

UNIVERSITÉS FRANCOPHONES

PROTOZOOLOGIE MÉDICALE

• W É R Y •

Préface de P. G. Janssens

«Médecine tropicale»
dirigée par le Professeur Marc Gentilini



Agence francophone
pour l'enseignement
et la recherche



De Boeck
Université

PROTOZOOLOGIE M É D I C A L E

La diffusion de l'information scientifique et technique est un facteur essentiel du développement. Aussi dès 1988, l'Agence francophone pour l'enseignement supérieur et la recherche (AUPELF-UREF), mandaté par les Sommets francophones pour produire et diffuser revues et livres scientifiques, a créé la collection **Universités francophones**.

Lieu d'expression de la communauté scientifique de langue française, **Universités francophones** vise à instaurer une collaboration entre enseignants et chercheurs francophones en publiant des ouvrages, coédités avec des éditeurs francophones, et largement diffusés dans les pays du Sud, grâce à une politique tarifaire préférentielle.

Quatre séries composent la collection:

- *Les manuels*: cette série didactique est le cœur de la collection. Elle s'adresse à un public de deuxième et troisième cycles universitaires et vise à constituer une bibliothèque de référence couvrant les principales disciplines enseignées à l'université.
- *Sciences en marche*: cette série se compose de monographies qui font la synthèse des travaux de recherche en cours.
- *Actualité scientifique*: dans cette série sont publiés les actes de colloques organisés par les réseaux thématiques de recherche de l'UREF.
- *Prospectives francophones*: s'inscrivent dans cette série des ouvrages de réflexion donnant l'éclairage de la Francophonie sur les grandes questions contemporaines.

Notre collection, en proposant une approche plurielle et singulière de la science, adaptée aux réalités multiples de la Francophonie, contribue efficacement à promouvoir la recherche dans l'espace francophone et le plurilinguisme dans la recherche internationale.

Professeur Michel GUILLOU
Directeur général de l'APELF
Recteur de l'UREF

Illustrations de couverture:

De gauche à droite:

- Formes sanguicoles de *Trypanosoma congolense*
- Formes schizogoniques érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* en culture
- Forme schizogonique de *Plasmodium vivax* dans le foie
- Trophozoïtes, schizontes et gamétocytes de *Plasmodium vivax*.

Dessins à la chambre claire de Maria Janssens.

© 1995 De Boeck & Larcier S.A.
rue des Minimes 39 - B-1000 Bruxelles

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre, par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou microfilm, est strictement interdite.

D/1995/0074/030

ISBN 2-8041-2048-1

PROTOZOOLOGIE MÉDICALE

• MARC WÉRY •

AVEC LA COLLABORATION DE SONIA PASKOFF

Préface de Peter Gustaaf Janssens

Directeur Honoraire de l'Institut de Médecine tropicale d'Anvers

Préface de Marc Gentilini

Agence francophone
pour l'enseignement
et la recherche



De Boeck
Université

Préface

Être **unique**, le protozoaire l'est par son caractère unicellulaire et sa place en parasitologie.

Être **inique**, il l'est souvent aussi par la violence des attaques de certains d'entre-eux, meurtriers, pour l'homme ou pour les animaux.

Dans leur ensemble, les protozoaires sont responsables des maladies parasitaires les plus répandues et les plus sévères en milieu tropical, celles qui déciment les pays pauvres et obèrent leur développement. Certes, les conséquences économiques de ces affections sont difficiles à évaluer mais elles retentissent d'évidence sur le **mal-développement** des nouvelles nations issues de la décolonisation; l'insécurité politique et les carences sanitaires sont autant de sources de résurgences tragiques des maladies à protozoaires.

Le **paludisme** qui s'étend, porté par une démographie croissante et une population vectorielle incontrôlée, la **maladie du sommeil** qui renaît des désordres socio-économiques, le **Sida** qui, inattendu et insolite, émerge et favorise ou réactive l'éclosion des protozooses, tous ces faits justifient une étude attentive des affections induites par des protozoaires agressifs ou sournoisement anodins. Les populations des régions tropicales en constituent les victimes les plus nombreuses.

Mais il n'est pas jusqu'aux voyageurs, **globetrotters** ou **nantis** qui, insuffisamment instruits des risques encourus sous les tropiques, payent un lourd tribut, eux aussi, aux insuffisances de diagnostic, de prévention ou de traitement.

Au contact des protozoaires, on peut découvrir la biologie cellulaire et moléculaire ou l'immunologie la plus raffinée sans que pour autant le microscope binculaire apparaisse comme un instrument obsolète: il est encore capable de «damer le pion» aux technologies avancées dont certaines, fragiles, doivent être jugées avec circonspection.

Le traité de Pr Marc Wéry de l'Institut Prince Léopold d'Anvers répond aux préoccupations du médecin biologiste ou du technicien supérieur, soucieux de mieux cerner le rôle de ces parasites à l'égard des individus autant que des collectivités. L'auteur a su rassembler une multitude de connaissances bien ordonnées qui permettront aux personnels médical et technique, confrontés à la délicate prise en charge des malades dans la lutte contre les grandes endémies, de bénéficier d'un traité simple, concret et riche. Son expérience d'homme de terrain et de laboratoire aura beaucoup contribué à faire de ce document une référence dont notre communauté francophone avait besoin.

Je souhaite donc que l'ouvrage *Protozoologie Médicale* de Marc Wéry, inscrit dans la collection consacrée aux maladies tropicales dont j'ai la charge, connaisse, par le canal de l'Université des Réseaux d'Expression Française (UREF), la diffusion qu'il mérite.

Pr Marc Gentilini

Table des matières

Table des matières	5	3 CLASSIFICATION	
Liste des figures	13	MÉTHODES TAXINOMIQUES	
Préface	17	CONSERVATION DES PROTOZOAIRE	33
Avertissement au lecteur	19	1. Critères de classification	
		des protozoaires	33
1 LE PROTOZOAIRE:		1.1 Caractères morphologiques	33
MORPHOLOGIE, PHYSIOLOGIE	21	1.2 Caractères biochimiques	33
1. Généralités	21	1.3 Caractères génomiques	33
1.1 Définition	21	1.4 Caractères physiologiques	
1.2 La cellule eucaryotique	21	et comportementaux	33
2. Structures et fonctionnement	21	2. Panmixie et clonalité	34
2.1 Système cytomembranaire	21	3. Méthodes de taxinomie	34
2.2 Cytosol	23	4. Entretien de Protozoaires	
2.3 Corpuscules intra-cytoplasmiques	23	au laboratoire	35
2.4 Noyau	24	4.1 Définitions	35
2.5 Cytosquelette	25	4.2 Les animaux de laboratoire	35
2.6 Organites moteurs	25	4.3 La culture	35
2.7 Reproduction	26	4.4 La cryoconservation	35
<i>Bibliographie</i>	28	4.5 Collections de souches	35
		5. Classification des Protozoaires	35
2 LE PROTOZOAIRE PARASITE		Groupe I Protozoaires flagellés	36
ET LE PHÉNOMÈNE DU PARASITISME	29	Groupe II Protozoaires amiboïdes	
1. Définitions	29	(<i>Subphylum: Sarcodina</i>)	37
2. Portes d'entrée du parasite	29	Groupe III Sporozoaires (<i>Phylum: Apicomplexa</i>)	37
3. Localisation du parasite	30	Groupe IV Microsporidies	38
4. Choix de l'hôte	30	Groupe V Haplosporidies	38
5. Réceptivité de l'hôte	30	Groupe VI Myxosporidies	38
6. Relations entre l'hôte et le parasite	30	Groupe VII Protozoaires ciliés	38
7. Le sort des parasites		<i>Bibliographie</i>	39
dans des hôtes inhabituels	31	4 ENTAMOEBA HISTOLYTICA (EUAMOEBA)	
<i>Bibliographie</i>	32	L'AMIBIASE	41
		1. Historique	41
		1.1 Le syndrome dysentérique	41
		1.2 Les parasites	41

2. Localisation anatomique	42	1.1 <i>Entamoeba dispar</i>	59
3. Cycle évolutif	42	1.2 <i>Entamoeba hartmanni</i>	60
3.1 Cycle non pathogène	42	1.3 <i>Entamoeba coli</i>	60
3.2 Cycle pathogène	42	1.4 <i>Entamoeba polecki</i>	61
4. Caractères morphologiques et physiologiques des stades	43	1.5 <i>Entamoeba gingivalis</i>	61
4.1 Formes végétatives (trophozoïtes)	43	2. Le genre <i>Endolimax nana</i>	62
4.2 Kyste	44	2.1 Localisation anatomique et distribution géographique	62
5. Développement du pouvoir pathogène	45	2.2 Morphologie	62
5.1 Faits d'observation	45	3. Le genre <i>Iodamoeba butschlii</i>	62
5.2 Facteurs liés à l'hôte	45	3.1 Localisation anatomique et distribution géographique	62
5.3 Facteurs liés au parasite	46	3.2 Morphologie	62
6. Lésions causées dans l'organisme de l'homme par <i>E. histolytica</i>	48	4. Les amibes libres	62
6.1 Amibiase intestinale (dysenterie amibienne)	48	4.1 Présentation générale	62
6.2 Localisations extra-intestinales	49	4.2 Amibes du genre <i>Naegleria</i>	63
6.3 Effet des défenses immunitaires de l'hôte	49	4.3 Le genre <i>Acanthamoeba (Hartmanella)</i>	64
7. Diagnostic de l'amibiase au laboratoire	50	<i>Bibliographie</i>	65
7.1 Recherche des amibes par examen microscopique	50	6 PROTOZOAIRES CILIÉS	
7.2 Détection d'antigènes amibiens	52	LE GENRE BALANTIDIUM (VESTIBULIFERA)	67
7.3 Mise en culture	53	1. <i>Balantidium coli</i>	67
7.4 Recherche d'anticorps anti-amibiens	53	1.1 Cycle évolutif, morphologie et caractères biologiques	67
7.5 Les tests de biologie générale (non spécifiques)	54	1.2 Hôtes	67
8. Culture <i>in vitro</i>	54	1.3 Pouvoir pathogène	67
8.1 Culture polyxénique	54	1.4 Diagnostic	68
8.2 Culture axénique	55	1.5 Traitement	68
9. Traitement	55	1.6 Transmission et épidémiologie	68
9.1 Amœbicides de contact (à action directe)	55	2. Autres ciliates parasites	69
9.2 Amœbicides tissulaires (toutes localisations tissulaires)	55	3. Protozoaires ciliés non parasites	69
10. Transmission	55	<i>Bibliographie</i>	69
10.1 Contamination	55	7 PROTOZOAIRES FLAGELLÉS PARASITES DU TUBE DIGESTIF ET DES CAVITÉS NATURELLES	
10.2 Réservoir de parasites	56	LA LAMBLIASE, LA TRICHOMONOSE	71
10.3 Facteurs influençant la prévalence	56	Schéma taxinomique	71
10.4 Endémicité amibienne	56	Ordre des Retortamonadida	71
<i>Bibliographie</i>	56	Ordre des Diplomonadida	71
5 AUTRES AMIBES PARASITES DE L'HOMME (EUAMOEBA, ACANTHOPODIDA, SCHIZOPYRENIDA)	59	Ordre des Trichomonadida	71
Schéma taxinomique	59	Ordre des Mastigamoebbia	71
Ordre des <i>Euamoebida</i>	59	1. <i>Chilomastix mesnili</i>	71
Ordre des <i>Acanthopodida</i>	59	1.1 Morphologie	71
Ordre des <i>Schizopyrenida</i>	59	1.2 Localisation	71
1. Le genre <i>Entamoeba</i> Casadrandi et Barbagallo 1895	59	1.3 Hôtes	71
		1.4 Pouvoir pathogène	71
		1.5 Culture	72

7

3. <i>Trypanosoma (Trypanozoon)</i> <i>brucei gambiense</i>	109	6. Traitement	129
3.1 Morphologie	109	7. Description des complexes d'espèces	129
3.2 Hôtes	109	7.1 Leishmanioses viscérales:	
3.3 Distribution géographique	109	le complexe <i>Leishmania (L.) donovani</i>	129
3.4 Cycle et mode de transmission	109	7.2 Les leishmanioses cutanées	
3.5 Pouvoir pathogène	109	de l'Ancien Monde	131
3.6 Diagnostic	110	7.3 Les leishmanioses cutanées	
3.7 Traitement	116	du Nouveau Monde	132
3.8 Épidémiologie	116	8. Méthodes de lutte et contrôle	134
3.9 Le contrôle de la trypanosomiase		8.1 Réservoir de parasites	134
à <i>T. b. gambiense</i>	117	8.2 Vecteurs	135
		8.3 Vaccins	135
4. <i>Trypanosoma (Trypanozoon)</i> <i>brucei rhodesiense</i>	118	9. Synthèse	135
4.1 Morphologie	118	<i>Bibliographie</i>	135
4.2 Hôtes	118		
4.3 Distribution géographique	118	12 LES CARACTÈRES	
4.4 Cycle et mode de transmission	118	DU GENRE <i>PLASMODIUM</i>	137
4.5 Pouvoir pathogène	118	<i>Introduction</i>	137
4.6 Diagnostic	119	1. Taxinomie (selon Levine 1988,	
4.7 Traitement	119	amendée par Cox 1991)	137
4.8 Épidémiologie	119	1.1 Embranchement, classes, ordres	137
5. Synthèse concernant		1.2 Famille	138
les sous-espèces de <i>T. (T.) brucei</i>	120	1.3 Genres	138
6. Synthèse générale	120	1.4 Sous-genres et espèces	138
<i>Bibliographie</i>	120	2. Cycle évolutif	
		des plasmodiums humains	138
11 LE GENRE <i>LEISHMANIA</i>		2.1 Description du cycle	138
LES LEISHMANIOSES	123	2.2 Dénomination des stades	
1. Historique	123	et principaux caractères	140
2. Bases de la distinction en espèces	123	3. Morphologie	140
2.1 Extériorisation clinique	123	3.1 Stade de la schizogonie	
2.2 Distribution géographique	124	pré-érythrocytaire	140
2.3 Espèces animales réceptives	124	3.2 Le mérozoïte, stade invasif	140
2.4 Combinaison de caractères	124	3.3 Stades de la schizogonie sanguine	140
3. Hôtes des leishmanies	124	3.4 Stades sporogoniques	141
3.1 Hôtes vertébrés	124	4. Caractères biologiques	142
3.2 Hôtes invertébrés	124	4.1 Pénétration dans le globule rouge	142
4. Cycle évolutif		4.2 Le plasmodium dans le globule rouge	143
et caractères biologiques	125	4.3 Le plasmodium chez l'anophèle	145
4.1 Chez l'hôte vertébré	125	4.4 La schizogonie pré-érythrocytaire	146
4.2 Chez l'hôte invertébré	125	<i>Bibliographie</i>	147
4.3 Biologie du parasite	126		
5. Diagnostic au laboratoire	127	13 LES PLASMODIUMS PARASITES	
5.1 Mise en évidence du parasite	127	DE L'HOMME	
5.2 Sérologie	128	PALUDISME OU MALARIA	149
5.3 Intradermo-réaction de Monténégro		1. Historique	149
à la leishmanine	129	1.1 La fièvre et les marais	149
5.4 Constantes biologiques	129	1.2 Le cinchona et la quinine	149

1.3 Le plasmodium et l'anophèle	149	14 COCCIDIES MONOXÈNES	
1.4 Le DDT, la chloroquine et le paludisme	150	LES GENRES <i>EIMERIA</i>, <i>ISOSPORA</i>	
2. Rappel de la biologie des plasmodiums et les relations hôte-parasite	150	<i>CRYPTOSPORIDIUM</i> ET <i>CYCLOSPORA</i>	
2.1 Le plasmodium chez l'homme	150	(EIMERIIDA) LES COCCIDIOSES	179
2.2 Le plasmodium chez l'anophèle	152	1. Généralités	179
3. Variations géographiques du paludisme	152	1.1 Cycle évolutif	179
4. Morphologie et caractères biologiques des parasites	153	1.2 Caractères distinctifs des genres	180
4.1 <i>Plasmodium vivax</i>	153	2. Coccidies infectant les animaux	181
4.2 <i>Plasmodium ovale</i>	155	2.1 Les genres <i>Eimeria</i> et <i>Isospora</i>	181
4.3 <i>Plasmodium malariae</i>	156	2.2 Le genre <i>Cryptosporidium</i>	181
4.4 <i>Plasmodium falciparum</i>	157	3. Coccidies infectant l'homme	182
5. L'immunité dans le paludisme	159	3.1 <i>Isospora belli</i>	182
5.1 Définitions	159	3.2 <i>Cryptosporidium</i> sp.	182
5.2 Les antigènes de Plasmodium	159	3.3 <i>Cyclospora cayetanensis</i>	185
5.3 Réponse immune	160	Bibliographie	187
5.4 Mécanismes de protection	160		
5.5 Immunité congénitale	160	15 COCCIDIES HÉTÉROXÈNES	
6. Physiopathologie du paludisme	161	LES GENRES <i>TOXOPLASMA</i>	
6.1 Effets généraux	161	ET <i>SARCOCYSTIS</i> (EIMERIIDA)	
6.2 Effets sur les principaux organes	161	LA TOXOPLASMOSE HUMAINE	189
7. Diagnostic du paludisme	163	1. <i>Toxoplasma gondii</i>	189
7.1 Diagnostic clinique	163	1.1 Historique	189
7.2 Le diagnostic spécifique	163	1.2 Classification	190
7.3 Le diagnostic biologique non spécifique	167	1.3 Hôtes habituels	190
8. Traitement du paludisme	167	1.4 Cycle évolutif de <i>Toxoplasma gondii</i>	190
8.1 Définitions	167	1.5 Pouvoir pathogène	193
8.2 Inventaire des produits et des associations	168	1.6 Diagnostic	194
8.3 Schémas prophylactiques	169	1.7 Traitement curatif	196
8.4 Schémas thérapeutiques les plus employés	169	1.8 Épidémiologie	197
8.5 Résistance des plasmodiums aux médicaments	170	1.9 Mesures prophylactiques	198
9. Épidémiologie du paludisme	171	2. <i>Sarcocystis</i> spp.	199
9.1 Paramètres théoriques importants	171	2.1 Introduction	199
9.2 Paramètres mesurés	173	2.2 Cycle évolutif	199
9.3 Classification des situations épidémiologiques	175	3. <i>Besnoitia</i>	201
10. Le contrôle du paludisme	175	4. <i>Frenkelia</i>	201
10.1 Objectifs	175	Bibliographie	202
10.2 Stratégies	176		
10.3 Application	176	16 LES GENRES <i>BABESIA</i> ET <i>THEILERIA</i>	
11. Perspectives de vaccination	176	(PIROPLASMIDA)	
11.1 Choix de l'antigène et effet attendu	176	LES PIROPLASMOSES	203
11.2 Obtention des antigènes	177	1. Le genre <i>Babesia</i>	203
11.3 Essais de vaccination	177	1.1 Hôtes, espèces et distribution géographique	203
Bibliographie	178	1.2 Spécificité d'hôte	203
		1.3 Cycle évolutif, morphologie et caractères biologiques	204
		1.4 Pathologie	205
		1.5 Diagnostic	205

1.6 Traitement	206	2. <i>Blastocystis hominis</i>	218
1.7 Données épidémiologiques	206	2.1 Localisation	218
1.8 Prévention et lutte	206	2.2 Morphologie et cycle	218
2. Le genre <i>Theileria</i>	207	2.3 Pouvoir pathogène	219
2.1 Hôtes, espèces	207	2.4 Diagnostic	219
et distribution géographique	207	2.5 Culture	219
2.2 Morphologie et cycle évolutif	207	2.6 Traitement	219
2.3 Pouvoir pathogène	207	2.7 Épidémiologie et transmission	219
2.4 Diagnostic	207	<i>Bibliographie</i>	219
<i>Bibliographie</i>	208		
17 LE GROUPE DES MICROSPORIDIES (MICROSPORIDA)	209	19 TECHNIQUES UTILISÉES POUR LE DIAGNOSTIC ET LA RECHERCHE	221
Introduction : taxinomie	209	1. Protozoaires des matières fécales	221
Famille des Microsporidae	209	1.1 Examen direct des selles	221
Famille des Nosematidae	209	pour recherche de protozoaires	221
Famille des Enterocytozoonidae	209	1.2 Méthodes de concentration	222
1. Inventaire des genres		1.3 Coloration des protozoaires fécaux	223
d'intérêt médical: généralités	210	sur frottis	223
1.1 Avant l'ère de l'immunodépression VIH	210	1.4 Coloration des oocystes	224
1.2 A l'époque du SIDA	210	de <i>Cryptosporidium</i> et de <i>Cyclospora</i>	224
1.3 Cycle évolutif, caractères biologiques	210	1.5 Conservation des kystes dans les selles	225
1.4 Caractères distinctifs importants	210	1.6 Culture polyxénique	226
des genres	210	de <i>Entamoeba histolytica</i>	226
2. Description des genres		1.7 Culture axénique	226
infectant l'homme	211	de <i>Entamoeba histolytica</i>	226
2.1 Le genre <i>Encephalitozoon</i>	211	1.8 Milieux de culture pour flagellates	228
2.2 Le genre <i>Enterocytozoon</i>	211	intestinaux et assimilés	228
2.3 Le genre <i>Nosema</i>	212	2. Protozoaires du sang et des tissus	231
3. Diagnostic des infections		2.1 Préparations pour la microscopie	231
à microsporidies	212	2.2 Préparation du colorant de Giemsa	231
4. Traitement des infections		2.3 Colorations utiles en histologie	232
à microsporidies	212	des parasitoses	232
<i>Bibliographie</i>	213	2.4 Techniques de concentration	234
		par centrifugation	234
		2.5 Techniques de concentration par filtration	235
		2.6 Techniques de concentration	236
		par hémolyse	236
		2.7 Milieux de culture	236
		pour flagellates sanguicoles	236
		2.8 Culture de <i>Plasmodium falciparum</i>	238
18 PROTOZOAIRES DE CLASSIFICATION INCERTAINE		3. Examen du liquide	
<i>PNEUMOCYSTIS CARINII</i>		céphalo-rachidien (LCR)	240
<i>BLASTOCYSTIS HOMINIS</i>	215	3.1 Numération des cellules (éléments)	240
1. <i>Pneumocystis carinii</i>	215	3.2 Examen parasitologique	241
1.1 Introduction	215	3.3 Dosage des protéines	241
1.2 Cycle évolutif, morphologie	215	3.4 Dosage des IgM non spécifiques	242
et caractères biologiques	215	4. Autres techniques	
1.3 Hôtes	216	de mise en évidence de parasites	243
1.4 Pouvoir pathogène	216	4.1 Recherche d'antigènes parasitaires	243
1.5 Diagnostic	217	par méthodes immunologiques	243
1.6 Traitement	218	4.2 Sondes ADN	245
1.7 Épidémiologie	218		

4.3 Amplification de séquence ("polymerase chain reaction", PCR)	245	1.2 Lutte biologique	261
5. Diagnostic indirect		1.3 Méthodes génétiques	261
par recherche d'anticorps	246	1.4 Lutte mécanique et écologique	262
5.1 Prélèvements et dilutions	246	1.5 Répulsifs	262
5.2 Réactions d'agglutination directe	247	2. Lutte contre les anophèles	262
5.3 Agglutination de particules inertes ("Latex agglutination test", LAT)	249	2.1 Pulvérisations intra-domiciliaires	262
5.4 Héماغglutination passive	249	2.2 Traitement spatial intra-domiciliaire	262
5.5 Variante de réaction d'agglutination: "immunosorbent agglutination assay" (ISAGA)	250	2.3 Traitement spatial extérieur	262
5.6 Précipitation en gel (PEG)	250	2.4 Mesures antilarvaires	262
5.7 Immunofluorescence indirecte (IFI)	252	2.5 Diminution du contact homme-insecte	263
5.8 Test ELISA ("Enzyme-linked Immunosorbent Assay")	253	2.6 Moustiquaires imprégnées d'insecticides	263
5.9 Variante: ELISA IgM "capture"	254	3. Lutte contre les glossines	263
5.10 Immuno-transfert	255	3.1 Insecticides	263
6. Cryoconservation	255	3.2 Lâcher de mâles stériles	263
6.1 <i>Plasmodium falciparum</i> du sang de patients ou de cultures	255	3.3 Etablissement de barrières chimiques et mécaniques	264
6.2 Trypanosomes sanguicoles	256	3.4 Utilisation de pièges	264
6.3 Parasites intestinaux en culture (amibes, <i>Giardia</i>)	257	3.5 Régulateurs de croissance	264
Bibliographie	257	3.6 Phéromones sexuelles	264
		3.7 Groupe de l'ivermectine	264
		4. Lutte contre les phlébotomes	264
		4.1 Utilisation des insecticides	265
		4.2 Modifications de l'environnement	265
		4.3 Mise en place de barrières naturelles	265
		4.4 Protection individuelle	265
		5. Lutte contre les réduvidés	265
		5.1 Utilisation des insecticides	265
		5.2 Réduction du contact homme - vecteur	265
		5.3 Réduction des populations de réduves	265
20 LUTTE CONTRE LES ARTHROPODES		INDEX	267
VECTEURS DE PROTOZOAIRES			
PARASITES	259		
1. Concepts généraux			
du contrôle des vecteurs	259		
1.1 Lutte chimique	259		

Liste des figures

Figure 1-1	Cellule eucaryotique	22	Figure 7-4	Espèces du genre <i>Trichomonas</i> infectant l'homme	77
Figure 1-2	Endocytose	23	Figure 8-1	Éléments structuraux des Trypanosomatidae	84
Figure 1-3	Structures cytosquelettiques et membranaires	25	Figure 8-2	Famille des Trypanosomatidae: stades des cycles	86
Figure 1-4	Organites de locomotion	26	Figure 8-3	Morphologie des formes de l'insecte chez <i>Trypanosoma</i>	86
Figure 1-5	Modes asexués de reproduction	27	Figure 8-4	Organites des trypanosomes au microscope électronique	88
Figure 4-1	Evolution possible de l'infection amibienne	41	Figure 9-1	Stercoraria sanguicoles	92
Figure 4-2	Cycle de <i>E. histolytica</i>	43	Figure 9-2	Réduve, vecteur de la maladie de Chagas	94
Figure 4-3	Trophozoïtes et kystes de <i>E. histolytica</i>	44	Figure 9-3	Stade trypomastigote de <i>T. cruzi</i>	95
Figure 4-4	Analyse isoenzymatique de <i>E. histolytica</i>	47	Figure 9-4	Stade amastigote de <i>T. cruzi</i>	95
Figure 4-5	Cristaux de Charcot-Leyden	50	Figure 9-5	Stade épimastigote de <i>T. cruzi</i>	96
Figure 4-6	Objets rencontrés à l'examen microscopique des selles	52	Figure 9-6	Cycle de <i>T. (S.) cruzi</i>	96
Figure 5-1	Amibes du tube digestif de l'homme	60	Figure 9-7	Immuno-électrophorèse dans l'infection par <i>T. cruzi</i>	99
Figure 5-2	Kystes d'amibes du tube digestif de l'homme.	61	Figure 10-1	Mouche tsé-tsé (genre <i>Glossina</i>)	103
Figure 5-3	Structure comparée des noyaux d'amibes	62	Figure 10-2	<i>T. (T.) brucei</i> et sous-espèces, trypomastigotes sanguicoles	104
Figure 5-4	Trophozoïtes et kyste de <i>Naegleria</i>	64	Figure 10-3	<i>T. (D.) vivax</i> , <i>T. (N.) congolense</i> et <i>T. (T.) rhodesiense</i>	104
Figure 5-5	Trophozoïte et kyste d' <i>Acanthamoeba</i>	65	Figure 10-4	<i>Trypanosoma congolense</i> , forme sanguicole	105
Figure 6-1	Trophozoïte et kyste de <i>Balantidium coli</i>	69	Figure 10-5	<i>Trypanosoma rangeli</i> , forme sanguicole	105
Figure 7-1	Flagellates intestinaux les plus courants	72	Figure 10-6	<i>T. (T.) brucei</i> et sous-espèces, épimastigotes du proventricule	106
Figure 7-2	Trophozoïte et kyste de <i>Giardia intestinalis</i>	73	Figure 10-7	Schéma du cycle de <i>T. (T.) brucei</i>	107
Figure 7-3	Cycle évolutif de <i>Giardia intestinalis</i>	74	Figure 10-8	Galerie forestière (gîte habituel de <i>G. palpalis</i>)	109
			Figure 10-9	Signe de Winterbottom	111

Figure 10-10	Fréquence relative des signes cliniques	111	Figure 13-2	Distribution du paludisme dans le monde	153
Figure 10-11	<i>T. b. gambiense</i> en goutte épaisse	114	Figure 13-3	<i>Anopheles stephensi</i> , un vecteur de paludisme	153
Figure 10-12	Schéma de dépistage classique	117	Figure 13-4	<i>P. vivax</i> dans le sang	154
Figure 10-13	Schéma de dépistage amélioré	118	Figure 13-5	<i>P. ovale</i> dans le sang	155
Figure 10-14	Microscopistes au cours d'une séance de dépistage actif	118	Figure 13-6	<i>P. malariae</i> dans le sang	156
Figure 10-15	<i>T. b. rhodesiense</i> en frottis et dans le sang non coloré, au contraste de phase	119	Figure 13-7	<i>P. falciparum</i> dans le sang	158
Figure 11-1	Phlébotome, vecteur de leishmanioses	124	Figure 13-8	La fièvre, symptôme cardinal	163
Figure 11-2	Macrophages et formes amastigotes	125	Figure 13-9	Mesure de l'hypertrophie de la rate	174
Figure 11-3	Formes promastigotes (vecteur, culture)	126	Figure 13-10	Actions possibles en zone endémique	176
Figure 11-4	Cycle évolutif des leishmanies	126	Figure 14-1	Schéma général du cycle des coccidies	180
Figure 11-5	Communautés antigéniques chez les Trypanosomatidae	128	Figure 14-2	Trophozoïte de <i>Cryptosporidium</i> dans l'intestin	180
Figure 11-6	Immuno-électrophorèse: arcs 4 et 24 spécifiques de <i>Leishmania</i>	129	Figure 14-3	Oocystes de <i>Isospora</i> dans les selles	182
Figure 11-7	Sérums de chiens et antigènes de <i>L. donovani</i>	131	Figure 14-4	Stades du cycle de <i>Cryptosporidium</i>	183
Figure 11-8	Ulcère leishmanien	131	Figure 14-5	Oocystes de <i>Cryptosporidium</i> dans les selles	184
Figure 12-1	Schéma du cycle des plasmodiums	138	Figure 14-6	Oocystes de <i>Cyclospora</i> dans les selles	186
Figure 12-2	Schizontes hépatiques	141	Figure 15-1	Schéma du cycle de <i>Toxoplasma gondii</i>	191
Figure 12-3	Ultrastructure des stades invasifs de <i>Plasmodium</i>	141	Figure 15-2	Ultrastructure d'un trophozoïte de <i>Toxoplasma</i>	192
Figure 12-4	Stades de la schizogonie érythrocytaire	141	Figure 15-3	Zoïtes et kystes de <i>Toxoplasma</i>	193
Figure 12-5	Stades de la sporogonie	142	Figure 15-4	Circulation des toxoplasmes	198
Figure 12-6	Étapes de la pénétration du mérozoïte dans le globule rouge	143	Figure 15-5	Schéma du cycle de <i>Sarcocystis</i>	199
Figure 12-7	Le plasmodium dans le globule rouge	144	Figure 15-6	Zoïtes et kystes de <i>Sarcocystis</i>	200
Figure 13-1	Modalités d'évolution de la parasitémie	151	Figure 15-7	Oocystes de <i>Sarcocystis</i>	201
			Figure 16-1	Formes érythrocytaires de <i>Babesia</i> sp	204
			Figure 16-2	Schéma du cycle de <i>Babesia</i>	205
			Figure 17-1	Spores de microsporidies (ultrastructure)	209

Figure 17-2	Schéma du cycle des microsporodites	210	Figure 19-3	Immunodiffusion radiale	242
Figure 17-3	Stades intracellulaires de microsporidies (dessins)	211	Figure 19-4	Prélèvements de sang séché, découpage de "confettis"	247
Figure 18-1	Schéma du cycle hypothétique de <i>P. carinii</i>	216	Figure 19-5	Test d'agglutination directe sur carte (CATT)	248
Figure 18-2	Stades de <i>Pneumocystis</i>	216	Figure 19-6	Réaction d'agglutination: promastigotes de <i>Leishmania</i> en plaque à microtitration	249
Figure 18-3	Formes de <i>Pneumocystis</i> dans les sécrétions bronchiques	217	Figure 19-7	Immunodiffusion (Ouchterlony) et immunoélectrophorèse	252
Figure 18-4	Stades de <i>Blastocystis</i> présents dans les selles	219	Figure 19-8	Lames «multispot»	252
Figure 19-1	Goutte épaisse correctement effectuée	227	Figure 19-9	Exemple de tests d'immunofluorescence positifs	253
Figure 19-2	Quadrillage des cellules à numération des éléments cellulaires dans le LCR	232	Figure 19-10	"Immunoblotting" ou "Western blot"	255

Avant-Propos

La protozoologie est la pierre angulaire des affections parasitaires endémo-épidémiques sous les tropiques. Elle a été reconnue comme telle, dès les premières tentatives d'identification par les pionniers de la médecine tropicale, toutes nationalités confondues. Broden et Rodhain ont fondé l'école belge de protozoologie qui connaîtra un lustre particulier notamment par la découverte des plasmodiums des rongeurs, les *Vinckeia*. Cette découverte transformera l'étude expérimentale, fondamentale et appliquée de ces protozoaires, menaces majeures et ubiquitaires pour la santé des hommes et des animaux.

