coût de la consommation en courant électrique. Mais par la suite, on s'est demandé, s'il y avait intérêt à augmenter cette durée de traitement.

On a ainsi doublé la durée totale du traitement : 10 jours au lieu de 5. Les autres conditions restent les mêmes (inoculum de  $2 \times 10^4$  parasites; durée des séances quotidiennes d'irradiation de 6 heures, la première séance débutant 2 heures après l'infestation).

Quatre expériences de ce type ont été réalisées, chacune comprenant trente souris traitées et dix souris témoins non traitées. Nous les désignons par le terme d'*Expérience du type I*.

On peut comparer les résultats de ces expériences avec ceux obtenus lors des expériences du type *D* qui ne comportaient elles que 5 séances d'irradiation de 6 heures.

On constate alors qu'un traitement de 10 jours augmente considérablement la proportion des souris définitivement guéries : celle-atteignait, selon les expériences, de 90 à 100% des animaux (au lieu d'environ 30% lors des *Expériences du type D*).

Enfin, parmi les souris guéries, un comportement assez inattendu a été observé dans quelques rares cas (trois souris sur un

total de cent vingt traitées lors des *Expériences du type I*). Le 8ème jour après la négativation survient une rechute, mais la parasitémie reste modérée (environ  $10^3$  à  $10^4$  parasites par  $\mu\text{l}$  de sang) et surtout elle est éphémère : elle disparaît après 2 à 3 jours d'évolution; la guérison définitive a ensuite lieu.

## 2.7. - Résultats obtenus chez le Rat

De nombreuses expériences de type *D* (traitement de 5 jours, avec une irradiation quotidienne de 6 heures) et de type *I* (traitement de 10 jours avec une irradiation quotidienne de 6 heures) ont été réalisées chez le Rat; l'inoculum cependant a été de  $2 \times 10^5$  parasites : en effet, un tel inoculum provoque, chez le rat non traité, une parasitose évoluant sensiblement comme celle obtenue chez la souris inoculée avec  $2 \times 10^4$  parasites (Figure 11).

Les résultats obtenus au cours de ces expériences sont absolument semblables à ceux décrits ci-dessus chez la souris.

On verra plus loin (voir ci-dessous le paragraphe 4.3.4.) que les rats, guéris par le rayonnement, ont permis la mise en évidence d'un phénomène intéressant pour la compréhension du mécanisme d'action du rayonnement : la facilitation thérapeutique.

Il nous faut parler à présent d'une condition expérimentale importante, condition qui intéresse encore le modèle parasitaire mais qui fait en quelque sorte la transition avec les paragraphes suivants (les conditions expérimentales liées au rayonnement).

## 2.8. - Température corporelle des souris traitées par le rayonnement

Lors du fonctionnement de l'appareil, la température ambiante ne s'élève pas au niveau de la zone active du rayonnement émis et reste égale à la température du laboratoire (22 à 25° C) .

Des souris normales ont été exposées au rayonnement dans les conditions habituelles d'irradiation (distance de 12,5 cm par rapport à la face de sortie du tube à plasma; durée d'irradiation de 6 heures).

La température corporelle, qui avant l'exposition est de l'ordre de  $37,2^{\circ} \text{C} \pm 0,4$ , n'accuse aucune élévation.

Une telle constatation était d'ailleurs prévisible en considérant l'énergie rayonnée par notre appareil, en particulier l'énergie correspondant à l'onde UHF 9,4 GHz. Pour cette onde, la densité d'énergie moyenne  $W_m$  est en effet égale à  $10 \mu\text{W}$  par  $\text{cm}^2$  (voir ci-dessus, le paragraphe 1.2.). Il est inutile de préciser qu'une puissance moyenne aussi faible ne peut donner lieu à aucun effet thermique global au niveau des animaux irradiés.

Nous avons cependant voulu déterminer si une élévation de la température corporelle pouvait avoir une action sur l'évolution de la trypanosomiase aiguë de la Souris à *Trypanosoma equiperdum* (expérience que nous désignons par le terme d'*Expérience J*). On a, à cet effet, placé des souris infestées avec  $2 \times 10^4$  parasites, 6 heures par jour, à des températures ambiantes respectivement de  $27^{\circ} \text{C}$  et de  $37^{\circ} \text{C}$ . A  $37^{\circ} \text{C}$ , la température corporelle des souris s'élève de  $1,5^{\circ} \text{C}$  environ au-dessus de la normale.

Malgré cette hyperthermie, provoquée en quelque sorte passivement, on ne constate aucun changement dans l'évolution de la trypanosomiase aiguë; les souris meurent aux environs de la 90ème heure, parfois même légèrement plus tôt. Il n'existe donc aucune tendance au freinage de la parasitose.

### 3 - TRYPANOSOMIASE AIGUE A T. EQUIPERDUM : MISE AU POINT

=====

#### DES CONDITIONS EXPERIMENTALES LIEES AU RAYONNEMENT

=====

A la suite des expériences précédentes, les conditions expérimentales, liées au modèle parasitaire, ont pu être précisées. Nous avons dès lors décidé de pratiquer des expériences du type D ou I (inoculum de  $2 \times 10^4$  parasites; traitement de 5 ou 10 jours, avec une séance d'irradiation quotidienne de 6 heures, la première séance débutant 2 heures après l'inoculation) pour étudier quelques conditions expérimentales liées au rayonnement de l'appareil N°2. Ici encore, il nous faut dire que nous n'avons pu réaliser toutes les expériences désirées, l'appareil n'étant pas toujours en état de fonctionner.

On a, dans un premier temps, cherché à étudier l'influence de certains paramètres du rayonnement émis. On a dû pour cela réaliser des expériences au cours desquelles les animaux se trouvent à des distances variables, aussi bien par rapport à la face de sortie du tube à plasma que par rapport à son axe.

#### 3.1. - Influence de la distance par rapport à la face de sortie du tube à plasma

Cette expérience revient à étudier l'action du rayonnement émis suivant la variation de certains paramètres le long de l'axe du tube (champ magnétique et rayonnement UHF).

A cet effet, fut réalisée une expérience (que nous désignons par le terme d'*Expérience K*) sur 3 lots de vingt souris inoculées dans les conditions habituelles ( $2 \times 10^4$  parasites), le premier lot non traité sert de témoin; les deux autres lots sont traités, l'un à la distance habituelle de 12,5 cm (voir les *Expériences A et suivantes*) et l'autre à une distance double, soit 25 cm.

Les souris témoins meurent dans les conditions habituelles.

On constate que l'action du rayonnement est la même dans les 2 lots de souris traitées : la négativation et la guérison se font comme au cours des expériences des types C et D .

Or il faut signaler qu'à la distance de 25cm, le champ magnétique n'est plus que de 700 Gs environ, alors qu'il est d'environ 850 Gs à la distance de 12,5 cm (Fig. 6). Il serait nécessaire de refaire de telles expériences dans le but de déterminer la distance limite au-delà de laquelle l'action du rayonnement subit un fléchissement.

### 3.2. - Influence de la distance par rapport à l'axe du tube à plasma

Cela revient à étudier l'action du rayonnement dans un plan perpendiculaire à l'axe du tube, mais à des distances variées par rapport à cet axe. Dans ces conditions, deux paramètres essentiels du rayonnement varient :

- le champ magnétique, qui est constant jusqu'à environ 8cm de l'axe du tube et qui décroît ensuite rapidement.

- le champ UHF, qui au contraire décroît rapidement dès que l'on s'éloigne de l'axe du tube.

On a indiqué ci-dessus (voir dans le chapitre MATERIEL et METHODES, paragraphes 1.2 et 1.4.) les valeurs de ces deux paramètres, recueillies dans un plan perpendiculaire à l'axe du tube à plasma et distant de sa face de sortie respectivement de 4,2 cm pour le champ magnétique (Fig. 7) et de 5cm pour le champ UHF (Fig. 4).

Rappelons que dans nos expériences, les souris se trouvent dans un plan distant de 12,5 cm.

Rappelons également que le rayon de la face de sortie circulaire du tube est de 12cm.

Au cours de nombreuses expériences, on avait remarqué que la zone active du rayonnement avait, à 12,5 cm de distance du tube, un rayon d'environ 20cm; la zone active semblait donc avoir une surface sensiblement plus grande que la face de sortie du tube à plasma. Cette constatation nous avait permis de pouvoir traiter simultanément jusqu'à quarante animaux. Mais, fait important, les animaux pouvaient se déplacer

librement sur la surface de la cage (de rayon de 20cm).

On a tenté d'étudier avec plus de précision l'influence de la variation (par rapport à l'axe du tube) des 2 paramètres essentiels que sont le champ magnétique et le champ UHF. On a ainsi réalisé des expériences au cours desquelles les animaux étaient disposés dans une série de cages, plus ou moins éloignées de l'axe du tube.

Pour ce faire, il était indiqué de réaliser des cages à animaux en métal conducteur, aussi bien les parois que les cloisonnements; on a choisi le laiton. Dans ces conditions, les animaux sont soumis à l'onde UHF directe, et non à des ondes omni-directionnelles (comme cela aurait été le cas en employant une matière plastique). Et la puissance de l'onde UHF au niveau des différentes loges de la cage varie alors conformément à la répartition de l'onde elle-même (Fig. 4).

Une première expérience (*Expérience L*) a été réalisée en utilisant une cage rectangulaire (80cm de longueur sur 8cm de largeur). La cage est divisée en 10 loges carrées (8cm sur 8cm), selon le schéma de la Figure 32.

Cette cage est disposée suivant un diamètre du tube.

Chaque loge reçoit trois Souris, infestée chacune avec  $2 \times 10^4$  parasites. Le traitement consiste en 5 jours d'irradiation, avec une séance quotidienne de 6 heures, la première séance débutant 2 heures après l'infestation.

Pour les animaux placés dans les 4 loges centrales, l'action du rayonnement se fait selon le mode habituel (négativation entre la 80ème et la 90ème heure).

Pour les animaux des 6 loges périphériques, la parasitose évolue tout comme chez les animaux témoins non traités (les animaux meurent entre la 90ème et la 110ème heure).

Il a donc semblé que la zone active de l'appareil possède un rayon de 16cm.

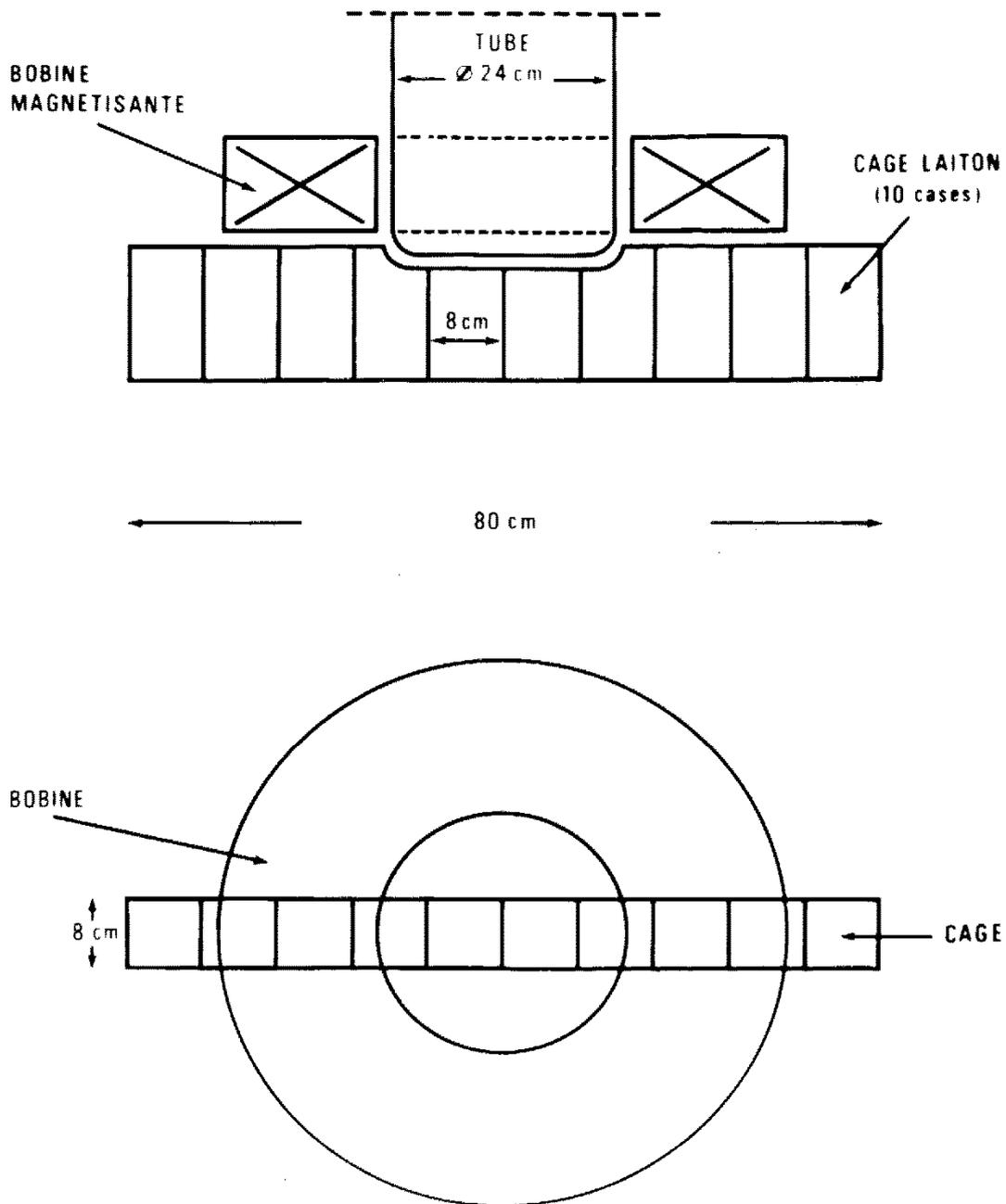


Fig. 32 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase aiguë de la Souris (*T. equiperdum*). Influence de la distance des animaux par rapport à l'axe de l'appareil. Schéma de la cage et de sa disposition par rapport à l'appareil. Expérience L .

Au cours de cette expérience, l'évolution de la parasitémie avait été réalisée par la technique semi-quantitative (voir ci-dessus le chapitre MATERIEL et METHODES, paragraphe 5.2.1.). Il semblait néanmoins que l'action du rayonnement pouvait être liée aux variations de la puissance UHF. Pour obtenir des données quantitatives, on a été amené à réaliser une expérience quelque peu différente.

Pour cette expérience (que nous désignons par le terme d' *Expérience M.*), on a augmenté le nombre des animaux par loge, afin d'obtenir une valeur moyenne de la parasitémie plus précise; puis on a quantifié avec un pas plus serré les niveaux de puissance UHF. A cette fin, dix loges co-axiales circulaires (loges N°7 à N°10) ou semi-circulaires (loges N°1 à N°6) ont été réalisées (Fig. 33). L'espacement des parois est de 4cm. Chaque loge reçoit dix souris, inoculées avec  $2 \times 10^4$  parasites, à l'exception de la loge cylindrique centrale (loge N°10) qui ne reçoit que deux souris et de la loge annulaire (loge N°9) qui, elle, ne reçoit que quatre souris.

Le traitement comporte 5 jours d'irradiation, avec une séance quotidienne de 6 heures, la première séance débutant 2 heures après l'infestation. La parasitémie a été mesurée à l'aide de la technique quantitative (2 numérations par jour).

Les résultats de l'expérience précédente (*Expérience L*) ont été confirmés (Fig. 34).

L'action de l'appareil se fait sur le mode habituel (voir courbe de l'*Expérience du type C*, Fig 29) au niveau des 4 loges centrales. Dans cette expérience, la négativation de la parasitémie est même intervenue plus précocement (vers la 60ème heure).

Les souris, placées dans les loges périphériques N°1 à N°5, meurent toutes de trypanosomiase aigüe, dans les mêmes conditions que les souris témoins non traitées.

Les dix souris de la loge N°6 ont un comportement intermédiaire : huit souris guérissent (la négativation se fait vers la 80ème heure donc plus tardivement que pour les souris des 4 cages centrales N°7 à N°10), mais deux évoluent vers la mort. Elles meurent cependant avec un retard de 12 heures environ par rapport aux animaux témoins non traités .

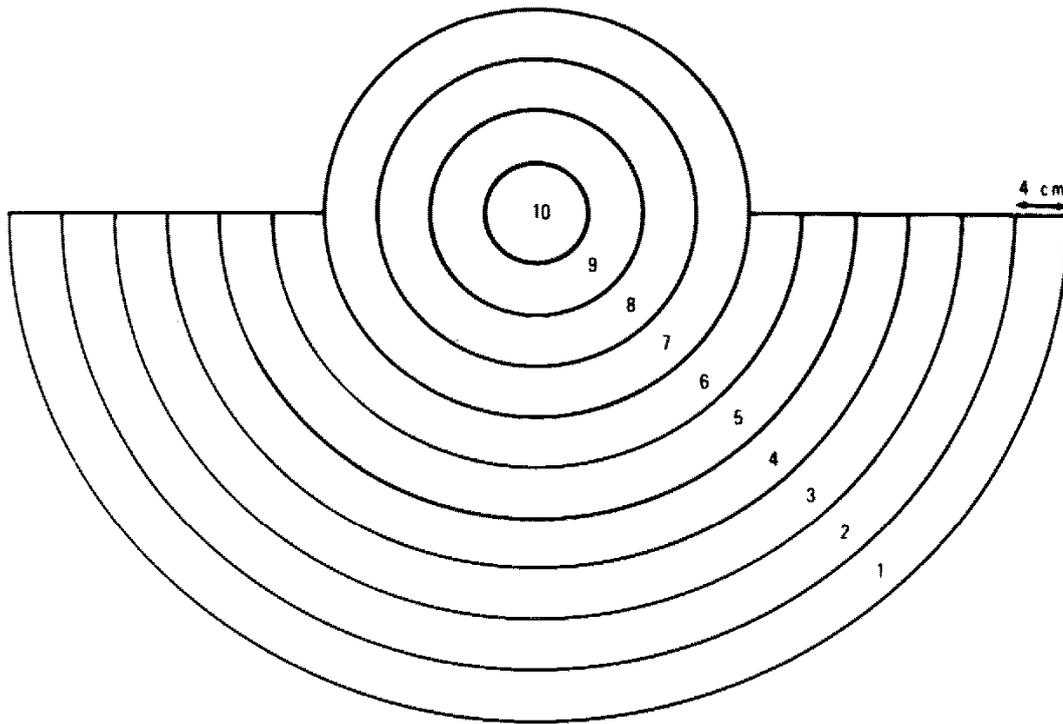


Fig. 33 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase aiguë de la Souris (*T. equiperdum*). Influence de la distance des animaux par rapport à l'axe de l'appareil. Schéma de la cage. Les 10 loges (semi-circulaires, circulaires et cylindrique ) sont numérotées de la périphérie vers le centre. Expérience M.

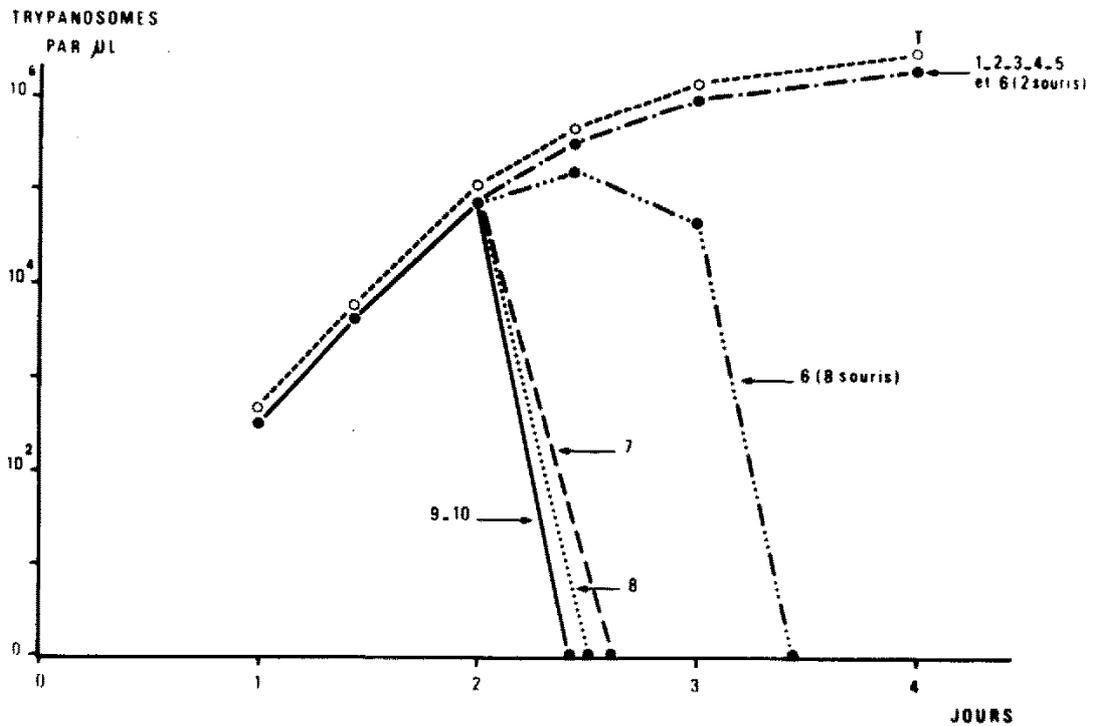


Fig. 34 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase aiguë de la Souris (*T. equiperdum*).  
 Influence de la distance des animaux par rapport à l'axe de l'appareil. Expérience M.  
 Evolution de la parasitémie chez des souris placées dans les loges de la cage. Les chiffres (de 1 à 10) correspondent aux 10 loges (pour leur disposition, voir la Fig. 33) .

T : souris témoin non traitée

Il semble donc bien exister une corrélation entre l'action biologique et le niveau de puissance UHF. Pour les 10 différentes loges, ces niveaux de puissance sont les suivants (puissance rayonnée moyenne) :

- 0  $\mu$ W pour les loges N°1 à N°5
- 25-95  $\mu$ W pour la loge N°6
- 95-220  $\mu$ W pour la loge N°7
- 220-440  $\mu$ W pour la loge N°8
- 440-650  $\mu$ W pour la loge N°9
- 650-700  $\mu$ W pour la loge N°10

En analysant toutes les données de l'évolution de la parasitémie chez les Souris des 10 loges, BERTEAUD et coll. (8) ont procédé à une approche mathématique; ils ont introduit la notion de "taux moyen de l'évolution de la parasitémie" : la décroissance de ce "taux moyen de l'évolution de la parasitémie", c'est-à-dire l'action du rayonnement, serait proportionnelle à la puissance de l'onde UHF.

Sur le plan pratique et en opérant avec le modèle parasite choisi (trypanosomiase aiguë de la Souris à *Trypanosoma equiperdum* - inoculum de  $2 \times 10^4$  parasites - traitement instauré quasi immédiatement et comportant 5 séances d'irradiation de 6 heures) on peut définir la zone active de l'appareil :

- jusqu'à une distance de 16cm, par rapport à l'axe du tube, la négativation de la parasitémie est obtenue dans 100% des cas.
- de 16 à 20cm, l'action n'est plus constante et une partie des souris développent une trypanosomiase aiguë.
- au-delà de 20cm, l'action est nulle.

Bien que la nécessité de l'onde UHF de 9,4 GHz semble nettement démontrée, ces résultats ne signifient nullement que ce rayonnement soit à lui seul suffisant. On sait par ailleurs que l'onde UHF est porteuse de l'onde HF (17 MHz).

On a donc réalisé des expériences en vue de démontrer l'éventuelle synergie des constituants essentiels du rayonnement.

### 3.3. Synergie des constituants essentiels du rayonnement

De nombreuses expériences (souvent des expériences involontaires, conséquences de pannes qui ont eu lieu) ont montré que la suppression de l'un des 3 constituants principaux du rayonnement annule l'action biologique du rayonnement, du moins sur le modèle parasitaire utilisé.