Marc Wéry est un digne représentant de cette lignée qui, ayant bénéficié au surplus de l'hospitalité et du climat stimulant du service de l'éminent protozoologiste P.C.C. Garnham, a acquis son expérience en associant des recherches sur le terrain et les méthodologies modernes dans ses laboratoires à Kinshasa (Zaïre) et à Anvers.

Les protozoaires, microorganismes unicellulaires, occupent présentement une place de choix dans l'étude de la biologie cellulaire. Ces eucaryotes offrent la possibilité de disposer d'un nombre illimité de cellules identiques aux divers stades de développement. Ils sont devenus de ce chef le matériel de choix pour l'étude des structures, ultrastructures et fonctions physiologiques et biochimiques des organites et des enveloppes cellulaires. La progression de nos connaissances a trouvé dans le champ des protozoaires un terrain très riche. La biologie moléculaire, la génétique, l'immunologie en ont profité et ont permis de mieux fixer des cadres taxinomiques, de préciser davantage les rapports complexes "hôte-parasite" et de mettre au point des techniques plus performantes pour les diagnostics individuels et communautaires.

Le cadre essentiellement tropical et subtropical des protozooses a été rompu: son extension est universelle. La fréquence, la capacité et la vitesse des transports aériens et leur utilisation routinière entraînent la globalisation des risques de transmission des maladies infectieuses. Le compartimentage des pays en fonction de leur climat et du niveau d'hygiène a de ce chef cessé d'exister. Il y a plus: la multiplication des

personnes immunodéficientes d'origine iatrogène et particulièrement par les tristes retombées du SIDA, a ouvert plus largement le registre des infections à protozoaires latents ou à potentiel opportuniste. Ce domaine particulier, auquel Marc Wéry s'est familiarisé dans le laboratoire de son maître J.B. Jadin, reçoit l'attention qu'il mérite.

Dans le présent ouvrage, tous les aspects classiques et neufs des protozoaires sont rassemblés dans un large panorama, selon une formule méthodique et précise et de plus, confrontés avec une large et précieuse expérience. On y trouve des données sûres et réfléchies sur une taxinomie basée de plus en plus sur des caractères génétiques, sur la biologie cellulaire et moléculaire, sur les cycles biologiques complexes rendus accessibles par des schémas particulièrement démonstratifs. Il offre une analyse critique des signes cliniques, sur les méthodes de diagnostic usuels ou très sophistiqués jugés comparativement avec objectivité, des indications pour les traitements et les moyens de prévention. L'épidémiologie, notion fondamentale pour les modalités des transmissions, reçoit l'attention qu'elle mérite.

Cet ouvrage s'avèrera un guide précieux pour tous ceux qui souhaitent acquérir et assimiler la protozoologie à l'aide de textes clairs, ordonnés, souvent captivants. Il n'y manque que le complément anecdotique qui enrichit les exposés magistraux. Il s'avèrera de même très utile pour un public plus large qui, confronté avec des problèmes déroutants en médecine humaine, y trouvera les données utiles à orienter la réflexion vers une solution.

C'est avec une grande satisfaction et gratitude que j'ai introduit ce traité de protozoologie qui fait honneur à son auteur et à l'école belge de protozoologie.

Professeur P.G. Janssens

Directeur honoraire
de l'Institut de Médecine tropicale
Prince Léopold
à Anvers

Avertissement au lecteur

Cet ouvrage a pour but principal de décrire les protozoaires et leur comportement parasitaire chez l'homme. Il ne s'agit donc pas d'un traité clinique.

La localisation anatomique de l'activité parasitaire et la réaction de l'hôte à la présence de cet intrus déterminent, dans de nombreux cas, un dysfonctionnement organique dont la pathogénie, souvent encore partiellement hypothétique, sera décrite et une maladie dont les symptômes seront évoqués schématiquement. Toute l'attention se porte sur le diagnostic au laboratoire.

La démarche thérapeutique qui s'en suit sera évoquée sous forme d'une liste de médicaments actifs et de schémas de traitement éprouvés.

Les mécanismes de transmission de chaque organisme, décrits en détail, introduiront les paragraphes de description épidémiologique qui situeront le parasite et suivront ses mouvements au sein d'une communauté d'individus. Les méthodes de mesure épidémiologique sont essentielles car elles permettent d'évaluer l'importance des endémies et de prévoir l'efficacité des méthodes de contrôle proposées.

La littérature récente est encombrée de données éparses sur la dissection des parasites et du système immunitaire en leurs composants moléculaires. Epitopes de protéines antigéniques, molécules de reconnaissance cellulaire et leurs séquences déterminantes identifiées dans le génome du parasite, étapes métaboliques du protozoaire, sécrétion de cellules immunitaires, déterminants du mécanisme oxydatif des phagocytes, tout est analysé. Ces mécanismes moléculaires ne seront évoqués que lorsque leur connaissance est suffisamment cohérente pour aider à comprendre la survie et la multiplication des microorganismes dans

l'espace intérieur de l'hôte ou la résistance que celui-ci leur oppose par une réaction de défense adaptée.

La liste des techniques de laboratoire est loin d'être exhaustive. Le choix présenté au chapitre 19 sera basé sur l'expérience accumulée par l'auteur. Ce sont des recettes éprouvées avec l'accent mis sur la faisabilité dans les conditions du terrain.

La lutte contre les vecteurs sortirait du cadre de la protozoologie médicale si elle n'était une composante essentielle de la lutte contre les maladies parasitaires dont il est question dans le reste du livre. Ici aussi, quelques indications pratiques utiles pour la mise en œuvre des opérations prendront le pas sur les principes généraux qui seront seulement évoqués. On en profitera cependant pour familiariser le lecteur avec les insecticides et leur formulation, produits généralement peu connus et souvent mal employés.

On peut regretter l'absence de couleurs dans les illustrations mais après tout la forme est, en parasitologie, l'élément le plus important sauf lorsqu'une coloration spécifique peut aider au repérage d'un organisme. Le but poursuivi sera de guider l'observation au microscope du stade diagnostique et de suivre la morphogenèse au cours du cycle parasitaire. En plusieurs endroits, un texte descriptif remplacera une photo dont l'utilité est marginale. D'autre part, des atlas en couleurs de qualité exceptionnelle (Atlas of human Protozoa, Ed. E.G. Rondanelli et M. Scaglia, Masson, Milano 1993 et Atlas de microbiologie médicale, Mangelschots, Lontje, Vandepitte, Acco Amersfoort Leuven 1990) ont été récemment publiés sur les protozoaires.

La bibliographie terminant chaque chapitre est présentée de manière chronologique pour mieux retracer les étapes marquantes dans la connaissance du protozoaire et de son comportement parasitaire.

Le Protozoaire: morphologie, physiologie

1

1. Généralités

1.1 Définition

Le Protozoaire est un être vivant unicellulaire dépourvu de chlorophylle et se multipliant par mitose ou par reproduction sexuée. L'embranchement des protozoaires comprend les ciliés, les flagellés, les rhizopodes (amibes, foraminifères, radiolaires) et l'hématozoaire du paludisme (dictionnaire *Larousse*)

1.2 La cellule eucaryotique

Les composants principaux de cette cellule, qui l'opposent au "procaryote" (bactéries et apparentés) sont énumérés ci-dessous (figure 1-1):

- un système de cytomembranes, y compris l'enveloppe nucléaire qui isole le matériel nucléaire du cytoplasme;
- des éléments cytosquelettiques et systèmes moteurs associés, y compris l'appareil mitotique;
- une organisation complexe du génome comprenant des chromosomes (ensembles de gènes avec leurs outils de fonctionnement), des nucléoles, des gènes segmentés, un système d'épissage de l'ARN (acide ribonucléique), une séparation physique stricte entre la transcription (noyau) et la traduction (cytoplasme) de l'information génétique;
- des organites métaboliques cytoplasmiques.

En tant que cellule isolée, le protozoaire possède les constituants des cellules métazoaires: membrane, cytoplasme et noyau. Il possède en outre un certain nombre d'organites spécialisés.

Les Protozoaires ont largement contribué aux progrès réalisés ces dernières années en matière de biologie cellulaire et moléculaire. Leur survie aisée et leur multiplication au laboratoire dans des liquides nutritifs simples en ont fait un matériel de choix pour l'observation au microscope électronique des constituants cellulaires, pour l'étude de la fonction des organites cytoplasmiques, pour la définition du rôle

primordial de la membrane externe de la cellule et pour l'élucidation des réactions biochimiques qui président au métabolisme de la cellule.

2. Structures et fonctionnement

2.1 Système cytomembranaire

C'est l'ensemble constitué par la membrane plasmique (paroi externe de la cellule) et ses invaginations endocytaires qui forment un réseau de membranes à l'intérieur de la cellule et la divisent en compartiments spécialisés. La structure adoptée permet aux membranes les deux actions opposées de fusion/fission qui sont la base de leur fonctionnalité: une membrane peut à tout moment s'interrompre, s'ouvrir (vacuole alimentaire, lysosome) ou au contraire fusionner avec une autre partie et se refermer (division cellulaire, formation des vésicules d'endocytose).

Ce système cytomembranaire est constitué d'une bicouche lipidique (phospholipides, glycolipides et sulfolipides), d'une épaisseur de 5 à 6 nm. Les têtes hydrophiles font saillie sur les deux faces de la membrane. La cohésion latérale est assurée par les forces de van der Waals entre les chaînes hydrocarbonées hydrophobes.

Cette structure simple procure aux membranes séparant différents compartiments, deux qualités indispensables au fonctionnement de la cellule: elles ont une tendance générale à se refermer spontanément sur elles-mêmes (formation de vésicules fermées) et elles sont imperméables aux molécules et ions solubles dans l'eau.

Les protéines membranaires sont insérées dans la couche bilipidique par des segments polypeptidiques hydrophobes et ancrées par un acide gras. Leur rôle est double:

- transporter les molécules d'un côté à l'autre de la membrane, par diffusion et par un système de pompes pouvant forcer le courant contre les déséquilibres ioniques et contre les charges électriques (potentiels de membranes); les pompes

1. Généralités
 - 1.1 Définition
 - 1.2 La cellule eucaryotique
2. Structures et fonctionnement
 - 2.1 Système cytomembranaire
 - 2.2 Cytoplasme
 - 2.3 Corpuscules intra-cytoplasmiques
 - 2.4 Noyau
 - 2.5 Cytosquelette
 - 2.6 Organites moteurs
 - 2.7 Reproduction

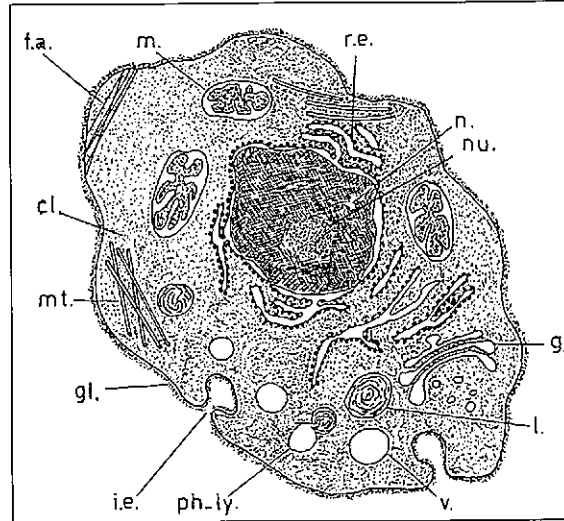
FIGURES

- 1-1 Cellule eucaryotique
- 1-2 Endocytose
- 1-3 Structures cytosquelettiques et membranaires
- 1-4 Organites de locomotion
- 1-5 Modes asexués de reproduction

Figure 1-1

Cellule eucaryotique

cl	cytosol
f.a.	fibres d'actine
g.	Golgi
gl.	glycoprotéines de surface
i.e.	invagination endocytaire
l.	lysosome
m.	mitochondrie
mt.	microtubules
n.	noyau
nu.	nucléole
ph.-ly	phagolysosome
r.e.	réticulum endoplasmique
v.	vacuole



sont alimentées en énergie par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP);

- communiquer avec l'environnement par des récepteurs situés à l'extérieur (par exemple, sites de fixation pour des ligands spécifiques), la réponse aux messages (réaction) étant assurée par les sites effecteurs situés de l'autre côté de la membrane.

Les membranes doivent remplir de multiples fonctions. Les différences résident dans l'abondance de telle protéine plutôt que telle autre. La membrane plasmique est un organite frontière. Elle est équipée de transporteurs, de pompes, de canaux, de vannes; elle est souvent renforcée, sous-tendue par un tissu cytosquelettique de diverses compositions, la plus courante étant un réseau serré de fibres d'actine. Les membranes internes sont des organites frontières spécialisés. Elles sont chargées, par exemple, de la fonction de triage entre la capture endocytaire (pinocytose) et la digestion lysosomiale (fusion avec un lysosome).

La membrane plasmique, semi-perméable, permet le passage des petites molécules (H_2O), passivement par les mécanismes osmotiques et activement (grâce aux protéines qui la truffent) par un système de "pompes" (exportation des ions Na^+ et importation des ions K^+ , Ca^{++}). Elle est, de plus, souple et déformable et donne naissance aux vacuoles d'endocytose (phagosomes) par invagination. L'importation dans le cytoplasme de particules solides (bactéries, grains d'amidon etc...) porte le nom de "phagocytose" (manger, au niveau de la cellule), celle de gouttelettes liquides contenant des matières nutritives dissoutes ou de

lipides en émulsion porte le nom de "pinocytose" (boire, au niveau cellulaire).

Les vacuoles chargées de produits du catabolisme, au contraire, fusionnent avec la membrane plasmique et s'ouvrent à l'extérieur (exocytose), éliminant ainsi les déchets cellulaires (figure1-2).

Chez certains protozoaires, toute la surface de la cellule participe au phénomène car la membrane est souple (amibes); chez d'autres dont la membrane externe est sous-tendue par des structures squelettiques rigides, l'endocytose se fait à un endroit spécialisé de la membrane: poche flagellaire chez les trypanosomes, cytostome chez les ciliates.

Les antigènes de surface recouvrent la membrane externe et sont constitués de protéines complexes, fixées aux structures membranaires par lesquelles le protozoaire entre en contact avec le milieu extérieur. Ces glycoprotéines revêtent une importance toute particulière chez les protozoaires parasites car ce sont elles qui vont induire la réponse immune chez l'hôte. Les premiers anticorps fabriqués par l'organisme envahi sont en effet dirigés spécifiquement contre ces protéines garnissant la membrane. L'action de ces anticorps a pour résultat la lyse des parasites par destruction de leur paroi. De nombreux protozoaires ont la capacité de produire au sein d'une population en cours de lyse, des mutants appelés "variants antigéniques". Ce sont des individus qui, ayant changé la séquence des acides aminés de leurs protéines de surface, échappent à l'action des anticorps lytiques dirigés contre le premier antigène et sont à l'origine d'une nouvelle population de parasites. Ces antigènes, portés par la surface du parasite, sont appelés glycoprotéines variantes de surface; le codage génétique de la synthèse de ces antigènes variables est assuré par des gènes nucléaires séparés, activés successivement.

Les protozoaires résistent très mal à la présence d'oxygène, à un excès d'ions Ca^{++} ou Mg^{++} , aux changements de tonicité, à la dessiccation, aux agents détergents... Certains sont capables de modifier leur membrane externe, de l'épaissir, au cours du processus d'enkystement.

La paroi kystique, rigide, a une constitution très variable. En général, elle est formée de différentes couches, l'interne étant cellulosique ou composée de chitine et l'externe phosphoprotéique, dure et chargée sur sa surface externe de mucopolysaccharides. Cette paroi contient chez les amibes 33 p.100 de protéines (manteau de surface de glycoprotéines) et permet au parasite qui l'a sécrétée, de survivre dans un milieu

hostile (antiseptiques, dessiccation) pendant des périodes plus longues.

Le protozoaire doit cependant, au préalable, avoir éliminé de son cytoplasme les matériaux usagés et les organites métaboliques de même que l'excédent d'eau (épuration et concentration du cytoplasme). Les échanges entre la cellule et l'extérieur sont interrompus pendant la durée du stade kystique et le métabolisme est arrêté.

2.2 Cytosol

C'est un élément amorphe (sans structure) mais très concentré (20 p.100 de protéines et 70 p.100 d'eau) dans lequel baignent des inclusions cytoplasmiques diverses. Il occupe tout l'espace entre la membrane externe et le noyau. Il contient des systèmes enzymatiques importants pour la vie de la cellule, entre autres les enzymes de la chaîne glycolytique et des systèmes bio-synthétiques.

La mobilité des substances entre les différents endroits du cytoplasme ou du noyau nécessite l'organisation de leur transport, souvent à travers des membranes ou enfermées dans des vésicules: c'est ce qu'on appelle la translocation. Le cytosol y joue un rôle important mais passif. C'est un lieu de passage où ont cependant lieu des transformations.

Le réticulum endoplasmique baigne dans le cytosol. C'est un réseau de membranes, réparti dans tout le cytoplasme et qui lui donne l'aspect d'une éponge. Certaines parties du réticulum sont garnies de grains visibles au microscope électronique contenant l'ARN: les ribosomes. Ils sont chargés de la synthèse protéique en utilisant l'information venue du noyau par l'intermédiaire de l'ARN messenger.

2.3 Corpuscules intra-cytoplasmiques

L'**appareil de Golgi** est constitué de sacs aplatis et empilés les uns sur les autres, ainsi que d'ampoules vésiculeuses, émises par la périphérie des saccules à la suite de constriction locale. Il participe à la fabrication de membranes, aux sécrétions cellulaires, au drainage d'éléments du cytosol vers l'extérieur (figure 1-3).

Les **mitochondries** sont des sacs allongés, entourés d'une membrane double. Le feuillet interne de cette membrane comporte de nombreux replis s'enfonçant à l'intérieur de la mitochondrie, en vue d'augmenter la surface de contact. Elles contiennent des enzymes d'oxydation (déshydrogénases) et ont pour principal rôle de brûler (c'est-à-dire oxyder) les substances ingérées par la cellule pour produire de l'énergie. Les mito-

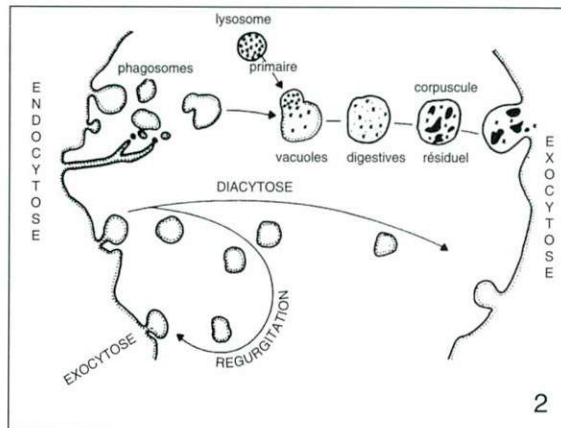


Figure 1-2

Endocytose

1. Vacuole d'endocytose avec accumulation de phosphatase acide indiquant la fusion précoce avec un lysosome
2. Vue schématique des phénomènes d'endocytose (d'après P.J. Jacques)

chondries sont des organites d'adaptation particulièrement importants pour les protozoaires qui sont amenés, au cours de leur cycle évolutif, à vivre dans des milieux très différents au point de vue valeur nutritive et oxygénation (par exemple successivement le sang d'un vertébré et l'estomac d'un invertébré). L'adaptation du protozoaire à un milieu pauvre en oxygène nécessite une hypertrophie très importante de la mitochondrie pour maintenir les oxydations intracellulaires à un niveau constant.

Le **kinétoplaste** des flagellés est une portion différenciée de la mitochondrie. C'est un corpuscule allongé, en forme de bâtonnet, qui se trouve sous le corpuscule basal chez certains flagellates. Il contient une quantité importante d'ADN (plus de 25 p.100 du contenu cellulaire total chez les trypanosomes). En continuité avec la mitochondrie, il est le support génétique réglant les adaptations métaboliques aux différents milieux où évolue le parasite.

Il faut remarquer que cet ADN cytoplasmique est une déviation du code génétique universel: le génome d'organite est en effet transmis, lors de la reproduction sexuée, par la mère (et exclusivement par elle) à sa descendance.

Les **lysosomes** sont de petits sacs sphériques à paroi simple. Ils contiennent des enzymes lytiques servant normalement à la digestion des particules ingérées dans le phagosome. Leur lésion amène la destruction de la cellule ("corpuscules suicide"). Protéases, glycosidases, phospholipases, phosphatases (entre autres phosphatase acide), peroxydases, hydrolases sont les principaux enzymes lysosomiaux.

La phagocytose et la pinocytose conduisent à la formation de **vacuoles** (phagosomes), entourées d'un morceau de membrane plasmique et contenant des produits alimentaires qui seront progressivement digérés avec l'aide des lysosomes. Les substances ingérées seront utilisées, après digestion, soit pour la fourniture d'énergie par oxydation avec l'aide des mitochondries, soit pour la synthèse des constituants cellulaires. La vacuole est parfois un critère morphologique utile (trophozoïte de *Plasmodium*, kyste de *Iodamoeba*). Il existe aussi dans certains protozoaires, des vacuoles dites "pulsatiles" qui servent à collecter les produits du catabolisme ou un excédent d'eau qui seront ensuite éliminés à l'extérieur de la cellule.

2.4 Noyau

Porteur du patrimoine génétique, le noyau des protozoaires est caractérisé par un grand degré de variabilité du matériel chromosomique mis en évidence par des variations dans la colorabilité au Feulgen mais aussi par les autres colorants usuels (Giemsa, hématoxyline). Il est délimité (contrairement aux bactéries) par une double membrane trouée, en continuité avec le réticulum endoplasmique, qui sépare la "réplication" de la "traduction".

La réplication des séquences de bases se fait à l'intérieur du noyau. L'ARN messager, copie conforme des séquences de bases de l'ADN, est exporté à travers la membrane nucléaire dans le cytoplasme pour être rattaché par épissage à l'ARN ribosomal.

La traduction (synthèse protéique) peut alors avoir lieu dans le cytoplasme par la lecture du code génétique: un triplet de nucléotides (trois nucléotides successifs) code pour l'utilisation d'un acide aminé. Cette disposition donne aux quatre nucléotides (Uracile, Adénine, Cytosine, Guanine), pris par groupes de trois, la possibilité de coder pour l'utilisation des vingt

acides aminés essentiels qui composent la matière vivante. Le code génétique est connu: le triplet UUA code pour l'utilisation de la leucine, UCA pour la sérine, GCU pour l'alanine, etc... Le code génétique n'a pas de ponctuation (il est lu sans interruption, par blocs de trois bases à la suite les unes des autres); il est universel car tous les organismes utilisent le même langage; il possède des codons de départ (AUG) et d'arrêt (UAG, UAA ou UGA) spécifiques, qui indiquent l'endroit où la traduction doit débiter et s'arrêter.

Le matériel génomique peut être diffus ou concentré en grains (chromatine), dont la disposition au sein du noyau peut constituer une caractéristique taxinomique. La chromatine est l'association de l'ADN avec des protéines appelées histones. Ces protéines servent de "bobines" autour desquelles s'enroule la chaîne d'ADN, jouant un rôle de protection contre les accidents de parcours. Toutefois, cette situation a un inconvénient: la réplication ne peut se faire qu'après déroulement, ce qui retarde le processus de la mitose.

Les gènes des protozoaires sont segmentés, interrompus par des introns et repérables à leurs extrémités par des télomères.

Rond ou ovale, le noyau occupe une position variable, le plus souvent centrale, au sein de la cellule. Il est parfois associé aux corpuscules basaux des flagelles ou attaché à une structure squelettique (axostyle).

La plupart des protozoaires n'ont qu'un seul noyau mais on rencontre cependant de nombreux exemples de cellules plurinucléées: kystes d'amibes, schizontes de plasmodium, ciliates... De plus, chez les flagellates, le noyau ne détient pas l'exclusivité de la présence de l'ADN, puisque des organites cytoplasmiques comme les kinétoplastes sont essentiellement composés de cette substance et interviennent donc dans le déterminisme génétique de la cellule. La disposition de la chromatine et des caryosomes, condensations d'ADN visibles au microscope optique, constituent chez certains protozoaires des caractères taxonomiques utiles.

Les noyaux se divisent par mitose mais lorsqu'une multiplication sexuée existe avec formation d'un œuf (zygote), la méiose (division réductionnelle) est obligatoire. Dans l'ordre des Coccidia, cette méiose est dite zygotique, c'est-à-dire qu'elle suit immédiatement la formation du zygote par fécondation avec pour conséquence que tous les stades végétatifs sont haploïdes.

2.5 Cytosquelette

Il doit assurer le maintien d'une forme, forcer les structures à rester en place ou au contraire les forcer à se rejoindre pour fusionner. Il est composé de protéines spéciales (actine et tubuline) qui s'alignent en chaînes pour former des fibrilles.

Les fibres d'actine sont contractiles. Enchevêtrées, elles peuvent former un réseau serré comme une toile résistante et semi-rigide.

Les microtubules sont composés de tubulines α et β , protéines très importantes chez les protozoaires. Des structures latérales de ces protéines permettent l'assemblage de 13 filaments côte à côte (ni plus ni moins) pour former un microtubule cylindrique. Ces fins tubes creux et rigides sont disposés en spirale immédiatement sous la membrane externe de certains protozoaires. Ils peuvent aussi, par un raccourcissement combiné à un appui sur un point d'ancrage (structure fixe), assurer la mobilisation d'une vésicule, des chromosomes lors de la mitose (métaphase), le mouvement d'un flagelle, etc.

Le couplage de ce travail avec une réaction fournissant l'énergie est nécessaire: l'hydrolyse de l'ATP. Il est assuré par des protéines comme la myosine, dans le cas de l'actine dans les fibres musculaires; dans le cas des tubulines, c'est la dynéine ou la kinésine qui jouent le rôle d'intermédiaires.

L'axostyle est un faisceau de microtubules accolés, en forme de bâtonnet rigide et rectiligne, qui constitue une sorte de colonne vertébrale chez *Trichomonas* par exemple. Bien visible au microscope optique, il se situe dans l'axe du parasite, en son centre. Il prend son origine devant le noyau, à la base des flagelles puis se dirige vers l'arrière où il semble dépasser l'extrémité postérieure du parasite (figure 1-3).

2.6 Organites moteurs

La plupart des protozoaires ont besoin d'une possibilité de se mouvoir dans le milieu ambiant. Les sporozoaires passent une partie importante de leur vie à l'intérieur des cellules. Ils n'acquièrent des possibilités de motilité qu'au moment où ils sont obligés de changer de cellule hôte (sporozoïtes, mérozoïtes), en même temps que des organes de pénétration se développent (rhoptries, micronèmes, anneau polaire).

Certains protozoaires possèdent une ou plusieurs structures spécialisées qui leur confèrent une mobilité extrêmement agile et rapide. Ce sont des mouvements visibles au microscope optique. De nombreux mouve-

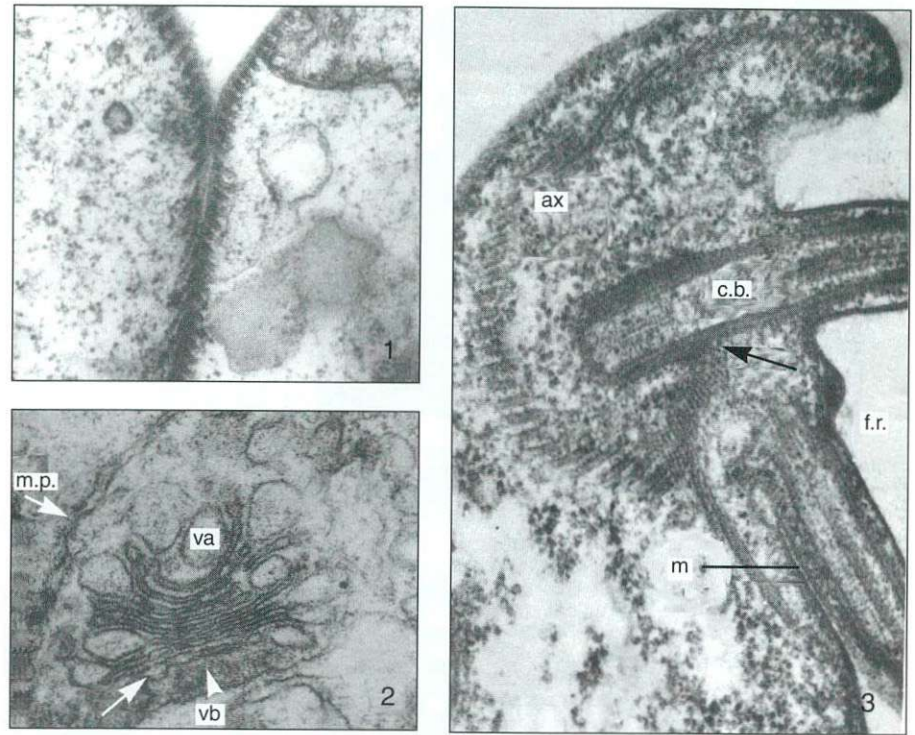


Figure 1-3

Structures cytosquelettiques et membranaires

1. Microtubules sous-tendant la membrane plasmatique
2. Appareil de Golgi (sacculés aplatis), réserve de membranes
m.p. membrane plasmatique
v.a. vacuole alimentaire
v.b. vacuole basale
3. Fibrilles soutenant les éléments flagellaires
m membrane plasmatique
ax. axostyle (microtubules torsadés)
c.b. blépharoplaste ou corpuscule basal
f.r. flagelle récurrent

ments, invisibles à l'observation, se font continuellement à l'intérieur de la cellule dans le cytoplasme, le noyau, les vacuoles: mouvements liquidiens, formation de vacuoles, invaginations des membranes, division nucléaire et cellulaire, etc. Tous ces mouvements sont rendus possibles grâce aux filaments d'actine et de tubuline qui composent le cytosquelette.

Le **flagelle** est un prolongement cytoplasmique long et fin centré par l'axonème, système de fibrilles axiales (9 paires périphériques et une paire centrale). Accompagné d'une gaine de cytoplasme et enveloppé par la membrane externe du parasite, cet axonème soutient et anime le flagelle sur toute sa longueur. Les paires de fibrilles contractiles sont constituées de 2 microtubules associés. Leur activation provoque des contractions des protéines de tubuline qui les composent et un raccourcissement d'un des microtubules de la paire, assurant ainsi une déformation, puisqu'ils sont fixés l'un à l'autre, produisant une onde sinusoïdale ou hélicoïdale dans le flagelle.