Des expériences ont été refaites, au cours desquelles on supprime isolément :

- soit le champ HF (longueur d'onde 17m)
- soit le champ UHF (longueur d'onde 3cm)
- soit la rotation de l'anode tournante

Dans ces 3 expériences (que nous désignons par les termes d'Expériences N, O et P) l'action biologique a été absolument nulle.

La synergie des 3 constituants majeurs semble donc absolument nécessaire. Il faut cependant garder à l'esprit qu'il n'est pas possible, dans les conditions actuelles, de supprimer l'un des constituants sans changer les caractères des deux autres constituants.

Nous avons également pu, grâce à un montage particulier, étudier l'action de l'onde UHF (nous désignons cette expérience par le terme d'Expérience Q). Une dérivation amenait l'onde UHF isolée au niveau des animaux. On a pu ainsi traiter simultanément 2 lots de souris :

- un lot N°1 avec le rayonnement habituel comprenant les 3 constituants majeurs.
- un lot N°2 avec l'onde UHF seule.

On s'était assuré que la puissance du rayonnement UHF (puissance rayonnée moyenne) était identique au niveau des 2 lots de souris (95-220  $\mu$ W à la périphérie des cages, 650-700  $\mu$ W à leur centre).

Les souris du lot N°1 se négativent toutes dans les conditions habituelles (voir courbe de négativation d'une *expérience du type C*). Les souris du lot N°2 meurent de trypanosomiase aigüe tout comme les souris témoins infestées non traitées.

Cette expérience indique que l'onde UHF, si elle est nécessaire, n'est pas à elle seule suffisante pour assurer l'action de notre appareil sur la trypanosomiase aigüe de la Souris à *Trypanosoma equiperdum*.

Une simple modification de l'un des constituants peut même changer l'action du rayonnement sur le modèle parasitaire. Nous allons en donner un exemple.

#### 3.4. - Influence de la nature du magnétron

On a en général utilisé, dans notre appareil, des magnétrons de la marque "RAYTHEON". Mais pour une expérience (que nous désignons par le terme d' *Expérience R*), on a été amené à utiliser un magnétron d'une marque différente, "THOMSON". Il s'agissait d'une expérience habituelle, du type *D* (inoculation de  $2 \times 10^4$  parasites - traitement comportant une séance quotidienne d'irradiation, de 6 heures pendant 5 jours).

Les résultats biologiques ont été nettement moins favorables. En effet, sur trente souris traitées, seules vingt trois se négativent, aux environs de la 90ème heure. Les sept autres évoluent vers la mort, qui survient avec un retard d'une quinzaine d'heures par rapport aux souris témoins non traitées. Dans les conditions habituelles (utilisation d'un magnétron "RAYTHEON"), la négativation survient chez la totalité des souris.

Ce résultat est très intéressant car ce qui distingue les deux types de magnétrons, c'est essentiellement leur tension interne lors du fonctionnement de l'appareil : 4 kV pour le magnétron "RAYTHEON" et 15 à 20 kV pour le magnétron "THOMSON".

#### 3.5. - Action des constituants accessoires du rayonnement

On a réalisé une expérience habituelle du type *D*, en interposant un papier noir entre la face de sortie du tube et la cage

des animaux, dans le but de supprimer les constituants du spectre visible et de l'infra-rouge. Nous désignons cette expérience par le terme d' *Expérience S* .

L'action biologique du rayonnement sur le modèle parasitaire est intégralement conservée.

4 - SOURIS ET RATS INFESTES AVEC T. EQUIPERDUM : ETUDE DE  
=====

L'ETAT IMMUNITAIRE OBTENU A L'AIDE DU TRAITEMENT PAR IRRADIATION  
=====

L'étude de l'état immunitaire peut se faire sur des Souris (ou des Rats) ayant été soumis à des expériences du type D ou I, qui comportent des traitements respectivement de 5 et 10 jours. Nous avons vu que lors de telles expériences, on obtenait la négativation de la totalité des Souris. Cette étude de l'état immunitaire peut être faite aux 3 niveaux indiqués au chapitre MATERIEL et METHODES (paragraphe 5.3.), à savoir:

- le taux sérique des immunoglobulines G et M
- l'étude de l'évolution des 4 anticorps humoraux choisis
- l'étude de l'état de protection immunitaire

4.1. - Taux sériques de l'IgG et de l'IgM

Le taux de l'IgG reste sensiblement constant, aussi bien avant qu'après le traitement.

Par contre, l'étude du taux de l'IgM est intéressante : dès la négativation de la parasitémie, ce taux augmente modérément (6 à 8 fois le taux normal) et cette élévation persiste pendant 8 à 10 jours. Il y a stimulation, modérée mais nette, des immunocytes synthétisant l'IgM, comme dans une trypanosomiase de longue durée.

4.2. - Evolution des anticorps humoraux

Les titres des quatre anticorps humoraux apparaissent relativement peu élevés. Ainsi le titre des anticorps agglutinants est de l'ordre de 200 à 400, celui des anticorps hémagglutinants du même ordre et celui des anticorps précipitants varie de 1/3 à 1 (la signification de ces valeurs a été indiquée ci-dessus au chapitre MATERIEL et METHODES, paragraphe 5.3.3.). Les anticorps séro-protecteurs sont à peine décelables, du moins avec la technique utilisée : le sérum analysé dilué au 1/10 (c'est là la première

dilution que nous injectons aux souris tests) ne confère qu'une protection partielle.

Il convient cependant de nuancer ces résultats et cela à la lumière de faits que nous avons constatés et qui seront exposés plus loin (voir ci-dessous, dans le même chapitre, paragraphe 5.6.).

Quoiqu'il en soit, cette faible valeur, au moins apparente, des titres anticorps contraste avec l'intensité de l'état de protection immunitaire créé chez les souris négativées.

#### 4.3. - Etude de l'état de protection immunitaire - Réinfestations

Cet état de protection immunitaire peut être mis en évidence chez tous les animaux traités, chez ceux qui ont guéri et chez ceux qui ont présenté des rechutes.

##### 4.3.1. - Souris ayant présenté des rechutes fatales

L'analyse des types antigéniques isolés de l'organisme-hôte, lors des rechutes, montre que ces types sont toujours différents du type de base inoculé  $E_1$ .

Ceci veut dire que l'état de protection, qui s'est installé après la négativation sous l'effet du rayonnement, empêche la recolonisation de l'organisme par le type antigénique de base  $E_1$  et a pour conséquence la "variation" du parasite, en particulier en ce qui concerne certaines de ses structures antigéniques. Il semble donc que l'état de protection immunitaire est bien spécifique de type antigénique, ce qui est classiquement admis.

##### 4.3.2. - Souris ayant évolué vers la guérison mais après une rechute parasitémique modérée et temporaire

L'analyse des types antigéniques présents chez la Souris lors de la rechute montre le même résultat : il est toujours différent du type  $E_1$ .

Là aussi, on peut dire que l'état de protection immunitaire obtenu est spécifique du type antigénique qui l'a induit (en l'occurrence le type  $E_1$ ), mais il faut bien admettre que dans ce cas sa spécificité

n'est pas absolue puisqu'elle s'exerce également d'une façon efficace vis-à-vis d'un type antigénique différent du type  $E_1$ .

Les animaux se trouvent guéris, on peut étudier plus à fond leur état de protection immunitaire.

#### 4.3.3. - Souris ayant évolué directement vers la guérison

Pour tester la valeur de l'état de protection immunitaire, il faut pratiquer des réinfestations par des trypanosomes du type de base  $E_1$  (la réinfestation par un type antigénique différent provoque une trypanosomiase aiguë).

Les souris guéries dont il sera question dans les expériences de réinfestation sont considérées guéries bien que ne satisfaisant pas, en théorie, à tous les critères de guérison (inoculation de broyats des différents organes à des souris normales). En pratique, cependant, on peut être certain de leur guérison : la parasitémie, régulièrement surveillée, reste constamment négative (passage du sang de l'animal sur des souris normales).

Divers types d'expériences comportant des réinfestations ont été réalisés, selon le nombre de réinfestations et l'importance des doses infestantes.

#### ./ 1ère expérience (que nous désignons par le terme d'Expérience T)

Des souris sont inoculées et traitées selon le mode habituel (voir Expérience I). On recueille les souris guéries et on les divise en 3 lots de vingt animaux. Ces lots sont infestés (avec un inoculum de  $2 \times 10^4$  parasites), respectivement au bout de 6 mois (pour le lot N°1), de 12 mois (pour le lot N°2) et de 18 mois (pour le lot N°3). Quelques animaux étaient morts entre temps d'affections intercurrentes.

Les résultats montrent qu'une proportion importante de souris résistent à la réinfestation :

- 8/10 dans le lot N°1
- 6/9 dans le lot N°2
- 3/7 dans le lot N°3

La persistance de l'état de protection immunitaire est donc remarquable. Il persiste même chez les souris qui ne résistent pas à la réinfestation : les trypanosomes qui évoluent dans ce cas appartiennent à un type antigénique différent du type  $E_1$ .

Chez les souris qui résistent à la réinfestation, on note un fait intéressant : le titre des anticorps humoraux augmente considérablement; ainsi, chez les souris survivantes des 3 lots précédents, on a observé des titres maximaux suivants :

<u>anticorps</u>	<u>titre</u>
agglutinants	5.000
hémagglutinants	20.000
précipitants	2
séro-protecteurs	50 et 100

N.B. : Pour les anticorps séro-protecteurs, le premier nombre indique le titre correspondant à une protection totale, le deuxième nombre le titre correspondant à une protection partielle ( voir ci-dessus, au chapitre MATERIEL et METHODES, le paragraphe 5.3.3.e.)

Chez ces mêmes souris, l'état de protection immunitaire devient particulièrement intense. On a ainsi pu, un mois plus tard, réinfester, une seconde fois, ces souris, mais avec une dose infectante très supérieure aux doses habituelles :  $2 \times 10^8$ . Sur les dix sept souris, sept ont pu résister à cet inoculum important; les dix autres font une trypanosomiase aiguë, mais de type antigénique différent du type de base  $E_1$ .

D'autres expériences comportant de multiples infestations ont été réalisées, en faisant varier l'importance et le rythme des réinfestations.

./ 2ème expérience (que nous désignons par le terme d'*Expérience U*)

. . . . .

On recueille des souris guéries après inoculation et traitement habituels (voir *Expérience I*) et on les divise en 3 lots de vingt souris qui sont réinfestés régulièrement, mais selon des rythmes différents : tous les 10 jours (pour le lot N°1), tous les 30 jours (pour le lot N°2) et tous les 90 jours (pour le lot N°3). Les réinfestations sont toutes pratiquées avec  $2 \times 10^4$  parasites.

Voici les résultats :

- pour le lot N°1, et dès la 3ème réinfestation, la plupart des animaux n'arrivent plus à résister à la dose infestante et développent une trypanosomiase aigüe (à type antigénique différent du type de base E<sub>1</sub>): après la 4ème réinfestation, toutes les souris du lot sont mortes de trypanosomiase aigüe.

- pour le lot N°2, les phénomènes sont semblables, à une différence près : c'est la 5ème réinfestation qui est fatale pour dix sept souris; les trois autres meurent après la 6ème réinfestation.

- pour le lot N°3, au contraire, la protection s'avère excellente : la 7ème (et dernière) réinfestation (les souris ont alors près de 2 ans d'âge) est encore surmontée par la totalité des animaux.

Ces résultats montrent donc clairement que des réinfestations rapprochées, non seulement n'améliorent pas l'état de protection immunitaire des souris, mais, au contraire, amènent une rupture de cet état.

On note chez les souris des lots N°2 et N°3 des phénomènes intéressants en ce qui concerne les taux sériques des immunoglobulines G et surtout M. L'IgG augmente modérément (2 à 3 fois le taux normal) dès les premières réinfestations. L'IgM augmente également, en général après la 3ème réinfestation; mais cette augmentation a des caractères particuliers : elle n'est pas régulière, en plafond (comme lors d'une trypanosomiase de longue durée) mais en dents de scie (rythmées par les réinfestations) les valeurs maximales peuvent être importantes, jusqu'à 20 fois le taux normal (53).

Les titres des anticorps humoraux sont élevés chez ces souris, en particulier chez celles du lot N°3. On a noté les valeurs maximales suivantes :

<u>anticorps</u>	<u>titre</u>
agglutinants	20.000
hémagglutinants	80.000
précipitants	16
séro-protecteurs	50 et 100

4.3.4. - Etat de protection immunitaire chez les Rats infestés par *T. equiperdum* et traités par le rayonnement.  
Phénomène de facilitation thérapeutique

On a réalisé une expérience identique à l'Expérience T mais avec des inoculums (infestation et réinfestations) de  $2 \times 10^5$  parasites (expérience que nous désignons par le terme d'Expérience V).

Tous les rats ont présenté un état de résistance totale.

L'étude de l'état de protection immunitaire chez le Rat a permis la mise en évidence d'un phénomène particulier, certainement très important pour la compréhension du mécanisme d'action du rayonnement.

Ce phénomène a été observé lors de l'expérience (que nous désignons par le terme d'Expérience W). Des rats sont infestés avec  $2 \times 10^5$  parasites et traités selon les conditions habituelles (10 jours de traitement avec une séance quotidienne de 6 heures). On a pu recueillir quatre rats qui, aux environs du 12ème jour après l'infestation, présentaient une rechute sévère, évoluant normalement vers la mort. Lorsque la parasitémie était de l'ordre de  $10^5$  parasites par  $\mu\text{l}$  de sang, on pratiqua une seule séance de traitement (de 6 heures). La parasitémie a diminué rapidement et est devenue nulle; les animaux ont guéri.

Dans ce cas, une seule séance de traitement a donc suffi pour juguler une parasitose importante, déjà bien installée et évoluant normalement vers la mort. Tout se passe comme si l'état de protection immunitaire, induit par le premier traitement, et théoriquement spécifique du type de base  $E_1$ , ait grandement facilité l'action du rayonnement sur l'évolution d'un type antigénique différent du type  $E_1$ .

En ce qui concerne la trypanosomiase aiguë de la souris (et du rat) à *Trypanosoma equiperdum*, on peut donc dire que l'action du

rayonnement est capable :

- d'interrompre, dans 100% des cas, l'évolution de la maladie expérimentale (négativation de la parasitémie) .

- d'amener la guérison définitive d'une certaine proportion d'animaux, proportion qui est variable selon les conditions de traitement.

Lors de la guérison, l'état immunitaire est très satisfaisant, en particulier l'état de protection immunitaire.

5 - TRYPANOSOMIASE CHRONIQUE DU LAPIN A T. EQUIPERDUM

ACTION DU RAYONNEMENT

Nous avons été amenés à étudier l'action du rayonnement chez vingt cinq Lapins, infestés avec *Trypanosoma equiperdum*.

Les conditions expérimentales ont été essentiellement de deux ordres, selon que le traitement par irradiation a été instauré soit 2 heures après l'infestation, soit après un certain temps d'évolution de la maladie (deux, trois et quatre semaines).

Ce traitement d'irradiation est plus intensif que celui utilisé pour la trypanosomiase aiguë de la Souris ou du Rat : les séances quotidiennes d'irradiation sont plus longues (10 heures au lieu de 6) et la durée totale du traitement a pu atteindre trois semaines.

Nous avons dit au chapitre MATERIEL et METHODES (paragraphe 4.2.1. a) que l'infestation est toujours effectuée avec un nombre considérable de trypanosomes, appartenant au type antigénique de base  $E_1$  :  $5 \times 10^6$  à  $2 \times 10^8$ ; l'importance de l'inoculum ne semble pas influencer grandement l'évolution de la maladie.

Pour chaque expérience de traitement par irradiation, trois lapins infestés dans les mêmes conditions, mais non traités, ont servi de témoins. Les lapins témoins (vingt et un au total) ont toujours présenté une trypanosomiase chronique, évoluant vers la mort en 5 à 10 semaines d'une façon très stéréotypée; cette évolution a été décrite également au paragraphe 4.2.1.a.

5.1. - Action du traitement par irradiation instauré 2 heures après l'infestation

Cinq Lapins ont été traités dans ces conditions; le traitement comportait soit 8, soit 10 séances d'irradiation, de 10 heures chacune. Nous donnons ici les résultats concernant l'un de ces lapins (Lapin RQ80 - Fig. 35 et Fig. 36), mais les phénomènes observés chez les quatre autres

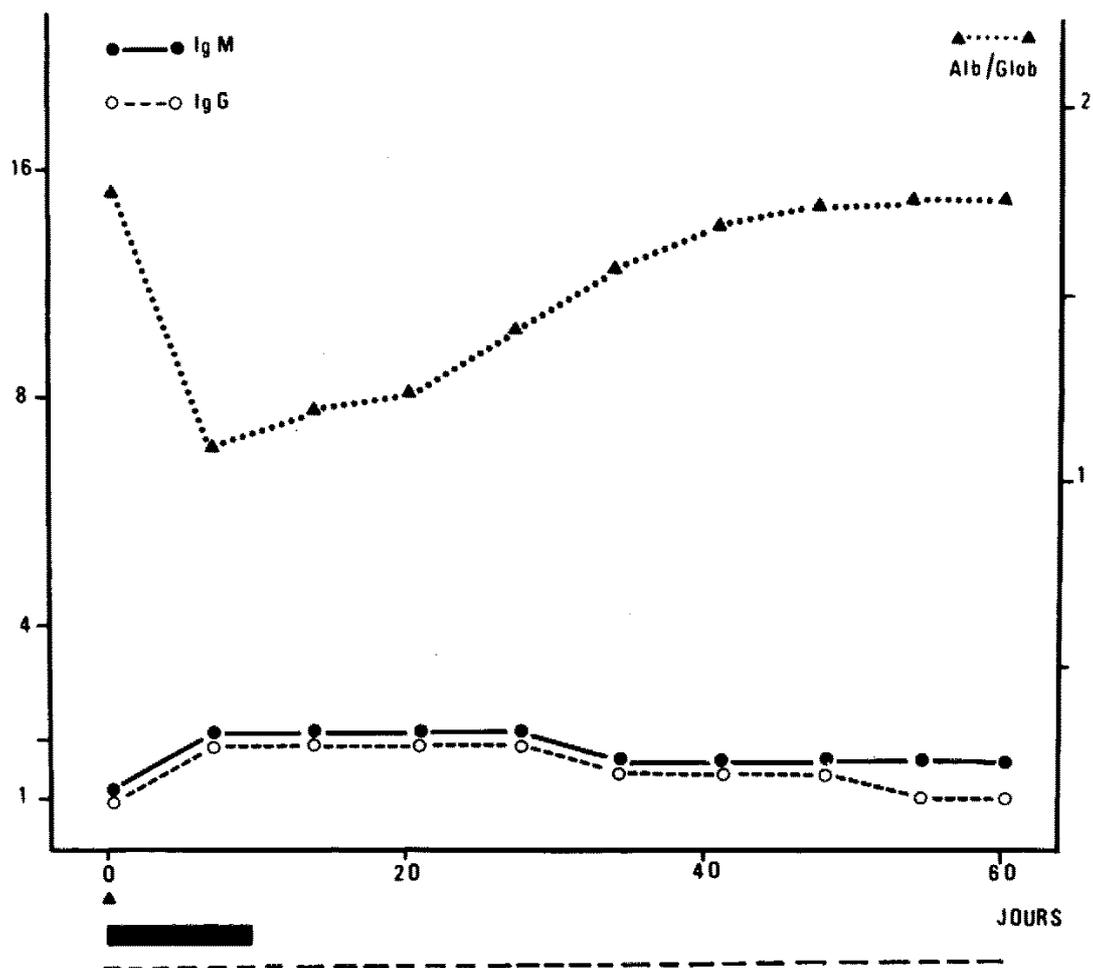


Fig. 35 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*). Effet d'un traitement instauré 2h après l'infestation.  
 Cas du Lapin RQ80. Infesté avec  $5 \times 10^6$  trypanosomes. Traité pendant 10 jours, séances quotidiennes de 10h. Expérience X. Evolution de la parasitémie, du rapport albumine/globulines et des immunoglobulines M (IgM) et G (IgG). Le taux des immunoglobulines est exprimé en multiples du taux existant avant l'expérience.

▲ infestation

■ durée du traitement

- absence de trypanosomes dans le sang

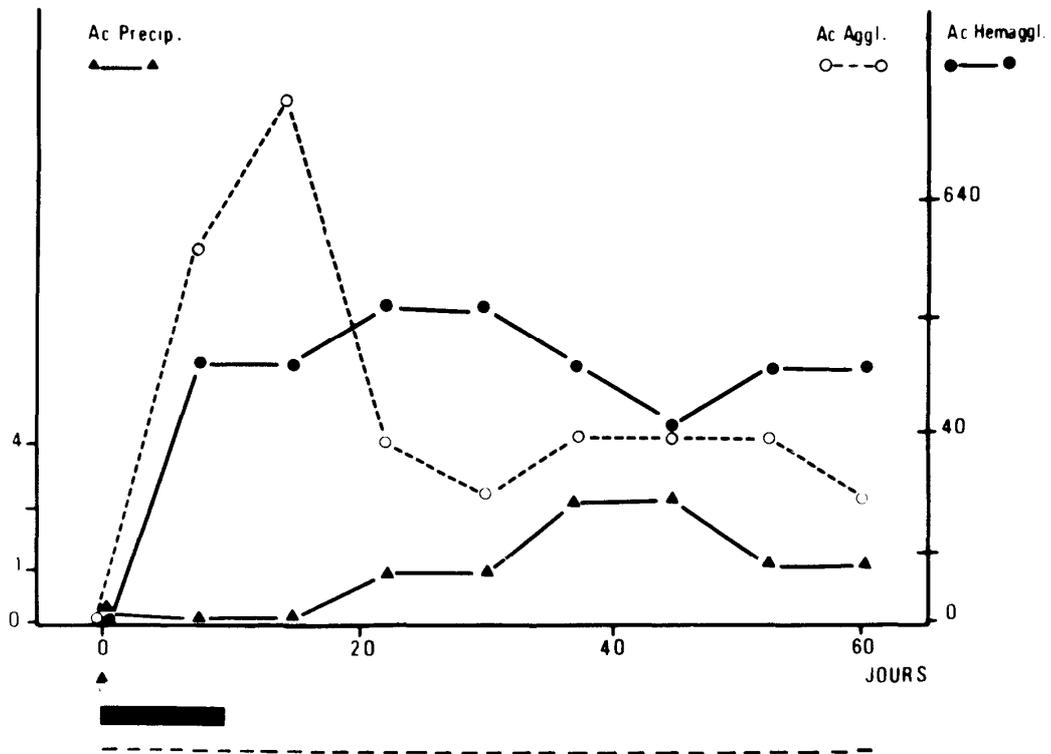


Fig. 36 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*). Effet d'un traitement instauré 2h après l'infestation.  
 Cas du Lapin RQ80. Expérience X - Voir Figure 35 - Evolution des anticorps précipitants (Ac. Précip.), agglutinants (Ac. Aggl.) et hémagglutinants (Ac. Hémaggl.). Leur taux est exprimé par l'inverse de la dernière dilution donnant encore une réaction positive.

▲ infestation

■ durée du traitement

- absence de trypanosomes dans le sang

Lapins sont absolument superposables, à une nuance près, qui concerne la parasitémie et qui sera exposée plus loin, dans ce même paragraphe (nous désignons cette expérience par le terme d' *Expérience X*).

L'état clinique reste tout à fait normal. Les parasites sont absents du sang périphérique.

Sur le plan biologique, on note par ailleurs une diminution rapide du rapport albumine/globuline; cette diminution qui est maximale le 8ème jour après l'infestation, n'est que temporaire : le rapport redevient normal environ 4 semaines plus tard.

Le taux sérique des immunoglobulines augmente légèrement, en particulier celui de l'IgM (deux fois le taux normal).

Enfin, l'animal irradié élabore aussi des anticorps humoraux; leur titre est assez modéré, mais ils continuent à être élaborés pendant plusieurs mois.

La persistance des anticorps humoraux, ainsi que la diminution du rapport albumine/globuline et la légère augmentation du taux sérique de l'IgM nous incitent à penser que l'action du rayonnement n'est pas instantanée : tout se passe comme si une parasitose légère évoluait pendant quelques jours.