Le **corpuscule basal** (cinétosome, blépharoplaste) est un granule cylindrique situé sur l'axonème du flagelle, à son point de fixation dans le cytoplasme.

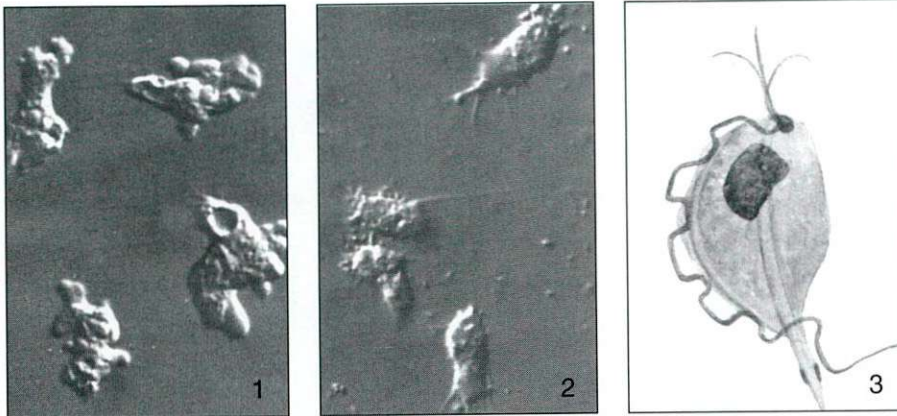
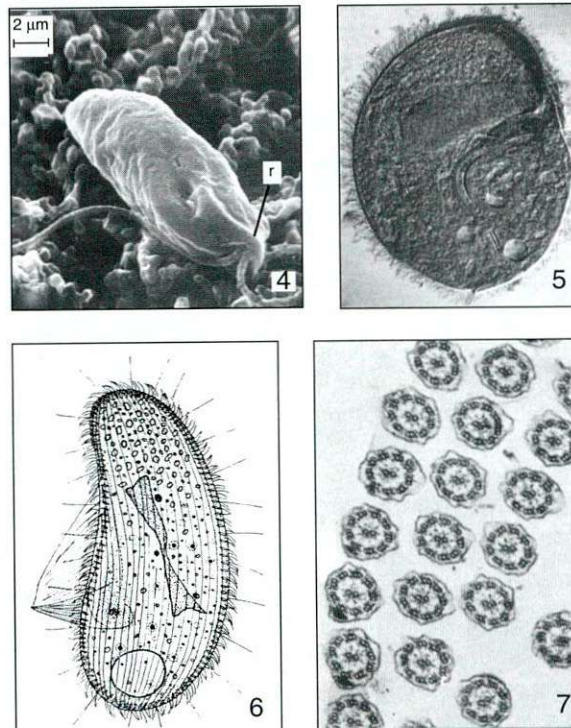


Figure 1-4

Organites de locomotion

1. Amibes avec pseudopodes (microscope à balayage)
2. Amibes avec pseudopodes filiformes (idem)
3. Dessin de flagelles (*Trichomonas* sp.)
4. Flagelles de *Trichomonas* sp. (microscope à balayage)
5. Ciliate holotriche (entièrement recouvert de cils) au microscope électronique: on y aperçoit l'empreinte du macronucleus réniforme, de vacuoles et de structures cytosquelettiques.
6. Dessin de ciliate holotriche
7. Cils coupés transversalement, au microscope électronique: ils ont une structure identique à celle des flagelles.



Les **cils**, toujours nombreux (ciliates), recouvrant dans certains cas la totalité de la surface de l'organisme (chez les holotriches), ont la même structure que les flagelles mais sont beaucoup plus courts. Leurs battements ne sont pas synchrones mais sont organisés par vagues et propulsent l'animal à grande vitesse. Chaque cil possède un corpuscule basal, semblable à celui des flagelles et est animé de mouvements "en moulinets", son extrémité libre décrivant un cercle.

Les **pseudopodes** sont provoqués par des déformations de la membrane plasmique (visibles au microscope optique chez les amibes) qui permettent à la cellule de ramper sur un support dans une direction déterminée. Ces déformations de la membrane externe sont provoquées par des pressions internes du cytoplasme, modulées par une contractilité de certaines parties de la membrane (sous-tendue d'un réseau de fibres d'actine) accompagnées du relâchement d'autres sites (situés à l'avant par rapport au mouvement). Grebecki (1982) a comparé l'amibe à une cornemuse écossaise: "la pression doit être exercée sur l'outre de la cornemuse pour la faire fonctionner mais c'est en actionnant les tuyaux à nombreuses ouvertures sur le front de l'instrument qu'on fait de la musique"... (figure 1-4).

2.7 Reproduction

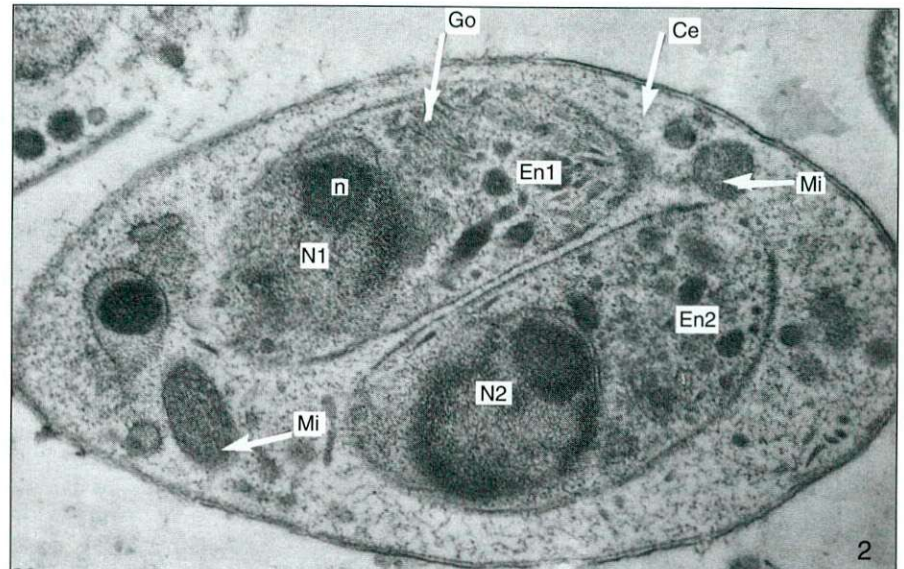
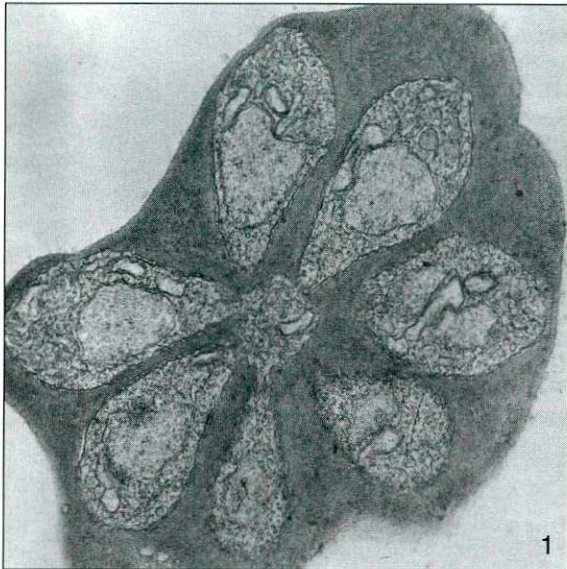
Trois modes de reproduction existent chez les Protozoaires: asexuée, sexuée, par conjugaison.

La **reproduction asexuée** peut se faire par

- **bipartition**: c'est la plus fréquemment observée. La division du noyau est immédiatement suivie de la division cellulaire (amibes, flagellates);
- **schizogonie**: plusieurs divisions du noyau ont lieu avant que la cellule mère (schizonte) ne se morcelle en plusieurs cellules, isolant les noyaux (coccidies);
- **endodyogenèse**: deux cellules filles se forment à l'intérieur de la cellule mère. Avant que chacune de ces deux cellules ne soit complète, avec membrane externe et cytoplasme individualisé, le noyau s'allonge et se divise une nouvelle fois... La membrane de la cellule mère persiste et finit par contenir de nombreux parasites (kyste de *Toxoplasma*).

La **reproduction sexuée** se fait par union de deux gamètes haploïdes (mâle et femelle) différenciés. Elle donne lieu à la fécondation et production d'un zygote (œuf fécondé) diploïde (coccidies).

La **conjugaison** consiste en un échange de matériel génétique entre deux cellules accolées, avant une nouvelle série de divisions par bipartition. La division du noyau donne une cellule binucléée, un des noyaux traverse le pont cytoplasmique et fusionne avec le noyau resté en place de l'autre cellule. C'est le mode habituel de reproduction chez les ciliés.



Remarque

Alternances de reproduction sexuée et asexuée

Il semble démontré pour certains protozoaires qu'au cours de séries de divisions par bipartition, des échanges de matériel nucléaire peuvent avoir lieu. On a parlé de la sexualité cachée des trypanosomes et de l'apparition en culture, d'hybrides entre isolats différents d'*Entamoeba histolytica*. Cependant, la fréquence de ces phénomènes reste suffisamment basse pour ne pas influencer le caractère clonal de ces protozoaires.

Le fait qu'un parasite évolue en lignées verticales strictes (comportement clonal) ou qu'il permette des hybridations fréquentes entre lignées verticales voisines (comportement panmictique) a des implications profondes sur son génie épidémique et sur la recherche appliquée qui essaye de décrire son comportement sur le terrain (voir méthodes taxinomiques, chapitre 3). La question est de savoir quel est le retentissement de la diversité génétique des microorganismes sur leurs propriétés biologiques qui intéressent le médecin et l'épidémiologiste (virulence, adaptation à des hôtes, résistance aux médicaments...).

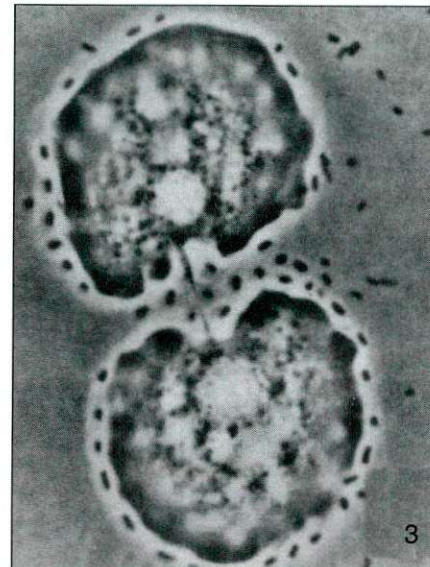


Figure 1-5

Modes asexués de reproduction

1. Schizogonie avec sept mérozoïtes (microscopie électronique, d'après Vivier, 1969)
2. Endodyogénie (*Toxoplasma gondii*, microscopie électronique, d'après Senaud, 1967)
Go. appareil de Golgi
n. nucléole
Ce cellule initiale ("mère")
En1 premier endozoïte
En2 deuxième endozoïte
N1 noyau de la première cellule
N2 noyau de la deuxième cellule
Mi. mitochondrie
3. Bipartition chez une amibe juste avant la séparation des deux cellules encore reliées par un fin pont cytoplasmique (microscopie optique, d'après Pussard, 1973)

BIBLIOGRAPHIE

- BRACHET J, MIRSKY A. (1964) *The cell Biochemistry, Physiology, Morphology*, London, Academic Press, VI, chap. 1 et 2.
- DURAND M, FAVARD P. (1967) *La Cellule*, Paris, Hermann, Collection Méthodes.
- SCHOLTYSEK E. (1979) *Fine structure of parasitic protozoa*, Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag.
- GREBECKI A. (1982) Etudes expérimentales sur la localisation des fonctions motrices chez les amibes, *Année Biologique*, XXI, 275-306.
- DE PUYTORAC P, GRAIN J, MIGNOT JP. (1987) *Précis de Protistologie*, Paris, Société Nouvelle Boubée.
- ANDERSON OR. (1988) *Comparative Protozoology: Ecology, Physiology, Life History*, Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag.
- RUSSEL PJ. (1988) *Génétique, des lois de Mendel à la biologie moléculaire*, Medsi/Mcgraw-Hill (traduction de "Essential Genetics") par Pradel J. et Joset F.
- DE DUVE C. (1990) *Construire une cellule*, Bruxelles, De Boeck Université.
- SLEIGH MA. (1991) The nature of the Protozoa, In: JP KREIER and JR BAKER (Eds) *Parasitic protozoa*, 1, 1-53

Le Protozoaire parasite et le phénomène du parasitisme

2

1. Définitions

Le parasitisme implique l'association intime de deux organismes vivants, de natures différentes. L'un, appelé "hôte", fournit l'hébergement et la nourriture pour l'autre, appelé "parasite". Le parasite vit donc aux dépens de l'hôte mais il existe plusieurs types de relations hôte-parasite et de comportements parasitaires.

Le parasite **commensal** vit aux dépens d'un autre organisme sans lui faire aucun mal. Dans certaines circonstances, cette coexistence pacifique cesse et l'organisme devient pathogène (infection opportuniste).

Le parasite vivant en **symbiose** vit au dépens de son hôte en l'aidant dans certaines de ses fonctions (nutrition, métabolisme, défense).

Le parasite **pathogène** entraîne, par sa présence chez son hôte, des désordres métaboliques, des lésions organiques ou des réactions allergiques plus ou moins graves.

Le parasite est dit "**obligatoire**" si sa survie et sa multiplication ne peuvent avoir lieu en dehors d'un hôte. Il est dit **occasionnel** (ou **facultatif**) s'il peut survivre et se multiplier aussi bien dans le milieu extérieur que chez un hôte.

L'**hôte** est l'organisme qui héberge le parasite. Dans cette relation, deux facteurs interviendront, l'adaptation du parasite à son hôte et la réceptivité de celui-ci. La cellule cible pour les parasites à développement intracellulaire est dite "cellule hôte".

Le **vecteur** est l'organisme (souvent invertébré) qui transmet le parasite d'un hôte à un autre, soit par simple transport, soit en l'hébergeant pendant une partie de son cycle évolutif (hôte intermédiaire).

Le **cycle évolutif** décrit les différentes étapes de la vie du parasite au cours de ses pérégrinations dans les différents hôtes dont dépend sa survie.

Si tout le cycle évolutif se passe dans un seul hôte, le parasite est dit "**monoxène**". Si le cycle évolutif

est partagé entre plusieurs hôtes (pour les protozoaires, pas plus de deux), le parasite est "**hétéroxène**".

L'organisme (hôte) qui héberge un parasite à potentialité pathogène tout en restant bien portant (ou peu s'en faut) en constitue le **réservoir**. Il fera donc office de "base" à partir de laquelle le parasite diffusera vers d'autres hôtes, parfois plus sensibles, chez qui il pourra causer l'apparition d'une pathologie.

Une **zoonose** est une infection naturellement transmise entre animaux vertébrés et homme (trypanosomiase américaine, toxoplasmose.) Elle implique la notion d'hôte réservoir.

2. Portes d'entrée du parasite

A partir d'un stock existant quelque part dans la nature, les parasites peuvent pénétrer chez un nouvel hôte par plusieurs voies.

Ingestion: le parasite se trouvant dans le milieu extérieur ou chez un autre hôte, est avalé par l'hôte. Un stade kystique de résistance en milieu extérieur et pour le passage dans le milieu acide de l'estomac est, en ce cas, souvent prévu dans le cycle (amibes, flagellates, coccidies).

Injection: le parasite se trouvant chez un hôte invertébré (vecteur) est injecté lors de la piqûre de celui-ci. Le stade infectant est le stade ayant atteint la maturité chez l'hôte invertébré: sporozoïtes de plasmodium, trypanosomes métacycliques... La présence du parasite chez le vecteur suppose la prise préalable d'un repas de sang sur un vertébré porteur de l'infection.

Contact sexuel: c'est le stade trophique (trophozoïte) qui passe, sans structure particulière prévue (*Trichomonas vaginalis*).

Voie transovarienne chez l'insecte vecteur: développement dans tous les organes de la tique y compris les ovaires et passage de l'infection à la descendance (*Babesia sp.*).

Parfois, le parasite pénètre activement à travers la peau ou les muqueuses. Le phénomène est rare chez

1. Définitions
2. Portes d'entrée du parasite
3. Localisation du parasite
4. Choix de l'hôte
5. Réceptivité de l'hôte
6. Relations entre l'hôte et le parasite
7. Le sort des parasites dans des hôtes inhabituels

les protozoaires (*T. cruzi*), plus fréquent chez les helminthes.

3. Localisation du parasite

Le parasite pourra rester extracellulaire, présentant alors une certaine mobilité: parasites intestinaux dans le tube digestif (*G. intestinalis* fixé à la muqueuse, *E. histolytica* pouvant essayer dans d'autres organes), parasites des muqueuses génitales, en communication avec le système urinaire (*T. vaginalis*), parasites du sang ("sanguicoles") avec sortie et envahissement des espaces extra-vasculaires (*T. gambiense*, *T. rhodesiense*).

Les parasites à développement intracellulaire ont imaginé une série de mécanismes pour entrer dans la cellule choisie.

Injection: une catapulte projette le parasite dans une cellule (microsporidies).

Phagocytose: elle se fait par intervention de cellules spécialisées (macrophages). Le parasite est capté dans un phagosome puis, théoriquement, digéré par les enzymes lysosomiaux. Divers mécanismes de protection contre la destruction par les macrophages ont été mis au point par les protozoaires: échappement de la vacuole avant fusion avec les lysosomes (*T. cruzi*), persistance dans le phagosome mais résistance aux enzymes lysosomiaux (*Leishmania*), formation d'une vraie vacuole parasitophore qui ne fusionne pas avec les lysosomes (*Toxoplasma*).

Remarque

Les parasites intracellulaires dépendent le plus souvent pour leur passage d'un individu à l'autre, de l'intervention d'un insecte hématophage.

Endocytose induite: les stades invasifs du parasite, munis d'un appareil de pénétration, provoquent une invagination de la membrane externe de la cellule hôte (*Plasmodium*, *Toxoplasma*); les trypomastigotes de *T. cruzi* pourraient faire de même.

4. Choix de l'hôte

La spécificité d'un parasite pour un hôte est importante à connaître pour ses implications épidémiologiques évidentes. Chaque parasite (genre, espèce) doit être défini comme zoonose ou non. Cet état dépend d'une série de facteurs génétiques. Deux exemples extrêmes se trouvent dans la liste des protozoaires d'importance médicale:

- les plasmodiums de l'homme n'infectent que l'homme (sont spécifiques de l'homme). Le réservoir de parasites se trouve donc limité aux personnes infectées.
- les stades non coccidiens du toxoplasme peuvent se développer chez n'importe quel animal aussi bien que chez l'homme. Les parasites sont présents dans différents organes et les modes de transmission sont très variés.

5. Réceptivité de l'hôte

La constitution génétique des hôtes vertébrés et invertébrés joue un rôle primordial dans la possibilité qu'a un parasite de se développer chez eux. Les exemples foisonnent et sont très diversifiés (reconnaissance cellulaire impossible, métabolites essentiels manquants, présence de facteurs toxiques dans le plasma, etc.).

6. Relations entre l'hôte et le parasite

Elles doivent être envisagées à deux niveaux, multiplication dans les espaces intercellulaires et pénétration dans les cellules. On peut citer les facteurs suivants, nécessaires pour un cycle évolutif réussi:

- la capacité d'adaptation métabolique à des environnements différents, indispensable au passage de l'hôte vertébré à l'invertébré;
- l'utilisation optimale des ressources énergétiques de l'hôte (métabolisme), indispensable pour une multiplication suffisante dans les localisations choisies par le parasite;
- l'évitement des défenses de l'hôte, par variation antigénique, défense contre la destruction dans les macrophages, etc... Somme toute, l'installation d'un parasite chez un hôte est l'équivalent d'une greffe d'organe réussie!
- le choix de la cellule mettant en jeu les mécanismes biochimiques de reconnaissance cellulaire (protéines membranaires de reconnaissance, lectines). La pénétration dans la cellule choisie suppose aussi un outillage enzymatique adéquat.

On peut, schématiquement, admettre que les relations entre un hôte et son parasite dépendront de trois facteurs parasitaires et de deux facteurs appartenant à l'hôte.

La **virulence** et la **pathogénicité** d'un parasite sont difficiles à définir de manière précise. Ces deux

termes ne sont pas synonymes. La virulence dépend des exigences nutritionnelles, de l'équipement enzymatique, de la vitesse de multiplication. La pathogénicité exprime une agressivité plus spécifique, la destruction de cellules, la mobilisation exagérée de lignées de cellules immunitaires, la localisation particulière touchant des cellules ou des organes vitaux, etc... Il faut noter qu'une virulence élevée n'est pas le signe d'une adaptation parasitaire réussie. Un parasite virulent qui détruit son hôte rapidement ne pourra pas s'y maintenir au cours du temps. Il doit exister, dans ce cas, un réservoir où le parasite se comporte plus calmement (*Trypanosoma rhodesiense*, très pathogène pour l'homme, est retrouvé chez plusieurs animaux tant domestiques que sauvages).

Le **degré d'adaptation** du parasite à son hôte a été acquis au cours de l'évolution.

Chez l'hôte vertébré, on distinguera

- des hôtes **principaux**, réguliers, préférentiels (homme pour *Entamoeba histolytica*),
- des hôtes **facultatifs**, secondaires (homme pour *Trypanosoma rhodesiense*),
- des hôtes **accidentels**, occasionnels (homme pour *Naegleria sp.*, *Balantidium coli*),
- des hôtes **inadaptés** dont le cycle incomplet aboutit à une impasse (cobaye pour *Plasmodium berghei*),
- des hôtes chez qui les parasites sont captifs parce qu'ils ne pourront pas continuer leur évolution, s'étant engagés dans un cul-de-sac (homme pour *Toxoplasma gondii*).

Chez l'hôte invertébré, il y aura

- des hôtes **intermédiaires vrais** (glossine pour *T. brucei*, anophèles pour *Plasmodium*) qui prennent en charge une phase de reproduction du parasite;
- des hôtes **intermédiaires facultatifs** (glossine pour *T. vivax*) dont le parasite peut éventuellement se passer en s'adressant à d'autres mouches hématophages chez qui il ne se multiplie pas mais qui le transmettront;
- des **transporteurs mécaniques principaux** (stomoxe pour *T. evansi*) chez lesquels la trompe souillée de sang infecté transmet l'infection avec efficacité;
- des **transporteurs mécaniques occasionnels** (moustiques pour tous les trypanosomes) où la survie du parasite est aléatoire et de courte durée.

La **spécificité d'hôte** peut être étroite (parasite adapté à un seul hôte) ou large (zoonoses, hôtes réservoirs, parasite adapté à plusieurs espèces animales y compris, éventuellement, l'homme).

L'**état général de l'hôte** (terrain) dépend de facteurs génétiques, de l'état nutritionnel, du stress, de la présence d'autres maladies ou conditions anergisantes et immunosuppressives (SIDA, splénectomie)... L'état de certains organes est aussi important. L'intestin peut être fragilisé par une irritation de la muqueuse, les déséquilibres alimentaires ou agressé par des microorganismes pathogènes concomitants. Il est alors plus vulnérable à l'invasion amibienne. L'absence de rate (sujets splénectomisés) peut favoriser l'infection par *Babesia* et aggraver l'infection plasmodiale.

Enfin, l'**immunité spécifique**, acquise au contact des antigènes parasitaires par la mise en branle des mécanismes de défense de l'organisme de l'hôte (immunité tissulaire et sérique), est très importante. Elle aboutit à un freinage de la virulence du parasite qui peut parvenir jusqu'à un équilibre des forces en présence. On en arrive donc à un parasitisme asymptomatique et les relations en resteront au stade de "paix armée", synonyme de "guerre froide". A la moindre défaillance des systèmes de défense de l'individu, le parasite va en profiter et un processus pathologique s'ensuivra (*Plasmodium sp.*).

7. Le sort des parasites dans des hôtes inhabituels

Lorsqu'un parasite entre par hasard dans un hôte auquel il n'est pas adapté, il peut subir plusieurs types d'évolution:

- il peut être détruit immédiatement, c'est le cas de loin le plus fréquent.
- il peut traverser l'hôte sans subir de changement, ni lyse, ni multiplication, se comportant comme un objet inerte. C'est souvent le cas de parasites ingérés qui traversent le tube digestif en se laissant emporter passivement par le péristaltisme intestinal, sans être capables de s'arrêter en chemin, de traverser les muqueuses ou même d'établir une colonie à un quelconque endroit du tube digestif. On les retrouvera dans les matières fécales (pseudo-parasitisme des oocystes de coccidies de poissons chez l'homme, des kystes de parasites d'insectes chez les animaux insectivores).

- il peut survivre un certain temps dans l'un ou l'autre organe sans se multiplier. C'est l'impasse parasitaire (parasites occultes chez les protozoaires révélés au laboratoire par passage aveugle à un hôte sensible).
- il peut survivre et se multiplier sous une forme immature, sans avoir la possibilité de compléter son cycle de développement jusqu'à maturité. Les toxoplasmes chez l'homme et chez de nombreux animaux se multiplient sous forme de trophozoïtes, ne produisant des oocystes que chez les Felidés.
- il peut se multiplier et atteindre la maturité en causant ou non l'apparition d'une maladie. Les infections expérimentales d'animaux de laboratoire avec des parasites qui ne les atteindraient jamais dans les conditions naturelles, en sont un exemple (*T. gambiense* chez le rat albinos). L'accomplissement des cycles évolutifs n'est possible que chez des hôtes habituels, sélectionnés par les parasites au cours de millénaires par d'innombrables essais et une adaptation progressive.

BIBLIOGRAPHIE

Symposia of the British Society for Parasitology (1975) *Pathologic Processes in Parasitic Infections*, TAYLOR A, MULLER R. (Eds), Oxford, London, Blackwell Scientific Publications, **13**.

Symposium of the Janssen Research Foundation (1976) *Biochemistry of parasites and Host-Parasite relationships*, VAN DEN BOSSCHE H. (Ed.), Amsterdam-New York-Oxford, North Holland Publishing Company, pp. 263-458.

Symposia of the British Society for Parasitology (1976) *Genetic Aspects of Host-Parasite Relationship*. A TAYLOR, R MULLER (Eds), Oxford, London, Blackwell Scientific Publications, **14**.

Symposia of the British Society for Parasitology (1977) *Parasitic Invasion*, AER TAYLOR and R MULLER (Eds), Oxford, London, Blackwell Scientific Publications, **15**.

Colloque de l'Institut de Médecine tropicale "Prince Léopold" (1983) *From Parasitic infection to Parasitic Disease, Contributions to Microbiology and Immunology*, PL GIGASE and EAE VAN MARCK (Eds), Basel-New York, S. Karger, **7**.

TRAGER W. (1986) *Living Together, The Biology of Animal Parasitism*, New York, London, Plenum Press.

COX FEG. (1993) *Modern Parasitology*, Oxford, Blackwell Scientific Publications.

Classification – Méthodes taxinomiques – Conservation des Protozoaires

3

1. Critères de classification des protozoaires

1.1 Caractères morphologiques

Au microscope optique, les dimensions et la forme de la cellule, la présence de flagelles, de cils, de pseudopodes, la présence et la position dans le cytoplasme de structures particulières comme les kinétoplastes, les axostyles, les vacuoles pulsatiles et nutritives, la disposition des granules chromatiniques du noyau, sont parmi les caractères le plus souvent retenus.

Au microscope électronique, on se concentre sur la membrane plasmique (couches externes de protection), les structures cytosquelettiques (microtubules, axostyle, tube polaire), l'appareil de pénétration (rhoptries, anneau polaire, micronèmes), les organites cytoplasmiques (mitochondrie, appareil de Golgi, etc...).

Malgré la perspicacité des observateurs, certains parasites sont impossibles à distinguer l'un de l'autre par la recherche des critères morphologiques et physiologiques, alors qu'ils peuvent différer par l'extériorisation clinique, la distribution géographique, le type d'hôte (genre, espèce) auquel ils sont adaptés. Depuis quelques années, les méthodes taxinomiques sont enrichies de l'apport de la biochimie, de l'immunologie et de la génétique moléculaire.

1.2 Caractères biochimiques

L'étude biochimique du cytoplasme permet de comparer entre eux, par migration électrophorétique, les enzymes métaboliques d'organismes voisins (par exemple malate déshydrogénase, glucose-phosphate isomérase, glucose 6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase, dans le cas de *Leishmania*).

La méthode isoenzymatique, largement utilisée, révèle un polymorphisme protéique qui constitue un

reflet fidèle de la variabilité génétique de l'organisme étudié et aboutit naturellement au concept de zymodème (population de parasites appartenant à un type iso-enzymatique donné).

L'immunologie, avec notamment la reconnaissance des antigènes (protéines constitutives), permet de faire l'inventaire des protéines d'une population homogène (clone) d'organismes et de comparer entre elles plusieurs populations morphologiquement indistinguishables (sérodièmes).

1.3 Caractères génomiques

L'information présidant à la détermination de tous les caractères qui précèdent est présente dans les molécules d'ADN du noyau sous forme de séquences de bases puriques et pyrimidiques, prises trois par trois (les triplets). L'analyse de ces séquences donne au taxinomiste l'outil idéal pour le calcul des distances génétiques qui séparent les organismes et d'en déduire une phylogénie.

Les méthodes de biologie moléculaire permettent de comparer les brins d'ADN d'organismes voisins en utilisant les enzymes de restriction, la dénaturation par la chaleur, l'hybridation in situ d'ARN avec un ARN connu, etc...

1.4 Caractères physiologiques et comportementaux

Enfin, la physiologie du parasite et les modalités de son cycle évolutif sont prises en compte: mode de multiplication (bipartition, schizogonie, endodyogenie, conjugaison), présence d'un cycle sexué (sporogonie), existence d'un stade kystique, position intra ou extracellulaire et type de cellule hôte, modifications morphologiques de la cellule hôte, pathogénicité, virulence chez les hôtes...

1. Critères de classification des protozoaires
 - 1.1 Caractères morphologiques
 - 1.2 Caractères biochimiques
 - 1.3 Caractères génomiques
 - 1.4 Caractères physiologiques et comportementaux
2. Panmixies
3. Méthodes de taxinomie
4. Entretien de Protozoaires au laboratoire
 - 4.1 Définitions
 - 4.2 Les animaux de laboratoire
 - 4.3 La culture
 - 4.4 La cryoconservation
 - 4.5 Collections de souches
5. Classification des Protozoaires

Groupe I	Protozoaires flagellés
Groupe II	Protozoaires amiboïdes (Subphylum: Sarcodina)
Groupe III	Sporozoaires (Phylum: Apicomplexa)
Groupe IV	Microsporidies
Groupe V	Haplosporidies
Groupe VI	Myxosporidies
Groupe VII	Protozoaires ciliés

Bibliographie

2. Panmixie et clonalité

La question posée à l'issue de l'analyse fine de populations de protozoaires parasites est la suivante: les populations analysées sont-elles des variants individuels fugaces ou des lignées parasitaires stables, indépendantes les unes des autres? Les génotypes mis en évidence par l'analyse isoenzymatique évoluent-ils indépendamment les uns des autres ou bien échangent-ils librement des gènes avec les autres génotypes?

L'analyse de génétique des populations, prônée par M. Tibayrenc, permet de vérifier que la distribution des génotypes est conforme à l'hypothèse de libre circulation des gènes (hypothèse panmictique). Si la distribution de ces génotypes est incompatible avec cette hypothèse, on en conclut que le flux génique a été entravé d'une quelconque manière (hypothèse clonale). C'est la constatation de "déséquilibres de liaison" qui indique l'absence de recombinaison entre les génotypes situés à des loci différents. Dans ce cas, la révélation d'un seul type isoenzymatique permet de prévoir quel génotype on observera pour tous les autres loci chez une souche donnée de parasites (puisque'il n'y a pas eu de mélanges).

Si l'organisme étudié est sexué, les génotypes individualisés par l'analyse isoenzymatique ne sont que des variants éphémères, ne perdurant que le temps d'une génération. Après quoi, ils se diluent dans le pool génique commun du fait du brassage génique dû à la reproduction sexuée. Il est donc vain de vouloir les "typer" du fait de leur fugacité. Par contre, si l'organisme est fondamentalement clonal, les génotypes sont capables de diffuser sans changement sur de longues périodes de temps et dans de vastes aires géographiques, comme des "photocopies génétiques". Il est donc licite de les "typer" du fait de leur pérennité dans l'espace et le temps, dans le but de suivre la diffusion des épidémies ("epidemiological tracking"). Les clones naturels parasitaires vont diverger toujours davantage les uns des autres du fait de l'accumulation de mutations qui ne sont pas brassées régulièrement par la sexualité. On peut donc prévoir que les clones présentant de grandes divergences évolutives les uns par rapport aux autres auront accumulé davantage de mutations différentes. Ceci devrait logiquement influencer sur leurs propriétés biologiques, en particulier celles qui intéressent le médecin (virulence, résistance aux médicaments).

Le modèle clonal éclaire le concept d'espèce chez les microorganismes. En effet, chez la plupart des organismes supérieurs, la définition de l'espèce est liée

à la reproduction sexuée (interfécondité intraspécifique). C'est la "notion biologique" de l'espèce. Or, chez la plupart des protozoaires parasites, la reproduction uniparentale est importante sinon prépondérante. Le concept biologique est dès lors inutilisable et la définition de l'espèce doit être réinventée car l'identification (nomenclature) est indispensable à toute recherche en zoologie.

On a alors décidé de baser la notion d'espèce sur la morphologie et la pathogénicité. Cette définition de l'espèce n'a pas de base rigoureuse, elle est une simple affaire de commodité, de consensus. On crée une espèce quand on estime que c'est souhaitable pour le travail des médecins, des pharmacologues, etc...Cependant, les progrès dans la finesse des analyses provoquent la description incessante de nouvelles entités taxinomiques, ce qui apporte la confusion dans les études faites (par exemple les leishmanioses). Où est la limite entre clones dissemblables et espèce? Quand doit-on créer une nouvelle espèce?

Comme l'a proposé M. Tibayrenc, il est souhaitable d'utiliser conjointement les deux critères (phénotypique et phylogénique) pour décrire de nouvelles espèces de microorganismes dans les cas où le concept biologique de l'espèce ne s'applique pas.

3. Méthodes de taxinomie

En zoologie, deux méthodes ont été proposées pour arriver à des regroupements d'organismes. La méthode phénétique est basée sur les degrés de ressemblance: elle compare entre eux les organismes à l'aide de caractères dont l'importance est éventuellement pondérée. Les paires les plus semblables sont placées dans un ensemble (Unité Taxinomique Opérationnelle) qui est ensuite comparé à d'autres ensembles et ainsi de proche en proche. Le traitement des données et leur comparaison nécessite l'emploi d'un ordinateur: ce sont des méthodes de "taxinomie numérique".

La méthode cladistique (ou phylogénétique) veut arriver à décrire les embranchements successifs qui se sont séparés du tronc commun en cours d'évolution. Le taxon monophylétique est entièrement défini par l'espèce ancestrale qui l'a engendré: toutes les espèces qui y figurent dérivent d'une espèce ancestrale unique et, réciproquement, toutes les espèces issues de cette espèce ancestrale appartiennent au même taxon.

4. Entretien de Protozoaires au laboratoire

Les protozoaires parasites peuvent être entretenus au laboratoire soit sur animaux, soit en culture *in vitro*, avec ou sans cellules suivant le cas. Ils peuvent également être conservés par cryopréservation.

4.1 Définitions

Les populations parasitaires manipulées au laboratoire sont décrites ci-dessous.

L'isolat est la population extraite de l'infection naturelle à une occasion; elle est hétérogène, pouvant provenir d'infections mixtes.

La lignée est issue de l'isolat, par entretien selon une technique choisie au laboratoire: passages sur animaux (mécaniques ou cycliques), culture.

Le clone est issu de l'isolat ou de lignées; il a pour origine un seul organisme, ce qui exclut toute hétérogénéité; c'est le matériel de choix pour mener les observations.

La souche définit l'ensemble isolat, lignées et clones subséquents, entretenus au laboratoire, isolés à une occasion unique de la population sauvage (Le Ray 1975).

Le stabilat est une population quelconque conservée dans l'azote liquide.

4.2 Les animaux de laboratoire

Les plus utilisés sont la souris blanche, le rat albinos, certains rongeurs sauvages (*Cricetomys gambianus*, *Mastomys sp.*, *Thamnomys surdaster* etc...), le hamster doré (*Mesocricetus auratus*), le cobaye, le lapin, les singes. Cette liste est loin d'être limitative.

Les voies d'inoculations les plus utilisées sont, par ordre de fréquence, les voies intrapéritonéale, intraveineuse, sous-cutanée, digestive et l'instillation nasale ou oculaire (*T. cruzi*). Les contrôles de l'évolution de l'infection doivent être périodiques (examens de sang, d'exsudat péritonéal, de liquides de ponction d'organes, de biopsies, etc...). Il faut noter que, dans le cas des parasites hétéroxènes, la conservation des caractères implique la transmission cyclique, c'est-à-dire le recours aux deux hôtes alternativement (rongeur et anophèle pour *Plasmodium berghei*)

4.3 La culture

La plupart des protozoaires peuvent être cultivés dans des milieux chimiquement semi-définis, c'est-à-dire contenant, outre les molécules organiques et inorganiques chimiquement définies, des produits biologiques complexes (sérum, bile...). Les parasites intracellulaires nécessitent généralement la présence de cellules pour se reproduire (*Plasmodium*). Le stade obtenu en culture acellulaire peut être différent de celui trouvé chez l'hôte vertébré (*Leishmania*).

4.4 La cryoconservation

C'est la méthode qui respecte le plus les caractères originaux des organismes. La congélation de protozoaires vivants est possible moyennant l'addition d'agents cryoprotecteurs dont les plus utilisés sont le glycérol et le diméthylsulfoxyde (voir Chapitre 19). Les températures de conservation sont: -79 °C (neige carbonique) ou -190°C (azote liquide). La durée de conservation à ces températures est indéfinie.

4.5 Collections de souches

Les organismes sont conservés à l'"American Type Culture Collection" où ils peuvent être obtenus sur demande, sous forme congelée ou en culture suivant le cas (ATCC, 12301, Park lawn Drive, Rockville, MD 20852, U.S.A; FAX 301-231-5826; TELEX 908768).

5. Classification des Protozoaires

Une bonne classification doit remplir trois critères: refléter les relations phylogénétiques; être compatible avec la littérature sur le sujet; être pratique pour les utilisateurs.

Elle doit refléter la réflexion moderne sur la classification de tout le groupe, tout en retenant suffisamment d'éléments familiers pour permettre de se référer aux traités présents et passés et aux taxons utilisés dans les listes de mots clés de la littérature.

Nous avons une préférence pour la présentation des protozoaires parasites en sept groupes et dix phyla qui ne pose pas de problème majeur, sauf pour les amoebo-flagellates qui chevauchent deux groupes: les flagellates et les amibes. Cette division se base évidemment sur des critères morphologiques mais tient compte également des récents développements au niveau moléculaire, y compris la comparaison des petites unités d'ARN ribosomal.

Chaque espèce fait partie d'un genre. Celui-ci occupe une place déterminée au sein d'une famille, d'un ordre, d'une classe et d'un embranchement (phylum).

Les noms donnés aux classes et aux ordres ne sont pas toujours ceux qui sont recommandés par la Nomenclature Zoologique Internationale mais les dénominations les plus couramment rencontrées dans les traités de parasitologie ont été intentionnellement choisies. La dernière classification proposée par le Comité de Nomenclature est exposée par Levine *et al.* en 1980.

Le nom de la classe se termine par "EA", celui de l'ordre se termine par "IDA"; le nom de famille est caractérisé par le suffixe "IDAE". Pour ne pas alourdir la présentation des tableaux qui suivent, les classes ne sont mentionnées que lorsqu'elles sont utiles et les familles ne le sont pas.

Le nom du genre s'écrit toujours avec une lettre majuscule. Il est souvent désigné par l'initiale seule suivie du nom de l'espèce dont l'initiale s'écrit en minuscule. Genre et espèce étant des noms latins, ils sont écrits en italiques: *E. histolytica* (*Entamoeba histolytica*), *T. brucei* (*Trypanosoma brucei*).

GROUPE I

Protozoaires Flagellés
(Subphylum: Mastigophora)

Locomotion par flagelles; possède des systèmes de "caryomastigontes" (organelles associées aux flagelles et au noyau)

PHYLUM	Classe	Ordre	Genres	Caractères
METAMONADA				Mitochondrie [-]; Golgi [-]; x paires de flagelles.
		Retortamonadida		1 ou 2 paires de flagelles; 1 caryomastigonte; Tous parasites.
			<i>Chilomastix</i>	
		Diplomonadida		4 paires de flagelles; 2 caryomastigontes; La plupart parasites.
			<i>Giardia, Enteromonas</i>	
PARABASALIA				Mitochondrie [-]; Golgi [+]; Cinétosomes; Deux paires de flagelles.
		Trichomonadida		1 flagelle récurrent; 3 flagelles antérieurs; La plupart parasites.
			<i>Trichomonas</i>	
KINETOPLASTA				Mitochondrie [+]; Golgi [+]; 2 flagelles (ou un seul).
		Trypanosomatida		1 flagelle; Tous parasites.
			<i>Trypanosoma, Leishmania</i>	
INCERTAE SEDIS ^A				
	<u>HETEROLOBOSEA</u>			<u>Un flagelle;</u> <u>Petites amibes avec monopode;</u> <u>Mitochondrie [+];</u> <u>Golgi [-].</u>
		Schizopyrenida		Stade flagellé.
			<i>Naegleria</i>	
		Mastigamoebida	<i>Dientamoeba</i>	

A. INCERTAE SEDIS: Protozoaires de position taxinomique incertaine

PHYLUM	Ordre	Genres	Caractères
RHIZOPODA			PSEUDOPODES
	Euamoebida		Pseudopodes lobuleux.
		<i>Entamoeba</i>	
	Acanthopodida		Pseudopodes filiformes.
		<i>Acanthamoeba</i>	

Groupe II

Protozoaires Amiboïdes
(Subphylum: Sarcodina)

Capables d'émettre des pseudopodes;
parfois libres; les formes parasites sont
toujours extracellulaires

PHYLUM	Classe	Ordre	Genres	Caractères
SPOROZOA OU APICOMPLEXA				Mitochondrie et Golgi [+]; Compexe apical; Reproductions sexuée (sporogonie) et asexuée (schizogonie).
	<u>Coccidea</u>			<u>Trophozoïte et stade sexué petits et in- tracellulaires</u>
		Eimeriida		Mérogonie présente, dimorphe; mérozoïtes peu nombreux. Microgamètes nombreux à flagelle triple; oocyste de taille fixée dès le début; sporocyste présent; sporozoïtes nombreux.
			<i>Eimeria, Isospora, Cryptosporidium, Sarcocystis, Toxoplasma</i>	
	<u>Haemosporidea</u>			<u>Mérogonie et gamétocytes chez le verté- bré (érythrocytes);</u> <u>Pigment;</u> <u>Sporozoïtes nombreux chez l'insecte hématophage.</u>
		Haemosporida		Mérogonie monomorphe; pigment présent. Oocyste de taille croissante; sporocyste absent; sporozoïtes nombreux chez l'hôte invertébré.
			<i>Plasmodium</i>	
	<u>Piroplasmidea</u>			<u>Mérogonie chez le vertébré (érythrocytes ou lymphocytes);</u> <u>Pigment absent;</u> <u>Développement des gamétocytes et des sporozoïtes chez l'invertébré.</u>
		Piroplasmida		Mérogonie monomorphe, mérozoïtes peu nombreux; Divisions asexuées au cours de la sporogonie.
			<i>Babesia, Theileria</i>	

Groupe III

Sporozoaires
(Phylum: Apicomplexa)

Pas de mode de locomotion évident

Groupe IV

Microsporidies

Pas de complexe apical; spores unicellulaires de structure complexe (sporoplasme, polaroplasme, filament en spirale)

PHYLUM	Ordre	Genre	Caractères
Microspora			MITOCHONDRIE [-]; GOLGI [+]; MÉROGONIE ET SPOROGONIE; SPORE RÉSISTANTE AVEC FILAMENT POLAIRE.
	Microsporida		Spore allongée (ovale à tubulaire); Filament polaire long, enroulé en spirale.
		<i>Pleistophora</i>	
		<i>Encephalitozoon</i>	
		<i>Enterocytozoon</i>	
		<i>Nosema</i>	

Groupe V

Haplosporidies

Trophozoïte allongé, libre dans les organes de son hôte ou enkysté; spores arrondies ou ovoïdes, uninucléées, pourvues d'une membrane d'enveloppe et dépourvues de capsules polaires.

Groupe VI

Myxosporidies

Voisins des microsporidies mais spores pluricellulaires, à paroi formée de valves et contenant un ou deux sporoplasmes et 1 à 4 capsules polaires.

Groupe VII

Protozoaires Ciliés

Déplacement et capture des aliments par le jeu des cils; présence d'un cytostome bien visible; deux noyaux: macro- et micronucléus; libres ou parasites; les formes parasitaires sont toujours extracellulaires.

PHYLUM	Ordre	Genre	Caractères
CILIOPHORA			CILS; DEUX NOYAUX DISSEMBLABLES.
LITOSTOMATA			
	Vestibuliferida		
		<i>Balantidium</i>	

BIBLIOGRAPHIE

- DIAMOND L. (1964) Freeze- preservation of protozoa, *Cryobiology*, **1**, 95.
- LUMSDEN WHR. (1972) Principles of viable preservation of parasitic protozoa, *International Journal for Parasitology*, **2**, 327-332.
- CARTER R, VOLLER A. (1973) Enzyme typing of malaria parasites, *British Medical Journal*, **1**, 149-150.
- BOUCKAERT A, WÉRY M. (1974) Genus Plasmodium: Studies in Numerical Taxonomy, *Annales de la Société belge de Médecine tropicale*, **54**, 103-119.
- LE RAY D. (1975) Structures antigéniques de *Trypanosoma brucei* (Protozoa, Kinetoplastida). Analyse immunoélectrophorétique et étude comparative, *Annales de la Société belge de Médecine tropicale*, **55**, 132-311.
- WILLAERT E. (1976) Etude Immunotaxonomique des Genres *Naegleria* et *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebozoa), *Acta Zoologica et Pathologica Antwerpiensia*, n°65.
- WILLIAMS PM, DE VASCONCELLOS COELHO M. (1978) Taxonomy and transmission of Leishmania, In : WHR Lumsden, R Muller, JR Baker (Eds), *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **16**, 1-42.
- TAYLOR A, BAKER JR. (1978) *The cultivation of parasites in vitro*. Blackwell Scientific Publications.
- GIBSON WC, DE C. MARSHALL TF, GODFREY DC. (1980) Numerical Analysis of Enzymes Polymorphism. A new approach to the epidemiology and taxonomy of the subgenus Trypanozoon. In : WHR Lumsden, R Muller, JR Baker (Eds), *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **18**:175-246.
- LEVINE N *et al.* (1980) A newly revised classification of the Protozoa, *Journal of Protozoology*, **27**, 37-58
- GÉNERMONT J. (1980) Trois conceptions modernes de taxinomie: taxinomie cladistique, taxinomie évolutive, taxinomie phénétique, *Annales de Biologie*, **19**, 19-40.
- COX FEG. (1991) Systematics of Parasitic Protozoa, In : KREIER JP, BAKER JR. (Eds) *Parasitic Protozoa*, San Diego, Academic Press, **1**, 55-80.
- TIBAYRENC M. (1993) *Entamoeba*, *Giardia* and *Toxoplasma*: Clones or Cryptic Species? *Parasitology Today*, **9**, 102-105.

Entamœba histolytica (Euamœbida) L'amibiase

4

1. Historique

1.1 Le syndrome dysentérique

La diarrhée a toujours été reconnue comme symptôme ("flux de ventre") mais la dysenterie des pays chauds est distinguée comme une entité particulière dès 1587 par les médecins et voyageurs rentrant du Brésil où son traitement par les racines d'Ipécawana (arbrisseau de la famille des Rubiacées) était pratiqué. La contagiosité de la dysenterie est mentionnée par Sennert en 1626 et le syndrome est décrit avec précision par Pisonis dans son traité "Historia Rerum Naturalium" paru en 1648 qui constitue une des premières bases de la médecine tropicale. L'auteur y rapporte les observations d'un médecin colonial hollandais, Jacob de Bondt, qui prescrit pour les diarrhées sanguinolentes "deux drachmes de racines d'Ipecacuanha en décoction dans du vin...". Quant à l'hépatite suppurée, reconnue depuis l'antiquité, il faut attendre les médecins coloniaux en poste aux Antilles et au Sénégal pour voir s'établir la relation entre la lésion hépatique et la dysenterie.

1.2 Les parasites

C'est à Saint Petersburg en 1875 que Lösch découvre pour la première fois des trophozoïtes mobiles qu'il nomme *Amœba coli* dans les selles d'un agriculteur atteint de dysenterie chronique. A l'autopsie de sujets morts de dysenterie, Koch décèle en 1883, dans des ulcérations intestinales, des amibes que Councilman et Lafleur baptiseront, en 1891, *Entamœba dysenteriae*. Quinck et Ross, en 1893 et 1894 décrivent les kystes, formes de résistance en dehors de l'intestin et reconnaissent chez l'homme deux types d'amibes qui seront décrites en 1903 par Schaudinn sous le nom de *Entamœba histolytica* pour le type pathogène et *Entamœba coli* pour la forme inoffensive. Pendant ce temps, Kartulis en 1885 en Egypte décrit les amibes dans les tissus en dehors de l'intestin, particulièrement dans l'abcès du foie. La notion de porteurs sains, sujets "semeurs d'amibes" est reconnue par Martin en 1908 et c'est Sir Léonard Rogers qui codifie en 1912 l'action curative de l'émétine, extraite de l'Ipéca, avec la description du schéma posologique.

1. Historique
 2. Localisation anatomique
 3. Cycle évolutif
 4. Caractères morphologiques et physiologiques des stades
 5. Développement du pouvoir pathogène
 6. Lésions causées dans l'organisme de l'homme par *E. histolytica*
 7. Diagnostic de l'amibiase au laboratoire
 8. Culture *in vitro*
 9. Traitement
 10. Transmission
- Bibliographie

FIGURES

- 4-1 Evolutions possibles de l'infection amibienne
- 4-2 Cycle de *E. histolytica*
- 4-3 Trophozoïtes et kystes de *E. histolytica*
- 4-4 Analyse isoenzymatique de *E. histolytica*
- 4-5 Cristaux de Charcot-Leyden
- 4-6 Arrêtés à l'examen microscopique des selles

GENRES	ESPÈCES	
<i>Entamœba</i>	<i>histolytica</i> Schaudinn 1903	
	<i>dispar</i> Brumpt 1925	}
	<i>hartmanni</i>	}
	<i>polecki</i>	}
	<i>coli</i>	}
<i>Endolimax</i>	<i>nana</i>	}
<i>Iodamœba</i>	<i>butschli</i>	} sont décrites au chapitre 5

Tableau 4-1

Famille des Entamœbidae
(amibes du tube digestif)

2. Localisation anatomique

La forme végétative (trophozoïte) *histolytica*, hématophage et pathogène, se multiplie dans la paroi du colon et du rectum (muqueuse et sous-muqueuse).

A partir de cette localisation, le parasite peut essaimer par voie sanguine ou lymphatique dans la plupart des organes (foie, poumons, cerveau, rate, peau, organes génitaux, muscles, tissus cartilagineux ou osseux, reins, voies urinaires).

La forme végétative non pathogène, appelée forme *minuta* à cause de sa taille plus petite, ainsi que le kyste se trouvent dans la lumière du gros intestin où ils trouvent les conditions les plus favorables à leur survie et à leur multiplication: anaérobiose relative, température de 35 à 40 °C, pH légèrement acide (6,1 à 6,6), potentiel redox réglé par la flore bactérienne normale, présence de substances phagocytiques (débris alimentaires, bactéries) (figure 4-1).

3. Cycle évolutif

3.1 Cycle non pathogène

L'ingestion de kystes mûrs est suivie du dékystement dans le milieu gastro-intestinal. La paroi kystique est décapée par la trypsine pancréatique dans des con-

ditions favorables de température, pH et potentiel d'oxydo-réduction.

Les 4 noyaux du kyste subissent chacun une mitose (conduisant au stade fugace de "métakyste" à 8 noyaux) qui est immédiatement suivie par la division du cytoplasme, donnant naissance à 8 petites amibes végétatives qui deviendront des trophozoïtes *minuta* (15 à 20 µm de diamètre).

Dans la lumière du côlon, après une série de divisions (par bipartition) qui augmentent considérablement leur nombre, les formes *minuta* s'arrondissent et s'entourent d'une paroi épaisse: c'est l'enkystement.

Dans le côlon, l'enkystement se fait suivant un rythme mal défini; on retrouvera donc dans le bol fécal une majorité de trophozoïtes *minuta* ou de kystes suivant le moment de l'examen.

Les kystes, immobiles et capables de résister un certain temps en milieu extérieur seront éliminés dans les selles, emportés passivement par le transit intestinal. Les trophozoïtes y seront moins nombreux car leurs mouvements de reptation leur permettent de s'abriter au fond des villosités intestinales où ils se trouvent à l'abri du transit.

Remarque importante

Si la recherche de kystes chez un individu suspect reste négative, il est nécessaire de répéter les examens de selles avant de conclure à une absence totale d'amibes car l'élimination des kystes est périodique et subit des variations importantes dans le temps.

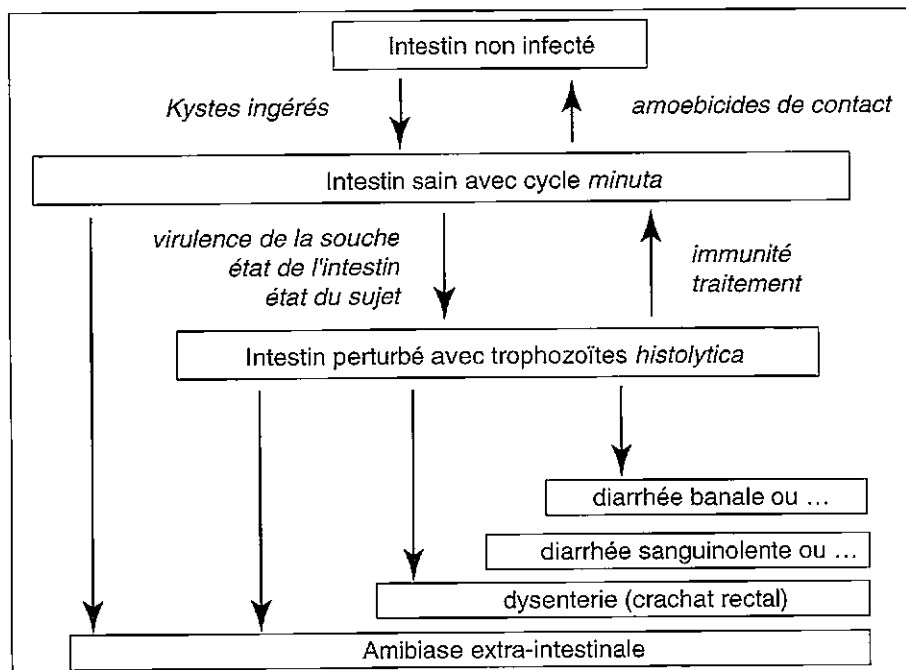
Tel est le cycle *minuta*, qui permet aux amibes de coloniser pour de longues périodes le gros intestin des individus bien portants. Ce cycle ne comporte aucun organisme pathogène.

3.2 Cycle pathogène

Si les conditions sont propices chez le porteur (facteurs hôte) et si la souche possède une potentialité pathogène (facteur parasite), on peut assister à la pénétration de quelques amibes dans la paroi intestinale où elles grandissent et deviennent hématophages (phagocytose d'hématies). Ces grandes amibes de 20 à 30 µm se divisent uniquement par bipartition, à un rythme accéléré. Elles possèdent un important pouvoir lytique sur les tissus et sont capables, en progressant de proche en proche, de provoquer des ulcères étendus dans la paroi de l'intestin et de là, d'essaimer dans d'autres organes. Le mécanisme et les circonstances de cette transformation du trophozoïte *minuta* non pathogène

Figure 4-1

Evolutions possibles de l'infection amibienne



en trophozoïte *histolytica* destructeur de tissus sont mal connus.

Sous l'influence d'un traitement médicamenteux spécifique ou des anticorps protecteurs synthétisés par l'organisme du malade, les amibes hématophages voient leur rythme de multiplication freiné; de nombreux trophozoïtes sont détruits et les amibes quittent les tissus pour se réfugier dans la lumière intestinale où l'attaque médicamenteuse ou immunologique est moins violente ou même inexistante. Ces trophozoïtes hématophages diminuent de taille et redeviennent *minuta* puis s'enkystent, réinstallant ainsi le cycle *minuta* dans la lumière du côlon (figure 4-2).

4. Caractères morphologiques et physiologiques des stades

4.1 Formes végétatives (trophozoïtes)

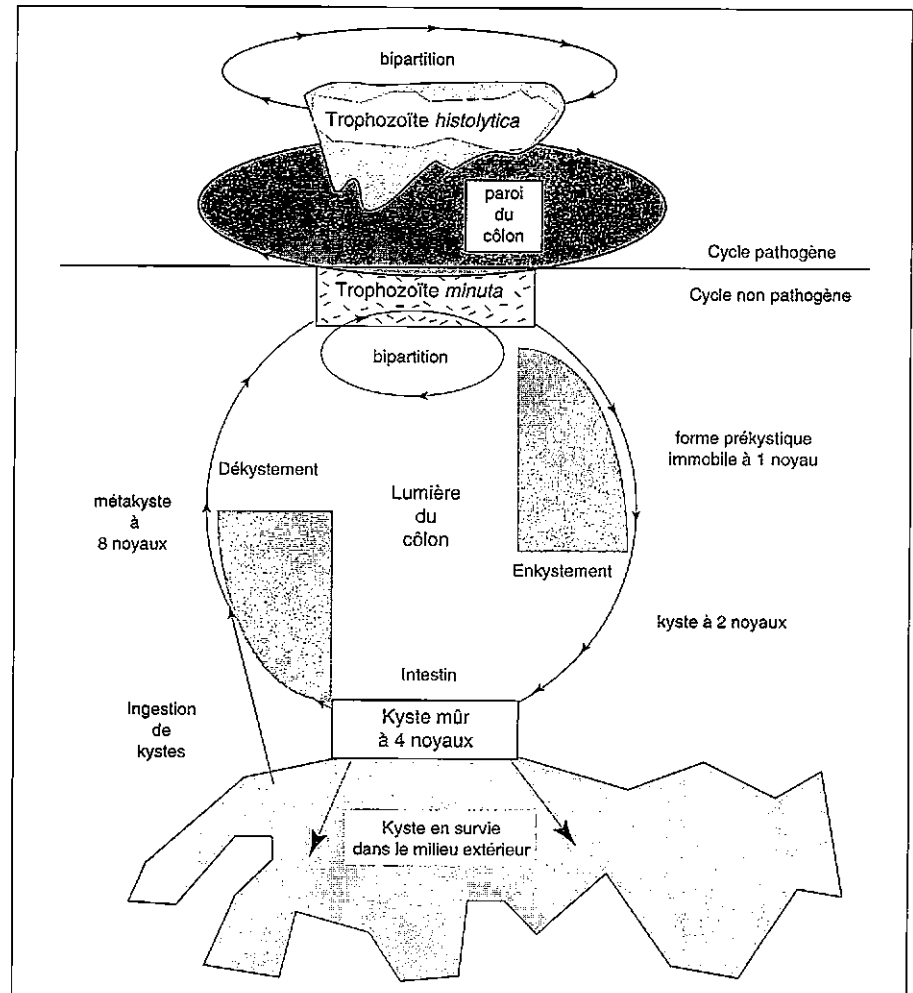
La forme *histolytica* mesure de 20 à 30 µm tandis que la forme *minuta* ne dépasse pas 10 à 20 µm.

A 37°C, les mouvements sont lents ou soudain rapides par émission de pseudopodes arrondis, larges, accompagnés de mouvements amples du cytoplasme. L'amibe se déplace dans le champ microscopique. A 20°C les déplacements deviennent minimes mais les pseudopodes sont toujours formés, souvent de manière explosive.

Cytoplasme

On y distingue deux zones: l'ectoplasme périphérique, d'aspect hyalin, transparent, qui intervient dans la formation des pseudopodes et est donc essentiellement déformable et l'endoplasme central, sphérique, d'aspect granuleux, qui contient les organites caractéristiques du cytoplasme. Il faut noter à ce sujet que le trophozoïte des amibes est très primitif et est dépourvu d'un bon nombre d'organelles présentes chez la plupart des métazoaires: microtubules cytoplasmiques, complexe membranaire de Golgi, mitochondries. Le réticulum endoplasmique est présent mais faiblement développé. Le cytoplasme contient essentiellement des vacuoles alimentaires en cours de digestion.

La forme *histolytica*, hématophage, contient souvent dans son endoplasme entre autres débris "ingérés" par l'amibe au cours de sa progression dans les tissus, des globules rouges.



Remarque importante.

La présence de globules rouges dans l'endoplasme est donc un élément diagnostique important pour la reconnaissance d'une dysenterie amibienne. Dans la lumière intestinale, les amibes ne phagocytent que des microbes. Ce sont alors des formes *minuta*, sans action pathogène.

Noyau

Il est habituellement central, au milieu de l'endoplasme granuleux et donc difficilement visible à frais.

Les colorants (surtout l'héματοxyline) mettent bien en évidence les structures nucléaires importantes pour le diagnostic d'espèce: chromatine nucléaire sous forme de grains arrondis disposés en couronne régulière sur la membrane et entourant un granule plus gros, le caryosome central. On sait actuellement que la chromatine périphérique est le lieu de synthèse et de stockage de l'acide ribonucléique (ARN) (figure 4-3).

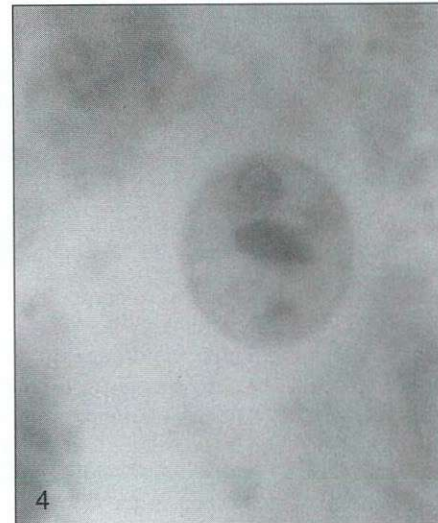
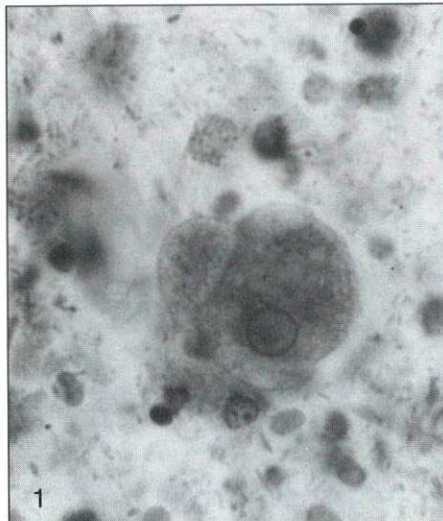
Figure 4-2

Cycle de *E. histolytica*

Figure 4-3

Trophozoïtes et kystes de *E. histolytica*

1. Trophozoïte avec pseudopode, inclusions endoplasmiques et noyau à structure typique
2. Pré-kyste avec mobilité diminuée, vacuoles cytoplasmiques, corps sidérophile et un noyau à structure typique
3. Kyste immature avec un noyau et corps sidérophile épais à extrémités arrondies
4. Kyste mûr où on devine trois noyaux à structure caractéristique de l'espèce, et corps sidérophile



Il faut se rappeler que cette morphologie nucléaire est, chez les amibes, un critère taxinomique important.