Cette façon de voir a pu être confirmée chez deux autres lapins traités dans les mêmes conditions et chez lesquels une parasitémie existait encore 5 jours après l'infestation; cette parasitémie était extrêmement faible : le passage sur souris normales de 0,5 ml de sang ne provoquait pas régulièrement une trypanosomiase aiguë et on peut penser que la parasitémie était donc de l'ordre de quelques unités parasitaires par  $\mu$ l de sang. Par la suite, la parasitémie reste définitivement négative.

Enfin, lorsque la durée totale du traitement est inférieure à 6 jours, l'action du rayonnement s'avère insuffisante pour empêcher l'évolution d'une trypanosomiase.

## 5.2. - Action du traitement par irradiation instauré après un certain temps d'évolution de la maladie

### 5.2.1. - Evolution de la maladie pendant 2 semaines

Deux semaines après l'infestation, les troubles cliniques et biologiques sont déjà très accusés. La parasitémie est en permanence positive. Le rapport albumine/globuline est très diminué (jusqu'à atteindre la valeur de 0,5 ou même moins). L'augmentation du taux sérique de l'IgM est dans tous les cas très importante (de 6 à 16 fois la valeur normale); l'augmentation du taux sérique de l'IgG est plus inconstante et plus variable (voir dans le chapitre MATERIEL et METHODES, le paragraphe 5.3.1.c).

Le traitement dure 15 jours avec une séance quotidienne de 10 heures. Deux lapins ont été ainsi traités. Les Figures 37 et 38 montrent les résultats pour l'un d'eux (Lapin RQ 85 - nous désignons cette expérience par le terme d' *Expérience Y*).

L'efficacité du traitement est notable dès les premiers jours. L'état général s'améliore, les manifestations oedémateuses disparaissent au niveau du museau et des oreilles (qui se redressent). L'évolution se fait vers la guérison clinique en 10 à 15 jours (Fig. 39). Les lésions testiculaires régressent et évoluent également vers la guérison (les phénomènes histologiques sont décrits dans le paragraphe suivant 5.3.).

Sur le plan biologique, les résultats sont les suivants :

- la parasitémie se négative au bout de quelques jours et reste définitivement négative
- le rapport albumine/globuline se normalise en quelques semaines .
- le taux de l'IgM se normalise très rapidement; il décroît environ de moitié en 10 jours : tout se passe comme si le traitement bloquait immédiatement l'élaboration des molécules d'IgM liées à l'évolution de la parasitose.
- le taux de l'IgG, dont l'élévation est en général moindre, se normalise plus lentement; mais nous savons que les variations de cette immunoglobuline ne sont pas strictement en rapport avec une maladie évolutive.
- le titre des anticorps hémagglutinants et précipitants reste élevé et cela pendant un temps très long (l'observation du Lapin RQ 85 a été

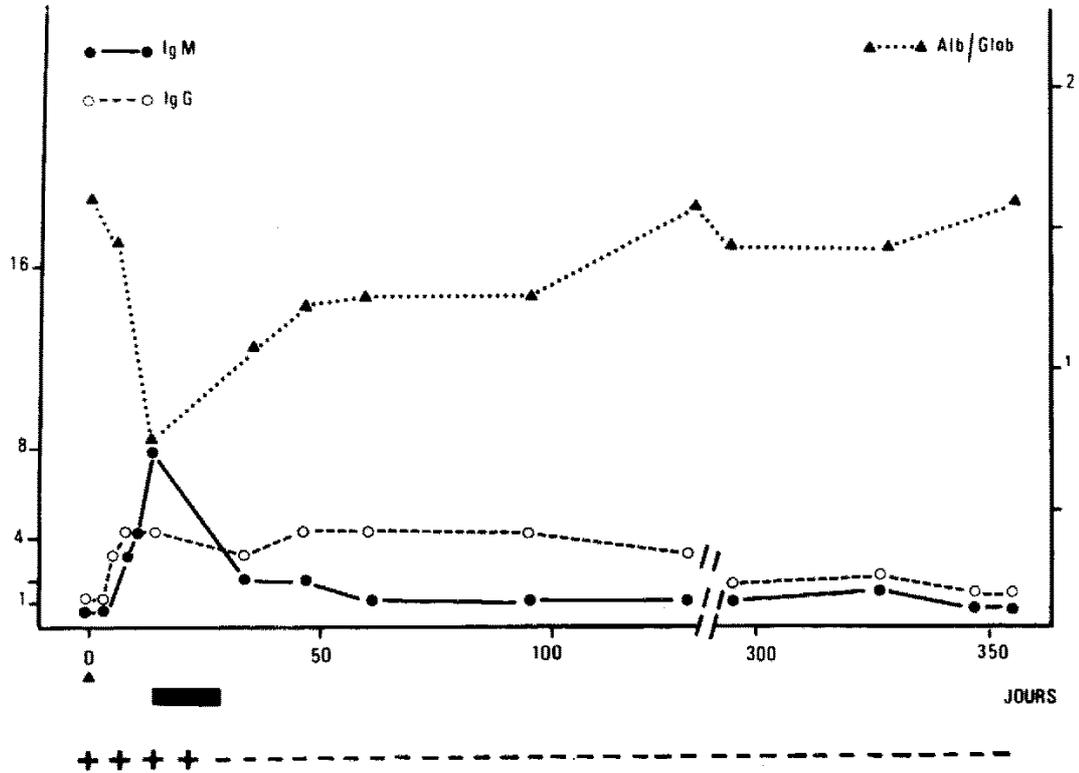


Fig. 37 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*).  
 Effet d'un traitement instauré 2 semaines après l'infestation. Cas du Lapin RQ85. Infesté avec  $5 \times 10^6$  trypanosomes, traité pendant 15 jours (séances quotidiennes de 10h). Expérience Y. Evolution de la parasitémie, du rapport albumine/globulines et des immunoglobulines M(IgM) et G(IgG). Le taux des immunoglobulines est exprimé en multiples du taux existant avant l'expérience.

- ▲ infestation
- durée du traitement
- + présence de trypanosomes dans le sang
- absence de trypanosomes dans le sang

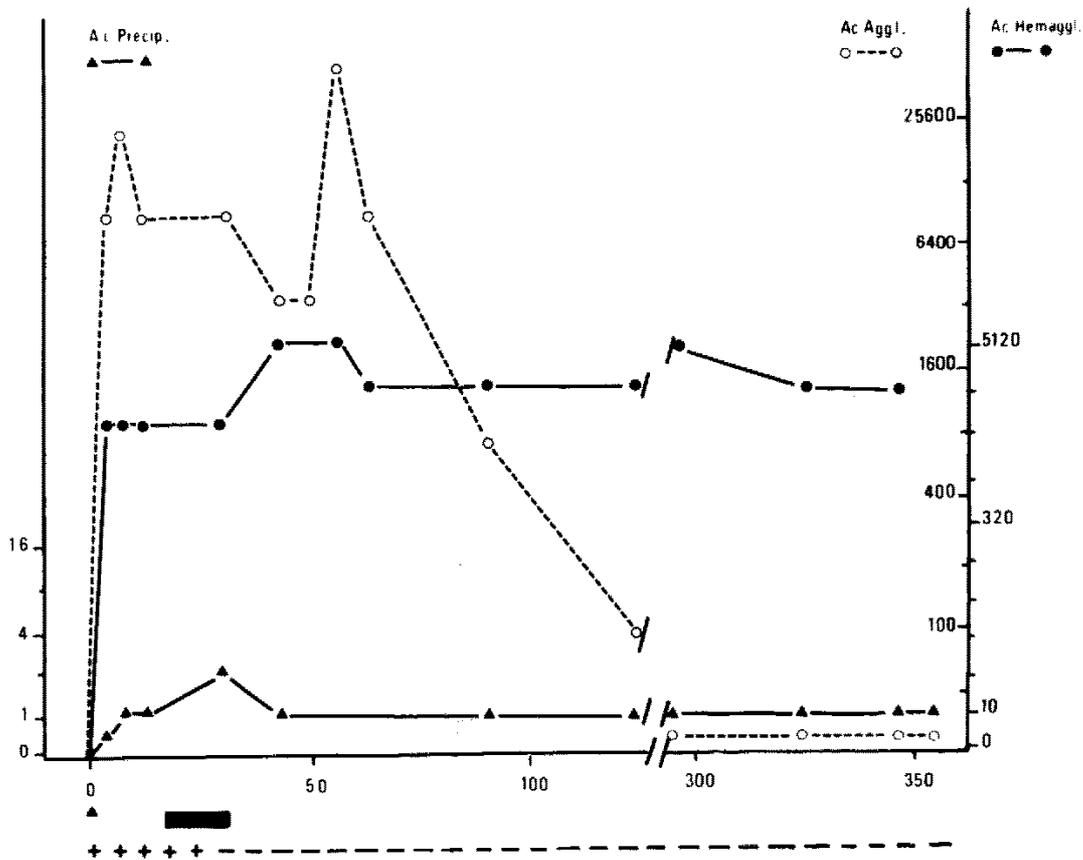


Fig. 38 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*).  
 Effet d'un traitement instauré 2 semaines après l'infestation.  
 Cas du Lapin RQ85 . Expérience Y - Voir figure précédente.  
 Evolution des anticorps précipitants (Ac. Précip.), agglutinants (Ac. Aggl.) et hémagglutinants (Ac. Hémaggl.). Leur taux est exprimé par l'inverse de la dernière dilution donnant encore une réaction positive.

- ▲ infestation
- durée du traitement
- + présence de trypanosomes dans le sang
- absence de trypanosomes dans le sang

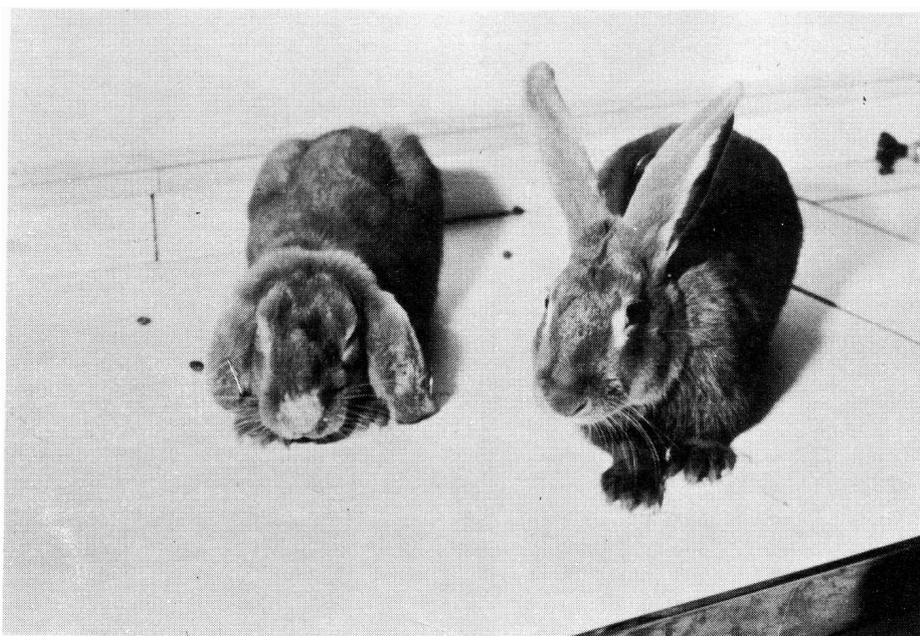


Fig. 39 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*).  
Aspect clinique de 2 Lapins, quatre semaines après leur infestation avec  $5 \times 10^6$  trypanosomes.  
Le Lapin de gauche n'a pas été traité.  
Le Lapin de droite a été mis en traitement après 15 jours d'évolution de la maladie. Le traitement a duré 15 jours (séances quotidiennes d'irradiation de 10h).  
Lapin RQ85 (voir Fig. 37 et Fig. 38 - Expérience Y).  
La photo a été prise au moment de l'arrêt du traitement.

arrêtée au bout d'un an environ).

- le titre des anticorps agglutinants anti-type antigénique de base E<sub>1</sub> diminue, tout comme il diminue chez les animaux non traités.

#### 5.2.2. - Evolution de la maladie pendant 3 semaines

Les troubles pathologiques sont encore plus accusés. Il s'est avéré nécessaire d'instituer un traitement anti-allergique (à base d'antihistaminiques et de Vitamine C), en même temps que l'irradiation, sinon l'animal meurt d'un choc anaphylactique, lié vraisemblablement à la destruction des parasites.

Le traitement dure 21 jours avec une séance quotidienne de 10 heures. Deux lapins ont été ainsi traités (nous désignons cette expérience par le terme d' *Expérience Z*).

L'évolution se fait également vers la guérison, mais plus lentement.

#### 5.2.3. - Evolution de la maladie pendant 4 semaines

Deux Lapins sont traités dans ces conditions (nous désignons cette expérience par le terme d' *Expérience AA*).

L'action du rayonnement ne peut plus éviter une évolution mortelle de la parasitose : les lésions organiques sont trop importantes, et l'état clinique des animaux est proche de la cachexie.

En ce qui concerne la trypanosomiase chronique du Lapin à *Trypanosoma equiperdum*, on peut donc dire que l'action du rayonnement :

- empêche le développement de la maladie, s'il est instauré 2 heures après l'infestation.
- guérit la maladie installée, à condition que le traitement intervienne avant la 4<sup>ème</sup> semaine. C'est là un résultat remarquable.

Enfin, il persiste chez les animaux guéris des anticorps humoraux (hémagglutinants et précipitants) pendant de longs mois et à un titre élevé. Ceci témoigne du bon fonctionnement du système immuno-logique et donc de l'absence d'effets nocifs sur ce système de la part du rayonnement.

Lorsque nous avons exposé les résultats de l'action du rayonnement sur la trypanosomiase aiguë, nous avons mentionné la nécessité de la présence simultanée des trois constituants essentiels (onde UHF, onde HF et champ magnétique). Il en est de même en ce qui concerne l'action du rayonnement sur la trypanosomiase chronique du Lapin à *Trypanosoma equiperdum*. Nous avons pu le vérifier lors de certaines pannes de l'appareil supprimant, à certains moments, tel ou tel constituant essentiel du rayonnement; dans ces circonstances, l'évolution habituelle de la maladie n'était en rien modifiée.

### 5.3. - Etude histologique des lésions testiculaires et de leur évolution chez les Lapins traités par irradiation

Cette étude a été conduite en collaboration avec le Professeur G. MAYER (Laboratoire d'Histologie et Embryologie - Unité des Sciences Médicales III - Bordeaux) et elle a été pratiquée également dans deux circonstances expérimentales différentes : traitement instauré 2 heures après l'infestation et traitement instauré après 15 jours d'évolution de la trypanosomiase chronique (45).

#### 5.3.1. - Traitement instauré 2 heures après l'infestation

Deux Lapins ont été étudiés dans ces conditions; le traitement, instauré 2 heures après l'infestation, a duré 10 jours, avec une séance quotidienne d'irradiation de 10 heures (voir même chapitre, le paragraphe 5.1.).

Les testicules ont été prélevés 30 jours après l'infestation, c'est-à-dire 20 jours après l'arrêt du traitement. L'examen histologique montre que les glandes sont dans un état absolument normal, aussi bien dans leur partie exocrine qu'endocrine.

Ceci confirme ce qui a été dit ci-dessus (voir même chapitre, le paragraphe 5.1.) : s'il est vraisemblable qu'une parasitose très légère et très temporaire ait évolué pendant les quelques jours qui ont suivi l'infestation, elle ne laisse cependant aucune trace histologique au niveau des testicules 30 jours plus tard.

### 5.3.2. - Traitement instauré après deux semaines d'évolution de la maladie

Quatre Lapins ont été étudiés dans ces conditions; le traitement a duré 15 jours, avec une séance quotidienne d'irradiation de 10 heures (voir, même chapitre, le paragraphe 5.2.1.). Au 15ème jour de la maladie, les lésions histologiques au niveau des testicules sont importantes.

Pour deux lapins, les testicules ont été prélevés ~~30 jours après~~ l'infestation (c'est-à-dire à la fin de la durée du traitement). A ce moment existent des lésions encore assez notables. Les tubes séminifères sont diminués de taille, mais ils ne sont pas entièrement dépeuplés de cellules germinales; parmi celles-ci les formes involutives sont nombreuses. La glande interstitielle est involuée. L'infiltration lymphocytaire du tissu conjonctif inter-tubulaire est plus ou moins abondante. L'épithélium des tubes épидидymaires est cubique; la lumière des tubes ne contient pas de spermatozoïdes.

Pour les deux autres Lapins, les testicules ont été prélevés plus tardivement :

- au 44ème jour après l'infestation, c'est-à-dire 2 semaines après l'arrêt du traitement, les lésions sont encore manifestes; les spermatozoïdes sont encore absents dans la lumière des tubes séminifères, mais l'épithélium est redevenu palissadique, ce qui témoigne de la récupération de la fonction endocrine (Fig. 40).

- au 8ème mois, après l'infestation : l'aspect histologique est absolument normal, tant au niveau du testicule que de l'épididyme; la fonction exocrine est normale : mis en présence d'une Lapine le 7ème mois, le Lapin s'est révélé fécond et a été à l'origine d'une portée apparemment normale (Fig. 41).

Il semble donc que l'on soit en droit de dire que chez le lapin trypanosomé (et dont la maladie évolue depuis 15 jours), l'action du rayonnement permet d'obtenir la guérison des lésions testiculaires, avec régénération des tissus glandulaires (exocrine et endocrine) et récupération de leurs fonctions. L'obtention de cette guérison demande cependant un certain laps de temps ce qui est assez logique après tout.

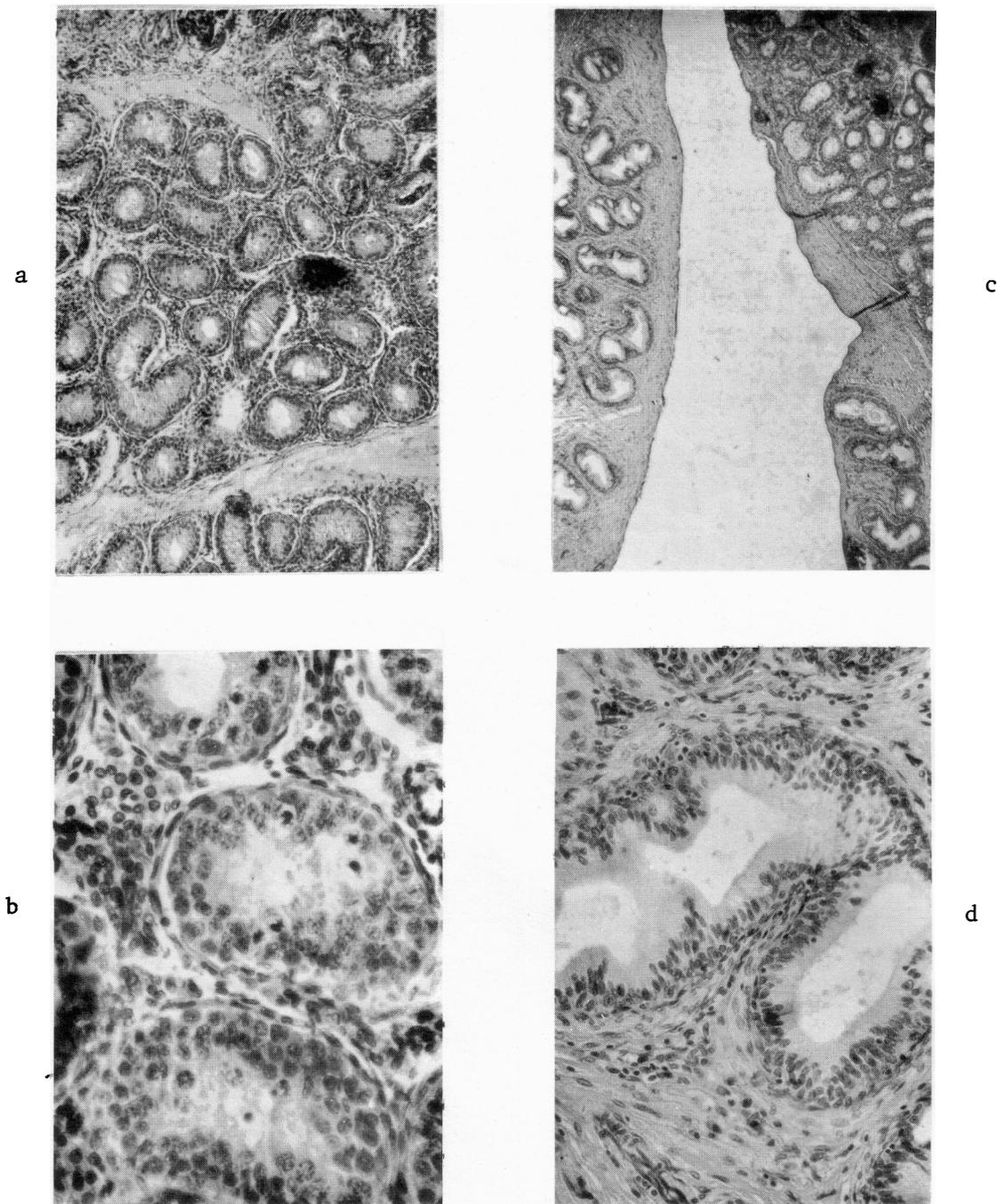


Fig. 40 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*).

Effet du traitement sur les lésions testiculaires.

Cas du Lapin RR20. Infesté avec  $5 \times 10^6$  trypanosomes. Traitement de 15 jours (séances quotidiennes de 10h), instauré 15 jours après l'infestation. Voir Expérience Y .

La glande testiculaire est prélevée 14 jours après l'arrêt du traitement, soit 44 jours après l'infestation .

Aspect histologique :

- a : tubes séminifères (gross. orig. 10 x 3,2)
- b : tubes séminifères (gross. orig. 40 x 3,2)
- c : tubes épидидymaires (gross. orig. 4 x 3,2)
- d : tubes épидидymaires (gross. orig. 25 x 3,2)

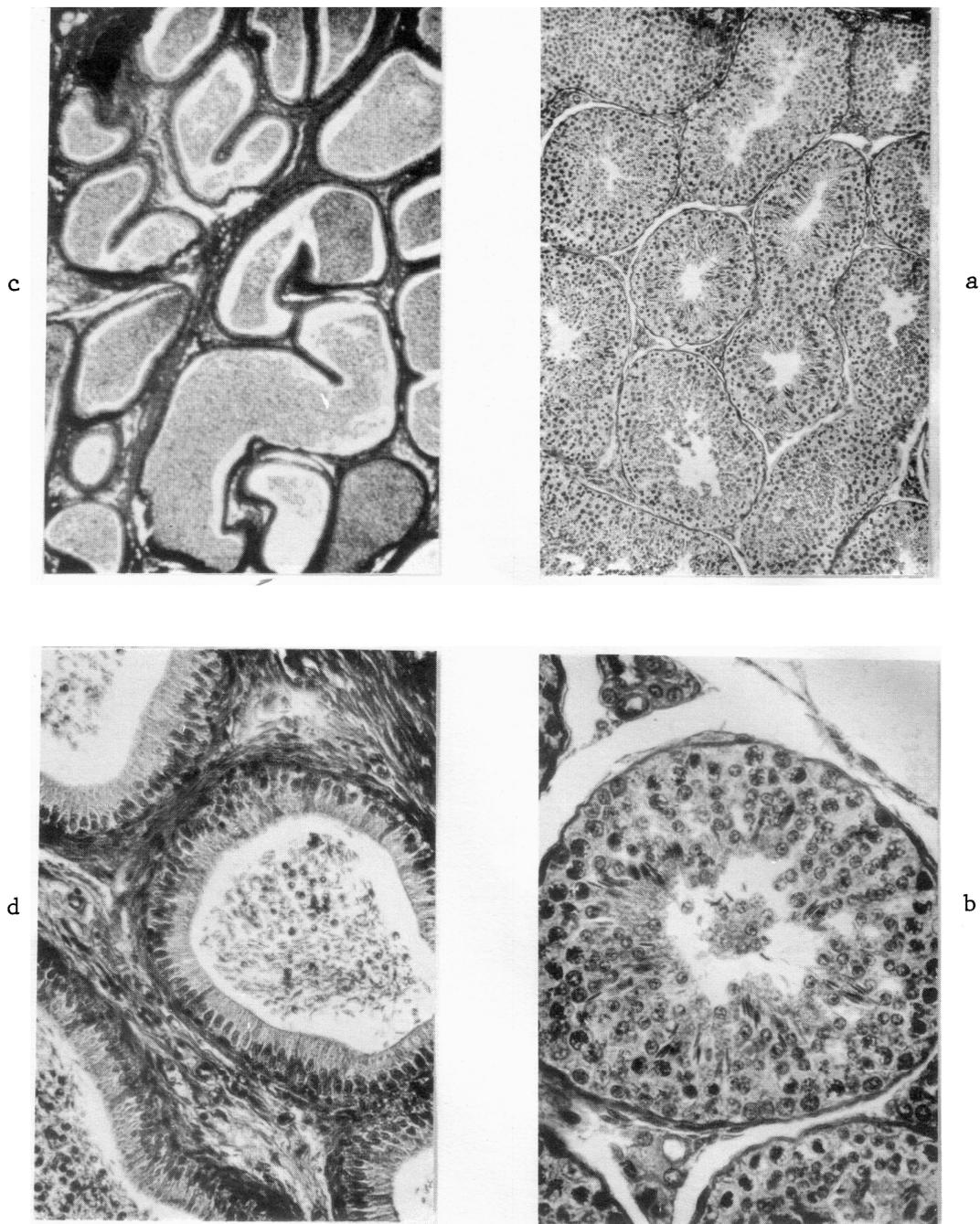


Fig. 41 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*).