La taille du génome serait de 4×10^8 paires de bases

Multiplication

La reproduction par bipartition se fait à un rythme calme chez les formes *minuta*, à un rythme accéléré chez les formes *histolytica*. Ces dernières ont à leur disposition des matériaux plus énergétiques qui leur permettent une activité accrue.

Capacité d'agression

Les observations faites *in vitro* ont montré que des trophozoïtes *histolytica* (de culture axénique) mis au contact d'une culture de cellules épithéliales en couche monocellulaire sur un support pouvaient détruire ce "tissu" de cellules en une heure.

4.2 Kyste**Morphologie**

Après une série de divisions uniquement dans l'intestin et pas dans la lésion tissulaire, certains trophozoïtes *minuta* ralentissent leurs mouvements, s'arrondissent et leur paroi s'épaissit: c'est la forme prékystique. Le trophozoïte *histolytica*, lui, ne s'enkyste pas.

Le kyste mûr est sphérique, mesure 12 à 16 μm de diamètre et le noyau, unique dans la forme prékystique, va subir deux divisions successives non suivies de division du cytoplasme, ce qui produit un kyste mûr à 4 noyaux.

Le jeune kyste est arrondi, avec 1 ou 2 noyaux (stades intermédiaires). Dans le cytoplasme granuleux, on repèrera facilement un ou deux bâtonnets épais, arrondis aux extrémités, plus réfringents que l'ensemble du cytoplasme et donc visibles à frais, mal colorés par le lugol mais colorés en noir par l'hématoxyline: ce sont les corps chromatoides (ou sidérophiles) (figure 4-3).

Dans les selles d'amibiens chroniques (convalescents et porteurs sains) on peut donc trouver des kystes de *E. histolytica* qui contiennent de un à quatre noyaux.

Remarque importante

Il est nécessaire d'examiner les matières fécales le plus vite possible après leur émission pour voir les corps chromatoides. La présence de ces bâtonnets dans les kystes est un élément de diagnostic de *E. histolytica* (chez *E. coli*, ils sont beaucoup plus rares et plus fins).

Capacité de survie

La forme kystique assure la transmission du parasite d'un individu à l'autre en passant par le milieu extérieur. Le kyste peut en effet rester viable à l'extérieur de l'hôte pendant un temps variable suivant les conditions qui lui sont offertes (tableau 4-2)

Les kystes sont détruits rapidement (en quelques minutes) dans une solution aqueuse d'iode à 200 ppm, dans l'acide acétique dilué (vinaigre) de même que par

l'exposition à une température supérieure à 68°C. La congélation à -10°C les tue en 24 heures.

Parmi les antiseptiques, le crésyl est très actif tandis que le formol dilué et les hypochlorites (eau de Javel) le sont moins.

5. Développement du pouvoir pathogène

Il s'agit du passage de la forme *minuta* à la forme pathogène. Ces facteurs sont multiples et leur importance relative est encore sujette à discussion.

5.1 Faits d'observation

La prévalence du parasitisme

E. histolytica est présent dans les différentes parties du monde: la recherche des kystes à 4 noyaux dans les selles des individus montre que le parasite est cosmopolite (voir paragraphe 10.2).

Amibiase intestinale

On sait que l'incidence annuelle de la dysenterie amibienne est beaucoup plus élevée dans les pays tropicaux que dans les pays tempérés. La maladie est fréquente en Afrique, Amériques Centrale et du Sud, Asie tropicale et Océanie, elle est rare en Amérique du Nord, Europe, Asie du Nord.

Amibiase hépatique

Parmi les processus pathologiques causés par l'amibe, la fréquence relative des localisations tissulaires extra-intestinales (abcès du foie) est nettement plus élevée en Extrême-Orient qu'en Afrique. Il se pourrait donc que les propriétés pathogènes des souches de *E. histolytica* soient différentes d'une région à l'autre à cause de variations de la virulence.

5.2 Facteurs liés à l'hôte

Facteurs liés à l'état de l'intestin

• L'AMIBIASÉ EXPÉRIMENTALE

Elle peut être réalisée chez le chaton (inoculation d'amibes par voie intrarectale) et chez le jeune rat albinos (inoculation intracœcale). On a pu ainsi mettre en évidence certains facteurs favorisant l'apparition du pouvoir pathogène (réceptivité de l'hôte): prolifération des formes *minuta*, nature de la flore intestinale associée, ajout d'extraits bactériens à la suspension d'amibes,

Fèces, eau, sol humide:	8 jours à 28 - 34°C;
	30 jours à 10°C;
Sol sec:	24 à 48 heures;
Sous les ongles:	45 minutes;
Sur les mains:	10 minutes;
Eau physiologique à température ambiante:	47 jours;
Fosses septiques (fermentations):	5 à 15 jours.

bes, substances irritantes (huile de croton), lésions préexistantes de la muqueuse colique...

L'élimination préalable du contenu intestinal chez des rongeurs a permis l'invasion amibienne expérimentale, tandis que les intestins avec un transit normal ne le permettaient pas. Il semble que la couche de mucus recouvrant les cellules épithéliales suffise à protéger celles-ci du contact avec les amibes.

• CHEZ L'HOMME

Il semblerait que certains facteurs prédisposent à l'invasion.

Le régime alimentaire: une alimentation déséquilibrée et tout ce qui peut avoir une action irritante sur la paroi intestinale favorise la pénétration des amibes et la prolifération des formes *minuta* dans un bol fécal anormalement hydraté.

La flore intestinale: certaines bactéries (groupe coli-typhique) s'associent au pouvoir pathogène de l'amibe; il en serait de même de certains virus.

Les plaies et excoriations au niveau du côlon et du rectum, les lavements irritants, les colites d'origine non infectieuse facilitent la pénétration des amibes.

Facteurs liés à l'état général du sujet

Un état général altéré favorise l'invasion amibienne: affections intercurrentes (malaria, viroses, entérites etc.), surmenage, promiscuité (camps de travailleurs, militaires en campagne), états de stress, états de malnutrition...

Les facteurs immunologiques sont primordiaux. L'immunité systémique (ici, de la muqueuse intestinale) joue un rôle important. Des IgA, IgG et IgM ont pu être décelés en grandes quantités dans les plaques de Peyer chez des sujets infectés. Les macrophages activés par l'IFN γ parviennent à tuer les trophozoïtes de *E. histolytica* *in vitro*. On a pu démontrer le rôle pri-

Tableau 4-2

mordial que jouent les lymphocytes T dans la protection immunitaire en produisant, par injection intraintestinale d'amibes, des abcès de foie chez la totalité des souris ayant une immunodépression sévère (seulement 10 p.100 des souris témoins immunocompétentes ont développé cette pathologie au niveau du foie).

De son côté, l'amibe ne reste pas inactive: elle sécrète un facteur qui immobilise les monocytes (mais pas les polynucléaires neutrophiles) et qui bloque, chez le macrophage, la libération d'oxygène libre.

5.3 Facteurs liés au parasite

La pathogénicité de *E. histolytica* varie d'après la région géographique et même d'un cas à l'autre. Certains patients présentent en effet une dysenterie explosive, d'autres des diarrhées rebelles sans présence de sang dans les selles, d'autres encore subissent d'emblée une invasion du parenchyme hépatique ou d'autres localisations extra-intestinales. Certains éliminent des kystes sans présenter de symptômes.

Reconnaissance des amibes pathogènes ou non pathogènes

- MORPHOLOGIE

La morphologie d'*E. histolytica* est très proche de celle d'amibes non pathogènes élevées au rang d'espèce: *E. hartmanni*, *E. polecki*... (voir chapitre 6). Leurs trophozoïtes sont semblables à ceux d'*E. histolytica* mais ne présentent jamais de globules rouges dans leur endoplasme. En ce qui concerne les kystes, un examen microscopique minutieux peut mettre en évidence de petites différences: la taille des kystes de *E. hartmanni* est comprise entre 6 et 8 µm alors que les kystes de *E. histolytica* dépassent 10 µm de diamètre. La structure nucléaire des kystes (4 noyaux) diffère sensiblement de *E. histolytica*: les amas de chromatine sur la membrane nucléaire sont plus gros et moins nombreux. Le rapport taille noyaux/taille du kyste est plus petit pour *E. hartmanni* que pour *E. histolytica*.

Chez *E. polecki* il y a une fréquence particulière de kystes à 1 noyau, comme si le stade de kyste jeune durait plus longtemps. On note également des condensations cytoplasmiques régionales et des inclusions plus nombreuses que chez les autres races ou espèces.

Des auteurs ont cultivé et décrit des amibes non pathogènes en les considérant comme des "races" ou des "souches" non pathogènes de *E. histolytica*: souche *Laredo*, souche *Huff* etc... Elles sont actuellement reconnues comme zymodèmes non pathogènes de *E.*

histolytica et viennent (1993) de recevoir le statut d'espèce séparée: *E. dispar* (voir chapitre 6).

Remarque importante

Il est impossible de faire, en routine, la distinction entre un porteur asymptomatique d'une souche pathogène et un porteur de souche non pathogène. Les techniques modernes d'analyse biochimique, immunologique et génétique pourraient donner ce renseignement

- POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL

Pour mesurer la virulence de cultures axéniques d'*E. histolytica*, on peut recourir à des techniques *in vivo* (inoculation intracérébrale au souriceau nouveau-né ou intrahépatique au hamster nouveau-né) ou mieux, à des techniques *in vitro*: les amibes sont introduites dans des cultures cellulaires ("monolayers") où elles ont l'occasion de montrer leur action lytique sur les cellules.

- CARACTÈRES CULTURAUX

La culture polyxénique de *E. histolytica* n'est possible qu'à la température de 37 °C, tandis que les souches non pathogènes peuvent se cultiver indifféremment entre 20°C et 37°C.

- ISOENZYMES

L'électrophorèse des isoenzymes (peptidase, acétylglutaminidase, phosphoglucomutase, aldolase, NADP diaphorase, hexokinase), citée comme critère de taxinomie, a permis de classer les isolats de *E. histolytica* en une vingtaine de zymodèmes différents dont 9 seulement font preuve de pathogénicité (figure 4-4).

- ANTIGÈNES

La virulence d'une souche de *E. histolytica* semble liée à des propriétés de la surface de ses trophozoïtes: la présence de glycoprotéines antigéniques intactes accélère l'activité de phagocytose de l'amibe; ces antigènes sont actuellement reconnus utiles comme critère d'identification d'une souche (lectine d'adhérence au galactose, certains antigènes de poids moléculaire connu: 96 kDa, 29-30 kDa, 81-84 kDa...). Ces protéines antigéniques peuvent être reconnues par des anticorps monoclonaux dirigés contre elles.

- CARACTÈRES GÉNOMIQUES

L'analyse, encore assez grossière, du génome a montré une grande variation parmi les amibes du groupe *histolytica* (avec kystes à 4 noyaux). On a retrouvé des génomes différents (nombre et taille des gènes codant pour l'actine, caryotype moléculaire)

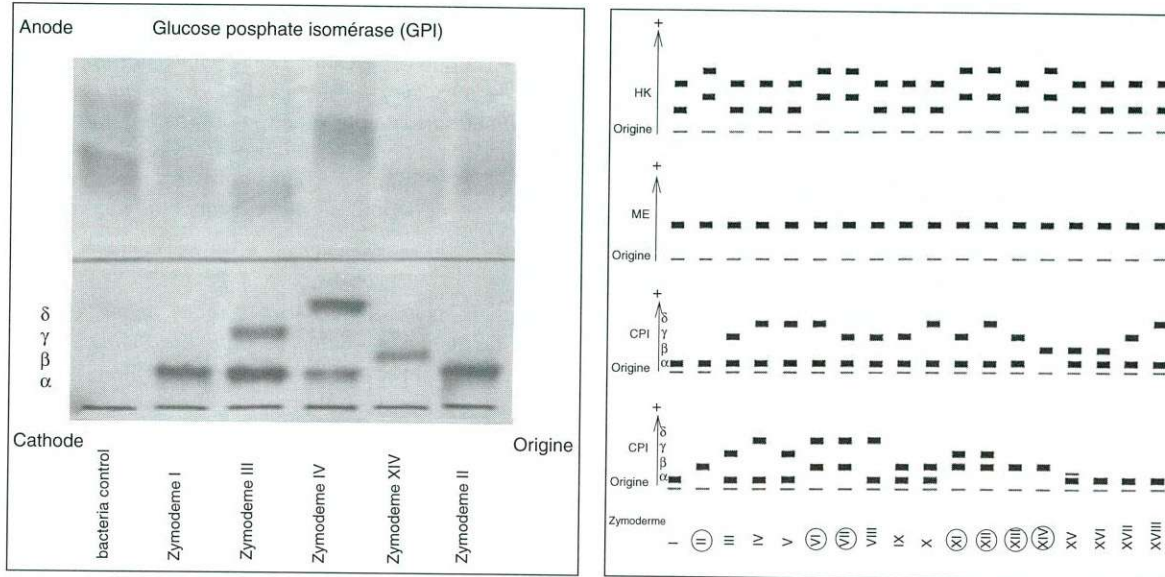


Figure 4-4

Analyse isoenzymatique de *E. histolytica*

(d'après Sargeant et al. 1984)

1. Migration de l'isoenzyme glucose phosphate isomérase. Les positions de fin de migration électrophorétique sont indiquées par les lettres grecques α , γ , β , δ . Le contrôle est un lysat bactérien. La migration se fait de la cathode vers l'anode.
2. L'analyse de quatre isoenzymes, hexokinase(HK), phosphoglucose mutase (PGM), glucose phosphate isomérase (GPI) et malate oxidoreductase(ME), a permis d'identifier vingt zymodèmes parmi les populations de *E. histolytica*. Les numéros des zymodèmes à potentialité pathogène parmi les dix-huit représentés sur la figure sont encadrés. Les numéros dix-neuf et vingt non représentés sont également potentiellement pathogènes.

dans une série de souches de *E. histolytica* pourtant considérées morphologiquement et pathologiquement comme "orthodoxes" (voir chapitre 6).

L'analyse de souches de *Entamoeba* "semblables à *histolytica*" ("*histolytica-like*", regroupant *E. dispar* et *E. hartmanni*) a montré la même diversité.

Actuellement, des sondes nucléiques marquées permettent d'identifier les souches pathogènes. La réaction d'amplification de séquence (PCR) est également utilisée pour leur reconnaissance.

Mécanismes de virulence (études expérimentales)

• ATTACHEMENT

Un contact de quelques minutes avec la membrane externe de l'amibe suffit à produire, chez une cellule de culture, des crevasses dans la membrane externe qui conduisent à son détachement du support et à sa destruction. Des protéases provoqueraient la transformation sphérique de la cellule et des collagénases endommageraient la matrice extracellulaire, isolant ainsi la cellule de ses voisines. L'étape de la reconnaissance par l'amibe de la cellule agressée (sous la dépendance de lectines reconnaissant la galactosamine de la cellule épithéliale) est suivie d'une phase d'attachement avec disparition des microvillosités de la cellule épithéliale puis de modifications léthales.

• ACTION LYTIQUE

Les protéinases de l'amibe (27 - 29 kDa) dégradent le tissu collagène, la laminine et la fibronectine dans les cultures cellulaires. Elles sont inhibées expérimentalement par des anticorps antiprotéinases qui protègent les cellules contre l'agression amibienne. Une protéinase-cystéine (histolysaïne) semble être la fraction enzymatique de loin la plus importante de l'appareil histolytique de l'amibe. L'histolysaïne, qui n'est présente que chez les souches pathogènes, induit la fabrication d'anticorps chez le sujet infecté et a pu servir d'antigène pour un test ELISA à visée diagnostique (Enzyme test). Il faut noter que dans les modèles *in vitro*, il suffit d'ajouter aux cultures de cellules un extrait acellulaire de *E. histolytica* pour démontrer une action cytopathogène. Ces toxines amibiennes, sans doute des protéinases, ont un effet agglutinant sur les cellules de mammifères et induisent une synthèse d'anticorps IgG chez des patients atteints d'amibiase invasive.

Enfin, par leurs mouvements (pseudopodes), les amibes sont aussi à même de détacher mécaniquement les cellules épithéliales de leur support.

Les phénomènes décrits ci-dessus précèdent et facilitent la phagocytose de la cellule cible et sa destruction intracytoplasmique chez l'amibe.

Néanmoins, *in vivo*, on n'a pas pu démontrer jusqu'ici d'effet lytique direct des amibes sur les tissus

de l'hôte. La nécrose résulterait plutôt de l'accumulation puis de la destruction des cellules inflammatoires au contact des amibes. Les amibes pathogènes sont capables de lyser ou de phagocyter les neutrophiles, éosinophiles, monocytes sanguins et macrophages non activés. Les lésions du tissu hépatique seraient provoquées plus par la lyse secondaire des cellules inflammatoires que par l'action directe de l'amibe. Les macrophages activés peuvent, en revanche, tuer les trophozoïtes, d'où la protection immune au niveau de l'invasion de la muqueuse intestinale.

- PHAGOCYTOSE

Son intensité est proportionnelle à la pathogénicité des trophozoïtes. L'érythro-phagocytose accélérée est un marqueur fidèle de pathogénicité. La libération de toxines et d'enzymes à la surface de l'amibe s'accompagne d'un accroissement de sa mobilité et d'une accélération de la digestion des vacuoles alimentaires.

Problème de la stabilité de la virulence des souches

Une vingtaine de zymodèmes, nous l'avons vu, ont été décrits à travers le monde, 9 liés à un pouvoir pathogène (isolés chez des sujets avec manifestations invasives), les autres provenant toujours de porteurs asymptomatiques.

En ce qui concerne la stabilité du zymogramme, les avis divergent: il est fixe pour certains (Sargeant), labile pour d'autres (Mirelman). Les arguments sont les suivants:

- POUR LA CONSERVATION DU ZYMOGRAMME
 - dans un même intestin, il arrive de trouver simultanément plusieurs zymodèmes de souches non pathogènes et un seul zymodème de souche pathogène;
 - les zymodèmes restent inchangés au cours du cycle et en culture;
 - les zymogrammes des isolats réalisés à partir d'abcès du foie sont homogènes;
 - il y a correspondance de virulence chez le cobaye suivant le zymodème, pathogène ou non;
 - le suivi de porteurs asymptomatiques de zymodèmes pathogènes a montré la survenue d'épisodes symptomatiques.

- POUR LE CHANGEMENT DE ZYMOGRAMME

L'unique observation de la conversion du zymogramme d'isolats de souches de *E. histolytica* entretenues en culture n'a pas pu être confirmée (constatation de l'apparition de zymogrammes nouveaux, issus de 2 clones à zymogramme connu cultivés ensemble). Elle aboutissait à l'hypothèse de l'existence de recombinaisons génétiques par échange de matériel nucléaire entre souches.

Si les zymodèmes sont stables, on est en présence de deux types différents de *E. histolytica*:

- un type non pathogène (*E. dispar*) dont les porteurs asymptomatiques se débarrassent en moins de un an;
- un type pathogène (*E. histolytica*) dont les porteurs peuvent développer à tout moment une amibiase invasive.

Si les zymodèmes ne sont pas stables au cours du temps (hautement improbable à la lumière des observations récentes), on se trouve en présence d'un seul type de *E. histolytica* à potentialité pathogène dont les variations pourraient être dues à la réceptivité particulière du porteur, le contact avec des bactéries, les conditions physico-chimiques prévalant dans le tube digestif...

6. Lésions causées dans l'organisme de l'homme par *E. histolytica*

On distingue les lésions intestinales et les lésions extra-intestinales.

6.1 Amibiase intestinale (dysenterie amibienne)

Localisation

La lésion siège dans le côlon, entre le cæcum et l'anus.

Pathogénèse

L'ulcération est le résultat de la destruction de cellules par l'action des amibes et surtout par l'inflammation responsable d'une accumulation de lymphocytes et de polynucléaires. Certaines de ces cellules, tuées par l'amibe, déversent le contenu de leurs lysosomes dans les tissus.

La large poche de tissu nécrosé de la sous-muqueuse communique avec la lumière intestinale

par un étroit orifice en cheminée qui traverse la muqueuse et se termine par une surélévation en cratère. Cet ulcère, qui est plutôt un abcès fistuleux, continue de s'étendre latéralement dans la sous-muqueuse (ulcère "en bouton de chemise").

Au cours de cette évolution, les trophozoïtes hématophages prolifèrent au contact des tissus sains et leur activité tend à agrandir la lésion. Les violentes contractions péristaltiques de l'intestin irrité les déversent dans la lumière intestinale en même temps que le sang extravasé et les cellules nécrosées. Ils pourront causer des lésions plus bas et seront retrouvés dans les selles.

La progression se fait en nappe dans la sous-muqueuse, avec passage à la chronicité ou en profondeur, pouvant aboutir à la perforation (amibiase fulminante).

Après cicatrisation, lorsque les abcès, vidés de leur contenu, se sont comblés progressivement de tissu fibreux, des déformations ou rétrécissements plus ou moins étendus peuvent persister.

Le développement, parfois tumoral, de tissus granulomateux (éosinophiles, lymphocytes, quelques fibroblastes, tissus nécrosés et trophozoïtes) se rencontre surtout au niveau du cæcum (amœbome).

6.2 Localisations extra-intestinales

Il faut bien admettre que l'amibiase extra-intestinale trouve son origine dans le côlon. Cependant, les essaimages surviennent généralement en l'absence de toute pathologie intestinale visible. Ils se font

- par extension de lésions d'organes voisins: au départ du rectum, vers les organes uro-génitaux ou vers la peau au pourtour de l'anus; au départ du foie, vers le poumon (base droite, à travers le diaphragme), vers la plèvre, vers la peau;
- par voie sanguine (au départ du côlon) au foie (par la circulation porte), au poumon (par le cœur droit et la petite circulation), au cerveau, à la rate, aux reins (par le cœur gauche et la grande circulation).

Amibiase hépatique (abcès amibien du foie)

La lésion typique est un abcès, la nécrose cellulaire formant une poche renfermant une collection purulente. Le plus fréquemment, l'abcès est unique. Au moment du diagnostic, la taille est très variable, d'une tête d'épingle à une tête d'enfant, envahissant parfois la totalité du lobe intéressé, le plus souvent du volume d'une orange.

A l'intérieur de la "membrane" pyogénique se trouve le pus de teinte jaune ou brunâtre (pus chocolat), constitué de cellules hépatiques nécrosées, de débris amorphes, de globules rouges, de leucocytes, de globules graisseux, de cristaux d'hématoïdine. C'est la présence d'hémoglobine en voie de décomposition qui donne au pus sa couleur jaune puis brune. Le pus ne contient pratiquement pas d'amibes, celles-ci se trouvant en périphérie dans la zone active de l'abcès.

Les microbes sont le plus souvent absents; lorsqu'on en trouve, il s'agit en général d'un abcès en communication avec le côlon transverse. C'est donc l'amibe qui semble seule responsable, avec les cellules inflammatoires, de la destruction cellulaire.

Amibiase pulmonaire

C'est un abcès évoluant comme un abcès du foie; le foyer nécrotique, sec au début, suppure ensuite et se surinfecte de germes microbiens venus de l'extérieur par les bronches.

L'abcès ouvert dans une bronche peut se vider lors d'un accès de toux et provoquer une vomique de crachats brunâtres.

Amibiase encéphalique

Dans la méningo-encéphalite amibienne métastatique, les amibes arrivées par voie sanguine produisent un abcès généralement unique qui provoque dès son début, une réaction méningée localisée. Une leucocytose légère peut être observée dans le liquide céphalo-rachidien.

6.3 Effet des défenses immunitaires de l'hôte

L'immunité cellulaire (cytotoxicité des lymphocytes T activés) jouerait, nous l'avons dit (paragraphe 5.2), un rôle important dans la limitation à l'intestin de l'invasion amibienne: chez des animaux intacts, les amibes se cantonnent dans l'intestin tandis que chez des animaux traités par un sérum anti-lymphocytaire (ou des animaux immunodéficients), l'invasion du foie est constante. De plus, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages (monocytes) activés détruisent les trophozoïtes.

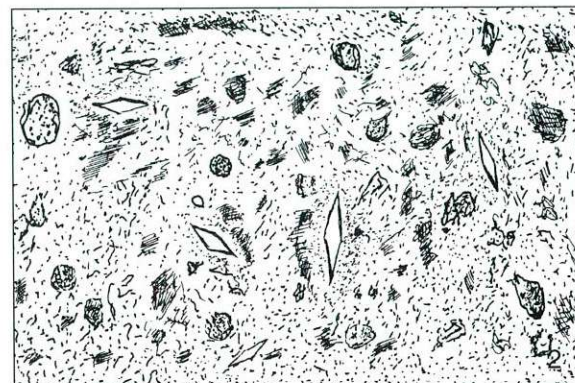
Les anticorps sériques sont présents dans tous les cas d'amibiase invasive. Le titre d'IgG est élevé tandis que celui des IgA subit peu de changements dans le sérum. Les IgA sont toutefois sécrétées au niveau de la muqueuse intestinale (plaques de Peyer) où elles jouent un rôle protecteur important. Les IgM et les IgG sériques sont notablement plus élevées dans les cas d'invasion extra-intestinale.

Figure 4-5

Cristaux de Charcot-Leyden

Des cristaux d'oxalate de potassium sont présents dans les selles en cas d'amibiase, c'est un élément accessoire de diagnostic. Ils se présentent sous forme de losanges très allongés, légèrement réfringents.

1. examen de selles d'amibien, microphotographie
2. Dessin représentant quatre cristaux dans un champs microscopique



Le contact des antigènes de surface avec d'éventuels anticorps de l'hôte provoque l'apparition d'immunocomplexes à la surface de l'amibe qui inhibent sa capacité de phagocyter. Ces complexes de surface sont toutefois rapidement rejetés par le parasite, le protégeant ainsi contre l'agression immunitaire de l'hôte.

Il faut toutefois mentionner que l'immunodépression du SIDA ne semble pas augmenter la fréquence des localisations extra-intestinales de l'amibe. Quant à la diarrhée fréquemment observée chez les patients immunodéprimés, elle est très rarement due à *E. histolytica*.

7. Diagnostic de l'amibiase au laboratoire

On envisagera successivement les examens directs (recherche des amibes au microscope, détection immunologique d'antigènes amibiens, culture) et les tests indirects (recherche d'anticorps anti-amibiens et tests de biologie générale).

L'utilité de chaque examen sera analysée pour le diagnostic de l'amibiase intestinale aiguë, des porteurs sains et des localisations extra-intestinales, de même que pour les enquêtes de prévalence.

Les différentes techniques évoquées sont décrites en détail dans le chapitre 19.

7.1 Recherche des amibes par examen microscopique

Amibiase intestinale aiguë

La recherche de formes végétatives invasives (*histolytica*) dans des matières fécales diarrhéiques muco-sanguinolentes est le seul cas où le diagnostic

microscopique est péremptoire, les trophozoïtes hématophages étant certainement pathogènes. Ces matières, émises à l'occasion de besoins fréquents, douloureux (coliques abdominales) et peu productifs (crachat rectal), sont liquides et de couleur non homogène à cause de la variété des éléments qu'on y retrouve: débris alimentaires, lambeaux de muqueuse, mucus abondant blanc-jaunâtre, traces de sang rouge.

Dans les cas moins aigus ou à la période de rémission, les matières encore liquides pourront présenter une coloration plus normale et plus homogène, brun clair.

Il faudra pratiquer l'examen à frais et à 37°C, immédiatement après l'émission de l'échantillon. On y trouvera des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* mesurant 20 à 30 µm de diamètre, contenant souvent des globules rouges dans leur endoplasme et formant des pseudopodes actifs. On notera aussi la présence de leucocytes, de globules rouges à l'état libre, de cellules épithéliales desquamées et de cristaux de Charcot-Leyden (oxalate de potassium) issus de la destruction de polynucléaires éosinophiles (figure 4-5).

On veillera à répéter l'examen 2 ou 3 fois en cas de négativité, à examiner de préférence le mucus et le sang. Il est parfois nécessaire de récolter le produit à l'occasion d'une rectoscopie ou en pratiquant une aspiration à la pipette du contenu rectal.

Remarque

Le diagnostic de la dysenterie bacillaire (*Shigella*) repose sur l'observation de selles liquides avec sang plus abondant contenant de nombreux leucocytes (attention, pseudopodes!) et des cellules de desquamation de la muqueuse mais dépourvues de trophozoïtes hématophages. On isolera *Shigella* sp. à la culture bactériologique.

Malades convalescents et porteurs sains

On recherchera dans les selles d'aspect normal, les kystes à 4 noyaux et, plus rarement, les trophozoïtes *minuta*

- chez les sujets qui relèvent d'un épisode aigu (contrôle de l'efficacité du traitement);
- chez les sujets pouvant présenter un danger de dissémination de l'agent pathogène (porteurs sains).

Remarque importante

Il est nécessaire de répéter les examens et d'utiliser une méthode d'enrichissement avant de conclure à une absence de kystes.

La recherche de kystes ou éventuellement de trophozoïtes non invasifs (*minuta*) est un examen difficile et décevant. Trois niveaux de spécificité doivent être considérés:

- il faudra connaître les différences entre *E. histolytica* et les autres espèces d'amibes de l'homme, non pathogènes, décrites au chapitre suivant;
- il faudra faire la distinction entre *E. histolytica* et des espèces proches non pathogènes. On se basera sur la taille des kystes, le nombre et la morphologie des noyaux (voir paragraphe 5.3);
- enfin, l'examen microscopique ne pourra pas faire la distinction entre souche pathogène et non pathogène (*E. dispar*); il faudrait recourir à des anticorps monoclonaux ou à des sondes nucléiques.

MÉTHODES FACILITANT L'EXAMEN

Les colorations extemporanées

En vue de la recherche des kystes, l'eau physiologique utilisée pour homogénéiser les matières fécales peut être remplacée par divers colorants.

L'éosine colore en rose le fond de la préparation sur lequel les kystes non colorés se détachent en négatif. L'examen se fait au faible grossissement (obj 10X);

Le lugol colore les membranes externes et nucléaires. L'examen se fait à l'objectif 40 X ou 100 X;

Le réactif de Bailenger colore certaines structures des protozoaires intestinaux (kystes et trophozoïtes): cytoplasme et bâtonnets cristalloïdes en rouge, structures nucléaires en noir;

La coloration de Sargeant est également extemporanée mais se fait après un enrichissement selon Ritchie, en mettant en contact entre lame et lamelle le culot obtenu et le colorant: paroi externe du kyste,

membranes nucléaires et chromatine sont colorées en vert pâle tandis que les corps chromatoïdes se présentent sous la forme de solides bâtonnets verts.

Les colorations permanentes

Elles se pratiquent sur des frottis de matières fécales fixés, en utilisant l'hématoxyline ferrique ou la technique de Kohn. Ces procédures sont longues et sont rarement utilisées dans les laboratoires de routine.

MÉTHODES DE CONCENTRATION PARASITAIRE

Elles ont pour but de séparer les éléments parasitaires des multiples autres constituants des matières fécales, de manière à concentrer les parasites dans un faible volume et à faciliter l'examen microscopique. Deux méthodes parmi beaucoup d'autres ont été choisies pour leur simplicité et leur efficacité: la méthode de Faust (flottation) et la méthode formol-éther de Ritchie (sédimentation).

Recherche de la prévalence des porteurs de *E. histolytica*

Les enquêtes de prévalence se basent sur la fréquence des porteurs de kystes à quatre noyaux dans des échantillons de population choisis par quartier (influence du niveau socio-économique, de la densité d'habitants), par groupe d'âge, par type d'environnement (urbain, rural) ...

Pour atteindre 80 ou 90 p.100 de sensibilité, il faudrait examiner trois échantillons de chaque personne à quelques jours d'intervalle, ce qui n'est évidemment jamais fait dans de telles enquêtes. Il faut donc être conscient de la sous-estimation des résultats.

La recherche des kystes se fera par une des techniques exposées au paragraphe précédent, à l'exclusion de la concentration qui est trop longue à pratiquer sur de grandes séries de prélèvements.

La morphologie identique des kystes de *E. histolytica* et de *E. dispar* jette un doute sur l'utilité de ces enquêtes car la spécificité des informations récoltées ne concerne pas la prévalence de *E. histolytica*. Il sera nécessaire, dans l'avenir, d'y adjoindre une technique d'identification immunologique (monoclonaux) ou génétique (sondes).