Effet du traitement sur les lésions testiculaires.

Cas du Lapin RQ85 (voir Fig. 37 et Fig.38 - Expérience Y).

Traitement de 15 jours (séances quotidiennes de 10h), instauré 15 jours après l'infestation. Guérison clinique et biologique. La glande testiculaire est prélevée 7 mois après l'arrêt du traitement.

Aspect histologique :

- a : tubes séminifères (gross. orig. 10 x 3,2)
- b : tubes séminifères (gross. orig. 40 x 3,2)
- c : tubes épидидymaires (gross. orig. 4 x 3,2)
- d : tubes épидидymaires (gross. orig. 25 x 3,2)

#### 5.4. - Température corporelle des Lapins au cours du traitement

On a dit qu'au cours de la trypanosomiase chronique du Lapin à *Trypanosoma equiperdum* survenaient des poussées fébriles à 40°-41° C. Ces poussées sont irrégulières et rien ne permet d'expliquer le rythme de leur apparition (il n'existe, en particulier, pas de variations décelables de la parasitémie).

Chez les lapins traités, on peut observer de telles poussées fébriles pendant les 5 premiers jours. Par la suite, la température reste strictement normale (38,5° - 38,8° C) .

La phase initiale (poussées fébriles pendant les 5 premiers jours) existe également chez les animaux infestés où le traitement est instauré immédiatement. Ce fait est en faveur de l'existence, dans de telles conditions expérimentales, d'une parasitose, légère et temporaire, évoluant ensuite rapidement vers la guérison (Fig. 42).

Quoi qu'il en soit, on peut donc dire que :

- l'hyperthermie qui existe chez les lapins trypanosomés non traités ne permet pas aux animaux de se débarrasser de leur parasitose.

- le traitement par le rayonnement, au contraire, entraîne rapidement une normalisation de la température en même temps que survient la guérison.

Un fait vient encore corroborer ces constatations : la guérison des lésions testiculaires. Leur guérison implique en effet la normalisation de la température corporelle des animaux. On sait que l'hyperthermie entraîne, au niveau des testicules, une involution importante de la glande. Une telle hyperthermie peut être réalisée, en l'absence de tout processus infectieux en plaçant, chez un lapin normal, les testicules en position intra-abdominale;

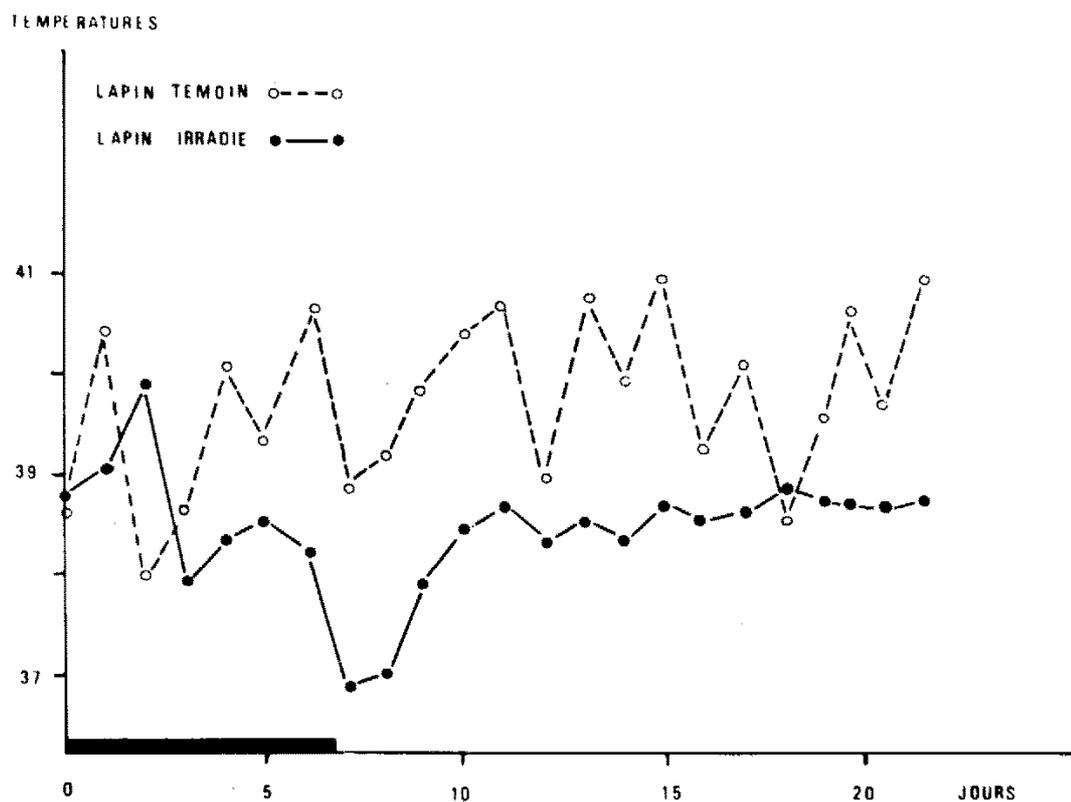


Fig. 42 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase chronique du Lapin (*T. equiperdum*). Evolution de la température corporelle (rectale) chez 2 Lapins infestés avec  $5 \times 10^6$  trypanosomes. L'un des lapins n'est pas traité et sert de témoin. L'autre lapin est mis en traitement 2h après l'infestation (traitement de 10 jours, séances quotidiennes de 10h - Lapin RQ80 de l'Expérience X . Voir Fig. 35 et Fig. 36)

#### 5.5. - Lapins trypanosomés guéris par le rayonnement : effet d'une réinfestation non accompagnée d'irradiation

On a vu que les lapins, infestés avec *T. equiperdum* et guéris par le rayonnement, élaborent des anticorps humoraux de façon prolongée. Les titres de ces anticorps sont particulièrement élevés dans le cas où les animaux sont mis en traitement après 2 ou 3 semaines d'évolution de la trypanosomiase. Nous avons donc voulu étudier l'état de protection immunitaire de ces lapins en pratiquant des réinfestations.

Nous avons constaté d'emblée que les réinfestations sont toujours suivies de l'apparition d'une parasitose à évolution mortelle en quelques semaines (5 à 12 semaines) ; sept lapins ont été ainsi étudiés (expériences que nous désignons par le terme d'*Expériences de type AB*).

L'état de protection immunitaire n'est donc pas total, mais nous allons voir au paragraphe suivant qu'il existe néanmoins.

On doit également préciser que les réinfestations ont toujours été pratiquées avec des doses importantes de trypanosomes :  $5 \times 10^6$  à  $2 \times 10^8$  (tout comme les infestations). Et il est permis de penser que les animaux auraient peut-être résisté à des doses réinfestantes d'importance moindre.

#### 5.6. - Lapins trypanosomés guéris par le rayonnement : effet de réinfestations accompagnées d'irradiations

Nous nous sommes rapidement rendu compte que les lapins, infestés par *T. equiperdum* et guéris par un premier traitement par irradiation, étaient capables de résister à des réinfestations à condition que celles-ci soient accompagnées d'une nouvelle irradiation, même très réduite, à savoir 2 ou même 1 seule séance de 10 heures. Nous sommes là encore en présence d'un phénomène de facilitation thérapeutique, assez analogue à celui décrit ci-dessus chez les rats infestés, guéris par le rayonnement et présentant une rechute parasitaire (paragraphe 4.3.4.).

Ce phénomène de facilité thérapeutique s'observe d'une manière absolument constante chez les lapins infestés et guéris par un premier traitement, chaque fois que les réinfestations (même massives) sont accompagnées par une irradiation réduite à 2 ou même 1 seule séance. Nous avons dit ci-dessus qu'un tel traitement réduit est tout à fait

insuffisant pour neutraliser, à lui seul, la quantité de trypanosomes inoculés, et qu'en fait le traitement nécessaire dans un tel cas, comporte au minimum 6 jours de traitement, avec une séance quotidienne de 10 heures.

Or, dans le cas présent, celui de la facilitation thérapeutique chez les lapins, les animaux résistent aux réinfestations d'une façon parfaite. L'état clinique reste normal et la parasitémie demeure négative. Le taux sérique de l'IgM reste normal ou accuse une très légère augmentation; celui de l'IgG peut s'élever davantage; ces modifications témoignent simplement de la sollicitation du système immunologique. Cette sollicitation se traduit évidemment par une élaboration intense des anticorps sériques qui existent alors à des titres élevés.

Sept lapins infestés et guéris par un premier traitement ont ainsi été étudiés à l'aide de réinfestations (unique ou multiples) accompagnées d'une irradiation réduite; nous désignons ces expériences par le terme d'*Expériences du type AC*. Nous allons décrire les résultats obtenus chez deux des sept lapins : les lapins RR13 et RQ86. Pour les autres animaux, les résultats sont très semblables, à quelques variantes près (nombre et rythme des réinfestations).

./ Cas du Lapin RR13 (Fig. 43 et 44)

. . . . .

Il s'agit d'un lapin infesté avec  $5 \times 10^7$  trypanosomes et où le traitement (10 séances d'irradiation de 10 heures) avait été instauré immédiatement après l'infestation. L'évolution de la parasitose est ainsi enrayée : la parasitémie reste négative; le taux sérique de l'IgM reste normal; des anticorps (agglutinants et hémagglutinants) apparaissent, en quantités assez modérées.

Une première réinfestation avec  $2 \times 10^8$  trypanosomes est pratiquée 14 jours après l'arrêt du traitement; elle est accompagnée d'une séance unique d'irradiation (de 10 heures). L'animal résiste à cette réinfestation : l'état clinique reste normal, la parasitémie négative et le taux de l'IgM absolument normal; les titres des anticorps humoraux s'élèvent considérablement (ce qui semble logique : la réinfestation agit en quelque sorte comme une injection antigénique de rappel).

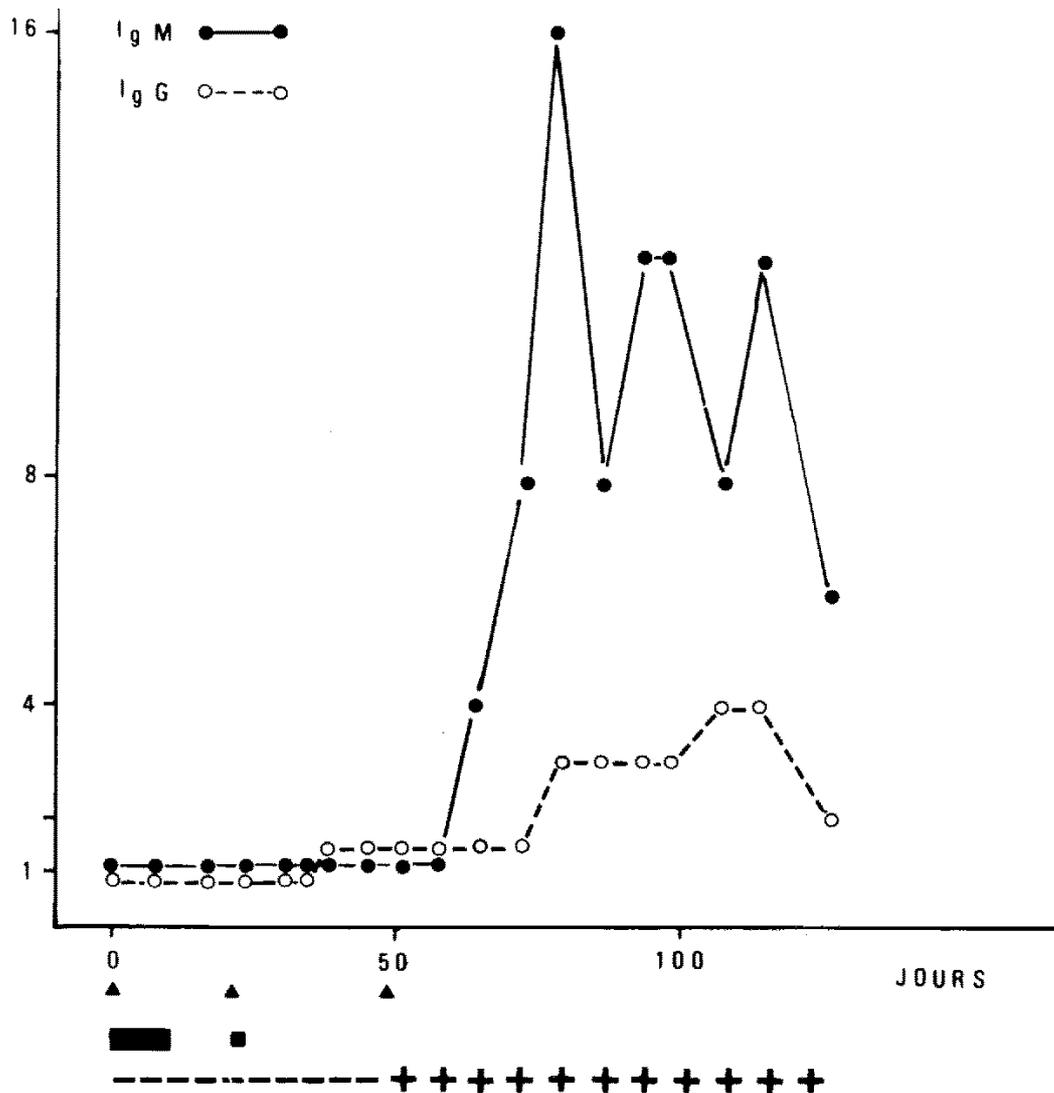


Fig. 43 - Effet de réinfestations chez un Lapin antérieurement infesté et traité. Evolution du taux sérique des immunoglobulines M (IgM) et G (IgG). Ces taux sont exprimés en multiples des taux existants avant l'expérience. Expérience AC.

Cas du Lapin RR13. Infesté avec  $5 \times 10^7$  trypanosomes, puis traité pendant 10 jours (séances quotidiennes de 10h, la première séance débutant 2h après l'infestation). Dix jours après l'arrêt de ce premier traitement, une première réinfestation avec  $2 \times 10^8$  trypanosomes est accompagnée d'un traitement réduit (2 séances d'irradiation de 10h, à jours passés, la première séance débutant 2h après la réinfestation). Une deuxième réinfestation est pratiquée 25 jours plus tard, également avec  $2 \times 10^8$  trypanosomes, mais sans traitement.

- ▲ infestation et réinfestations
- durée du traitement
- + présence de trypanosomes dans le sang
- absence de trypanosomes dans le sang

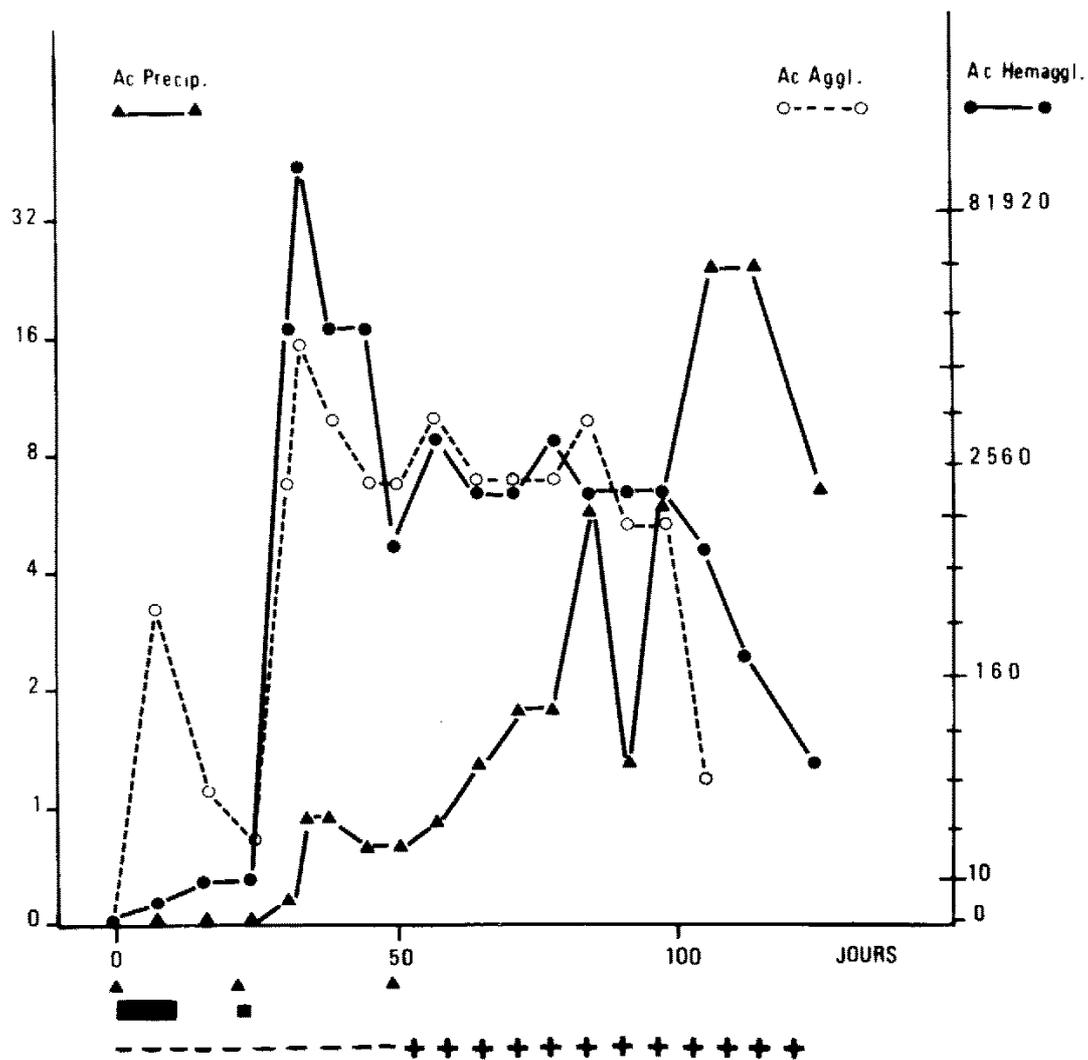


Fig. 44 - Effet de réinfestations chez un Lapin antérieurement infesté et traité.  
 Cas du Lapin RR13 - Expérience AC - Voir Figure précédente - Evolution des anticorps circulants précipitants (Ac. Précip.), agglutinants (Ac. Aggl.) et hémagglutinants (Ac. Hémaggl.). Leur taux est exprimé par l'inverse de la dernière dilution donnant encore une réaction positive.

- ▲ infestation et réinfestations
- durée du traitement
- + présence de trypanosomes dans le sang
- absence de trypanosomes dans le sang

Une deuxième réinfestation (avec également  $2 \times 10^8$  trypanosomes) est pratiquée 25 jours après la première réinfestation, mais cette fois-ci sans traitement réduit. Aussitôt une parasitose sévère se développe : l'état clinique s'altère et une orchite bilatérale se développe vers le 15ème jour de la maladie; la parasitémie est positive, le taux sérique de l'IgM augmente rapidement et intensément (jusqu'à environ 16 fois le taux normal); le titre des anticorps précipitants augmente également d'une manière considérable ( et atteint la valeur 24 ). La maladie aboutit à la mort environ après 3 mois d'évolution.

./ Cas du Lapin RQ86 (Fig. 45 et 46)

. . . . .

Chez cet animal, le traitement (21 séances d'irradiation de 10 heures chacune) avait été instauré alors que la trypanosomiase évoluait depuis 24 jours (après une infestation avec  $5 \times 10^6$  trypanosomes) et que l'état général était déjà très atteint; l'orchite bilatérale commençait à s'ulcérer au niveau de la peau du scrotum; la parasitémie était positive; le taux des immunoglobulines (en particulier de l'IgM) était élevé (titre environ 8 fois le taux normal); le titre des anticorps humoraux était également élevé.

Sous l'effet du traitement, l'évolution se fait rapidement vers la guérison : l'état clinique s'améliore dès les premiers jours du traitement; les lésions testiculaires (du moins les lésions macroscopiques) disparaissent; la parasitémie devient négative; le taux sérique de l'IgM se normalise en l'espace de 3 semaines, ce qui est remarquable, le titre des anticorps humoraux (hémagglutinants et précipitants) reste à peu près à une valeur constante, avec néanmoins une tendance à une lente diminution (en particulier en ce qui concerne les anticorps précipitants).

On a pratiqué 2 réinfestations, tardivement : la première, le 295ème jour et la deuxième le 315ème jour après l'arrêt du premier traitement (curatif). On a accompagné les deux réinfestations d'un traitement réduit (2 séances d'irradiation de 10 heures chacune à jour passé). L'animal résiste aux deux réinfestations : l'état général reste inchangé, la parasitémie reste négative; le taux de l'IgM demeure inchangé (titre normal); les titres des anticorps humoraux, encore présents au moment des réinfestations, s'élèvent à des valeurs considérables (les réinfestations jouant ici le rôle de deux injections antigéniques de rappel).