EXAMENS DIFFÉRÉS

Conservation des selles

Si les échantillons ne peuvent pas être traités ou examinés immédiatement, il faut y ajouter un agent conservateur pour éviter la détérioration des protozoaires qui pourraient s'y trouver (valable surtout pour les

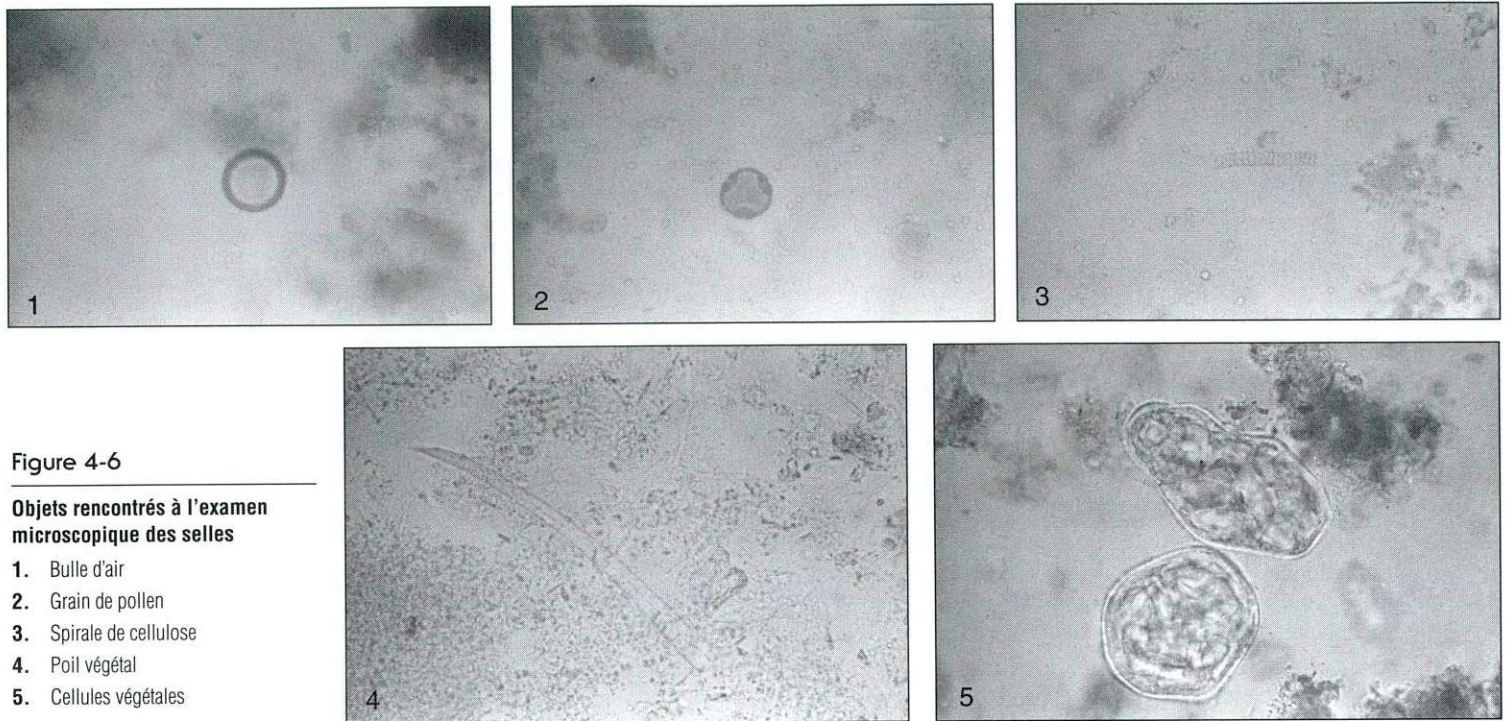


Figure 4-6

Objets rencontrés à l'examen microscopique des selles

1. Bulle d'air
2. Grain de pollen
3. Spirale de cellulose
4. Poil végétal
5. Cellules végétales

kystes). Le formol, le mélange merthiolate-iode-formol (MIF) et l'alcool polyvinylique (PVA) sont les plus faciles à utiliser.

Colorations permanentes sur frottis.

Elles sont précieuses pour le diagnostic d'espèce des kystes et des trophozoïtes de tous les parasites fécaux (enquêtes épidémiologiques, recherche des porteurs sains). Elles soulignent les structures nucléaires importantes pour la détermination de l'espèce (sauf pour la distinction entre *E. histolytica* et *E. dispar*).

Les structures des trophozoïtes et des kystes (membranes, corps chromatoides, bactéries et hématies phagocytées, chromatine nucléaire) sont colorées en noir par l'hématoxyline ferrique.

Noyaux et caryosomes prennent une teinte gris-vert foncé après une coloration de Kohn.

Amibiase extra-intestinale

L'examen microscopique a peu d'intérêt puisque dans plus de 50 p.100 des cas on ne met pas d'amibes en évidence dans les selles du patient et que les pus d'abcès ponctionnés ne contiennent que de très rares parasites (sensibilité insuffisante de l'examen direct). On augmente les chances de les mettre en évidence

en raclant, lors de la ponction, la paroi de l'abcès avec l'aiguille.

Difficulté de l'examen microscopique des selles

Les kystes sphériques à 4 noyaux, de 12 à 16 μ m de diamètre, peuvent appartenir à *E. dispar*, *E. coli*, *Blastocystis hominis* (kyste immature).

En outre ils peuvent être confondus avec (figure 4-6):

- des globules de graisse réfringents, incolores ou pigmentés, sans structure interne;
- des cellules végétales à paroi mince ou épaisse, hérissée de protubérances;
- des vaisseaux spiralés du bois, réfringents et parfaitement ronds;
- des spores de champignons, rectangulaires, à paroi double;
- des grains d'amidon, réfringents et incolores, de formes et dimensions variables, anguleux.

7.2 Détection d'antigènes amibiens

On peut repérer les amibes morphologiquement intactes, au faible grossissement, par immuno-

fluorescence ou identifier des antigènes solubles dans les prélèvements (selles, pus, plasma) en utilisant des anticorps monoclonaux dans un test ELISA ou Western-blot.

Un anticorps monoclonal bien choisi permet d'identifier en IFI les zymodèmes pathogènes de *E. histolytica* isolés de patients avec symptômes tandis que les zymodèmes non pathogènes ne sont pas reconnus par ce monoclonal. En Western-blot, un antigène de 30 kDa spécifique des souches pathogènes aurait été identifié.

Amibiase intestinale aiguë

L'examen microscopique direct des selles est considéré comme plus rapide et plus simple. Actuellement à l'essai, un test ELISA serait capable d'apprécier la densité d'amibes dans les prélèvements.

Malades convalescents et porteurs sains

La recherche d'antigènes solubles dans les selles serait la méthode de choix car non seulement elle peut repérer la présence du cycle *minuta* dans un intestin mais de plus, en utilisant un anticorps monoclonal adéquat, elle pourrait identifier les parasites comme pathogènes ou non.

Recherche de la prévalence de E. histolytica

Ces techniques n'ont pas encore été utilisées dans les enquêtes épidémiologiques. Elles peuvent s'avérer d'une grande précision et donc constituer un précieux progrès.

Amibiase extra-intestinale

On a pu mettre en évidence des amibes végétatives par immunofluorescence sur des coupes de foie ou de poumon à partir de blocs fixés au formol et enrobés dans la paraffine depuis plus de 10 ans, en utilisant des immuns sérums polyclonaux de patients ayant eu un abcès amibien du foie. Ceci démontre la stabilité des antigènes d'amibes au cours des traitements agressifs de l'histologie classique.

7.3 Mise en culture

Amibiase intestinale aiguë

La mise en culture est possible en inoculant un peu de matières fécales fraîches dans un tube contenant du milieu diphasique de Dobell (culture polyxénique). Après 3 ou 4 jours à 37°C, on pourra trouver

dans le fond du tube (anaérobiose), des trophozoïtes en grand nombre. La culture est plus sensible que l'examen direct mais rarement pratiquée dans les laboratoires de routine.

Malades convalescents et porteurs sains

Les stades du cycle *minuta* peuvent aussi être mis en culture mixte. La sensibilité en est plus grande que l'examen direct où seulement les kystes sont recherchés. Mais l'encombrement de la technique est dissuasif. Il faut souvent faire une ou deux subcultures (une semaine de délai) avant de voir les trophozoïtes dans le culot du tube.

Enquêtes de prévalence

La remarque faite pour les porteurs sains reste valable ici.

Amibiase extra-intestinale

La culture peut être tentée à partir du pus d'un abcès du foie. L'examen microscopique direct étant non rentable, il peut être remplacé avantageusement par la mise en culture mixte en présence de germes microbiens extrinsèques.

Remarque importante

Il faut rappeler que, par ailleurs, la culture bactériologique de pus d'abcès du foie reste stérile.

7.4 Recherche d'anticorps anti-amibiens

La titration d'anticorps anti-amibiens dans le sérum (anticorps sériques, sérologie) ou dans le contenu intestinal (copro-anticorps) se fait par immunofluorescence indirecte (IFI), hémagglutination indirecte ou passive (HAI), agglutination de particules de latex (LAT), précipitation en gel (PEG), contre-immunoélectrophorèse (CIE) ou test immuno-enzymatique (ELISA). Les antigènes utilisés sont produits par culture axénique: antigène figuré pour l'IFI, antigènes solubles (extrait total de trophozoïtes) pour les autres tests.

Dans notre expérience, l'apparition des anticorps fluorescents (IFI) est légèrement plus précoce que les anticorps précipitants (PEG).

Amibiase intestinale aiguë

La détection des anticorps sériques (IgG, IgM) donne 70 à 80 p.100 de positivité en cas d'amibiase invasive. Les anticorps persistent à un niveau détectable pendant plusieurs semaines.

Les copro-anticorps ont été retrouvés chez 80 p.100 des sujets dysentériques tandis que, parmi des sujets porteurs d'autres affections intestinales, seulement 1 à 2 p.100 étaient trouvés positifs. Il est probable que ces anticorps soient des IgA parce que le test de fixation du complément les détecte mal (souvent négatif) alors que l'HAI est positive. On sait en effet que les IgA ne fixent pas le complément.

Après l'épisode aigu, les copro-anticorps disparaissent plus rapidement que ceux du sérum car trois semaines après la guérison des symptômes, il ne reste que 50 p.100 de tests positifs alors que les titres d'anticorps sériques sont en augmentation.

Rappelons le test "Enzymebsa" qui détecte les anticorps sériques anti-histolysaïne, enzyme spécifique des souches pathogènes du parasite.

Malades convalescents et porteurs sains

Les malades convalescents restent positifs (IgG sériques) et les tests ne peuvent pas servir à suivre le processus de guérison.

Les porteurs sains (disséminateurs de kystes) ont des anticorps IgA dans les selles (copro-anticorps sécrétés par la muqueuse intestinale) mais le plus souvent pas d'anticorps sériques.

Amibiase extra-intestinale

Les anticorps sériques sont pratiquement toujours retrouvés à des titres significatifs. Le diagnostic sérologique est une aide précieuse et fidèle pour le clinicien qui se trouve devant un processus hépatique ou pulmonaire d'étiologie inconnue.

La sensibilité est excellente (99 p.100), les titres d'anticorps spécifiques (IFI, HAI, LAT, ELISA, PEG) ne laissent aucun doute car ils s'élèvent rapidement avant que les premiers symptômes n'apparaissent. La négativation est lente, elle prend plusieurs mois. Tant que le pus de l'abcès n'est pas complètement résorbé, la stimulation antigénique persiste.

Prévalence des porteurs d'anticorps

Dans les études épidémiologiques, la détection d'anticorps sériques peut être utilisée pour obtenir une information sur la fréquence du processus d'invasion. Malheureusement, les études pèchent par manque de standardisation des tests et ne sont donc pas comparables entre elles. Il faudrait

- standardiser les techniques;
- définir les seuils de spécificité;

- connaître le délai de négativation après sérologie positive (très variable d'un sujet à l'autre et selon la localisation);
- savoir si les tests peuvent faire la distinction entre porteurs d'isolats pathogènes ou non pathogènes.

Une enquête réalisée au Mexique (1974) a porté sur 20.000 sérums, provenant de tout le pays. La prévalence varie de 2,3 à 9,9 p.100 suivant la densité de population, le niveau socio-économique et l'âge. Les tests utilisés ont été l'HAI, la CIE et l'IFI.

Remarque importante

Les spécialistes du "Centers for Disease Control" (CDC, Atlanta, USA) accordent leur préférence à l'HAI et choisissent comme seuil de positivité le titre de 1/256.

7.5 Les tests de biologie générale (non spécifiques)

Il n'y a que dans les cas d'amibiase extra-intestinale que les tests inflammatoires peuvent être utiles. Ils ont une valeur d'orientation: numération des leucocytes (15.000 à 20.000 par μ l), taux de fibrinogène élevé (supérieur à 0,40 g par 100 ml), présence de protéine C-réactive. La vitesse de sédimentation est élevée et son retour à la normale signe l'efficacité du traitement.

8. Culture *in vitro*

La culture des amibes a plusieurs utilités:

- diagnostic (recherche d'amibes dans les selles ou dans un pus d'abcès, par culture polyxénique);
- production d'antigènes pour tests sérologiques;
- préalable à une analyse iso-enzymatique pour identification des caractères d'une souche;
- essais médicamenteux.

On distingue les cultures classiques faites en présence de bactéries (polyxéniques) et les cultures axéniques dans lesquelles les amibes se multiplient en l'absence de tout autre organisme vivant (milieu de culture plus complexes, satisfaisant à tous les besoins des amibes).

8.1 Culture polyxénique

Les amibes s'y multiplient en compagnie de bactéries provenant du tube digestif (cultures mixtes).

Elles ont, depuis 50 ans, été utilisées comme moyen de diagnostic (mise en culture des selles ou de

pus d'abcès) permettant en outre, comme signalé plus haut, la distinction entre souches pathogènes (cultivables à 37°C seulement) et non pathogènes d'*E.histolytica* (cultivables indifféremment à 28° et 37°C).

Elles ont également été utilisées pour fournir des organismes en nombre suffisant (obtention d'antigènes pour réactions sérologiques, études de virulence et sensibilité aux médicaments).

Les milieux utilisés (milieux de Dobell, de Jones) sont à base de produits biologiques (sérum de cheval, albumine d'œuf), additionnés d'éléments figurés tels que des grains d'amidon qui serviront de source d'énergie aux seules amibes qui les phagocytent (voir chapitre 19).

L'enkystement peut y être réalisé par un choc osmotique ou en supprimant l'approvisionnement en glucose. Il s'accompagne de l'apparition, à la surface du parasite, de glycoprotéines sialées alors que le trophozoïte, lui, est dépourvu d'acide sialique.

8.2 Culture axénique

Les amibes se développent en l'absence de tout autre organisme vivant. Elle a été l'œuvre de Diamond qui depuis 1961 en a sensiblement amélioré le rendement (milieu TYI-S-33 ou milieu TPS avec hydrolysats de caséine). Ce type de culture a permis l'obtention d'antigènes purs, figurés ou solubles, utilisables en sérologie, de même que des études immunologiques, biochimiques, pathologiques et pharmacologiques.

Les imperfections de la culture axénique restent

- la nécessité d'utiliser du sérum animal dans les milieux de culture (milieux "semi-définis");
- l'axénisation laborieuse: elle doit obligatoirement passer par une phase d'adaptation sur culture xénique qui peut être rendue plus facile par l'utilisation de bactéries tuées par irradiation;
- l'impossibilité d'induire l'enkystement en culture: pas de production du cycle complet.

9. Traitement

9.1 Amœbicides de contact (à action directe)

Ces médicaments, pris par voie orale, ne sont pas résorbés. Ils agissent dans l'intestin, sur les trophozoïtes du cycle *minuta*: ils suppriment donc aussi les kystes qui ont leur origine dans les trophozoïtes.

Iodoquinol

Direxiodé®: 650 mg trois fois/jour pendant 20 jours maximum.

Furoate de diloxanide (Furamide®)

Traitement de 10 jours à raison de 500 mg trois fois/jour.

9.2 Amœbicides tissulaires (toutes localisations tissulaires)

Dérivés de l'émétine

2-déhydroémétine: 1 mg/kg/jour en injection sous-cutanée profonde ou intra-musculaire pendant 10 jours.

Dérivés azolés

Métronidazole (Flagyl®): 2 g/jour ou (chez les enfants) 30 à 50 mg/kg/jour pendant 5 à 10 jours.

Tinidazole (Fasigyn®): 2 g/jour en 1 prise pendant 3 jours.

Secnidazole (Flagentyl®): 1,5 g/jour en 3 prises (25 mg/kg/jour chez l'enfant) pendant 2 à 5 jours.

Ornidazole (Tiberal®): 2 g/jour pendant 5 à 10 jours.

Remarque

Vu la relative toxicité de l'émétine, on lui préfère le métronidazole. Les amœbicides tissulaires ayant peu d'effet sur les formes intestinales, on fait en général suivre le traitement par une cure d'amœbicide de contact.

10. Transmission

10.1 Contamination

Se fait par ingestion de kystes présents dans le milieu naturel. Les sources d'infection les plus fréquentes sont:

- l'eau (puits à proximité de fosses d'aisance, canalisations défectueuses);
- les légumes crus (fumure du sol avec de l'engrais humain, cuisiniers peu soigneux, propreté des récipients multi-usages);
- les mains sales, souillées de terre, de matières fécales, facilement portées à la bouche (enfants); matériel médical contaminé (lavements);
- les mouches domestiques se promenant sur les aliments et sur la table dressée pour le repas

Tableau 4-3

PORTEURS DE KYSTES:	p.100 MINIMUM	p.100 MAXIMUM
Bangladesh	10	30
Bolivie	3	14
Costa Rica	7	36
Cote d'Ivoire	0,2	5,0 (rural)
Gambie		40,0 (rural)
Inde	0,5	38
Mexico	0	55,0
Tanzanie	1	8
U.S.A.	1	32,0 (homosexuels)
Zaïre		20
Maroc	5	45
Egypte	5	40
Sicile	18	55
Espagne	2	21
France	6,0 (Nord)	31,0 (Sud)

(Sources: R. Deschiens, 1965; R. Kretschmer, 1990)

(transport mécanique de kystes sur les pattes et la trompe).

10.2 Réservoir de parasites

L'homme est pratiquement le seul à pouvoir héberger le cycle et donc disséminer les kystes. La prévalence des porteurs de kystes est plus haute dans les couches socio-économiques plus basses, chez les handicapés mentaux (institutions), chez les sujets âgés et

chez les homosexuels. La durée maximale du statut de porteur de l'infection est d'environ deux ans; elle serait plus longue avec les souches pathogènes.

10.3 Facteurs influençant la prévalence

Ce sont essentiellement la longue survie des kystes et le contact féco-oral: température et humidité de la surface de la terre, méthodes de conservation des aliments (congélation et ébullition détruisent les kystes), habitude de consommer cru, qualité de la distribution d'eau, hygiène individuelle (utilisation de latrines, propreté des mains), abondance des mouches domestiques (tableau 4-3).

10.4 Endémicité amibienne

Lorsque l'endémicité est élevée, les cas sont disséminés, il y a des kystes partout (eaux-aliments).

Lorsque l'endémicité est faible, on assiste surtout à des contaminations familiales où le contact direct, les mains sales, jouent un rôle prépondérant. On peut cependant assister à de petites épidémies parmi les clients d'un restaurant (cuisiniers).

De graves accidents épidémiques sont possibles, à l'occasion de rassemblements importants de personnes (pèlerinages, congrès internationaux). A Chicago, en 1933, à l'occasion d'une exposition universelle, une canalisation défectueuse dans un hôtel a été responsable de centaines de cas "primaires" ayant à leur tour, après être rentrés chez eux, été à l'origine d'innombrables cas "secondaires". En tout, on a dénombré 1.409 cas de dysenterie et une centaine de décès.

BIBLIOGRAPHIE

- POWELL SJ *et al.* (1965) Clinical evaluation of gel-diffusion precipitin test in amoebic liver abscess, *Lancet*, ii:602.
- DESCHIENS R. (1965) *L'amibiase et l'amibe dysentérique*, Paris, Masson et Cie.
- POWELL SJ *et al.* (1966) Clinical evaluation of gel-diffusion precipitin test in amoebic dysentery, *Lancet*, i, 566.
- DIAMOND LS. (1968) Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn 1903 and *E. histolytica*-like amoebae, *Journal of Parasitology*, 54, 1047-1056.
- ROBINSON GL. (1968) The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62, 285.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. (1969) *L'Amibiase*, Série de Rapports techniques, 421.

- WÉRY-PASKOFF S, RENOIRTE R, WÉRY M ET BENNIKE T. (1971) Diagnostic sérologique de l'amibiase hépatique par immunofluorescence, *Annales de la Société belge de Médecine tropicale*, **51**, 221-228.
- NIEL G, GENTILINI M, CHARMOT G. (1972) Le test au latex appliqué au diagnostic sérologique de l'amibiase: valeur comparée à celle de l'immunofluorescence et de l'immuno-électrophorèse, *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*, **65**, 382.
- AMBROISE-THOMAS P. (1974) Séro-diagnostic de l'amibiase par un test rapide d'agglutination de particules de latex sensibilisées. Résultat de 462 examens et comparaison à la réaction d'immunofluorescence indirecte, *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*, **67**, 156.
- WÉRY M, WEYN J, WÉRY-PASKOFF S, LOKOMBE-BOLOLA J. (1976) La fréquence du parasitisme par *Entamoeba histolytica* dans des échantillons de populations au Zaïre appréciée au laboratoire par des méthodes parasitologiques et par immunofluorescence, *Annales de la Société belge de Médecine tropicale*, **56**, 169-182.
- DIAMOND LS, HARLOW DR, CUNNINGHAM CC. (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **72**, 431-432.
- SARGEANT PG, WILLIAMS JE, GREENE JD. (1978) The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **72**, 519-521.
- SARGEANT PG. (1980) A comparative study of *E. histolytica* (NIH:200, HK9, etc.), "*E. histolytica*-like" and other morphologically identical amoebae using iso-enzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **74**, 469.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. (1982) *Infections intestinales à Protozoaires et à Helminthes*, Série des Rapports techniques, **666**.
- MIRELMAN D. (1987) Effect of culture conditions and bacterial associates on the zymodemes of *E. histolytica*, *Parasitology Today*, **3**, 37.
- SARGEANT PG. (1987) The reliability of *E. histolytica* zymodemes in clinical diagnosis, *Parasitology Today*, **3**, 40.
- KRETSCHMER RR. (1990) *Amoebiasis, Infection and disease by Entamoeba histolytica*, CRC Press.
- MARINKELLE et al. (1991) A modification of Diamond's medium for axenic culture of *Entamoeba histolytica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**, 746-747.
- TACHIBANA et al. (1991) Reactivity of monoclonal antibodies to species-specific antigens of *Entamoeba histolytica*, *Journal of Protozoology*, **38**, 329.
- BLANC DS. (1992) Determination of taxonomic status of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* zymodemes using isoenzyme analysis, *Journal of Protozoology*, **39**, 471-479.
- LUACES AL, OSORIO LM, BARRETT AJ. (1993) A new test for infection by *Entamoeba histolytica*, *Parasitology Today*, **9**, 69-71.
- DIAMOND LS, CLARK CG. (1993) A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker 1911). Separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**, 340-344.
- PETRI WA, CLARK CG, BRAGA LL, MANN BJ. (1993) International Seminar on Amebiasis, *Parasitology Today*, **9**, 73-76.

Autres amibes parasites de l'homme (Euamoebida, Acanthopodida, Schizopyrenida)

5

Schéma taxinomique

Embranchement (Phylum): Rhizopoda

Classe: Rhizopodea.

ORDRE DES EUAMOEBA Calkins 1902

Amibes nues, uninucléées, en majorité libres mais de nombreuses espèces sont parasites.

Famille des Entamoebidae

Elle comprend trois genres: *Entamoeba*, *Endolimax* et *Iodamoeba*.

Il s'agit de parasites obligatoires du tube digestif de l'homme ou des animaux, caractérisés par des trophozoïtes mobiles grâce à la formation de pseudopodes et des kystes le plus souvent multinucléés.

ORDRE DES ACANTHOPODIDA

Famille des Hartmanellidae (ou Acanthamoebidae)

Il s'agit de protozoaires libres, occasionnellement parasites, caractérisés par des trophozoïtes mobiles grâce à des lobopodes (pseudopodes filiformes) et des kystes uninucléés à paroi plissée. Il n'y a pas de stade flagellé.

Genre *Hartmanella* Alexeieff 1912 (ou *Acanthamoeba*)

ORDRE DES SCHIZOPYRENIDA

(dont la position taxinomique n'est pas certaine)

Famille des Vahlkampfiidae

Ce sont des protozoaires libres, occasionnellement parasites, caractérisés par des trophozoïtes amiboïdes mobiles par pseudopodes globuleux et flagellés transitoires. Le kyste est uninucléé et à membrane lisse.

Genre *Naegleria* Alexeieff 1912

1. Le genre *ENTAMOEBA* Casadrandi et Barbagallo 1895

1.1 *ENTAMOEBA* DISPAR Brumpt 1925

Historique

Les souches non pathogènes de *E. histolytica*, morphologiquement identiques à l'amibe dysentérique, ont récemment reçu un statut plus tranché: elles rejoignent l'espèce *E. dispar*, déjà proposée par E. Brumpt en 1925 pour désigner ces organismes hors-la-loi.

Longtemps, le concept d'*E. histolytica* non pathogène ("*histolytica*-like") a été débattu. Les observations de non-pathogénicité ne manquaient pas, mais bien les outils qui auraient permis de différencier les uns des autres, des organismes morphologiquement identiques. De plus, la variation dans le temps de l'extériorisation clinique des souches pathogènes perturbe les observations.

Récemment, les autorités en matière d'amibes ont été en mesure de distinguer, par des caractères biochimiques, immunologiques et génétiques, les organismes pathogènes des non pathogènes. Elles ont donc proposé de classer les non-pathogènes dans une espèce séparée et ont repris le nom de *Entamoeba dispar* de Brumpt, la dénomination *Entamoeba histolytica* n'étant plus attribuée qu'aux organismes à pathogénicité démontrée.

Caractères distinctifs

• CARACTÈRES BIOCHIMIQUES

Ils sont basés sur les différences de migration électrophorétique en gel d'agarose, de divers isoenzymes: hexokinase, phosphoglucomutase, aldolase, acétyl-glutaminidase, peptidase, NADP diaphorase. Cela fait déjà quelques années que les zymodèmes d'isolats

Schéma taxinomique

Ordre des Euamoebida
Ordre des Acanthopodida
Ordre des Schizopyrenida

1. Le genre *Entamoeba* Casadrandi et Barbagallo 1895

- 1.1 *Entamoeba dispar*
- 1.2 *Entamoeba hartmanni*
- 1.3 *Entamoeba coli*
- 1.4 *Entamoeba polecki*
- 1.5 *Entamoeba gingivalis*

2. Le genre *Endolimax*

- 2.1 Localisation anatomique et distribution géographique
- 2.2 Morphologie

3. Le genre *Iodamoeba*

- 3.1 Localisation anatomique et distribution géographique
- 3.2 Morphologie

4. Les amibes libres

- 4.1 Présentation générale
- 4.2 Amibes du genre *Naegleria*
- 4.3 Le genre *Acanthamoeba*

Bibliographie

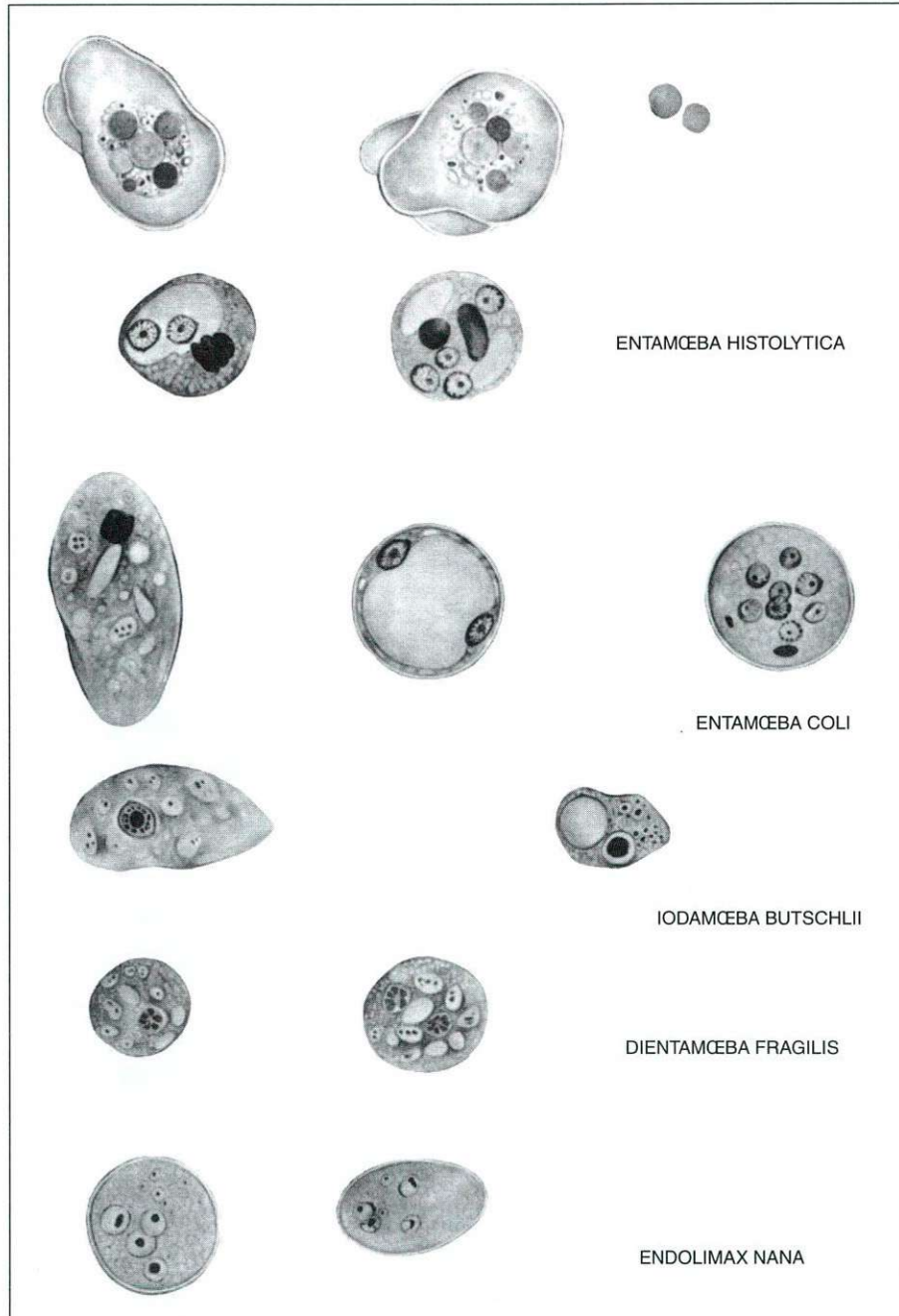
FIGURES

- 5-1 Amibes du tube digestif de l'homme
- 5-2 Kystes d'amibes du tube digestif de l'homme
- 5-3 Structure comparée des noyaux d'amibes
- 5-4 Trophozoïte et kystes de *Naegleria*
- 5-5 Trophozoïte et kystes d'*Acanthamoeba*

Figure 5-1

Amibes du tube digestif de l'homme

Dessin représentant schématiquement trophozoïtes et kystes de chacune des espèces.



de toutes provenances ont été étudiés et classés en pathogènes et non pathogènes.

- CARACTÈRES IMMUNOLOGIQUES

Des anticorps monoclonaux dirigés contre plusieurs protéines de l'amibe permettent le marquage sélectif des souches pathogènes. On cite comme pro-

téines (antigènes) cibles: la lectine d'adhérence GAL/GALNAC, les antigènes de 96 kDa, de 29-30 kDa et de 81-84 kDa, l'antigène de "granules denses aux électrons"...

- CARACTÈRES GÉNÉTIQUES

La reconnaissance de parties du génome permet, par l'utilisation de sondes (sonde P145), par l'analyse de fragments de restriction (après marquage de certains gènes) et par amplification de matériel génétique sélectionné, d'identifier les souches pathogènes.

1.2 *ENTAMOEBA HARTMANNI* Von Prowazek 1912

Cette amibe est une forme non pathogène ressemblant à *E. histolytica*. Morphologiquement, ses trophozoïtes ont plus de 12 µm et ses kystes, à 4 noyaux, ont toujours moins de 10 µm de diamètre. Les différences avec *E. histolytica* portent sur la taille des kystes qui ont, chez cette dernière, plus de 10 µm et sur la disposition de la chromatine nucléaire (voir chapitre 4).

1.3 *ENTAMOEBA COLI* Grassi 1879

Localisation anatomique

Elle vit dans le gros intestin (cæcum et côlon) de l'homme et du singe mais n'envahit pas les tissus et est dépourvue de pouvoir pathogène.

Distribution géographique

Cosmopolite, on peut estimer que 28 p. cent des individus à travers le monde sont porteurs de *E. coli*. Elle est dépourvue de pouvoir pathogène.

Morphologie

Elle est importante à connaître car, vu la fréquence de *E. coli*, son diagnostic différentiel avec *E. histolytica* se pose souvent (figures 5-1, 5-2, 5-3).

- TROPHOZOÏTE

De forme amiboïde, sa taille est de 20-30 µm. Légèrement mobile, il change de forme mais ne se déplace pas beaucoup.

Le cytoplasme avec endoplasme et ectoplasme peu distincts contient des bactéries et de petites vacuoles mais jamais de globules rouges.

Le noyau est plus facilement visible à frais que celui de *E. histolytica*. Sa chromatine se présente en plaques réparties sur la surface de la membrane nucléaire.

- KYTE

De taille très variable (10 à 30 μm), il est généralement plus grand que celui de *E. histolytica*.

Le noyau, unique chez les kystes jeunes, se divise trois fois pour aboutir à un kyste mûr rond ou ovale, à 8 noyaux. Le diagnostic différentiel avec le kyste d'*E. histolytica* qui n'a jamais plus de 4 noyaux devient alors facile. D'autre part, les kystes jeunes à deux noyaux possèdent souvent une grande vacuole de glycogène en position centrale, refoulant les noyaux en périphérie.

Le cytoplasme possède des granules grossiers qui font ressembler l'intérieur du kyste à une éponge. Les corps chromatoïdes sont moins fréquents et plus fins que chez *E. histolytica*.

1.4 *ENTAMOEBA POLECKI* Von Prowazek 1912

C'est une amibe plus fréquente chez le porc que chez l'homme. Elle ressemble à *E. coli*, avec un kyste à 1 ou 2 noyaux. Elle n'est pas pathogène.

1.5 *ENTAMOEBA GINGIVALIS* Gros 1849

Localisation anatomique

On la trouve dans la cavité buccale de l'homme, du chien et du cheval, entre les dents et dans le sillon

gingival. Sa présence est souvent liée à une mauvaise hygiène buccale.

Morphologie

Le trophozoïte, de 10 à 20 μm de diamètre, a tendance à former plusieurs pseudopodes en même temps. L'endoplasme granuleux contient des vacuoles avec des bactéries phagocytées et d'autres débris. L'ectoplasme transparent est nettement distinct. La chromatine en granules est répartie sur la paroi nucléaire, quelques grains sont libres dans le noyau et il y a un caryosome central.

Le kyste n'a jamais été décrit.

Pathogénicité

Cette amibe n'a pas de pouvoir pathogène propre. Cependant on la retrouve souvent associée à une infection préexistante des muqueuses buccales (levures, bactéries). Elle se trouve alors dans les sécrétions purulentes (pyorrhée).

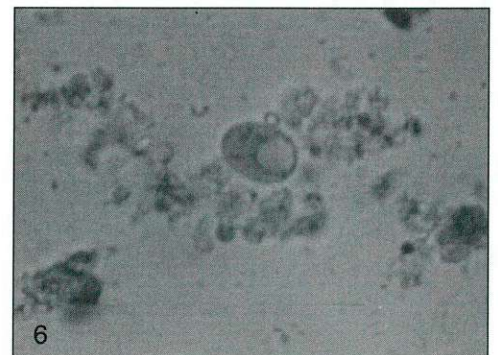
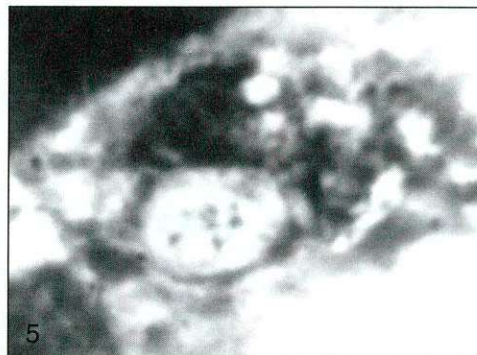
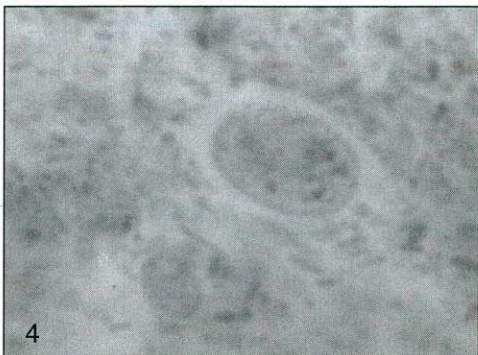
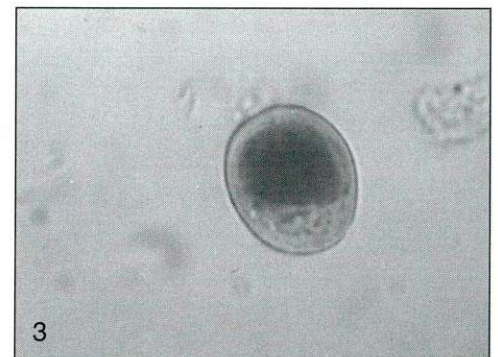
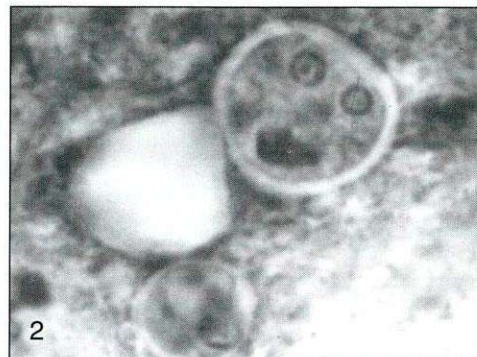
Elle n'est jamais présente dans les selles car avalée, elle est détruite par le suc gastrique et la bile.

Tous les essais d'adaptation à des animaux de laboratoire sont restés infructueux.

Figure 5-2

Kystes d'amibes du tube digestif de l'homme.

1. *Entamoeba coli*
2. *Entamoeba coli* (hématoxyline ferrique)
3. *Entamoeba coli* (jeune, avec un noyau et grande vacuole)
4. *Endolimax nana*
5. *Endolimax nana*
6. *Iodamoeba butshlii*



2. *ENDOLIMAX NANA* Wenyon and O'Connor 1917

2.1 Localisation anatomique et distribution géographique

Ce parasite, dépourvu de pouvoir pathogène, vit dans la lumière du gros intestin de l'homme. Il est cosmopolite.

2.2 Morphologie

Trophozoïte

De 6 à 12 μm de diamètre, il se déplace avec des mouvements lents. L'endoplasme granuleux, contenant des vacuoles avec des bactéries et l'ectoplasme transparent sont bien distincts. Le noyau est difficilement visible à frais et pourtant le gros caryosome souvent excentrique est très réfringent. La coloration à l'hématoxyline fait ressortir l'absence de chromatine sur la membrane nucléaire.

Kyste

Ovoïde ou arrondi, il mesure de 8 à 10 μm et contient quatre noyaux dont la membrane est très fine et le volumineux caryosome excentrique (figures 5-1, 5-2, 5-3).

3. *IODAMCEBA BUTSCHLI* Von Prowazek 1912

3.1 Localisation anatomique et distribution géographique

Il vit dans la lumière du gros intestin de l'homme et du porc où il n'exerce aucun pouvoir pathogène. C'est un parasite cosmopolite.

3.2 Morphologie

Trophozoïte

Sa taille est de 9 à 13 μm . L'endoplasme et l'ectoplasme sont difficiles à dissocier. L'endoplasme contient des vacuoles alimentaires et des bactéries. Le noyau présente un seul grand caryosome.

Kyste

La taille et la forme sont très variables (9 à 15 μm). Une grande vacuole de glycogène (colorée en brun par le lugol) et le noyau unique avec grand caryosome central et logettes périnucléaires sont les principaux repères pour son diagnostic (figures 5-1, 5-2, 5-3).

4. Les amibes libres

4.1 Présentation générale

Dispersion

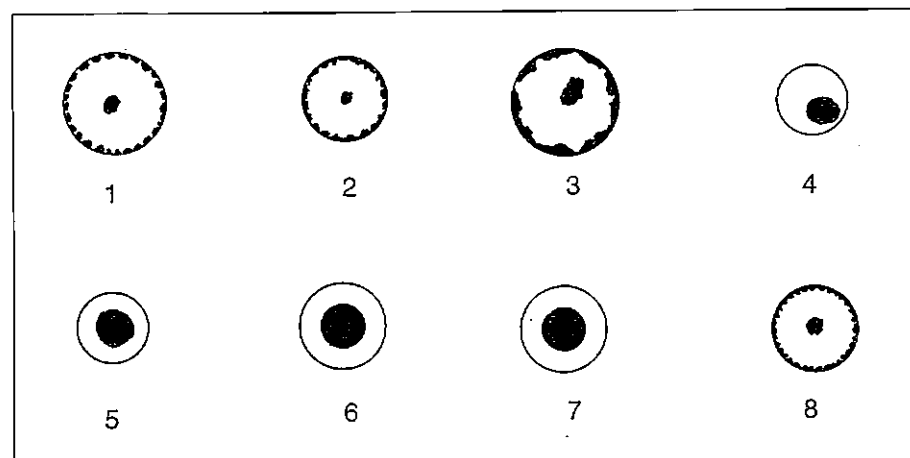
Les amibes libres peuvent vivre partout où il y a des bactéries et des déchets organiques qui constituent leur principale source de nourriture. On les retrouve dans les lacs, rivières, canaux, piscines, puits, réseaux de distribution d'eau, aquariums, terre humide, boues, égouts et sur n'importe quelle muqueuse humide de sécrétions (voies respiratoires, voies urinaires, conjonctive oculaire et surface humidifiée et exposée de la cornée, tube digestif de l'homme et d'animaux les plus divers à sang froid ou à sang chaud). Ces amibes ne nécessitent pas, pour leur survie et leur multiplication, une température de 37 °C comme c'est le cas pour les représentants de la famille des Entamoebidae.

Toutefois, l'élévation de température et le foisonnement de bactéries et de déchets organiques favorisent leur prolifération. Les piscines chauffées, ainsi que les lacs, rivières, canaux dont l'eau sert à refroidir les machines des industries riveraines ou les réacteurs de centrales nucléaires, permettent une multiplication

Figure 5-3

Structure comparée des noyaux d'amibes

1. *Entamoeba histolytica*
2. *Entamoeba hartmanni*
3. *Entamoeba coli*
4. *Endolimax nana*
5. *Iodamoeba butschlii*
6. *Naegleria*
7. *Acanthamoeba*
8. *Entamoeba histolytica* (trophozoïte *histolytica*)



anormale de la flore microbiologique de l'eau et particulièrement des amibes libres.

Cette très large distribution rend le contact de l'homme avec ces organismes inévitable: le contrôle et la prévention de ce contact est problématique.

Vie parasitaire

Contrairement aux amibes du genre *Entamoeba* qui sont des parasites permanents du tube digestif des vertébrés dont le passage en milieu extérieur (kystes) n'est que transitoire et accidentel (parasitisme obligatoire), les amibes des genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* sont des parasites libres dans le milieu extérieur, dont le passage dans les tissus de l'hôte n'est que transitoire et accidentel (parasites facultatifs, occasionnels).

4.2 Amibes du genre NAEGLERIA

Localisation anatomique

Chez l'homme, on peut les retrouver le plus fréquemment dans la totalité du tube digestif et dans l'arbre bronchique. La porte d'entrée est le carrefour naso-pharyngé, soit par la cavité buccale, soit par les fosses nasales.

Morphologie

Elles se présentent, au cours de leur cycle évolutif, sous trois formes.

Le trophozoïte amiboïde, de 10 à 20 µm de diamètre, émettant des pseudopodes, possède un noyau unique, un endoplasme et un ectoplasme distincts. C'est la forme parasitaire.

Le trophozoïte flagellé, ovale de 8 µm sur 15, possède deux à quatre flagelles antérieurs, une vacuole postérieure et un noyau unique. C'est la forme libre.

Le kyste sphérique uninucléé dispose d'une paroi double dont la surface externe est lisse (figure 5-4).

La transformation de trophozoïte amiboïde en trophozoïte flagellé peut être obtenue au laboratoire par contact avec l'eau distillée. Les trophozoïtes flagellés sont évidemment résistants dans le milieu extérieur. Ils s'y multiplient en se nourrissant de matières organiques, y compris les bactéries.

Pouvoir pathogène

Naegleria fowleri est capable de traverser la muqueuse tapissant les fosses nasales et passant de l'autre côté de la lame criblée de l'os ethmoïde, elle se trouve dans la boîte crânienne, au contact du lobe frontal du cerveau. Dans la substance cérébrale, elle se

multiplie de manière foudroyante et provoque une fonte nécrotique qui aboutit au coma et à la mort du patient dans un délai de 30 heures à 5 jours après la pénétration des parasites: c'est la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP).

La dénomination MEAP distingue immédiatement cette affection de l'abcès amibien du cerveau, secondaire à une invasion d'*Entamoeba histolytica* au départ de l'intestin. Les cas, heureusement peu nombreux, décrits dans différentes parties du monde ont été contractés dans des piscines chauffées, des lacs d'eau douce, des sources d'eau chaude. La baignade dans ces eaux amène les muqueuses respiratoires supérieures en contact avec l'eau contaminée.

Diagnostic (mise en évidence des amibes)

• CHEZ LE PATIENT

On examinera le liquide céphalo-rachidien à frais. On y recherchera les trophozoïtes amiboïdes mobiles, à différencier des polynucléaires pouvant émettre des pseudopodes.

L'examen après coloration à l'hématoxyline permettra de distinguer plus facilement les amibes des nombreux polynucléaires neutrophiles.

La mise en culture, l'inoculation aux animaux de laboratoire pour démonstration du pouvoir pathogène, l'examen anatomo-pathologique des pièces d'autopsie permettront de préciser l'étiologie amibienne.

• DANS LES EAUX SUSPECTES

On pratiquera la filtration d'un volume d'eau connu (1 à 10 litres) sur filtre millipore (1,2 µm de diamètre de pores) puis on mettra en culture les amibes retenues à la surface du filtre en retournant celui-ci sur une boîte de Pétri garnie de gélose couverte d'une suspension de bactéries tuées. On déterminera ensuite leur pouvoir pathogène et leur spectre antigénique pour détermination de l'espèce.

• LA DÉTERMINATION DU POUVOIR PATHOGÈNE

Se fait par la culture *in vitro* à 37 °C et 45 °C. Seules les amibes pathogènes se multiplient à ces températures. L'inoculation à la souris par injection intracérébrale ou par instillation nasale est suivie de la mort de l'animal en 4 à 8 jours si le parasite est pathogène (*Naegleria fowleri*).

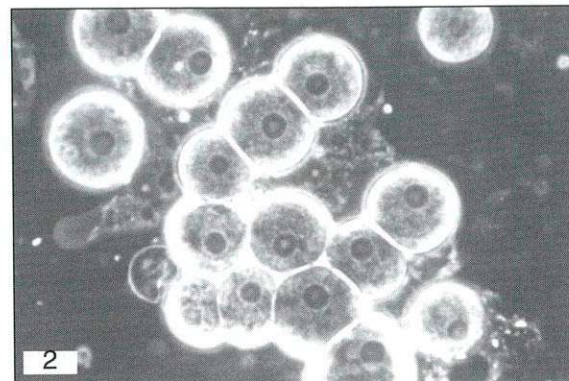
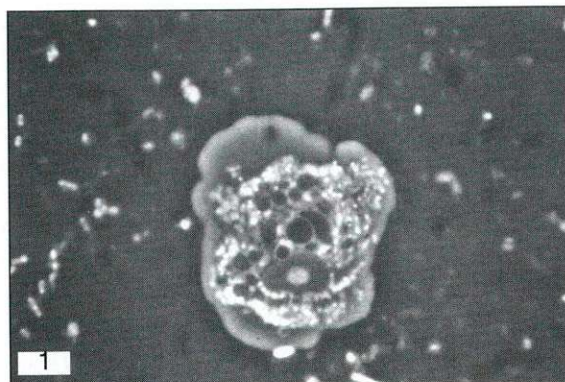
Prévention et traitement

Etant donné la présence de ces organismes dans les eaux de consommation et dans les collections

Figure 5-4

Trophozoïte et kystes de *Naegleria*

1. Trophozoïte amiboïde
2. Kystes à paroi lisse



d'eau fréquentées par le public, l'accent doit être mis sur la nécessité d'un contrôle rigoureux de ces eaux.

La filtration sur sable et l'addition de chlore sont deux moyens très efficaces à condition d'être contrôlés et mis au point par des autorités compétentes, ce qui est rarement le cas, comme le prouve la fréquence des isollements de ces parasites faits à partir des eaux de distribution urbaine, d'eaux de piscine et même d'eaux minérales.

Le traitement curatif arrivera souvent trop tard. Signalons l'efficacité relative de l'Amphotéricine B® contre *Naegleria fowleri*.

4.3 Le genre *ACANTHAMCEBA* (*HARTMANELLA*)

Localisations anatomiques

Les représentants du genre *Hartmanella* peuvent causer une pathologie des muqueuses digestives et respiratoires ainsi que des méningites dont l'évolution est moins rapide que celles provoquées par *Naegleria*. Ils peuvent de plus coloniser les couches superficielles de la cornée (kératite amibienne).

Morphologie

Ces amibes se présentent, au cours de leur cycle évolutif, sous deux formes.

Le trophozoïte de 12 à 15 µm est hérissé de pseudopodes effilés ou filamenteux avec endoplasme et ectoplasme distincts, vacuoles alimentaires contenant des bactéries, noyau unique avec gros nucléole central et membrane nucléaire très nette (figure 5-3).

Le kyste est polygonal, avec un seul noyau et une paroi double dont la surface extérieure est plissée (figure 5-5).

Dispersion

Le faible nombre de cas connus de ces affections contraste avec la très large distribution des agents étiologiques dans la nature. Le portage rhino-pharyngé a été mis en évidence chez 7 à 50 p.100 des petits mammifères. Dans les mares d'eau superficielle, on a compté jusqu'à 46.000 amibes par ml.

On ne connaît pas le facteur qui déclenche la pathogénicité, ou alors les moyens de diagnostic sont insuffisants pour avoir une mesure exacte de la fréquence des processus pathologiques.

Pathologie

Bien plus rare, la méningo-encéphalite est ici aussi observée. Elle est moins aiguë que chez *Naegleria*.

Depuis 1975, l'attention a été attirée par la fréquence des ulcères cornéens à *Acanthamoeba*.

L'étiologie amibienne comme cause de rejet de greffe de cornée est bien connue mais il apparaît que les lésions peuvent aussi survenir sur des cornées en dehors de toute agression chirurgicale:

- dans les régions à climat sec, où la poussière, le vent, la chaleur, l'insolation et les traumatismes par le contact avec des épis de mil fragilisent la surface cornéenne; la carence en vitamine A et des lésions préexistantes dues au trachome peuvent préparer le terrain;
- chez les porteurs de lentilles de contact qui causent une irritation et délimitent une cavité où les amibes peuvent se multiplier.

Diagnostic

Dans la méningite, le LCR montrera surtout des mononucléaires. La biopsie cérébrale confirmera le diagnostic.

Les frottis de cornée seront examinés au microscope. On y reconnaîtra les kystes d'aspect polygonal, à paroi chiffonnée. Les trophozoïtes sont très difficiles à repérer.

Traitement

Le miconazole sera appliqué localement en cas de kératite. Les antibiotiques semblent être utiles préventivement, en cas d'intervention sur la cornée.

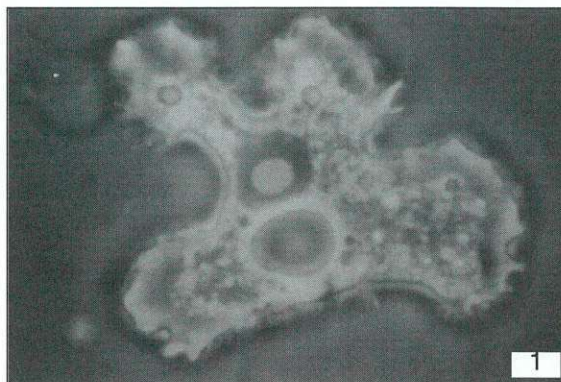
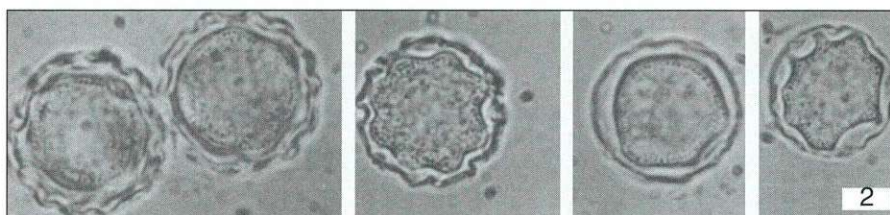


Figure 5-5

Trophozoïte et kystes d'*Acanthamoeba*

1. Trophozoïte amiboïde de *A. culbertsoni* avec pseudopodes filiformes (microphotographie)
2. Kystes à paroi plissée de *A. castellani* (dessins)



DWYER DM. (1972) Analysis of the antigenic relationships among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* and *Entamoeba*. 1. Quantitative fluorescent antibody methods, *Journal of Protozoology*, **19**, 316-325.

JADIN JB. (1974) Colloque international sur la méningoencéphalite amibienne primitive et les amibes libres, *Annales de la Société belge de Médecine tropicale*, **54**, 233-446.

VISVESVARA GS, JONES DB, ROBINSON NM. (1975) Isolation, identification and biological characterization of *Acanthamoeba polyphaga* from a human eye, *American Journal of Tropical Medicine and hygiene*, **24**, 784-790.

PUSSARD M, PONS R. (1977) Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, amœbidae), *Protistologica*, **13**, 557-598.

HAMBURG A, DE JONCKHEERE JF. (1980) amœbic keratitis, *Ophtalmologica (Basel)*, **181**, 74-80.

BAILINGER J. (1982) Coprologie parasitaire et fonctionnelle, Bordeaux, France.

SHARMA S, SRINIVASAN M, GEORGE C. (1990) Diagnosis of *acanthamoeba* keratitis; a report of four cases and review of the literature, *Indian Journal of Ophthalmology*, **38**, 50-56.

BLANC DS. (1992) Determination of taxonomic status of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* zymodemes using isoenzyme analysis, *Journal of Protozoology*, **39**, 471-479.

DIAMOND LS, CLARK CG. (1993) A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker 1911). Separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**, 340-344.

BIBLIOGRAPHIE

Protozoaires ciliés

Le genre *Balantidium* (Vestibulifera)

6

Caractéristiques du genre

Toutes les espèces de ce genre sont des parasites obligatoires et se présentent alternativement sous forme de trophozoïte garni de cils et de kyste à paroi épaisse.

Le corps est ovoïde. On note la présence de deux noyaux de type différent, le macronucléus (polyploïde) allongé et le micronucléus (haploïde) petit et sphérique. Le cytoplasme granuleux contient une vacuole contractile en relation avec le cytophyge (pore excréteur). Elle est située à la partie postérieure de la cellule tandis que la fente cytostomale occupe l'avant du parasite. Les cils sont répartis uniformément sur tout le corps du trophozoïte; ils sont plus longs dans et autour du cytostome.

Les parasites de ce genre se multiplient dans le côlon de leur hôte et sont doués d'un pouvoir d'invasion tissulaire. La distinction entre les espèces n'est pas facile. Celles-ci ont été le plus souvent nommées d'après leur hôte habituel mais on n'est pas certain de la spécificité pour l'hôte. Seul *Balantidium coli* est pathogène pour l'homme.

Il y a deux vacuoles contractiles, l'une proche du centre du parasite, l'autre tout près de l'extrémité postérieure. Elles drainent l'eau en excès dans le cytoplasme et assurent ainsi le maintien de la pression osmotique. Le cytoplasme est parsemé de phagosomes contenant des grains d'amidon, des fragments cellulaires, des bactéries, des érythrocytes, etc... L'alimentation est principalement à base d'amidon. La surface du parasite est entièrement couverte de rangées parallèles, longitudinales, de cils (figure 6-1).

Le kyste est ovale ou sphérique et mesure de 40 à 60 μm de diamètre; il a une paroi épaisse et claire apparaissant double; le macro et le micronucléus sont peu visibles; le cytoplasme est grossièrement granuleux et le parasite, détaché de l'ample paroi kystique, peut se mouvoir quelque peu à l'intérieur.

Le kyste ingéré se transforme en trophozoïte dans la lumière du côlon. Celui-ci peut rester saprophyte et se nourrir de bactéries et de débris alimentaires ou provoquer des ulcérations de la paroi. De toutes façons, il se multiplie. L'enkystement se fait également dans le côlon. Les kystes sont alors rejetés dans le milieu extérieur avec les selles.

1.2 Hôtes

L'hôte le plus fréquent est le porc; le singe et les rongeurs sont moins importants. Le parasitisme de l'homme est occasionnel. L'hôte expérimental le plus utilisé est le cobaye.

1.3 Pouvoir pathogène

B. coli attaque la paroi intestinale (côlon, rectum) même saine. Il cause une diarrhée muqueuse ou muco-sanguinolente pouvant présenter un caractère d'extrême gravité.

La lésion est un ulcère de la paroi du côlon, à collet plus large que celle d'*E. histolytica*. Les lésions sont très localisées et restent superficielles (pas de métastase); les ulcérations sont rondes ou de forme

Caractéristiques du genre

1. *Balantidium coli*

- 1.1 Cycle évolutif, morphologie et caractères biologiques
- 1.2 Hôtes
- 1.3 Pouvoir pathogène
- 1.4 Diagnostic
- 1.5 Traitement
- 1.6 Transmission et épidémiologie

2. Autres ciliates parasites

3. Protozoaires ciliés non parasites

Bibliographie

FIGURE

6-1 Trophozoïte et kyste de *Balantidium coli*

1. *BALANTIDIUM COLI*

1.1 Cycle évolutif, morphologie et caractères biologiques

Le trophozoïte est ovoïde et de grande taille (60-80 μm /30-50 μm) avec un cytostome subterminal à la partie antérieure plus étroite. Le cytophyge est à l'extrémité postérieure plus large. Le macronucléus est réniforme et le micronucléus, arrondi, est situé contre la face concave du macronucléus, à peu près en son centre.

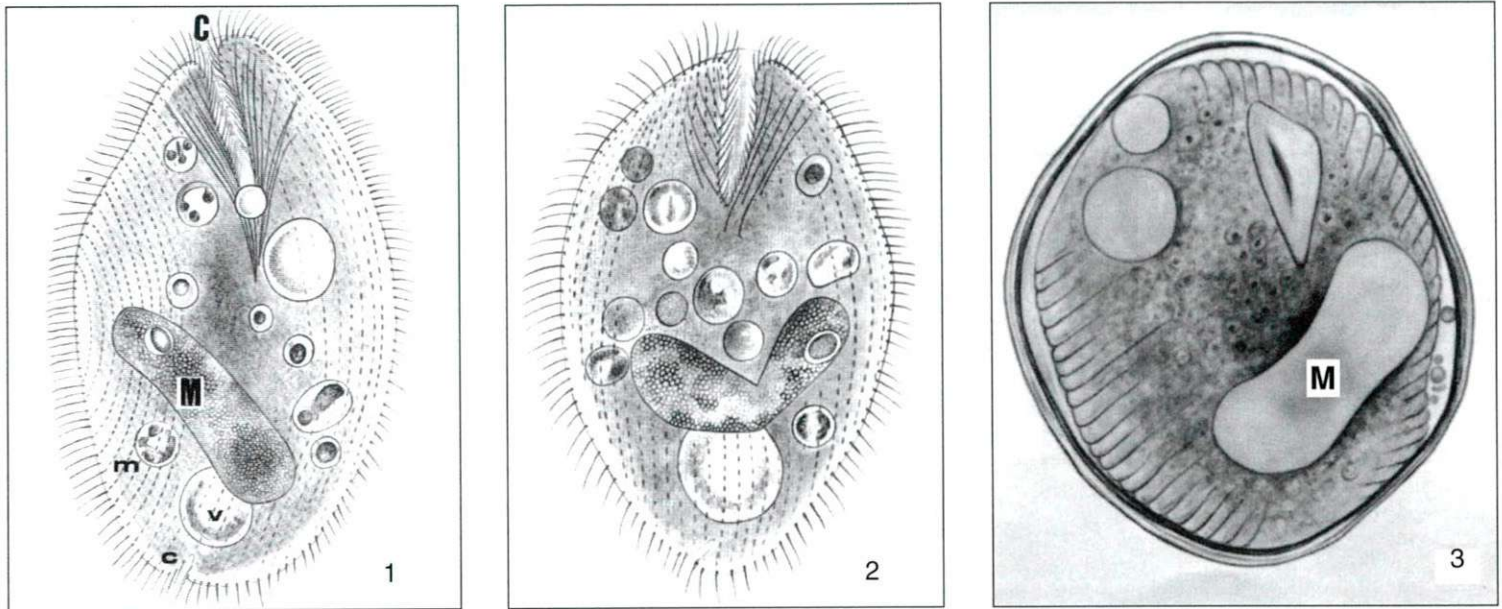


Figure 6-1

Trophozoïte et kyste de *Balantidium coli*:

1. dessin de trophozoïte
2. dessin de trophozoïte (en mitose)
3. dessin de kyste

- C cytostome
 c cytopye
 M macronucleus
 m micronucleus
 v vacuole pulsatile

irrégulière; les bords sont flous et le centre est couvert de pus et de matériaux nécrosés. L'incision de la lésion fait sourdre du mucus mélangé de pus contenant de nombreux parasites.

L'infection peut prendre un caractère chronique ou même devenir asymptomatique (porteurs de kystes). Ce statut est cependant moins fréquent que pour l'amibiase.

Un régime riche en hydrates de carbone favorise la multiplication du parasite et augmente donc la sensibilité à l'infection tandis qu'un excédent en protéines agit en sens inverse.

Les lésions chez le porc sont plus bénignes que chez l'homme.

1.4 Diagnostic

Dans les cas symptomatiques, on pratiquera l'examen des selles, la rectoscopie, la biopsie d'une lésion. On y trouvera des trophozoïtes reconnaissables à leur grande taille (3 fois plus grands que les plus grands flagellés) et, dans les examens à frais, à leur extraordinaire rapidité de mouvement de translation. La culture est possible sur milieu de Dobell et Laidlaw.

Chez les porteurs sains, les kystes seront recherchés dans les selles à l'examen direct et après concentration. Ils sont reconnaissables à leur grande taille, à leur paroi apparaissant double et au flou du contour

du parasite intrakystique (cils). Les colorations extemporanées (lugol ou Bailenger) sont utiles.

1.5 Traitement

Il est à base de métronidazole, cyclines (flore bactérienne associée). Les schémas thérapeutiques sont superposables à ceux de l'amibiase intestinale.