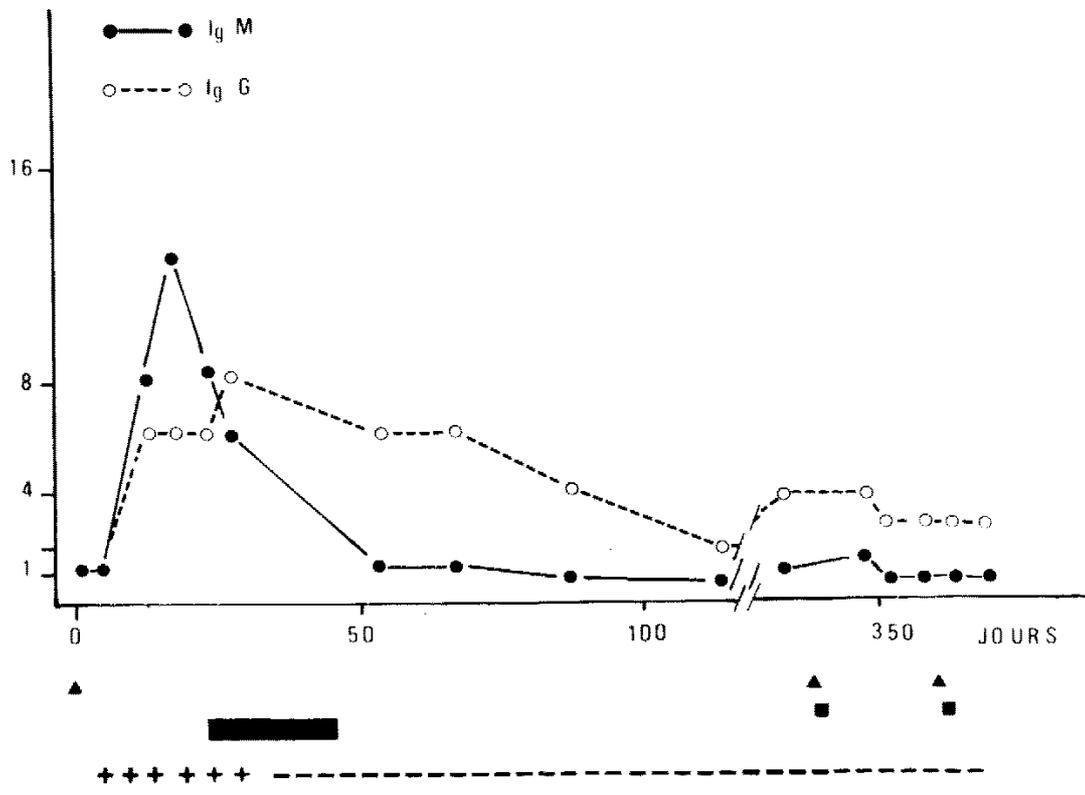


Fig. 45 - Effet de réinfestations chez un Lapin trypanosomé (*T. equiperdum*) guéri par le rayonnement. Evolution du taux sérique des immunoglobulines G(IgG) et M(IgM). Ces taux sont exprimés en multiples des taux existants avant l'expérience. Expérience AC - Cas du Lapin RQ86. Infesté avec  $2 \times 10^8$  trypanosomes. Après 24 jours de maladie, traitement pendant 21 jours (séances quotidiennes de 10h). Deux réinfestations sont pratiquées tardivement : les 338ème et 360ème jours après l'infestation primaire, la première avec  $2 \times 10^8$  trypanosomes, la deuxième avec  $10^9$  trypanosomes. Chaque réinfestation est accompagnée d'un traitement réduit (2 séances de 10h, à jour passé, la première débutant 2h après la réinfestation).

- ▲ infestation et réinfestations
- durée du traitement
- + présence de trypanosomes dans le sang
- absence de trypanosomes dans le sang

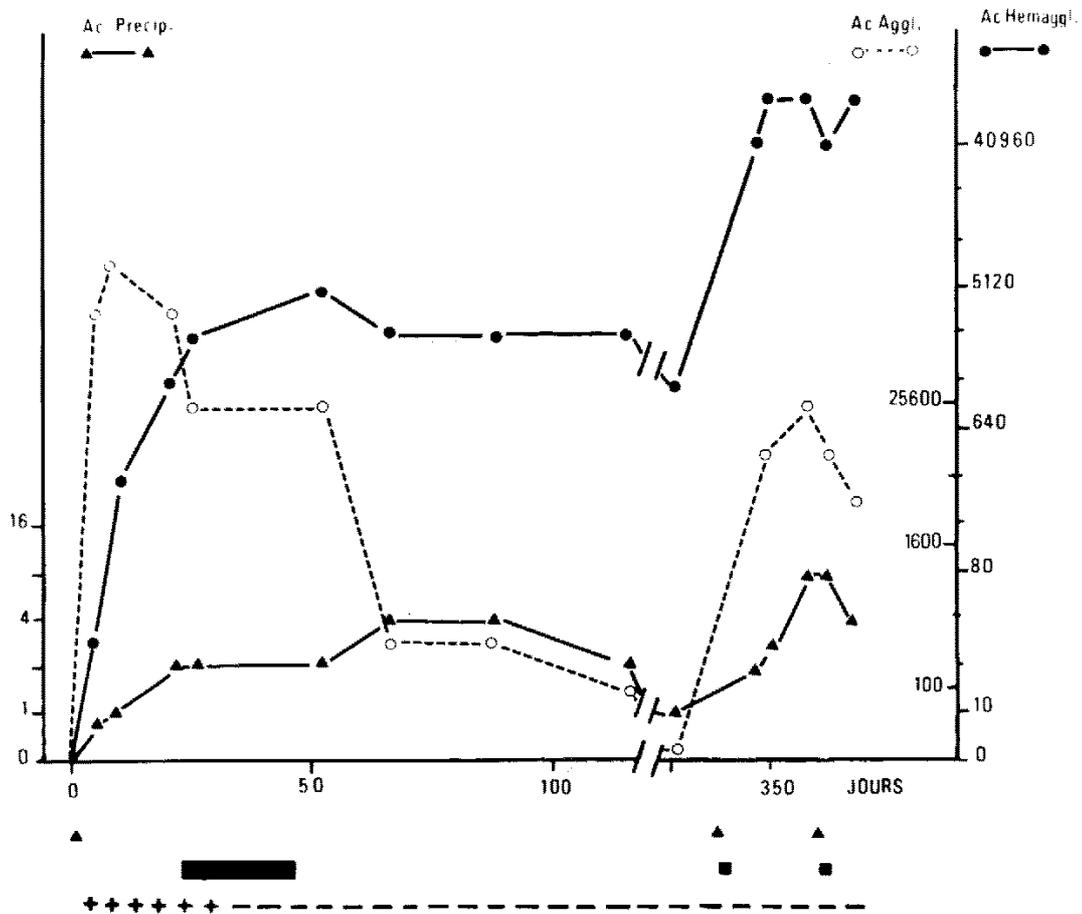


Fig. 46 - Effet de réinfestations chez un Lapin trypanosomé (*T. equiperdum*), guéri par le rayonnement. Evolution des anticorps circulants précipitants (Ac. Précip.), agglutinants (Ac. Aggl.) et hémagglutinants (Ac. Hémaggl.). Leur taux est exprimé par la dernière dilution donnant encore une réaction positive. Cas du Lapin RQ86 (Voir Figure précédente).

- ▲ infestation et réinfestations
- durée du traitement
- + présence de trypanosomes dans le sang
- absence de trypanosomes dans le sang

L'étude des deux lapins RR13 et RQ86, ainsi que celle des cinq autres lapins dont nous ne donnons pas les détails ici, permet ainsi les constatations suivantes :

- il existe chez les lapins ayant subi un premier traitement par irradiation (soit instauré immédiatement après l'inoculation d'une dose infestante importante de trypanosomes, soit ayant guéri une trypanosomose évoluant depuis 2 ou 3 semaines) un état de protection immunitaire partiel.

- cet état de protection immunitaire partiel peut durer remarquablement longtemps (au moins pendant un an) .

- il permet la mise en évidence du phénomène de facilitation thérapeutique : l'animal résiste à des réinfestations importantes de trypanosomes lorsqu'on les accompagne d'un traitement réduit (à lui seul tout à fait incapable de bloquer l'évolution des parasites inoculés lors de la réinfestation).

- enfin, le taux des anticorps humoraux est toujours élevé lors de ces réinfestations, ce qui témoigne là encore du bon fonctionnement du système immunologique.

#### 5.7. - Analyse du pouvoir séro-protecteur : confirmation de sa nature immunoglobulinique

Tout comme chez la Souris guérie par le rayonnement, on a recherché et titré à maintes reprises les anticorps séro-protecteurs (voir ci-dessus, le paragraphe 5.3.3.e.). Les anticorps sont bien décelables chez les Lapins guéris après un premier traitement par irradiation, mais leur titre est en général plus élevé chez les animaux ayant subi des réinfestations accompagnées d'irradiation réduite.

On a voulu confirmer le substratum immunoglobulinique du pouvoir séro-protecteur; nous désignons cette expérience par le terme d' *Expérience AD*.

~~On a choisi à cet effet le lapin RR15 mis en traitement une première fois 2 heures après son infestation; le traitement dura 10 jours.~~

L'animal ne fut donc pas le siège d'une trypanosomiase évolutive. Quatre réinfestations, accompagnées chacune d'une irradiation réduite, furent pratiquées, deux assez précocement (les 26 et 53ème jour après l'infestation) et les deux autres bien plus tardivement (les 254ème et 272ème jour après l'infestation). Le lapin résista parfaitement aux quatre réinfestations (Fig. 47 et Fig. 48).

On a analysé 4 échantillons de sérums, prélevés aux dates suivantes :

- avant l'infestation : *échantillon N*.
- 18 jours après la 1ère réinfestation : *échantillon A*.
- 7 jours après la 2ème réinfestation : *échantillon B*.
- 15 jours après la 2ème réinfestation : *échantillon C*.

0,4 ml de chaque échantillon sont déposés au-dessus de 11,6 ml d'un gradient de saccharose (de 5 à 20%) et soumis à une ultra-centrifugation à +4° C : 24.000 tours/minute, pendant 13 heures (centrifugeuse BECKMAN-SPINCO, modèle L2-65B, rotor SW-40).

Après centrifugation, on prélève des fractions de 1 ml, dans lesquelles on recherche simultanément le pouvoir séro-protecteur ( en inoculant la fraction à quatre souris, 0,2 ml par animal), le titre des immunoglobulines G et M (appréciation semi-quantitative à l'aide de techniques de double diffusion) et enfin la présence éventuelle de particules virales. Les résultats du pouvoir séro-protecteur et du dosage des immunoglobulines sont rapportés dans la Figure 49 et montrent clairement que le pouvoir séro-protecteur est lié aux immunoglobulines, soit à l'IgG seul (puisque'il existe dans les fractions 12 et 11 où cette immunoglobuline existe seule), soit à l'IgG et à l'IgM.

Il convient de préciser que la recherche du pouvoir séro-protecteur a été en fait effectuée dans un milieu sérique dilué. Ainsi, si on considère la répartition des concentrations de l'immunoglobuline G peut-on constater que la fraction N°7 de l'*échantillon A* (où le pouvoir séro-protecteur est partiel) correspond au sérum A dilué environ 9 fois et la fraction N°8 du même échantillon (où le pouvoir séro-protecteur est total) au sérum A dilué environ 7 fois.

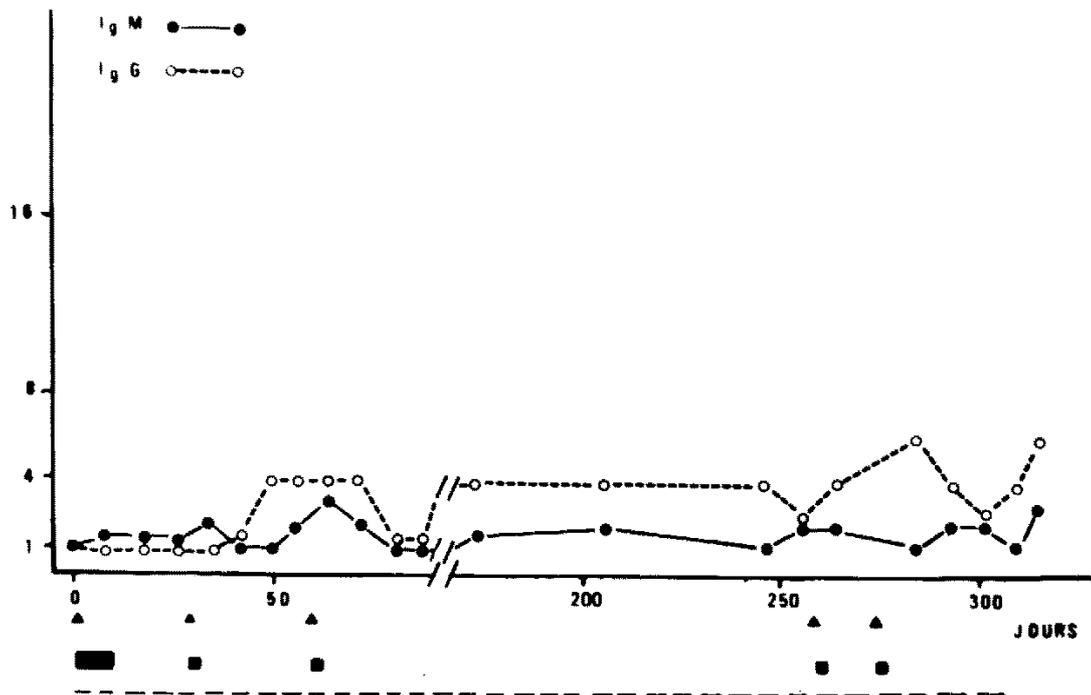


Fig. 47 - Confirmation de la nature immunoglobulinique du pouvoir séro-protecteur.

Expérience AD. On a choisi le Lapin RR15: Infesté avec  $9 \times 10^7$  trypanosomes, puis traité pendant 10 jours (séances quotidiennes de 10h, la première séance débutant 2h après l'infestation). Quatre réinfestations sont pratiquées, chacune accompagnée d'un traitement réduit (2 séances d'irradiation de 10h, à jours passés, la première débutant 2h après la première réinfestation).  
Cadence des 4 réinfestations :

- 1ère : 26ème jour après l'infestation avec  $2 \times 10^8$  trypanosomes
- 2ème : 53ème jour après l'infestation avec  $1,5 \times 10^9$  trypanosomes
- 3ème : 257ème jour après l'infestation avec  $2 \times 10^8$  trypanosomes
- 4ème : 272ème jour après l'infestation avec  $10^9$  trypanosomes

Evolution du taux sérique des immunoglobulines G (IgG) et M (IgM). Ces taux sont exprimés en multiples des taux existants avant l'expérience.

▲ infestation et réinfestations

■ durée du traitement

- absence de trypanosomes dans le sang

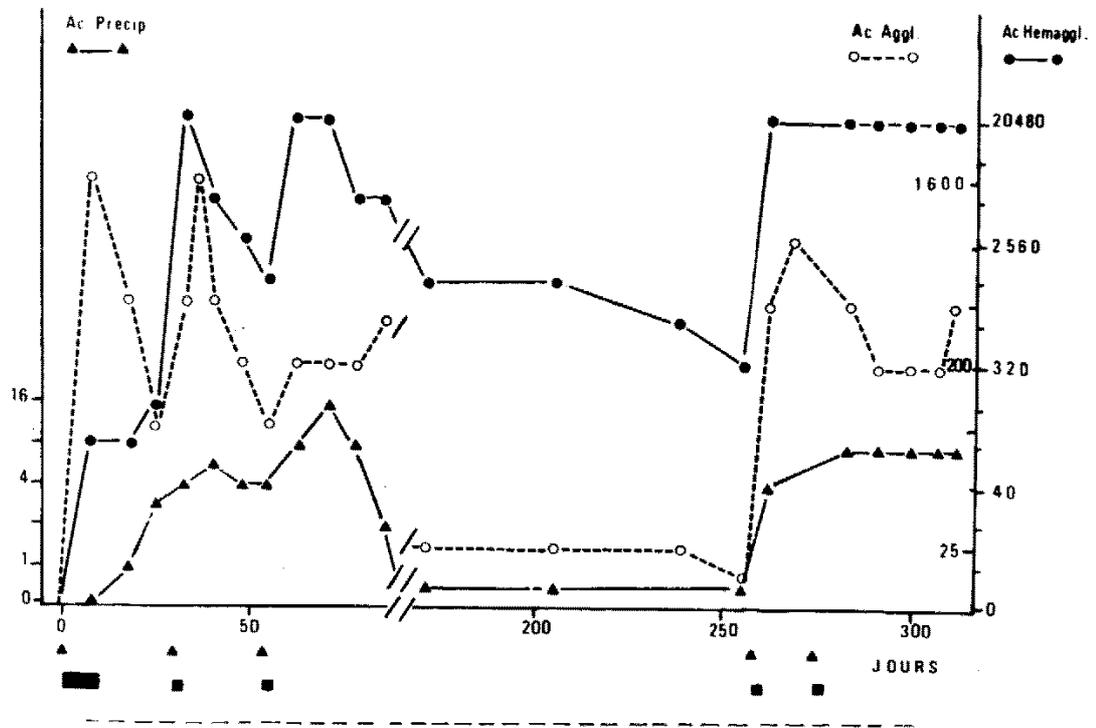


Fig. 48 - Confirmation de la nature immunoglobulinique du pouvoir séro-protecteur.  
 Expérience AD. On a choisi le Lapin RR15 - Voir Figure précédente - Evolution des anticorps précipitants (Ac. Précip.), agglutinants (Ac. Aggl.) et hémagglutinants (Ac. Hémaggl.) . Leur taux est exprimé par l'inverse de la dilution donnant encore une réaction positive .

- ▲ infestation et réinfestations
- durée du traitement
- absence de trypanosomes dans le sang

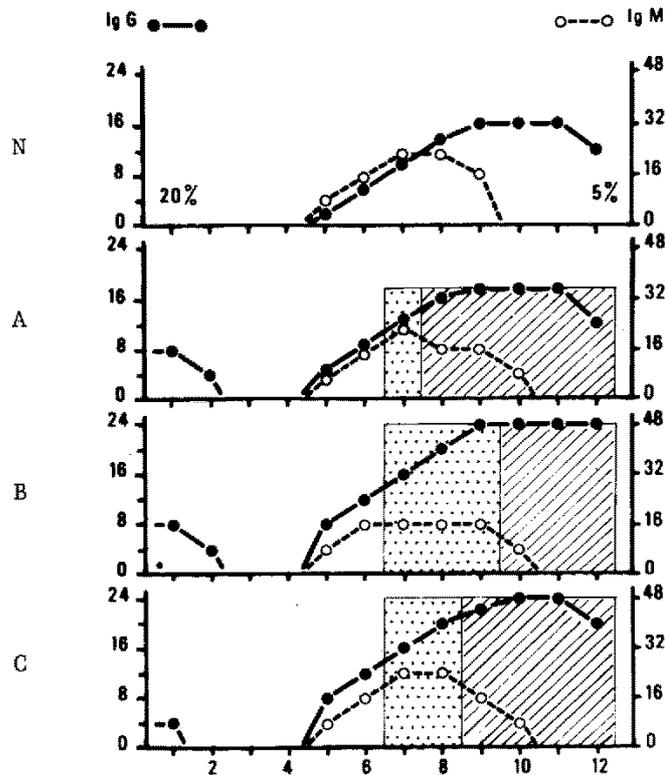


Fig. 49 - Confirmation de la nature immunoglobulinique du pouvoir séro-protecteur présenté par le sérum du Lapin RR15 (voir Fig. 47 et 48). Expérience AD .  
Quatre échantillons de sérum ont été analysés par ultra-centrifugation; 0,4 ml de chaque échantillon a été déposé au-dessus d'un gradient de saccharose (5 à 25%) :

- échantillon N : avant l'infestation
- échantillon A : 18 jours après la 1ère réinfestation
- échantillon B : 7 jours après la 2ème réinfestation
- échantillon C : 15 jours après la 2ème réinfestation

Voir le texte pour les détails expérimentaux. Douze fractions de 1 ml ont été recueillies. La fraction N°1 correspond au fond du gradient. Les taux des immunoglobulines G et M sont exprimés en unités conventionnelles, en se référant à un étalon personnel contenant par définition 100 unités de chaque immunoglobuline. Le pouvoir protecteur est indiqué par une zone en pointillés lorsqu'il est partiel, par une zone hachurée lorsqu'il est total.

Une autre constatation a pu être faite grâce à cette expérience : il existe, mais seulement pour les *échantillons A, B et C* dans les fractions du fond des tubés (fractions N°2 et surtout N°1) des quantités appréciables d'IgG. Il existe donc des molécules d'IgG qui sédimentent notablement plus vite que les molécules habituelles; les deux zones IgG sont même séparées par 2 ou 3 fractions où l'IgG n'est pas décelable.

Un tel résultat évoque fortement l'existence de complexes circulants solubles formés de molécules d'antigènes trypanosomiques unies à des molécules d'anticorps IgG et possédant une constante de sédimentation élevée.

La présence dans la circulation sanguine, durant des périodes prolongées, de tels complexes antigènes-anticorps, est du plus grand intérêt. Ainsi, par exemple, en ce qui concerne les titres des anticorps humoraux, il apparaît possible que des titres faibles soient dûs en réalité au fait qu'une partie importante de ces anticorps se trouve engagée dans des complexes et dès lors neutralisée immunologiquement.

Cette expérience d'ultracentrifugation et l'observation de chacune des fractions au microscope électronique n'a pas révélé de particules virales, en particulier dans les fractions où existe un pouvoir séro-protecteur.

6 - TRYPANOSOMIASE CHRONIQUE DE LA SOURIS A T. GAMBIENSE

=====

ACTION DU RAYONNEMENT

=====

Les résultats que nous allons décrire ici sont préliminaires :  
les circonstances (pannes de l'appareil) ne nous ont pas permis d'effectuer  
des traitements aussi prolongés que nous le souhaitions.

Néanmoins, on a pu soumettre des souris à des traitements de  
durée relativement courte : 4, 6 et 9 jours (avec une séance quotidienne  
d'irradiation de 6 heures). Pour ces trois expériences, les souris avaient  
été infestées avec  $10^3$  parasites et la trypanosomiase évoluait depuis 11  
jours. A ce moment, la parasitémie est modérée ( $10^1$  à  $10^2$  parasites par  
 $\mu$ l de sang); le taux de l'IgM sérique est déjà très élevé (8 à 24 fois  
le taux normal, selon les expériences et selon les animaux).

On va décrire ici les résultats de l'expérience comportant  
9 jours de traitement (*expérience AE*). Au 11<sup>ème</sup> jour de la maladie (jour  
où débute le traitement), le taux sérique de l'IgM était déjà très élevé :  
24 fois le taux normal (c'est-à-dire le taux avant infestation).

Dix souris, non - traitées, servent de témoins. Elles se  
comportent ainsi : huit meurent relativement rapidement entre le 15<sup>ème</sup>  
et le 20<sup>ème</sup> jour (évolution de type  $\alpha$ ) les deux autres présentent une  
phase de latence et meurent respectivement après deux mois et demi et  
trois mois et demi (évolution du type  $\beta$  - voir ci-dessus, le paragraphe  
4.2.2.)

Trente souris sont traitées; on constate les phénomènes  
suivants (Fig. 50 et 51):

- aucune souris n'évolue vers la mort dans un bref délai, c'est-à-dire  
aucune souris ne montre une évolution de la parasitose du type  $\alpha$ .

- au contraire, la parasitémie se négative au bout de 3 jours de  
traitement.

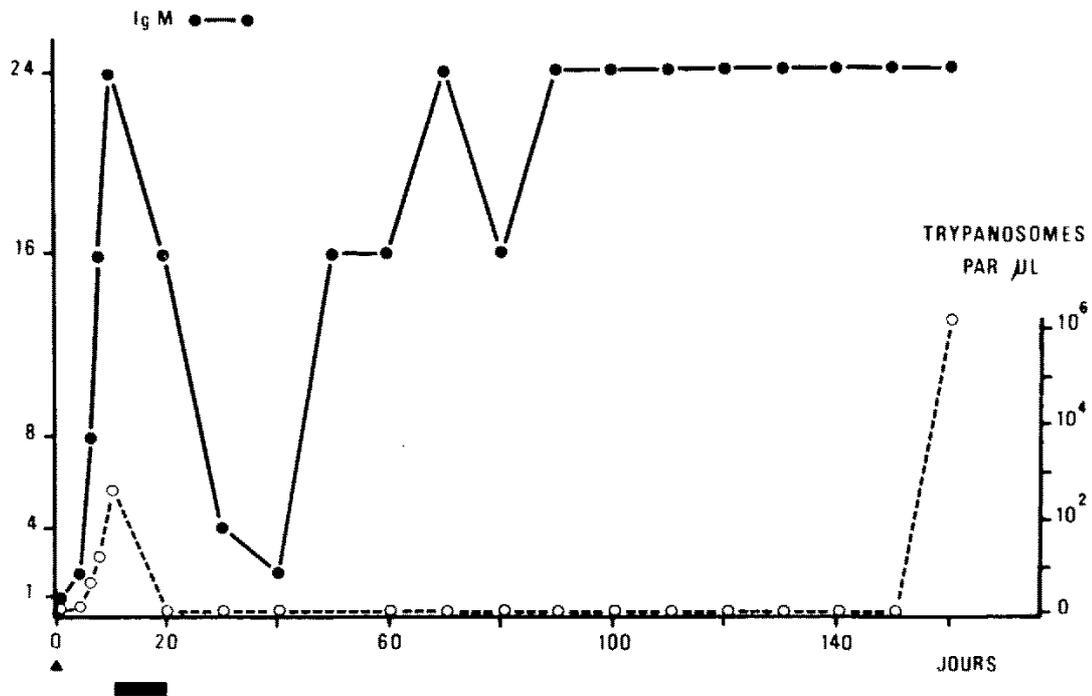


Fig. 50 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase chronique de la Souris (*T. gambiense*). Expérience AE.  
 Evolution de la parasitémie (nombre de trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang) et du taux sérique de l'IgM chez une souris infestée avec  $10^3$  trypanosomes et mise en traitement 11 jours après. Traitement de 9 jours (séances quotidiennes de 6h). Le taux de l'IgM est exprimé en multiples du taux existant avant l'infestation.  
 Dans le cas de cette Souris, les trypanosomes disparaissent du sang périphérique, et le taux de l'IgM se normalise rapidement. Par la suite, ce taux s'élève à nouveau. Environ 4 mois plus tard, des trypanosomes réapparaissent dans le sang et l'animal meurt.

▲ infestation

■ durée du traitement

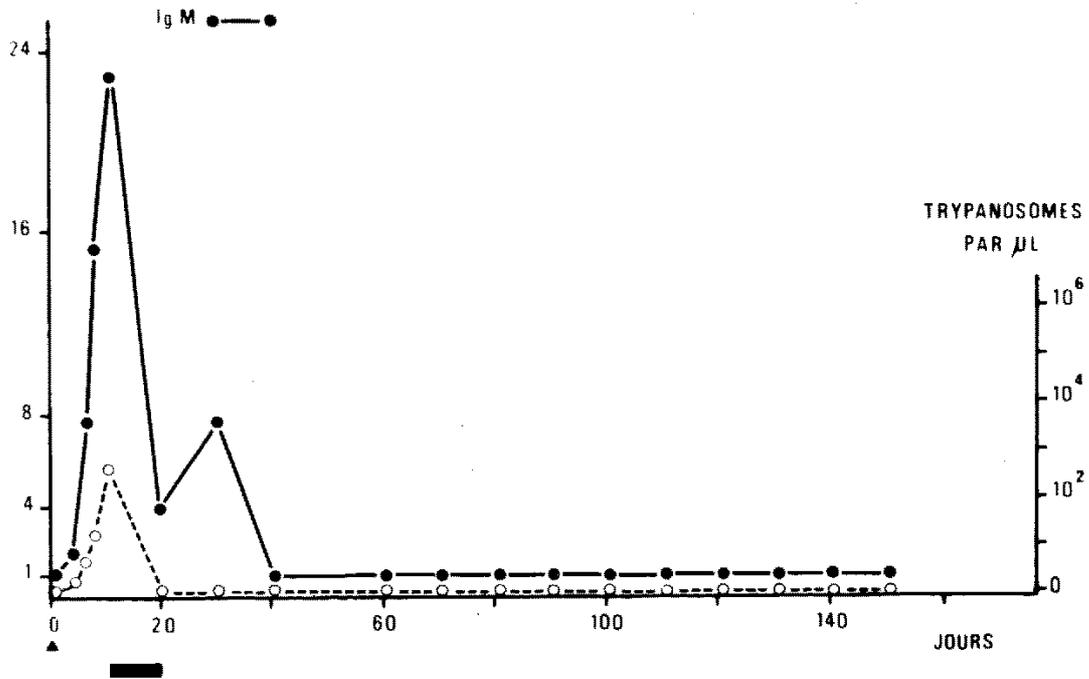


Fig. 51 - Traitement par irradiation de la trypanosomiase chronique de la Souris (*T. gambiense*).  
 Expérience AE. Evolution de la parasitémie (nombre de trypanosomes par  $\mu$ l de sang) et du taux sérique de l'IgM chez une Souris mise en traitement 11 jours après son infestation (avec 10<sup>3</sup> trypanosomes). Traitement de 9 jours (séances quotidiennes de 6h). Le taux de l'IgM est exprimé en multiples du taux existant avant l'infestation. Dans le cas de cette souris, les trypanosomes disparaissent définitivement du sang périphérique, et le taux de l'IgM se normalise rapidement et définitivement. Guérison.

▲ infestation

■ durée du traitement

- l'évolution du taux sérique de l'IgM est particulièrement intéressante. En effet, ce taux (qui était égal à environ 24 fois le taux normal) décroît rapidement chez toutes les souris; au bout de dix jours environ, le taux est diminué de moitié; et au bout de trois à quatre semaines (après le début du traitement) le taux est à peu près normalisé. En tenant compte de ce que l'on sait à propos du catabolisme de l'IgM et en particulier sur sa demi-vie (qui est en moyenne de 6,3 jours chez l'homme trypanosomé, GOMBERT et coll. (21) ), tout se passe comme si la synthèse massive des molécules d'IgM en rapport avec la trypanosomiase était arrêtée dès les premiers jours du traitement. Ce phénomène est intéressant à signaler.

Par la suite, les souris ont montré deux sortes d'évolution :

- Chez quinze animaux (50% exactement), on assiste à une "*rechute immunologique*" : environ un mois après l'arrêt du traitement, le taux de l'IgM augmente à nouveau, rapidement (en l'espace de 2 à 3 semaines); et ce taux va rester élevé (environ 24 fois le taux normal), en plafond. En fait, ces souris présentent une trypanosomiase évoluant selon le type  $\beta$ . La parasitémie est négative. Cette phase de latence a duré de 6 à 18 mois, selon les animaux. Finalement, des trypanosomes apparaissent dans le sang circulant, et les souris meurent en 5 à 10 jours (en présentant in fine une parasitémie massive).

- Treize souris ont effectivement guéri : les parasites restent définitivement absents du sang circulant; le taux sérique de l'IgM reste définitivement normal.

- Deux souris qui, elles aussi, ont finalement guéri, ont montré, dans un premier temps une évolution curieuse : après sa normalisation consécutive au traitement, le taux sérique de l'IgM s'est à nouveau élevé, mais en se stabilisant à un niveau relativement modéré (environ 8 fois le taux normal); environ six mois après, le taux de l'IgM se normalise enfin définitivement. La parasitémie est toujours restée négative. Il est impossible de dire à quoi correspond exactement cet état en quelque sorte intermédiaire (entre une évolution d'une trypanosomiase du type  $\beta$  et une guérison immédiate par le traitement) .

Des traitements, de durée moindre (de 4 et de 6 jours), toujours instaurés 11 jours après l'infestation des souris avec  $10^3$  parasites, ont été réalisés. Dans ces deux expériences (*expériences AF*) pratiquées chacune sur des lots de trente souris, le taux sérique de l'IgM s'est élevé un peu plus lentement que pour l'*expérience* précédente AE : le 11<sup>ème</sup> jour (jour du début du traitement), ce taux n'avait pas encore atteint la valeur maximale habituelle (environ 24 fois le taux normal).

Malgré leur durée brève, les traitements influent nettement l'évolution de la trypanosomiase :

- l'ascension du taux sérique de l'IgM est ralentie.
- l'évolution rapide de la maladie (type  $\alpha$ ) est supprimée et toutes les souris présentent une maladie prolongée (type  $\beta$ ).

Ces résultats, pour préliminaires qu'ils soient, nous permettent néanmoins de dire :

- l'action du rayonnement est certaine sur la trypanosomiase de la souris à *Trypanosoma gambiense*, évoluant depuis 11 jours.
- des traitements de durée brève (de 4 et de 6 jours) ont déjà une influence nette sur l'évolution de la parasitose : l'ascension du taux sérique de l'IgM est ralentie et la maladie évolue obligatoirement sur le mode prolongé type  $\beta$ .
- un traitement de 9 jours a pu amener la guérison de 50% des animaux; les 50% restants présentent une maladie évoluant selon le type  $\beta$ .

Ces résultats nous semblent très encourageants.

7 - PALUDISME DE LA SOURIS A P. BERGHEI  
=====

ACTION DU RAYONNEMENT  
=====

On a réalisé trois expériences (que nous désignons par le terme d' *expériences AG*) au cours desquelles trente souris sont infestées, chacune avec  $10^4$  parasites (éléments des schizogonies endo-érythrocytaires), et traitées pendant 10 jours (séances quotidiennes d'irradiation de 6 heures, la première séance débutant 2 heures après l'infestation); trente souris non-traitées servent de témoins.

La Figure 52 montre les résultats de l'une des expériences.

On constate :

- aucune souris n'évolue vers la guérison.
- cependant, le temps de latence parasitémique est augmenté : la parasitémie ne devient décelable qu'à partir du 7ème jour.
- la montée de la parasitémie est légèrement freinée.
- ainsi les animaux meurent entre le 20ème et le 22ème jour de la maladie (la parasitémie étant alors de l'ordre de 30%) .

On peut donc dire :

- l'action du rayonnement sur le paludisme de la Souris à *Plasmodium berghei* est nette mais très partielle.
- il semble que les conditions expérimentales dans lesquelles nous agissons actuellement (en particulier les conditions liées au rayonnement) ne soient pas les conditions optimales d'action sur ce modèle parasitaire.

On peut espérer que la guérison du paludisme de la Souris à *Plasmodium berghei* devienne chose possible lorsque nous disposerons d'un appareillage où les différents paramètres pourront être variés et réglés à volonté.

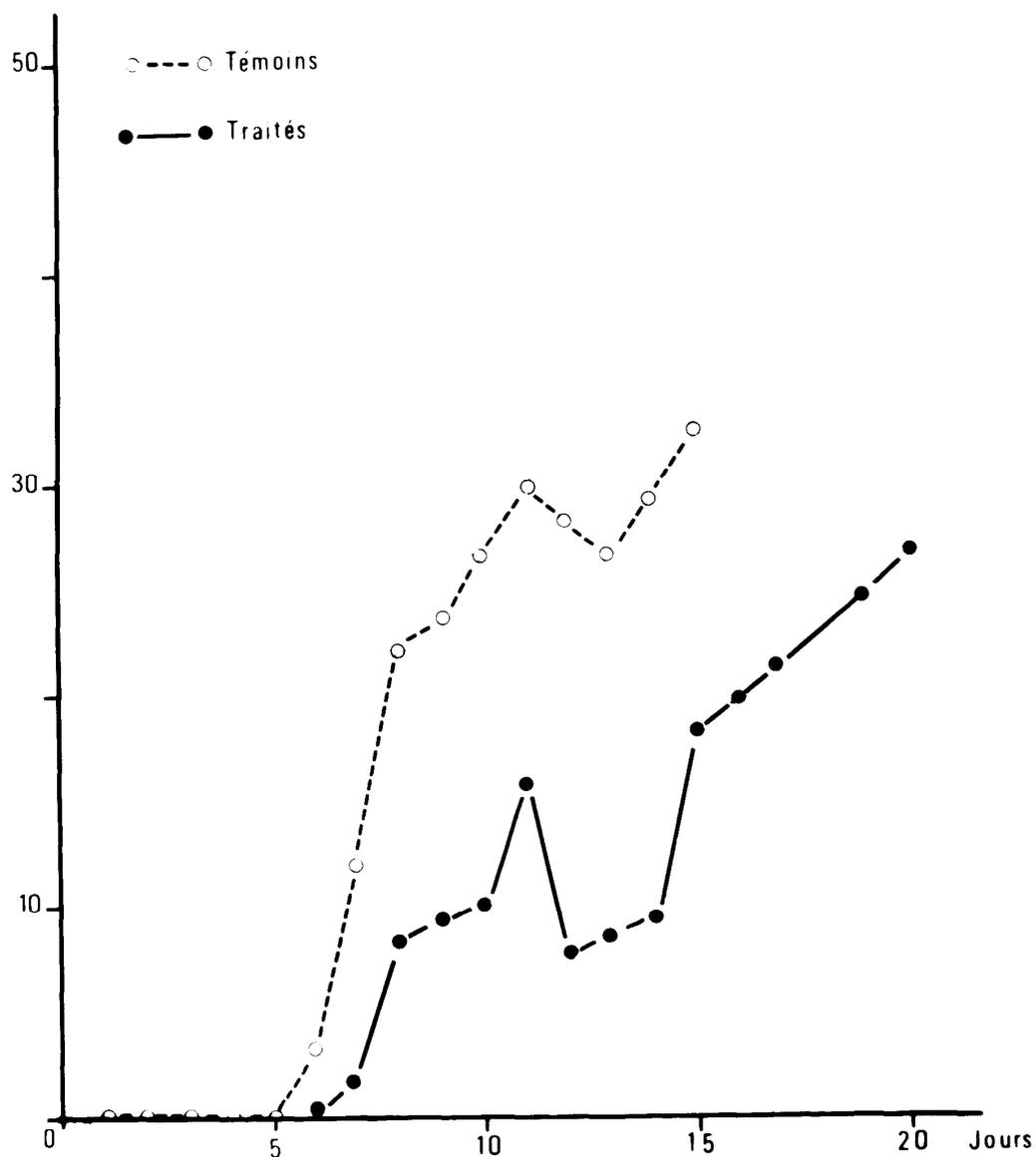


Fig. 52 - Traitement par irradiation du paludisme de la Souris (*P. berghei*). Evolution de la parasitémie chez 2 lots de 30 souris infestées chacune avec  $10^4$  parasites. Les souris du premier lot ne sont pas traitées et servent de témoins. Les souris de l'autre lot sont traitées pendant 10 jours (séances quotidiennes d'irradiation de 6h, la première séance débutant 2h après l'infestation). Evaluation semi-quantitative de la parasitémie (proportion des hématies parasitées par des formes endo-erythrocytaires, exprimée en %). Expérience AG.  
 Les Souris témoins meurent aux environs du 15ème jour.  
 Les Souris traitées aux environs du 20ème jour.

---

CHAPITRE III : D I S C U S S I O N - C O N C L U S I O N

---

## 1 - CONSIDERATIONS GENERALES

=====

Nous avons pu préciser, au chapitre précédent, quelques propriétés biologiques présentées par le rayonnement émis par nos deux appareils, et tout particulièrement par l'appareil N°2 .

L'action de ce rayonnement s'avère être très intense dans les trypanosomiasés expérimentales, étudiées dans le cadre de cette thèse, beaucoup moins intense dans le cas du paludisme expérimental de la Souris.

En ce qui concerne les trypanosomiasés, aussi bien la trypanosomiase aiguë de la Souris et du Rat ( à *Trypanosoma equiperdum*) que les trypanosomiasés chroniques du Lapin ( à *Trypanosoma equiperdum*) et de la Souris (à *Trypanosoma gambiense*), l'action du rayonnement permet en effet d'obtenir, dans certaines conditions de traitement, la guérison de la parasitose, et cela même dans le cas où le traitement par irradiation est instauré après un certain temps d'évolution de la maladie.

Cette guérison est totale et définitive.

Sur le plan clinique, les troubles de l'état général (amaigrissement hyperthermie) et les lésions macroscopiques régressent rapidement et disparaissent. Sur le plan histologique, les lésions de la glande testiculaire, si importantes au cours de la trypanosomiase chronique du Lapin, disparaissent elles aussi et on assiste à une régénération qui conduit au rétablissement de l'état normal. Sur le plan biologique, les parasites disparaissent définitivement aussi bien dans le sang circulant que dans les divers organes. Les taux sériques des immunoglobulines se normalisent, en particulier le taux de l'IgM, très élevé au cours des trypanosomiasés en évolution. Enfin, l'animal guéri présente un excellent état immunitaire, ce qui se traduit d'une part par un état de résistance, total ou partiel, aux réinfestations, et d'autre part, par l'élaboration prolongée d'anticorps circulants possédant un pouvoir agglutinant, hémagglutinant, précipitant et séro-protecteur.

Il n'est sans doute pas inutile de redire que les trypanosomiasés expérimentales étudiées dans notre thèse - ainsi que d'ailleurs le paludisme expérimental de la Souris - constituent des parasitoses sévères évoluant dans tous les cas vers la mort de l'animal infesté.

En ce qui concerne le paludisme expérimental de la Souris à *Plasmodium berghei*, nous avons constaté une action du rayonnement beaucoup moins intense. L'évolution de la parasitose est simplement freinée, mais son issue reste fatale.

L'effet du rayonnement émis sur les trypanosomiasés expérimentales apparaît donc comme un phénomène absolument original. A notre connaissance, aucun traitement biophysique, de quelque nature que ce soit et appliqué jusqu'à ce jour, n'a réussi à guérir de telles parasitoses. Nous nous sommes donc trouvés dans l'obligation d'examiner avec une rigueur toute particulière toutes les conditions expérimentales relatives à notre expérimentation, ce qui nous amène à décrire les points ci-après.

#### 1.1. - Contrôle des trypanosomes inoculés - Animaux témoins

Pour toutes nos expériences, les suspensions de trypanosomes utilisées pour l'infestation des animaux ont subi, lors de l'évaluation quantitative des parasites (ou numération) un strict contrôle microscopique; tous les trypanosomes doivent être mobiles.

Pour toutes nos expériences, nous rappelons que nous avons toujours infesté, simultanément et dans les mêmes conditions, à la fois les animaux destinés à être soumis à l'irradiation et des animaux témoins laissés sans traitement; ces animaux témoins sont toujours morts de leur trypanosomiase, dans 100% des cas.

#### 1.2. - Commission de Contrôle

Une Commission de Contrôle a été constituée en 1969 dans le but de constater et vérifier l'effet du rayonnement sur la trypanosomiase aiguë de la Souris. Cette Commission avait été présidée par le Professeur CAMBAR, de la Faculté des Sciences de Bordeaux. Ont signé le procès-verbal final dix Professeurs de Facultés et dix personnalités non-universitaires. La Commission, à l'unanimité de ses membres, avait décidé de demander le

contrôle de la totalité des expériences (préparation des animaux et de la suspension de trypanosomes, exécution de l'infestation et du traitement par irradiation, résultats) par le ministère d'un huissier. Cet huissier a établi, lors de la fin de l'expérience, un procès-verbal dit de constat.

L'expérience contrôlée par la Commission était une expérience du *type D*. Trente souris, marquées et choisies selon les techniques statistiques usuelles (Professeur DUHAMEL) sont inoculées avec  $2 \times 10^4$  trypanosomes et traitées pendant 5 jours, avec une séance d'irradiation de 6 heures. Trente souris, marquées et choisies dans les mêmes conditions, sont également infestées mais non traitées et servent de témoins.

Les résultats étaient strictement semblables à ceux décrits pour les *expériences du type D*. Toutes les souris traitées présentent d'abord une phase de parasitémie ascendante, puis stationnaire, et enfin se négativent toutes vers la 90ème heure. Les souris témoins meurent toutes de trypanosomiase aiguë entre la 80ème et la 120ème heure.

### 1.3.-Existence éventuelle d'un effet thermique

On pourrait supposer que l'action du rayonnement se fasse par l'intermédiaire d'un effet thermique global. En d'autres termes, le rayonnement agirait en provoquant une augmentation de la température corporelle des animaux irradiés.

A priori, une action de ce genre apparaît comme hautement improbable lorsque l'on considère la puissance du rayonnement émis, en particulier celle de l'onde UHF, pour celle-ci, la densité d'énergie moyenne  $W_m$  est en effet au maximum de  $10 \mu W/cm^2$  au niveau de la table d'expérience et au centre de la zone active.

En fait, les résultats expérimentaux obtenus et décrits dans le chapitre RESULTATS, paragraphe 2.8. (trypanosomiase aiguë de la Souris) et 5.4. (trypanosomiase chronique du Lapin) ont confirmé l'absence d'un effet thermique global.

### 1.4. - L'effet du rayonnement n'est pas toujours un effet total

Les résultats obtenus montrent que, dans certaines circonstances expérimentales, l'effet du rayonnement d'une part n'est pas un effet de 100% et que d'autre part l'intensité de son action biologique pouvait

varier en fonction de certains facteurs. De tels résultats constituent à la fois un argument en faveur de la rigueur de l'expérimentation et peuvent inciter à raisonner sur le mode d'action du rayonnement.

Rappelons brièvement ces circonstances expérimentales, qui sont liées les unes aux caractères du rayonnement émis, les autres aux conditions d'expérience.

#### 1.4.1. - Valeur de la longueur d'onde HF

Pour une longueur d'onde égale à 19 m, nous avons vu que seulement une partie des souris infestées avec *Trypanosoma equiperdum* (par exemple 50% dans les expériences du type A) pouvait être négativée. Lorsqu'on amène la longueur d'onde à 17 m, toutes les autres conditions expérimentales restant identiques, la proportion des animaux négativés atteint 100% (expériences du type B).

#### 1.4.2. - Influence de la puissance de l'onde UHF

Nous avons montré que l'effet biologique du rayonnement sur la trypanosomiase aiguë de la Souris était fonction de la puissance de l'onde UHF.

Lors de l'expérience M qui consistait à exposer des lots de souris infestées avec *Trypanosoma equiperdum* à des puissances variables de l'onde UHF, nous avons constaté que chez les souris soumises à une puissance UHF (puissance rayonnée moyenne) allant de 95 à 700  $\mu$ W, la négativation de la parasitémie survenait dans 100% des cas. En outre, des calculs ont permis de montrer qu'il existe une relation entre la valeur de la puissance UHF et la vitesse de négativation de la parasitémie.

Mais chez les souris, soumises à une puissance UHF allant de 25 à 95  $\mu$ W (il s'agit des dix souris qui avaient été placées dans la loge N°6 lors de l'expérience M), l'effet du rayonnement n'est plus de 100%; la négativation de la parasitémie ne survient (et avec un léger retard) que chez huit animaux; les deux autres meurent de trypanosomiase aiguë, tout comme d'ailleurs les souris des cages 1 à 5, soumises à une puissance UHF nulle.

#### 1.4.3. - La notion de "limite supérieure de l'action biologique du rayonnement"

En ce qui concerne la trypanosomiase aiguë de la Souris à *Trypanosoma equiperdum*, nous avons vu que l'action du rayonnement, instauré

deux heures après l'infestation des animaux, permettait d'enrayer l'évolution de la parasitose chez 100% des animaux si l'infestation avait été réalisée avec  $\leq 2 \times 10^5$  parasites; pour des infestations supérieures, seule une faible proportion des animaux peut être négativée dans certains cas, mais en général l'effet du rayonnement se traduit par un simple ralentissement de l'évolution de la parasitose vers la mort (*expériences du type E*).

1.4.4. - Souris infestées avec *T. equiperdum* et mises en traitement après 48 heures d'évolution de la trypanosomiase aigüe

Dans ce type d'expériences (*expériences du type F*), l'action du rayonnement arrive le plus souvent encore à négativer les animaux, bien que la parasitémie, 48 heures après l'infestation, soit de l'ordre de  $10^5$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang circulant. Cependant, lors de quelques expériences de ce type, une certaine proportion des animaux (de l'ordre de 30%) ne s'est pas négativée et a évolué vers la mort.

1.4.5. - Durée du traitement par irradiation

La durée totale du traitement peut, dans certaines conditions, augmenter considérablement le pouvoir de guérison du rayonnement. Ainsi, dans le cas de souris infestées par *Trypanosoma equiperdum* et soumises 2 heures plus tard à l'irradiation, un traitement de 5 jours permet de guérir définitivement environ 30% des animaux, alors qu'un traitement de 10 jours en guérit de 90 à 100% (voir les *expériences des types C et I*).

1.4.6. - Effet du traitement par irradiation sur la trypanosomiase chronique de la Souris à *T. gambiense*

Nous avons décrit une expérience (voir *expérience AE*) où des souris, infestées depuis onze jours avec *Trypanosoma gambiense*, sont soumises à un traitement de neuf jours. Nous avons montré que, dans ces conditions, la parasitose est enrayée chez la totalité des animaux, mais que par la suite 50% des souris présentent une rechute biologique et parasitologique à évolution mortelle, alors que les 50% restants demeurent définitivement guéris. C'est là un exemple parfait de circonstances expérimentales aboutissant à un effet qui ne soit pas un effet de 100% .

1.4.7. - Effet du rayonnement dans d'autres modèles parasitaires

Nous rappelons que, dans le cas du paludisme expérimental de la Souris, l'effet du rayonnement est très partiel, ce qui démontre l'importance de l'agent causal en cause.

Nous pouvons également signaler les résultats obtenus dans une autre parasitose chronique : la souris infestée avec *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Ce Protozoaire flagellé appartenant au sous-genre *Schizotrypanum* et non au sous-genre *Trypanozoon*, possède une biologie très différente aussi bien de celle de *Trypanosoma gambiense* que de *Trypanosoma equiperdum*. En particulier, le parasite qui existe chez l'organisme infesté à la fois sous forme flagellée (trypomastigote) sanguine et sous forme non flagellée (amastigote) intra-cellulaire se multiplie sous cette dernière forme.

Dans cette parasitose chronique de la Souris, l'action du rayonnement s'est révélée nulle (12). Il est possible que des résultats différents puissent être obtenus dans l'avenir en faisant varier les conditions expérimentales, en particulier les paramètres du rayonnement émis.

A présent, nous pensons donc pouvoir dire que notre expérimentation a été réalisée avec rigueur. L'effet du rayonnement, sur les trypanosomiasés expérimentales aiguës et chroniques étudiées dans notre thèse, constitue donc un effet net, clair et précis.

## 2 - MECANISME D'ACTION

=====

Nous sommes donc à présent en droit de nous poser la question qui vient naturellement à l'esprit : quel est le ou les mécanismes d'action du rayonnement ?

Schématiquement, on pourrait envisager trois mécanismes d'action :

- $\alpha$  : soit une action exclusive sur l'agent causal, le trypanosome.
- $\beta$  : soit une stimulation des moyens de défense de l'organisme parasité.
- $\gamma$  : soit une combinaison des deux mécanismes précédents .

### 2.1. - Action exclusive sur le trypanosome

L'action sur le trypanosome pourrait être une action directe ou une action indirecte. Un exemple d'action indirecte est constitué par la libération de certains groupements chimiques tels les radicaux libres, actifs sur certains parasites (LWOFF et coll. (36), DODIN et coll. (18) ).

Selon nous, une action exclusive sur le parasite semble peu probable . Nous allons en voir les raisons ci-après.

#### 2.1.1. - Propagation des constituants du rayonnement à travers l'organisme

Nous avons dit plus haut qu'au cours de la trypanosomiase aiguë de la Souris et du Rat et de la trypanosomiase chronique du Lapin, les trypanosomes sont présents, en quantité plus ou moins importante, dans tous les tissus et les organes de l'organisme infesté (Chapitre MATERIEL et METHODES, les paragraphes 4.1.1. et 4.2.1.) .

Par ailleurs, nous avons constaté que l'action du rayonnement sur les trypanosomiasés, aiguë et chronique, nécessitait la présence simultanée de ces trois constituants essentiels : onde UHF, onde HF et champ magnétique. En particulier en ce qui concerne l'onde UHF, on a pu

établir que, si à elle seule elle n'était pas suffisante, sa présence semble absolument primordiale et son action biologique serait proportionnelle à sa puissance (Chapitre RESULTATS, les paragraphes 3.2. et 3.3.)

Cependant la pénétration et la propagation dans l'organisme n'est pas la même pour les trois constituants essentiels du rayonnement.

Si l'onde HF et le champ magnétique pénètrent et se propagent sans trop de perte dans tout l'organisme, il n'en est pas de même pour l'onde UHF : celle-ci perd 50% de son énergie lors de son passage à travers la peau et elle ne pénètre guère au-delà de 4 à 5 mm. de profondeur. En d'autres termes, l'onde UHF ne se propage pas dans la totalité de la souris infestée, à plus forte raison du rat ou du lapin.

Or nous avons constaté que l'action du rayonnement peut aboutir à la guérison parasitologique totale et définitive aussi bien de la ~~trypanosomiase aiguë de la Souris et du Rat que de la trypanosomiase~~

#### 2.1.2. - La notion de "limite supérieure de l'action biologique du rayonnement"

Nous avons évoqué cette notion ci-dessus, dans ce même chapitre, au paragraphe 1.4.3. Elle consiste, rappelons-le, dans la possibilité d'enrayer et même de guérir l'évolution d'une trypanosomiase aiguë chez une souris ayant été infestée avec au maximum  $2 \times 10^5$  trypanosomes.

Une telle notion nous semble difficilement compatible avec l'hypothèse d'une action exclusive sur le parasite.

#### 2.1.3. - Le phénomène de la facilitation thérapeutique

Nous discuterons de ce phénomène un peu plus loin, en particulier en ce qui concerne le Lapin (voir, même chapitre, paragraphe 2.2.6.) .

#### 2.1.4. - Irradiation de trypanosomes maintenus en survie *in vitro*

Nous mentionnons enfin une expérience au cours de laquelle des trypanosomes (*T. equiperdum*) maintenus en survie *in vitro* dans un milieu approprié (culture de cellules KB), ont été irradiés pendant 5 jours, 6 heures par jour, c'est-à-dire comme les souris traitées lors de certaines de nos expériences (*expériences de type A, B, C et D*). Au terme de l'expérience, les trypanosomes étaient restés vivants et se

montraient normalement infectieux (14) .

## 2.2. - Stimulation des moyens de défense

Le rayonnement agirait en stimulant les facteurs de défense. Certains de ces facteurs sont de nature immunologique : on les appelle spécifiques. Les autres sont dits aspécifiques.

Au sein de l'organisme, il est en réalité parfois difficile de séparer les deux ordres de facteurs. Prenons le cas des cellules macrophages. Lors d'une agression, infectieuse ou non, ces cellules sont mobilisées; elles subissent une série de transformations aspécifiques mais caractéristiques et elles deviennent capables de phagocyter activement des micro-organismes ou des particules. Mais ces processus de mobilisation et de phagocytose sont considérablement augmentés lorsqu'interviennent des facteurs spécifiques, par exemple sous la forme d'anticorps circulants fixés à la surface des macrophages ou à la surface des micro-organismes.

Par ailleurs, nous avons pu montrer au cours de notre expérimentation que des anticorps circulants pouvaient présenter un pouvoir anti-trypanosome important. Nous avons pu déceler chez les animaux (Souris, Rats et Lapins), infestés puis traités, des anticorps circulants séro-protecteurs (de nature sûrement IgG, peut-être aussi IgM); après des réinfestations, les titres de ces anticorps sont élevés. Il est aussi plus que probable que les anticorps agglutinants (de nature IgM et IgG) jouent un rôle important dans la lutte de l'organisme pour se débarrasser des trypanosomes.

Quoiqu'il en soit, une série de faits expérimentaux constatés dans notre thèse sont compatibles avec cette théorie d'exaltation des moyens de défense. Nous allons passer en revue ces faits expérimentaux.

### 2.2.1. - Evolution de la parasitémie chez les souris infestées avec *T. equiperdum* et traitées par irradiation

Considérons l'évolution de la parasitémie au cours d'expériences du type D ou I, où les souris sont infestées avec  $2 \times 10^4$  trypanosomes et traitées pendant 5 ou 10 jours, avec des séances quotidiennes d'irradiation de 6 heures, la première séance débutant 2 heures après l'infestation. Nous avons vu que pendant les 40 à 50 premières heures, la parasitémie augmente sensiblement comme chez les souris témoins non-traitées. Passée la 50ème heure, l'évolution de la parasitémie est très ralentie (par

rapport aux souris témoins) ou même stationnaire pendant une vingtaine d'heures; puis, survient la négativation, vers la 90ème heure.

On peut admettre qu'à partir de la 50ème heure après l'infestation, et sous l'influence du rayonnement, les facteurs de défense deviennent suffisamment importants pour provoquer la négativation de la parasitémie et la guérison.

Cet effet est absolument considérable, car vers la 50ème heure après l'infestation, la parasitémie est de l'ordre de  $10^5$  parasites par  $\mu\text{l}$  de sang, et le nombre total de trypanosomes existants dans le seul compartiment sanguin d'une souris (environ 2 ml) peut donc être estimé à environ  $2 \times 10^8$  trypanosomes.

#### 2.2.2. - Décroissance de la parasitémie jusqu'à la négativation entre deux séances d'irradiation

En ce qui concerne les souris ainsi traitées, nous avons dit ci-dessus (voir *expérience du type C*) qu'on pouvait observer des animaux qui présentent, à la fin de la 4ème séance d'irradiation, une parasitémie encore relativement importante ( $10^3$  à  $10^4$  trypanosomes par  $\mu\text{l}$  de sang). Bien que les animaux soient alors retirés de l'appareil, la parasitémie continue à décroître et la négativation peut intervenir avant le début de la 5ème séance d'irradiation, c'est-à-dire toujours en dehors de l'appareil. Tout se passe comme si les moyens de défense mis en place sous l'influence du rayonnement étaient devenus suffisants pour provoquer la négativation.

#### 2.2.3. - Influence de la puissance de l'onde UHF

Nous avons rappelé ci-dessus l'*expérience M* (même chapitre, paragraphe 1.4.2.) et le comportement des dix souris de la loge N°6. Pour ces souris, infestées avec *Trypanosoma equiperdum* et traitées par irradiation, la maladie évolue soit vers la négativation (huit souris sur dix), soit vers une parasitémie massive et la mort (deux souris sur dix); au niveau de la loge N°6, la puissance UHF se situe entre 25 et 95  $\mu\text{W}$  (puissance rayonnée moyenne). Elle est la même pour toutes les souris de la loge.

Ces résultats peuvent s'expliquer si l'on admet que les moyens de défense peuvent atteindre des niveaux différents d'un animal à l'autre;

ce seraient ces différences de niveau qui font que la maladie évolue soit vers la négativation, soit vers la mort.

#### 2.2.4. - Action du traitement par irradiation sur la trypanosomiase de la Souris à *T. gambiense*

Nous avons rappelé ci-dessus, dans ce même chapitre, au paragraphe 1.4.6., l'expérience AE qui avait consisté à traiter par irradiation pendant 9 jours des souris infestées par *Trypanosoma gambiense* depuis 11 jours. Dans cette expérience, 50% des souris avaient présenté, après une phase d'amélioration passagère, des rechutes à issue mortelle, les 50% restants avaient évolué vers la guérison définitive.

On peut, également dans ce cas, penser que les moyens de défense avaient atteint, sous l'influence du rayonnement, des niveaux différents selon les animaux.

#### 2.2.5. - Propagation des éléments constitutifs du rayonnement dans l'organisme

Nous avons parlé ci-dessus de ce problème (dans ce même chapitre, le paragraphe 2.1.1.) et les considérations émises à son sujet sont conformes à l'hypothèse d'une exaltation des moyens de défense grâce au rayonnement.

#### 2.2.6. - Phénomène de facilitation thérapeutique

Nous avons pu mettre en évidence ce phénomène chez le Rat et chez le Lapin ayant subi un premier traitement par irradiation.

##### a - Facilitation thérapeutique chez le Rat

Rappelons qu'il s'agit de rats infestés par *Trypanosoma equiperdum* et traités par irradiation dans les conditions habituelles (séances quotidiennes de 6 heures pendant cinq jours). Nous avons vu ci-dessus (voir Chapitre RESULTATS, le paragraphe 2.7.) qu'après la négativation parasitémique, une certaine proportion des animaux présentent une rechute parasitaire, les trypanosomes qui apparaissent appartiennent à un type antigénique différent du type de base  $E_1$  qui a servi à l'infestation.

On a choisi des rats se trouvant ainsi en phase de rechute et présentant une parasitémie de l'ordre de  $10^5$  parasites par  $\mu\text{l}$  de sang ce qui équivaut à un nombre total d'environ  $10^9$  trypanosomes dans le seul

compartiment sanguin. On a constaté que, dans ce cas, une seule séance d'irradiation de 6 heures était suffisante pour obtenir la négativation de la parasitémie et la guérison définitive. Or nous savons qu'un tel traitement, réduit à une seule séance d'irradiation, est absolument incapable d'enrayer l'évolution d'une trypanosomiase aiguë lorsqu'on inocule à des rats normaux  $10^9$  trypanosomes.

En somme, le traitement réduit semble agir à la manière d'une injection de rappel chez un organisme sensibilisé à un antigène. Les facteurs de défense, spécifiques et aspécifiques, sont puissamment amplifiés lors du 2ème traitement (réduit). De plus, il apparaît que ces facteurs de défense amplifiés sont actifs vis-à-vis de trypanosomes appartenant à un type antigénique différent de celui qui les a induits originellement.

#### b - Facilitation thérapeutique chez le Lapin

Rappelons qu'elle a été mise en évidence chez des lapins infestés avec un nombre important de trypanosomes et mis en traitement par irradiation, soit très peu de temps (2 heures) après l'infestation, soit après 2 à 3 semaines d'évolution de la trypanosomiase chronique.

Appliqué dans les conditions voulues (voir Chapitre RESULTATS, les paragraphes 5.1. et 5.2.), ce traitement aboutit dans tous les cas à la guérison. Nous avons dit (voir Chapitre RESULTATS, le paragraphe 5.6.) que les lapins ainsi guéris résistent à des réinfestations réalisées également avec un nombre important de trypanosomes, à condition toutefois que les réinfestations soient accompagnées d'un traitement réduit, à savoir un ou deux jours de traitement, avec une séance quotidienne d'irradiation de 10 heures, la première séance débutant 2 heures après la réinfestation.

Or nous savons que lorsque les trypanosomes sont inoculés à des lapins normaux, il faut, pour empêcher l'évolution d'une maladie chronique, un traitement par irradiation qui dure au minimum six jours (voir chapitre RESULTATS, le paragraphe 5.1.).

Dans ce cas également, tout semble se passer comme si la deuxième irradiation (réduite) agissait à la manière d'une injection de rappel.

Quoiqu'il en soit, ces phénomènes de facilitation thérapeutique sont nets dans les deux cas décrits, chez le Rat aussi bien que chez le Lapin : l'effet du rayonnement se trouve grandement facilité lorsque l'organisme a été soumis antérieurement à un premier traitement par irradiation.

Deux faits expérimentaux méritent peut-être une mention particulière.

2.2.7. - Souris infestées avec *T. equiperdum* et traitées après 48 heures d'évolution de la maladie

Nous avons pu constater, lors des expériences du type F, que des souris, infestées avec  $2 \times 10^4$  trypanosomes et mises en traitement seulement 48 heures plus tard, arrivent néanmoins à se négativer bien que chaque animal héberge chacun au minimum  $2 \times 10^8$  trypanosomes lorsque commence le traitement. L'ascension de la parasitémie est arrêtée déjà vers la 60<sup>ème</sup> heure.

Il faut donc admettre une stimulation intense des moyens de défense en un temps très court : une dizaine d'heures. Une telle stimulation ne nous paraît pas impossible, surtout si on considère qu'elle a lieu chez un organisme sollicité depuis une cinquantaine d'heures par l'évolution de la trypanosomiase.

2.2.8. - Effet du rayonnement dans d'autres modèles parasitaires

Dans les conditions actuelles, l'effet du rayonnement est très partiel dans le paludisme expérimental de la Souris à *Plasmodium berghei*, il est nul dans la trypanosomiase chronique de la Souris à *T. (Schizotrypanum) cruzi* (12) .

On peut donc admettre que, dans le cas des divers modèles parasitaires étudiés dans notre thèse, les moyens de défense mis en oeuvre par les organismes parasités ne sont pas tout à fait les mêmes, par exemple ne font pas intervenir les mêmes populations cellulaires (macrophagiques ou lymphocytaires). Le rayonnement, du moins dans les conditions actuelles de fonctionnement de notre appareil, ne stimulerait que certains de ces moyens de défense.

### 2.3. - Combinaison des deux mécanismes précédents

Cette hypothèse postule une synergie entre l'action proprement dite du rayonnement et les moyens de défense. Il faut donc, d'une part, que l'agent causal, parasitaire, soit "sensible" au rayonnement et que, d'autre part, soient mis en place, au sein de l'organisme parasité, les moyens de défense aspécifiques et spécifiques, ou les deux.

L'hypothèse de la synergie rend assez bien compte, à notre avis, de tous les faits expérimentaux constatés tout au long de notre travail.

Cependant, il faut rappeler que jusqu'à ce jour, nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet quelconque du rayonnement sur les trypanosomes.

### 3 - CONCLUSION

=====

L'effet de notre rayonnement sur les trypanosomiasés expérimentales est un effet net, clair et précis. Il permet d'obtenir la guérison aussi bien de la trypanosomiasé aigué de la Souris et du Rat (à *Trypanosoma equiperdum*) que celle des trypanosomiasés chroniques du Lapin (à *Trypanosoma equiperdum*) et de la Souris (à *Trypanosoma gambiense*).

Il est encore trop tôt pour vouloir adopter une explication univoque du mécanisme d'action du rayonnement.

Cependant, il est certain que le traitement par irradiation ne diminue pas les moyens de défense de l'organisme, en particulier ceux qui sont de nature immunologique. Ce fait mérite d'être souligné, car il nous semble unique jusqu'à ce jour : les radiations ionisantes habituellement utilisées en biologie atténuent ou même suppriment la réponse immunitaire. Il n'est pas à exclure que le rayonnement, non seulement ne déprime pas le système immunitaire, mais au contraire exalte les moyens de défense, stimule la synthèse des immunoglobulines et l'activation des macrophages.

Quoiqu'il en soit, les animaux, infestés par les trypanosomes, puis guéris par l'action du rayonnement, témoignent d'un état immunitaire excellent.

Ainsi les souris, infestées et guéries après un premier traitement, présentent-elles une immunité considérable qui dure pratiquement toute la vie de la souris. Grâce à cette immunité, les animaux peuvent résister à des réinfestations réalisées avec des doses importantes de parasites et à des moments très éloignés de la première infestation. Dans le sang sont présents des anticorps, en particulier des anticorps séro-protecteurs à pouvoir trypanocide intense.

Quant aux lapins infestés et guéris par un premier traitement, ils élaborent pendant de longs mois des quantités importantes d'anticorps circulants, parmi lesquels des anticorps séro-protecteurs. Il est fort

possible que ces anticorps soient, au moins partiellement, responsables du phénomène que nous avons appelé la facilitation thérapeutique : les lapins guéris résistent à des réinfestations (même pratiquées de longs mois après le premier traitement) lorsque celles-ci sont accompagnées d'une irradiation très minime.

~~Dans l'avenir, nous espérons pouvoir continuer des recherches~~  
concernant le mécanisme d'action de notre rayonnement. Nous envisageons un certain nombre d'expériences parmi lesquelles nous pouvons citer l'influence de certains traitements immuno-suppressifs (rayons-X, drogues, immun-sérums anti-lymphocytaires, thymectomie) et l'irradiation des animaux préalablement à leur infestation.

R E S U M E



L'effet biologique du rayonnement, émis par les deux appareils que nous avons construits, a été étudié à l'aide de modèles parasitaires. Les deux appareils sont du même type : sur un tube à décharge dans lequel est créé un plasma confiné par un champ magnétique longitudinal, viennent s'adapter 3 antennes. L'une émet une onde centimétrique (UHF), les deux autres émettent une onde métrique (HF).

Les modèles parasitaires utilisés sont la trypanosomiase aiguë de la Souris et du Rat (*Trypanosoma equiperdum*), la trypanosomiase chronique du Lapin (*Trypanosoma equiperdum*), la trypanosomiase chronique de la Souris (*Trypanosoma gambiense*) et le paludisme de la Souris (*Plasmodium berghei*).

Chez des animaux traités par irradiation et chez des animaux témoins non traités, nous avons étudié d'une part l'évolution de la parasitose (en nous basant sur les signes cliniques, certaines lésions histologiques, la présence ou l'absence de parasites dans le sang périphérique) et d'autre part l'état immunitaire (en nous basant sur trois données les taux sériques des immunoglobulines G et M, l'état de protection immunitaire, l'élaboration de certains anticorps circulants).

En ce qui concerne les immunoglobulines G et M, les variations du taux sérique de l'IgM sont particulièrement intéressantes : le taux est très augmenté au cours d'une trypanosomiase évolutive et il se normalise en cas de guérison.

L'état de protection immunitaire est spécifique du type antigénique (ou variant) qui l'a induit; son étude a rendu nécessaire l'utilisation de techniques de clonage permettant d'obtenir des populations homogènes des différents types antigéniques.

Les anticorps circulants étudiés ont été les anticorps agglutinants (les trypanosomes vivants), les anticorps hémagglutinants, les anticorps précipitants et les anticorps séro-protecteurs.

Les résultats obtenus peuvent être résumés ainsi :

A / Trypanosomiase aiguë de la Souris et du Rat

---

Elle évolue vers la mort en quelques jours. Un seul trypanosome est infestant, c'est-à-dire capable de provoquer une trypanosomiase aiguë. L'affection est suivie en évaluant le nombre de parasites par  $\mu\text{l}$  de sang circulant (parasitémie).

Des souris infestées avec  $2 \times 10^4$  parasites ou des rats infestés avec  $2 \times 10^5$  parasites meurent entre la 80ème et la 110ème heure de la maladie.

1) Evolution de la parasitose sous l'effet du traitement par irradiation.  
Influence de facteurs liés au modèle parasitaire

a) Chez toutes les souris infestées avec  $2 \times 10^4$  trypanosomes, puis traitées pendant 5 jours à raison d'une séance quotidienne de 6 heures, la première séance débutant 2 heures après l'infestation, les parasites disparaissent du sang (négativation) vers la 90ème heure. Un tiers des souris est définitivement guéri; les autres animaux rechutent quelques jours après l'arrêt du traitement : il apparaît à nouveau des trypanosomes dans le sang, mais ils appartiennent à des types antigéniques différents du type antigénique initialement inoculé (qui est en l'occurrence le type de base  $E_1$ ). Après un traitement de 10 jours, la guérison est obtenue chez 90% et même 100% des animaux, suivant les expériences.

b) Chez des souris infestées avec  $2 \times 10^5$  trypanosomes, les résultats sont très semblables. Mais pour des inoculum égaux ou supérieurs à  $2 \times 10^6$  trypanosomes, l'action du rayonnement est incapable d'empêcher l'évolution fatale de la trypanosomiase.

c) Lorsqu'on traite des souris non pas 2 heures après leur infestation, mais après 24 voire 48 heures, la négativation de la parasitémie et la guérison peuvent encore être obtenues.

d) Des souris privées de leur rate peuvent être guéries dans les mêmes conditions que les souris normales.

e) La souche de *Trypanosoma equiperdum* utilisée habituellement provenait de l'Institut Pasteur de Paris. Mais des expériences effectuées avec une souche différente, dite dyskinétoplastique et provenant de BETHESDA (USA), ont donné des résultats identiques.

f) Les résultats expérimentaux obtenus sont sensiblement les mêmes dans la trypanosomiase aigüe de la Souris que dans celle du Rat.

## 2) Etat immunitaire des animaux traités par le rayonnement

a) Les souris et les rats, infestés puis guéris par le rayonnement, élaborent des anticorps circulants spécifiques anti-trypanosomes : agglutinants, hémagglutinants, précipitants et séro-protecteurs.

b) Les animaux présentent, en outre, un état de protection immunitaire très important leur permettant de résister à des réinfestations. Cet état de protection dure pratiquement toute la vie de la Souris. A la suite de réinfestations, le taux des anticorps circulants augmente d'une manière importante.

c) Chez certains rats infestés, puis négativés par le traitement par irradiation et présentant par la suite une rechute parasitaire normalement mortelle, une seule séance d'irradiation de 6 heures a permis à ces animaux de se débarrasser d'un nombre considérable de trypanosomes (de l'ordre de  $10^9$ ), ce qui semble mettre en évidence un phénomène de "facilitation thérapeutique".

Tout se passe comme si, dans ce cas, l'état de protection immunitaire, induit par le premier traitement et théoriquement spécifique du type antigénique de base  $E_1$  ait grandement facilité l'action du rayonnement sur l'évolution d'un type antigénique différent du type  $E_1$ .

## 3) Influence des facteurs liés au rayonnement

a) Au cours de notre expérimentation, les animaux sont placés sur un plan perpendiculaire à l'axe de l'appareil et distant de 12,5 cm du pôle de sortie du tube. A une distance de 25 cm, l'effet du rayonnement sur la trypanosomiase aigüe de la Souris reste le même.

b) Si l'onde UHF est nécessaire à l'efficacité du rayonnement, elle n'est cependant pas à elle seule suffisante. En fait, l'action du rayonnement sur la trypanosomiase aiguë nécessite la présence simultanée de ses 3 constituants majeurs (onde UHF, onde HF et champ magnétique).

c) La tension interne du magnétron doit posséder une valeur bien définie sinon l'effet biologique diminue d'intensité.

#### B / Trypanosomiase chronique du Lapin à *T. equiperdum*

Il s'agit d'une affection grave aboutissant constamment, à la suite d'un état de cachexie, à la mort de l'animal en 5 à 10 semaines. Les lésions au niveau des testicules sont très importantes. Les modifications de l'état biologique le sont également, en particulier en ce qui concerne l'immunoglobuline M dont la synthèse est très augmentée.

##### 1) Lapins infestés traités par le rayonnement

Le traitement a été réalisé dans des conditions variées :

a) Traitement instauré 2h après l'infestation. Il dure au minimum 6 jours, à raison d'une séance quotidienne d'irradiation de 10 heures.

Un tel traitement empêche le développement de la parasitose.

b) Traitement instauré après un certain temps d'évolution de la trypanosomiase. Deux ou trois semaines après son infestation, les animaux sont cliniquement et biologiquement très atteints. Le traitement, à condition de l'appliquer pendant 2 ou 3 semaines, à raison d'une séance quotidienne d'irradiation de 10 heures, est capable de guérir définitivement les animaux, cliniquement et biologiquement.

c) En particulier, en ce qui concerne les graves lésions testiculaires, le traitement par irradiation aboutit à la restauration totale de la glande, sur les plans anatomique et fonctionnel.

2) Etat immunitaire des lapins infestés puis guéris par le rayonnement

a) Les animaux infestés, puis guéris par le rayonnement élaborent pendant plusieurs mois une quantité importante d'anticorps circulants : anticorps agglutinants, hémagglutinants, précipitants et séro-protecteurs.

b) Lorsqu'on pratique des réinfestations, les animaux n'arrivent pas à se débarrasser des trypanosomes inoculés. Cependant, ils en deviennent capables lorsqu'on accompagne les réinfestations d'un traitement réduit à 1 ou 2 séances d'irradiation.

C'est là un autre cas de "facilitation thérapeutique".

c) On a pu, chez un Lapin ainsi soumis à des réinfestations multiples accompagnées de traitements réduits, confirmer la nature immunoglobulinique du pouvoir séro-protecteur. Les anticorps concernés appartiennent certainement à la classe des IgG, peut-être également à la classe des IgM.

C / Trypanosomiase chronique de la Souris à *T. gambiense*

---

Il s'agit d'une maladie qui peut, chez certaines souris infestées, évoluer pendant plusieurs mois. Les perturbations biologiques sont importantes, en particulier en ce qui concerne la synthèse de l'immunoglobuline M qui est très augmentée. Tous les animaux infestés meurent de trypanosomiase.

L'effet du rayonnement sur la maladie est certain. On a utilisé des souris infestées depuis 11 jours. Des traitements de durée brève (de 4 et de 6 jours, avec une séance quotidienne de 6h) ont une influence nette sur l'évolution de la parasitose : l'ascension du taux sérique de l'IgM est ralentie et la maladie évolue toujours sur un mode prolongé.

Un traitement de 9 jours a pu amener la guérison définitive de 50% des animaux; les 50% restants, après une phase d'amélioration temporaire, présentent une maladie évoluant sur un mode chronique.

*Plasmodium berghei* provoque chez la Souris un paludisme mortel. Au moment de la mort, 30 à 40% des érythrocytes sont parasités. La rapidité de l'évolution est fonction du nombre de parasites inoculés.

Les souris ont été infestées avec  $10^4$  plasmodiums. Les témoins, non traités, meurent aux environs du 15ème jour.

Les souris traitées pendant 10 jours, au cours de séances quotidiennes d'irradiation de 6 heures, présentent, par rapport aux animaux témoins, un ralentissement du développement de la parasitémie et une survie prolongée : elles meurent entre le 20ème et le 22ème jour.

L'effet du rayonnement sur les trypanosomiasés expérimentales aiguës et chroniques, étudiées dans le cadre de ce travail, est net, clair et précis : il permet d'obtenir la guérison définitive de ces affections qui sont sévères et qui, en l'absence de traitement, sont toujours mortelles. Par contre, dans les conditions actuelles d'irradiation, l'effet n'est que partiel sur le paludisme expérimental de la Souris.

Nous pensons qu'il est encore trop tôt pour pouvoir adopter une attitude définitive en ce qui concerne son mécanisme d'action.

Néanmoins, il nous semble possible de pouvoir éliminer, pour des raisons aussi bien théoriques qu'expérimentales, l'intervention d'un effet thermique, ainsi que l'hypothèse d'une action s'exerçant exclusivement sur les trypanosomes.

Nous pensons, plutôt, que le rayonnement agit en stimulant les moyens de défense, spécifiques et aspécifiques, au niveau de l'organisme

parasité. L'hypothèse d'une synergie entre l'action proprement dite du rayonnement sur le parasite et les moyens de défense ne peut cependant pas être exclue.

Quoi qu'il en soit, et c'est là un fait à nos yeux très important, le système immunitaire des animaux traités par le rayonnement est et reste excellent.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- 1 - BARNOTHY J.M. -  
Development of young mice.  
in : Biological effects in magnetic fields, vol.I, Plenum  
Press, New York, 1964, p. 93
- 2 - BARNOTHY J.M. -  
Rejection of transplanted tumors in mice.  
in : Biological effects of magnetic fields, vol.I, Plenum  
Press, New York, 1964, p. 100
- 3 - BARNOTHY M.F. -  
Biological effects of magnetic fields, vol.I, Plenum Press,  
New York, 1964
- 4 - BARNOTHY M.F. -  
Hematological changes in mice.  
in : Biological effects of magnetic fields, vol.I, Plenum  
Press, New York, 1964, p. 109
- 5 - BARNOTHY M.F. -  
Biological effects of magnetic fields, vol.II, Plenum Press,  
New York, 1969
- 6 - BARNWELL F.H. & BROWN F.A. -  
Responses of Planarians and Snails.  
in : Biological effects of magnetic fields, vol.I, Plenum  
Press, New York, 1964, p. 263
- 7 - BERLUREAU F. -  
Communication personnelle.
- 8 - BERTEAUD A.J., BOTTREAU A.M., PRIORE A., PAUTRIZEL A.N.,  
BERLUREAU F. & PAUTRIZEL R. -  
Essai de corrélation entre l'évolution d'une affection par  
*Trypanosoma equiperdum* et l'action d'une onde électromagnétique  
pulsée et modulée.  
C.R. Acad. Sci.(Paris), 1971, 272, 1003
- 9 - BERTHARION G., SERVANTIE B. & JOLY R. -  
Electro-cortico-graphic modification after exposure to microwave  
fields on the white rat (preliminary results).  
J. Microwave Power, 1971, 6, 62
- 10 - BERTHARION G., SERVANTIE B. & JOLY R. -  
Etude de l'action d'un rayonnement électromagnétique de très  
haute fréquence (radar) sur le système nerveux central du  
rat blanc. Modification électrocorticographique.  
C.R. Soc. Biol.(Paris), 1971, 165, 1928
- 11 - BRAY R.S. -  
Studies on the exo-erythrocytic cycle in the genus Plasmodium.  
1 vol., Lewis edit., London, 1957, p. 192

- 12 - CAPBERN A. -  
Communication personnelle.
- 13 - CARPENTER R.L. & LIVSTONE E.M. -  
Evidence for non thermal effects of microwave radiation :  
abnormal development of irradiated insect pupae.  
IEEE Transactions on microwave theory and techniques, 1971,  
19, 173
- 14 - CHATEAUREYNAUD P. -  
Communication personnelle.
- 15 - D'ARSONVAL A. -  
Action d'un champ magnétique puissant sur les fermentations.  
C.R. Soc. Biol.(Paris), 1882, 34, 276
- 16 - D'ASTRE -  
Influence physiologique de l'état magnétique.  
C.R. Soc. Biol.(Paris), 1882, 34, 278
- 17 - DELMON C. & BIRABEN J. -  
La croissance du carcinome de Guérin sous l'action de champs  
magnétiques.  
Rev. Path. comp., 1966, 3, 85
- 18 - DODIN A. & MOREAU J.P. -  
Essai de protection de l'Homme contre la réinfestation bilharzienne  
au moyen de cercaires inactivées.  
C.R. Acad. Sci.(Paris), 1966, 263, 795
- 19 - EPSTEIN N. & COOK H. -  
The effects of microwaves on the Rows N 1 fowl sarcoma virus.  
Brit. J. Cancer, 1951, 5, 244
- 20 - FREY A.H. -  
Auditory system response to radiofrequency energy.  
Aerospace Med. , 1961, 32, 1140
- 21 - GOMBERT J., BRESSON G. & MASSEYEFF R. -  
Comportement métabolique anormal de la macro-immunoglobuline(IgM)  
des malades atteints de trypanosomiase africaine.  
C.R. Acad. Sci.(Paris), 1965, 261, 5729
- 22 - GORDON Z.V. -  
Biological effect of microwaves of low intensity.  
Med. Electron. Biol. Enging., 1963, 1, 67
- 23 - GORODETSKAIA S.F. -  
The effect of centimeter waves on the fecundity of female mice.  
Fiziol. Z., 1963, 9, 394
- 24 - GOSSET A., GUTMANN A., LAKHOVSKY G. & MAGROU J. -  
Essais de thérapeutique du cancer expérimental des plantes.  
C.R. Soc. Biol.(Paris), 1924, 91, 626

- 25 - GROSS L. & SMITH L.W.  
Wound healing and tissue regeneration.  
in : Biological effects of magnetic fields, vol. I, Plenum  
Press, New York, 1964, p. 140
- 26 - IMIG C.J., THOMPSON J.D. & HINES H.M.  
Testicular degeneration as a result of microwave radiation.  
Elec. Engry., 1952, 71, 979
- 27 - JOLY R.  
Effets biologiques et danger éventuel des rayonnements T.H.F.  
des "aériens-radars".  
Arch. Mal. Prof., 1968, 29, 121
- 28 - JOLY R., PLURIEN G., DROUET J. & SERVANTIE B.  
Effets biologiques et physiopathologiques éventuels des rayonnements  
électromagnétiques UHF des "aériens-radars".  
Rev. Corps Santé Armées, 1969, 10, 239
- 29 - KLEIN F., MATTERN P. & KORNMAN van der BOSCH H.J.  
Experimental induction of rheumatoid factor-like substances  
in animal trypanosomiasis.  
Clin. exp. Immunol., 1970, 7, 851
- 30 - LAKHOVSKY G.  
L'origine de la vie. La radiation et les êtres vivants.  
1 vol., Gauthier Villars édit., Paris, 1925
- 31 - LANHAM S.M. & GODFREY D.G.  
Isolation of Salivarian Trypanosomes from Man and other mammals  
using DEAE-cellulose.  
Expl. Parasit., 1970, 28, 521
- 32 - LAVERAN A. & MESNIL F.  
Sur l'agglutination des trypanosomes du rat par divers sérums.  
C.R. Soc. Biol. (Paris), 1900, 52, 939
- 33 - LAVERAN A. & MESNIL F.  
Trypanosomes et Trypanosomiasés.  
1 vol., Masson édit., Paris, 1912
- 34 - LAZAROVITCH V.G.  
Influence des champs magnétiques UHF sur la teneur en fer,  
cuivre et quelques métalloprotéines du sang et des tissus.  
Bjull. eksper. Biol. Med., 1970, 35, 44
- 35 - LOBANOVA E.A.  
The survival and development of animals exposed to SHF fields  
of different intensity and duration.  
in : The Biological Action of Superhigh Frequencies, Moscou,  
1960, p. 61
- 36 - LWOFF A. & MOREL M.  
L'action de la vitamine C sur la multiplication de *Proteus vulgaris*.  
Ann. Inst. Pasteur, 1942, 68, 255

- 37 - LYSINA G.G. -  
Modifications sanguines provoquées par les T.H.F.  
Gig. i. sanit. Kiev, 1965, 6, 95
- 38 - McAFEE R.M. -  
Physiological effects of thermode and microwave stimulation  
of peripheral nerves.  
Am. J. Physiol., 1962, 203, 374
- 39 - McNEILLAGE G.J.C., HERBERT W.J. & LUMSDEN W.H.R. -  
Antigenic type of first relapse variants arising from a strain  
of *Trypanosoma brucei*.  
Expl. Parasit., 1969, 25, 1
- 40 - MANCINI G., CARBONARA A.O. & HEREMANS J.F. -  
Immunochemical quantitation of antigens by single radial  
immunodiffusion.  
Immunochemistry, 1965, 2, 235
- 41 - MATTERN P. -  
Etat actuel et résultats des techniques immunologiques utilisées  
à l'Institut Pasteur de Dakar pour le diagnostic et l'étude de  
la trypanosomiase humaine africaine.  
Bull. Org. mond. Santé, 1968, 38, 1
- 42 - MATTERN P., BENTZ M. & MacGREGOR I.A. -  
Les anticorps précipitants présents dans le sang et dans le  
liquide céphalo-rachidien de malades atteints de trypanosomiase  
humaine africaine, à *T. gambiense*.  
Ann. Inst. Pasteur, 1967, 112, 105
- 43 - MATTERN P., DURET J. & PAUTRIZEL R. -  
Hyper- $\beta_2$ -macroglobulinémie au cours de la trypanosomiase expérimentale  
du Lapin à *Trypanosoma equiperdum*.  
C.R. Acad. Sci.(Paris), 1963, 256, 820
- 44 - MATTERN P., MAYER G. & FELLICI M. -  
Existence de formes amastigotes de *Trypanosoma gambiense* dans  
le tissu plexuel choroïdien de la souris infectée expérimentalement.  
C.R. Acad. Sci.(Paris), 1972, 274, 1513
- 45 - MAYER G., PRIORE A., MAYER G. & PAUTRIZEL R. -  
Action de champs magnétiques associés à des ondes électromagnétiques  
sur l'orchite trypanosomienne du Lapin.  
C.R. Acad. Sci.(Paris), 1972, 274, 3011
- 46 - MICHAELSON S.M. -  
Human exposure to nonionizing radiant energy-potential hazards  
and safety standards.  
Proceedings of the IEEE, 1972, 60, 389
- 47 - MIRO L. -  
Note sur la radioprotection exercée par les ondes ultra-courtes  
vis-à-vis des bactéries.  
Rev. Med. Aero., 1965, 4, 21

- 48 - MIRO L., DELTOUR G., PFISTER A., DONADIEU L. & ROYET J. -  
Influence des variations d'un champ magnétique sur la croissance  
de certains micro-organismes.  
J. Physiol., 1967, 59, 267
- 49 - MIRO L., LOUBIERE R. & PFISTER A. -  
Modifications morphologiques et métaboliques observées expérimentalement  
sous l'action des champs électromagnétiques hyperfréquence.  
Rev. Med. Aero., 1966, 5, 9
- 50 - PAUTRIZEL R. -  
Communication personnelle.
- 51 - PAUTRIZEL R., DURET J., TRIBOULEY J. & RIPERT Ch. -  
Etude de la spécificité de la réaction d'agglutination des  
trypanosomes au cours des trypanosomoses.  
Bull. Soc. Path. exot., 1962, 55, 383
- 52 - PAUTRIZEL R., DURET J., TRIBOULEY J. & RIPERT Ch. -  
Etude comparative de l'évolution de différents anticorps élaborés  
au cours de trypanosomoses expérimentales chez le Lapin.  
Rev. Immunol., 1962, 26, 157
- 53 - PAUTRIZEL R., MATTERN P., PRIORE A., PAUTRIZEL A.N. & BERNARD D.  
Etat de protection vis-à-vis de *Trypanosoma equiperdum* chez des  
souris splénectomisées et soumises à une stimulation physique.  
1er Multicolloque européen de Parasitologie - RENNES -  
1 au 4 Septembre 1971, 116.
- 54 - PAUTRIZEL R., PRIORE A., BERLUREAU F. & PAUTRIZEL A.N.  
Stimulation, par des moyens physiques, des défenses de la souris  
et du rat contre la Trypanosomose expérimentale.  
C.R. Acad. Sci. (Paris), 1969, 268, 1889.
- 55 - PAUTRIZEL R., PRIORE A., BERLUREAU F. & PAUTRIZEL A.N.  
Action de champs magnétiques combinés à des ondes électro-  
magnétiques sur la trypanosomose expérimentale du Lapin.  
C.R. Acad. Sci. (Paris), 1970, 271, 877.
- 56 - PAUTRIZEL R., PRIORE A., DALLOCHIO M. & CROCKETT R.  
Action d'ondes électromagnétiques et de champs magnétiques  
sur les modifications lipidiques provoquées chez le lapin  
par l'administration d'un régime alimentaire hypercholestérolé.  
C.R. Acad. Sci. (Paris), 1972, 274, 488.
- 57 - PAUTRIZEL R., RIVIERE M., PRIORE A. & BERLUREAU F.  
Influence d'ondes électromagnétiques et de champs magnétiques  
associés sur l'immunité de la souris infestée par *Trypanosoma  
equiperdum*.  
C.R. Acad. Sci. (Paris), 1966, 263, 579.

- 58 - PAZDEROVA J.  
Effects of electromagnetic radiation of the order of centimeter and meter waves on human's health.  
Pracovni Lek., 1968, 20, 447.
- 59 - PERCOVSKIJ A.I., IROČENKO J.Ia., GUZ S.Ia., VOLKOV E.S., BARKO A.I. & KOSHLJAK T.N.  
L'influence d'un champ électromagnétique de haute fréquence par l'évolution de l'athérosclérose expérimentale.  
Patol. Fiziol. Terap., 1969, 13, 64.
- 60 - PETROV F.P. & SOUBOTTA A.G.  
Action des ondes électromagnétiques UHF sur l'organisme.  
Vo.-med. Z., 1966, 2, 16.
- 61 - PLURIEN G., SENTENAC-ROUMANOV H., JOLY R. & DROUET J.  
Influence du rayonnement électromagnétique d'un émetteur radar sur la fonction phagocytaire du système réticulo-endothélial.  
C.R. Soc. Biol. (Paris), 1966, 160, 597.
- 62 - PRESMAN A.S.  
Electromagnetic fields and life.  
1 vol., Plenum Press, New York & London, 1970.
- 63 - PRESMAN A.S. & LEVITINA N.A.  
The non thermal effect of microwaves on the systolic rythm of animals.  
Bjuil. eksper. Biol. Med., 1962, 53, 39.
- 64 - PRESMAN A.S. & LEVITINA N.A.  
Influence de l'irradiation par des micro-ondes non thermiques sur la résistance des animaux à l'irradiation gamma.  
Radiobiologija, 1962, 2, 170.
- 65 - De RAADT P.  
Taxonomie des trypanosomes, parasites des Mammifères.  
Organisation Mondiale de la Santé - Document : WHO/TRYP/73.39 .
- 66 - RENO V. & NUTINI N.G.  
Tissue respiration.  
in : Biological effects of magnetic fields.  
Vol. I, Plenum Press, New York, 1964, p. 211.
- 67 - RIVIERE M.R. & GUERIN M.  
Nouvelles recherches effectuées chez des rats porteurs d'un lymphosarcome lymphoblastique soumis à l'action d'ondes électromagnétiques associées à des champs magnétiques.  
C.R. Acad. Sci. (Paris), 1966, 262, 2669.
- 68 - RIVIERE M.R., PRIORE A., BERLUREAU F., FOURNIER M. & GUERIN M.  
Action de champs électromagnétiques sur les greffes de la tumeur T 8 chez le Rat.  
C.R. Acad. Sci. (Paris), 1964, 259, 4895.

- 69 - RIVIERE M.R., PRIORE A., BERLUREAU F., FOURNIER M. & GUERIN M.  
Effets de champs électromagnétiques sur un lymphosarcome lymphoblastique transplantable du Rat.  
C. R. Acad. Sci. (Paris), 1965, 260, 2099.
- 70 - RIVIERE M.R., PRIORE A., BERLUREAU F., FOURNIER M. & GUERIN M.  
Phénomènes de régression observés sur les greffes d'un lymphosarcome chez des souris exposées à des champs électromagnétiques.  
C.R. Acad. Sci. (Paris), 1965, 260, 2639.
- 71 - RHODAIN J.  
Les formes pré-érythrocytaires du *Plasmodium vivax* chez le Chimpanzé.  
Ann. Soc. belge Med. trop., 1956, 36, 99.
- 72 - ROCARD Y.  
Actions of a very weak magnetic gradient. The reflex of the Dowser.  
in : Biological effects of magnetic fields.  
Vol. I, Plenum Press, New York, 1964, p. 279.
- 73 - SCHWAN H. & LI K.  
Variations between measured and biologically effective microwave diathermy dosage.  
Arch. phys. Med. Rehab., 1955, 36, 363.
- 74 - SCHWAN H. & PIERSOL G.M.  
The absorption of electromagnetic energy in body tissues (Review and critical analysis).  
Am. J. phys. Med., 1954, 33, 371.
- 75 - SCHWAN H. & SHER L.D.  
Alternating-current field-induced forces and their biological implications.  
J. Electrochem Soc., 1969, 116, 220.
- 76 - SERVANTIE B.  
Essai de synthèse à propos des effets biologiques des hyperfréquences.  
Electron. Fisc. Apli., 1973, 16, 545.
- 77 - SERVANTIE B., BERTHARION G. & JOLY R.  
Influence d'un rayonnement électromagnétique de très haute fréquence sur la sensibilité de pentetrazol chez la Souris blanche.  
C.R. Soc. Biol. (Paris), 1971, 165, 1952.
- 78 - SERVANTIE B., BERTHARION G. & JOLY R.  
Influence d'un rayonnement électromagnétique de très haute fréquence sur la sensibilité au triodoethylate de gallamine et à l'iodure de suxamethonium chez le Rat blanc.  
C.R. Soc. Biol. (Paris), 1971, 165, 376.
- 79 - SERVANTIE B. & JOLY R.  
Radar - Recherche biologique et médecine du travail.  
Gaz. Hôp. (Paris), 1970, 31, 797.

- 80 - SERVANTIE B., JOLY R. & BERTHARION G.  
Experimental study of the biological effects of microwave radiation on the white rat and mouse.  
J. Microw. Power, 1971, 6, 59.
- 81 - SHORTT H.E. & GARNHAM P.C.C.  
The pre-erythrocytic development of *Plasmodium cynomolgi* et *Plasmodium vivax*.  
Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 1948, 41, 785.
- 82 - TEIXEIRA-PINTO A.A., NEJELSKI L.L., CUTLER J.L. & HELLER J.H.  
The behavior of unicellular organisms in an electromagnetic field.  
Exp. Cell. Res., 1960, 20, 548.
- 83 - THOMSON R.A.E. & MICHAELSON S.M.  
Leukocyte response following simultaneous ionizing and microwave (radar) irradiation.  
Blood, 1966, 28, 157.
- 84 - TRIBOULEY-DURET J.  
~~Recherches expérimentales sur l'antigénicité des Trypanosomes~~  
Thèse d'Etat en Pharmacie, Bordeaux, 1961.
- 85 - TRIBOULEY J., TRIBOULEY-DURET J., IRIBARREN M.J. & PAUTRIZEL R.  
Mise en évidence des anticorps spécifiques de *Fasciola hepatica* par hémagglutination passive en utilisant la glutaraldéhyde comme agent de couplage.  
C.R. Acad. Sci. (Paris), 1969, 268, 2215.
- 86 - TYAGIN N.V.  
Changes in the blood of animals due to a SHF field.  
Trud. vo.-med. Akad. (Leningrad), 1957, 73, 116.
- 87 - WEBB S.J. & BOOTH A.D.  
Absorption of microwave by microorganisms.  
Nature (Lond.), 1969, 222, 1199.
- 88 - ZARET M.M.  
The biological effects of microwave radiation.  
Industr. Hyg. Rev., 1962, 5, 11.