1.6 Transmission et épidémiologie

La transmission se fait par contact féco-oral (mains sales, eau, mouches), par l'intermédiaire des kystes qui constituent le stade infectant. Ils résistent deux semaines environ dans l'eau à température ambiante. Le réservoir est apparemment exclusivement humain: les essais de transmission des kystes du porc à l'homme ont échoué et les isolats provenant d'animaux et de l'homme sont distinguables sérologiquement (immobilisation à l'aide de sérums immuns).

Le parasite est cosmopolite mais la prévalence est nettement plus élevée en zones tropicales, particulièrement l'Amérique latine, les îles du Pacifique, les Philippines, la Nouvelle Guinée, l'Asie centrale et occidentale (Iran). En Afrique, les infections étaient connues dans la région de l'Ituri (Nord-Est du Zaïre).

Dans certaines régions, le porc est considéré comme réservoir du parasite humain: en Nouvelle-Guinée, où près de 50 p.100 de la population hébergerait ce parasite, la promiscuité avec le porc est évidente. Par contre, en Iran, pays musulman, la

prévalence serait due à la transmission d'homme à homme.

2. Autres ciliates parasites

Les ciliates parasites sont très nombreux (parasites des poissons d'eau douce, entre autres), mais la plupart sont des commensaux ou des symbiontes. Un groupe particulièrement important est constitué par les ciliales du tube digestif des ruminants: grâce à leurs enzymes, ceux-ci jouent un rôle dans la digestion de la cellulose et la synthèse de protéines.

Les genres *Entodinium*, *Epidinium*, *Eodinium*, *Diplodinium*, *Eremoplastron*, *Eudipladinium*, etc. sont régulièrement retrouvés dans la panse de divers herbivores.

Les énormes quantités de protozoaires du rumen constituent environ 20 p.100 des protéines qui atteignent l'intestin de ces herbivores. Chez les ruminants, la digestibilité des protéines de protozoaires est de 91 p.100 contre 74 p.100 pour les bactéries et 84 p.100

pour les levures. Les protéines de protozoaires sont donc de valeur nutritive supérieure.

L'accumulation d'amylopectine par les ciliates constitue en outre une source d'hydrate de carbone pour l'hôte tandis que les acides gras volatiles produits par les parasites sont également récupérés.

Bref, depuis un siècle, on sait que les ciliates du tube digestif des ruminants fournissent à leur hôte un cinquième de la nourriture dont ils ont besoin.

Il n'est cependant pas vrai de dire que les ciliates sont indispensables à l'assimilation de la cellulose par la vache. La suppression de la flore protozoaire du tube digestif de cet animal ne diminue pas sa capacité de digestion de l'herbe. Les bactéries présentes dans le rumen jouent un rôle équivalent.

3. Protozoaires ciliés non parasites

L'embranchement des Ciliophora comprend un nombre impressionnant d'espèces non parasites, vivant dans l'eau et le sol. Ce sont les opalines, les paramécies etc...

BIBLIOGRAPHIE

- LAMY PL, ROUX MH. (1950) Remarques morphologiques, biologiques et spécifiques sur les balantidiums de culture, *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **43**, 424-427.
- ZAMAN V. (1970) Ultrastructure of the balantidium, *South-East Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **1**, 225-230.
- KNIGHT R, WRIGHT GS. (1978) Progress report: Intestinal protozoa, *Gut*, **19**, 940-953.
- COLEMAN GS. (1980) Rumen Ciliate Protozoa. In : WHR Lumsden, R Muller, JR Baker (Eds), *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **18**, 121-175.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ (1982) *Infections intestinales à protozoaires et à helminthes*, Série de Rapports Techniques, **666**, 58.
- ZAMAN V. (1993) *Balantidium coli*, Morphology and Life Cycle, In JPKreier and JR Baker (Eds), *Parasitic Protozoa*, **3**, 43-63.

Protozoaires Flagellés (Retortamonadida, Diplomonadida, Trichomonadida et Mastigamœbida) Parasites du tube digestif et des cavités naturelles La lambliaose, la trichomonose

7

Schéma taxinomique

ORDRE DES RETORTAMONADIDA

2 à 6 flagelles, dont un à direction postérieure associé à un cytostome. Sont en général parasites.

Genres *Chilomastix*, *Retortamonas*.

ORDRE DES DIPLOMONADIDA

Corps à symétrie bilatérale avec deux noyaux, chaque moitié comportant trois ou quatre flagelles et les corpuscules accessoires. La plupart sont parasites.

Famille des Hexamitidae

8 flagelles, disque ventral.

Genre *Giardia*.

Famille des Enteromonadidae.

Genre *Enteromonas*.

ORDRE DES TRICHOMONADIDA

4 à 6 flagelles dont un récurrent avec membrane ondulante associée et un axostyle; pas de kystes. Tous sont parasites.

Famille des Trichomonadidae

Costa présente; appareil parabasal associé à des filaments.

Genre *Trichomonas*.

Famille des Monocercomonadidae.

Genre *Histomonas*.

Ordre des Mastigamœbida

Genre *Dientamoeba*.

1. *CHILOMASTIX MESNILI*

1.1 Morphologie

Trophozoïte

Il est piriforme à extrémité postérieure pointue. Il mesure 10 à 15 μm , possède 1 noyau et quatre flagelles dont trois dirigés vers l'avant.

Un large sillon, en forme de S, à la partie antérieure du parasite fait office de cytostome et abrite le quatrième flagelle. Le noyau se trouve en position antérieure et les flagelles prennent leur origine à proximité de quatre blépharoblastes (figure 7-1).

Kyste

Il est piriforme, plus étroit à l'avant et renflé à l'arrière. Le sillon cytostomal reste bien visible, le noyau unique est situé à l'avant et les structures flagellaires atrophiées sont retrouvées dans le cytoplasme. Il mesure environ 8 μm (figure 7-1).

1.2 Localisation

Géographiquement cosmopolite, il vit et se multiplie dans le cæcum et le côlon.

1.3 Hôtes

L'homme (3 à 10 p. cent de porteurs), le porc et la plupart des singes l'hébergent.

1.4 Pouvoir pathogène

Classiquement inexistant, il peut provoquer des diarrhées banales par irritation (colite) en cas de parasitisme intense.

Schéma taxinomique

Ordre des Retortamonadida
Ordre des Diplomonadida
Ordre des Trichomonadida
Ordre des Mastigamœbida

1. *Chilomastix mesnili*

1.1 Morphologie
1.2 Localisation
1.3 Hôtes
1.4 Pouvoir pathogène
1.5 Culture

2. *Giardia intestinalis*

2.1 Synonymes
2.2 Espèces et hôtes
2.3 Morphologie, structures
2.4 Cycle évolutif
2.5 Pathologie et immunité
2.6 Diagnostic
2.7 Culture
2.8 Traitement
2.9 Épidémiologie

3. Le genre *Trichomonas*

3.1 *Trichomonas hominis*
3.2 *Trichomonas tenax*
3.3 *Trichomonas vaginalis*

4. Description brève de quelques autres flagellates

4.1 *Histomonas meleagridis*
4.2 *Retortamonas intestinalis*
4.3 *Enteromonas hominis*
4.4 *Dientamoeba fragilis*

Bibliographie

FIGURES

- 7-1 Flagellaires intestinaux les plus courants
7-2 Trophozoïte et kyste de *Giardia intestinalis*
7-3 Cycle évolutif de *Giardia intestinalis*
7-4 Espèces du genre *Trichomonas* infectant l'homme

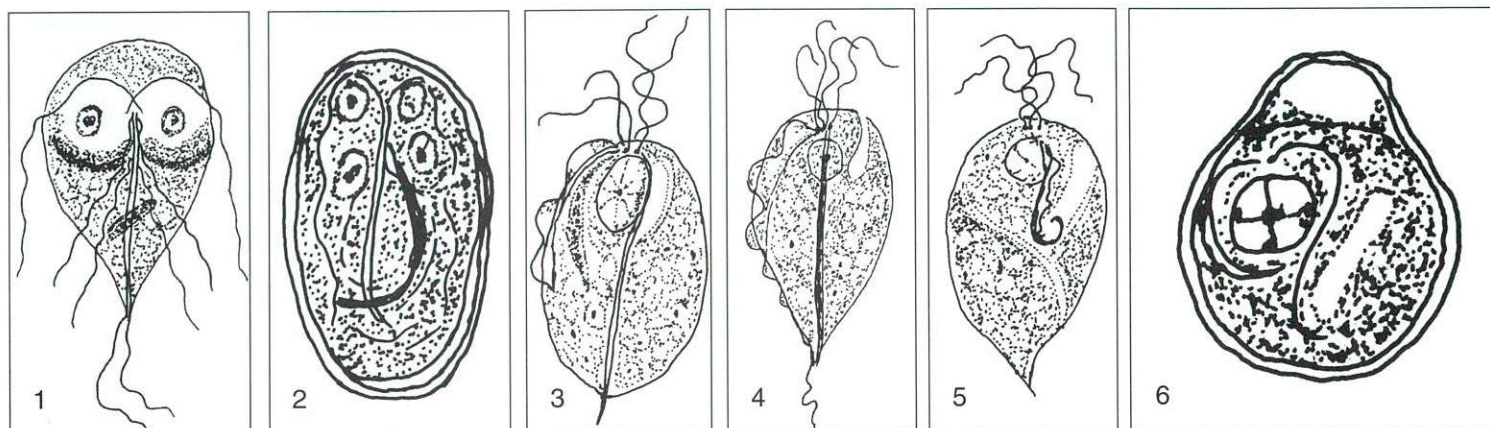


Figure 7-1

Flagellates intestinaux les plus courants:

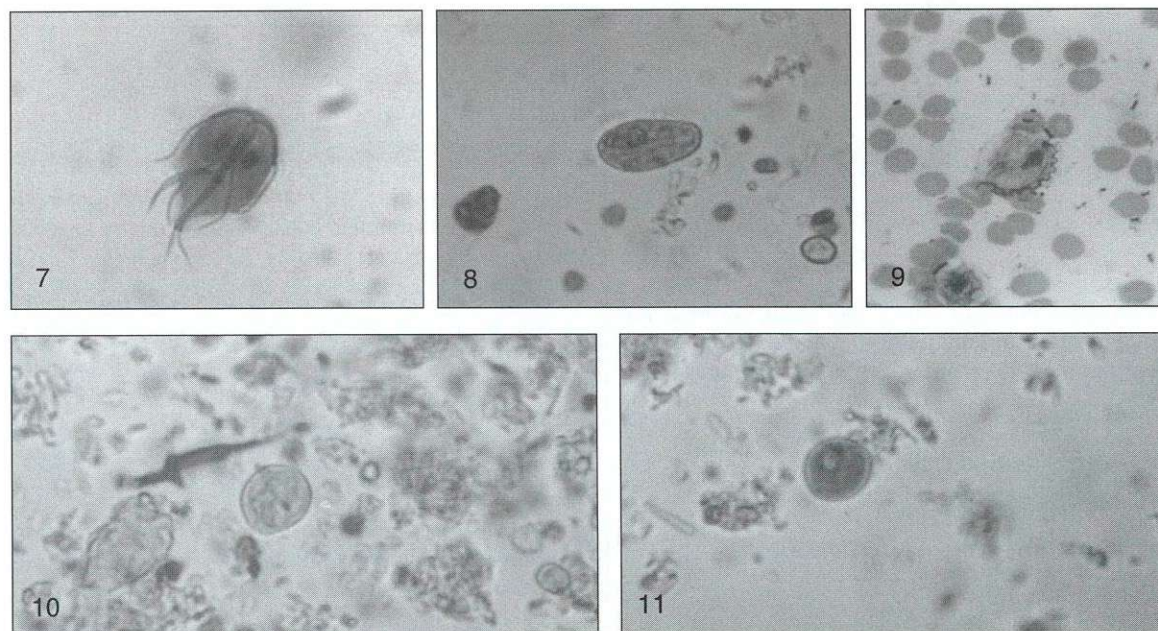
Chilomastix, *Giardia*, *Trichomonas*

DESSINS

1. Trophozoïte de *Giardia intestinalis*
2. Kyste de *Giardia intestinalis*
3. Trophozoïte de *Trichomonas vaginalis*
4. Trophozoïte de *Trichomonas intestinalis*
5. Trophozoïte de *Chilomastix mesnili*
6. Kyste de *Chilomastix mesnili*

PHOTOGRAPHIES

7. Trophozoïte de *Giardia intestinalis*
8. Kyste de *Giardia intestinalis*
9. Trophozoïte de *Trichomonas intestinalis*
10. Kystes de *Chilomastix mesnili*
11. idem



1.5 Culture

Elle est possible dans les milieux usuels pour les flagellates intestinaux (voir chapitre 19).

2. *GIARDIA INTESTINALIS* Lambl 1853

2.1 Synonymes

Giardia duodenalis (Davaine 1875), *Giardia lamblia* (Kofoid et Christiansen 1915).

2.2 Espèces et hôtes

On peut, sur base de la morphologie et particulièrement celle des "median bodies", distinguer trois groupes de *Giardia*:

Giardia intestinalis, parasite de reptiles, oiseaux, mammifères y compris l'homme;

Giardia muris, parasite de rongeurs (souris, hamster), oiseaux, reptiles;

Giardia agilis, parasite d'amphibiens.

2.3 Morphologie, structures

Trophozoïte

Les deux noyaux sont situés de part et d'autre de la ligne médiane, dans la partie antérieure, large, du parasite.

Le corps est aplati dans le sens dorsoventral, donnant une symétrie bilatérale.

La face dorsale est convexe, la face ventrale concave. Celle-ci porte une structure en forme de disque située sous les noyaux et pouvant faire ventouse grâce à un rebord circulaire rigide. Des microtubules en spirale serrée donnent à la ventouse sa rigidité; la membrane plasmatique du parasite est sous-tendue de microtubules en rangées régulières, procurant au corps du trophozoïte son élasticité.

Deux "corps médians", en forme de virgule épaisse, sont disposés transversalement derrière la ventouse; leur rôle est inconnu. Ils sont composés de torsades de microtubules.

Le cytosquelette est principalement constitué de tubulines mais d'autres protéines caractéristiques du genre, appelées "giardines", entrent dans la composition des structures du disque ventral rigide.

Le trophozoïte possède huit flagelles:

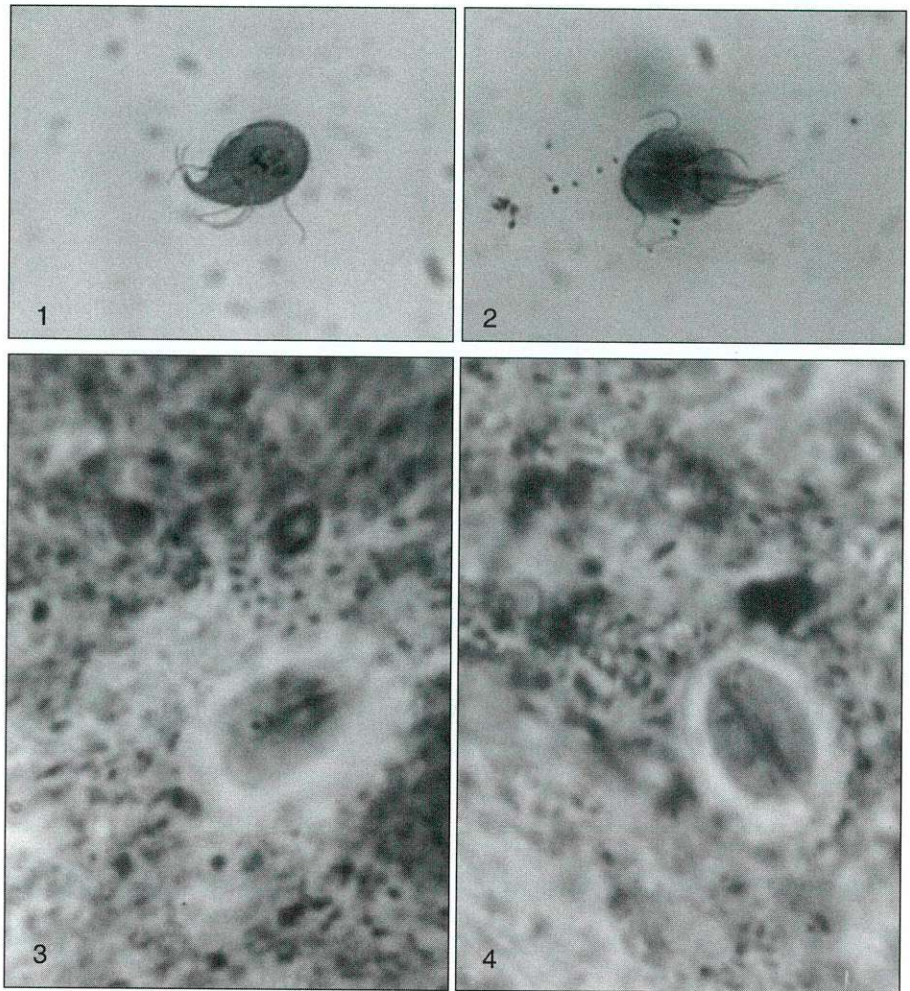
- deux antéro-latéraux, prenant leur origine devant les noyaux et sortant par la face dorsale;
- deux postéro-latéraux, prenant leur origine entre les noyaux et sortant latéralement par la face ventrale;
- deux fibrilles caudales, prenant leur origine entre les noyaux et sortant par la face ventrale à l'extrémité postérieure, pointue, du parasite;
- deux ventraux, situés au fond du sillon formé par la concavité de la face ventrale. Ces deux flagelles, plus épais que les autres, assureraient par leurs mouvements, l'aspiration nécessaire à l'action de succion de la ventouse.

Les dimensions habituelles du trophozoïte sont de $12 \times 7 \times 2 \mu\text{m}$ (10 à $20 \mu\text{m}$ de longueur). Il se déplace en décrivant une sorte de balancement, évoquant la chute d'une feuille.

Kyste

Il est ovale avec deux à quatre noyaux, tous situés dans la moitié antérieure. Son grand diamètre mesure 8 à $18 \mu\text{m}$.

La paroi épaisse, sans doute composée de chitine, est légèrement détachée du corps du parasite



(aspect de membrane double). Les résidus des structures flagellaires et des corps médians ainsi que des fragments de microtubules en forme de croissant représentant les restes du disque rigide de la ventouse, sont visibles à l'intérieur de la paroi kystique (figures 7-1, 7-2).

2.4 Cycle évolutif

Les deux stades, trophozoïte et kyste, se succèdent dans le tube digestif de l'hôte.

Le kyste pénètre par ingestion dans le tube digestif. Le dékystement a lieu dès la sortie de l'estomac, sous l'influence du milieu acide. Le trophozoïte vit attaché à la muqueuse du duodénum et du premier quart de l'intestin grêle, par l'action de la ventouse ou bien par adhérence aux cellules épithéliales (une liaison chimique par des lectines). En tout cas, l'adhé-

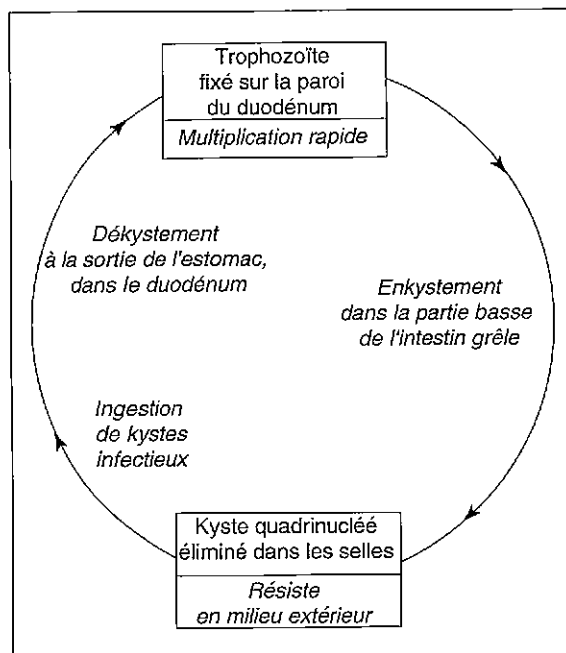
Figure 7-2

Trophozoïtes et kystes de *Giardia intestinalis*

1, 2. Trophozoïtes en culture (remarquer les deux flagelles ventraux qui longent l'axe du parasite).

3, 4. Kystes dans un examen de selles

Figure 7-3

Cycle évolutif
de *Giardia intestinalis*

rence est tenace, rendant le diagnostic difficile. Le mode de multiplication, sans doute par bipartition, reste une énigme vu la présence de deux noyaux dans le trophozoïte avant division. On ne connaît pas la fréquence des échanges de matériel nucléaire entre souches (mélanges possibles de populations de caractères différents). La nutrition se fait par pinocytose et formation de petites vésicules intracytoplasmiques.

Au cours de l'enkystement qui survient lorsque le trophozoïte se détache de la paroi (détachement favorisé par la réponse immune), une division nucléaire donne un kyste à 4 noyaux qui sera entraîné par le transit dans les matières fécales. Une période de maturation de quelques jours semble nécessaire pour le développement du pouvoir infectieux (figure 7-3).

2.5 Pathologie et immunité

L'atrophie de la bordure en brosse de l'épithélium s'accompagne d'une diminution de l'activité disaccharidasique qui conduit à la malabsorption; de plus, on assiste à une disparition des villosités et à une atrophie des microvillosités, entravant le processus de digestion au niveau du duodénum et du jéjunum. L'invasion de la vésicule biliaire n'est pas rare.

Facteurs liés à l'hôte

La réponse immunitaire locale à médiation cellulaire consiste en la multiplication des lymphocytes

intra-épithéliaux et leur migration dans la lumière de l'intestin, suivie de leur attachement aux trophozoïtes. Les lymphocytes T semblent donc intervenir dans le contrôle de l'infection. Il est possible que les macrophages et les monocytes puissent empêcher l'adhérence des trophozoïtes et même les phagocyter.

La présence d'IgA sécrétées dans l'intestin amènerait la résolution de l'infection. Les IgG sont aussi une composante de la réponse immune. En cas de déficience immunitaire (taux d'IgA, IgG et IgM abaissés), on a remarqué une plus grande sensibilité à l'infection, une durée de l'infection nettement prolongée (l'individu continue à éliminer des kystes) et une résistance inhabituelle aux traitements.

L'infection ne semble pas être aggravée chez les sujets atteints d'une infection à VIH.

Facteurs liés au parasite

Les isolats de *G. intestinalis* montrent une hétérogénéité importante au point de vue de leur virulence et de leur infectiosité pour l'homme ou les animaux. On a identifié plus de dix types isoenzymatiques différents et récemment, l'analyse génétique par la technique de "random amplified polymorphic DNA" (RAPD) a pu confirmer le classement des zymodèmes. Il faut souligner l'avantage des techniques d'amplification de séquences géniques qui ne nécessitent pas la mise en culture préalable des parasites et évitent donc les biais de sélection des souches analysées.

La pathogénicité variable des souches serait liée à des antigènes de surface, entre autres certaines protéines riches en cystéine.

La présence d'endosymbiontes (coliformes) dans les trophozoïtes et les kystes de *Giardia* ajoute à leur pouvoir pathogène propre, la possibilité de transmettre des bactéries ou des virus. On a décrit le "*Giardia virus*", présent dans 25 p.100 environ des isolats de *Giardia intestinalis*. Le virus peut freiner la multiplication du parasite en cas d'infection massive, mais aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la présence du virus et le pouvoir pathogène des souches du parasite.

Conséquences pathologiques

L'infection par *G. intestinalis* peut être à l'origine d'épisodes de diarrhée aqueuse avec élimination de grandes quantités de trophozoïtes, suivis de périodes de rémission avec selles normales dans lesquelles on ne retrouve que des kystes. Inappétence, perte de poids, déshydratation (chez l'enfant !) s'expliquent par

la malabsorption et la digestion incomplète des aliments.

Cependant, il faut noter que la majorité des infections restent asymptomatiques.

2.6 Diagnostic

Recherche par examen microscopique

La recherche des kystes dans les selles normales devra se faire en utilisant des techniques de concentration (flottation avec sulfate de zinc ou formol-éther) et de coloration qui soulignent les caractères morphologiques (lugol, trichrome ou hématoxyline ferrique). Des colorations fluochromes ont été récemment proposées: diacétate de fluorescéine qui colore les kystes viables uniquement ou l'iodure de propidium qui colore sur-tout les kystes dégénérés.

Vu l'émission intermittente de kystes (enkystement périodique des trophozoïtes), la répétition des examens augmente considérablement la sensibilité; on fera trois examens consécutifs à quelques jours d'intervalle.

La recherche des trophozoïtes à frais se fait dans les selles diarrhéiques immédiatement après leur émission et dans le produit de tubage duodénal. Dans ce dernier cas, on peut, pour éviter le désagrément du tubage, utiliser la capsule Enterotest®: la capsule de gélatine est avalée, reliée à un fil de nylon dont l'extrémité est fixée à la peau, sur la joue; le fil se déroule à mesure que la gélatine extérieure se dissout, sa longueur permettant à la capsule d'atteindre le jéjunum; après quelques heures, le fil est retiré et on sort ce qui reste de la capsule; le liquide qui imprègne le fil est examiné au microscope.

Détection d'antigènes

La recherche d'antigènes solubles de *Giardia* dans les selles (ELISA kits) est possible à l'aide d'anticorps monoclonaux. Ce test, dont le principe est du type ELISA capture, reconnaît des protéines de 30 et de 66 kDa. Mais attention à la variation antigénique! Elle rend nécessaire l'utilisation de plusieurs monoclonaux. La détection et l'amplification du gène giardine par PCR est actuellement en cours d'essai.

Recherche d'anticorps

Les anticorps antitrophozoïtes (IgG) sont démontrables par immunofluorescence indirecte. L'antigène (figuré) peut être constitué de trophozoïtes provenant de cultures ou de kystes provenant de matières fécales.

La réaction manque de spécificité et détecte, entre autres, les anciens cas guéris.

2.7 Culture

Ce n'est pas une technique de diagnostic mais elle rend des services aux chercheurs qui s'intéressent aux caractères du parasite. L'adaptation à partir de matières fécales est difficile. On utilise des milieux du type HPS-1 de Meyer (phytone, peptone, glucose, sérum, cystéine, sérum) et TPS-1 de Diamond (aussi utilisé pour la culture axénique de *E. histolytica*). Les premiers repiquages se font en présence de levures (*Candida* ou *Saccharomyces*) ou d'extraits de levures.

L'addition de bile améliore le rendement. D'autre part, la réussite de l'enkystement - dékystement *in vitro* met tout le cycle à la disposition des chercheurs. Malgré les progrès, un certain nombre de cultures ne réussissent pas (isolats non adaptables). Par conséquent, les études sont faites sur des parasites sélectionnés pour leur cultivabilité (biais d'échantillonnage) et peut-être modifiés par l'adaptation en culture.

La congélation de ces parasites (trophozoïtes) à partir de cultures se fait aisément en refroidissant lentement la suspension de trophozoïtes en présence de 7 p. cent de glycérol et 1 p. cent de l'agent tensio-actif tween 80. Les parasites conservent leur viabilité indéfiniment en azote liquide.

2.8 Traitement

Nitro-imidazoles

Métronidazole (Flagyl®): schéma thérapeutique de 5 jours.

Tinidazole (Fasigyn®): traitement en dose unique.

Secnidazole; (Flagentyl®)

Furazolidone (Furoxone®)

Un traitement de 7 à 10 jours est nécessaire, les résultats très satisfaisants.

Quinacrine (Atébrine®, Mépacrine®)

Traitement d'une durée de 5 à 7 jours. Ce schéma a donné jusqu'à 80 p.100 de succès, mais des effets secondaires gênants en limitent l'emploi.

Nouvelle voie de recherche

Des agents qui se lient à la tubuline et qui pourraient donc interférer avec l'importante fonction du cytosquelette, sont à l'étude.

2.9 Épidémiologie

Caractères des kystes

Ils sont résistants au chlore (aux doses utilisées habituellement dans les systèmes d'épuration) et à la dessiccation; leur viabilité dans les fosses septiques persiste jusqu'à trois mois.

La dose de kystes capable d'infecter en moyenne 50 p.100 des sujets (D.I. 50) est de 25 à 100 kystes, mais on a réussi des infections expérimentales avec 10 kystes ou 1 trophozoïte (ce qui explique la forte contagiosité de l'infection). L'incubation dure 7 à 20 jours (avant l'apparition des symptômes et des kystes dans les selles).

Réservoir

Vu la souplesse d'adaptation de *G. intestinalis* à plusieurs espèces de mammifères (cobaye, chien, mouton, veau, gerbille, castor, etc.), certains animaux pourraient servir de réservoir de l'infection humaine. Leur rôle est secondaire.

On trouve souvent des kystes dans l'eau (examen microscopique de résidus de filtrations) où ils peuvent survivre plusieurs mois mais la description de leur morphologie ne permet pas de déterminer leur origine. On a décrit plusieurs épidémies en Europe et aux USA qui ont eu leur origine dans l'eau du robinet (réseaux de distribution mal surveillés).

L'homme reste le réservoir le plus important. L'infection se transmet habituellement par voie féco-orale (mains sales, aliments frais etc...) au sein des collectivités comme les homes d'enfants et de vieillards. On remarque, d'autre part, une prévalence importante chez les homosexuels masculins.

Les difficultés inhérentes aux études sur le réservoir sont de deux ordres: l'énorme variabilité génétique des isolats de *G. intestinalis* et la sensibilité prouvée d'une espèce donnée d'hôte pour plusieurs variants.

Réceptivité des individus à l'infection

Elle varie en fonction de l'état de la muqueuse gastrique et de l'immunité.

L'acidité gastrique normale élimine un bon nombre de kystes. Le défaut d'acidité permet le dékystement et l'installation facile du parasite au niveau du duodénum: achlorhydrie de l'anémie de Biermer, traitements anti-acides des ulcéreux, états de malnutrition, drogués...

On a vu que l'immunité tant muqueuse que cellulaire pouvait freiner la multiplication des trophozoïtes et leur fixation à la muqueuse. Les adultes sont moins infectés que les enfants. Dans les populations non immunes (crèches, pays à niveau élevé d'hygiène), on assiste à des poussées épidémiques, tandis que là où la prévalence de l'infection est élevée (pays tropicaux), l'infection est endémique.

Prévalence

Les services de santé britanniques rapportent jusqu'à 3.200 cas chaque année et en Hollande, le parasite a été retrouvé dans les selles de 7 p.100 des consultants en médecine générale.

Douze épidémies ont été observées aux USA entre 1971 et 1974 (5.127 cas au total). Une enquête faite en 1976 a trouvé 3,8 p.100 de positifs sur 500 000 examens (contre 0,6 p.100 d'*E. histolytica*).

3. Le genre *TRICHOMONAS*

Les trichomonas parasites de l'homme sont au nombre de trois: *T. hominis*, *T. tenax*, *T. vaginalis*. Ils se distinguent les uns des autres par leur localisation anatomique, leur pouvoir pathogène et leur morphologie. Ils n'ont pas de stade kystique et vivent au contact des muqueuses en produisant une inflammation superficielle mais il sont incapables de pénétrer dans les tissus.

3.1 *TRICHOMONAS HOMINIS* (synonyme: *T. INTESTINALIS*)

Morphologie

Le trophozoïte est ovale, possède un noyau antérieur et mesure 8 à 15 µm de longueur et 4 à 6 µm de largeur. La fente cytotomale (localisation du processus de pinocytose) est située à côté du noyau. Les blépharoplastes (corpuscules basaux), au nombre de deux, sont situés à l'avant d'où partent quatre flagelles antérieurs et un flagelle postérieur longeant le corps du parasite (membrane ondulante) et se prolongeant au delà de l'extrémité postérieure (flagelle libre). L'axostyle rigide traverse tout le cytoplasme d'avant en arrière et dépasse le corps du parasite par l'arrière où il se termine en pointe (figures 7-1, 7-4).

Localisation et hôtes

Il s'agit d'un parasite cosmopolite, vivant dans la lumière de l'intestin (cæcum, côlon) de l'homme, du singe, du chien, des rongeurs.

Pouvoir pathogène

Il peut provoquer une diarrhée muqueuse s'il est présent en grande quantité (irritation en surface de la muqueuse).

Transmission

Elle est réalisée par les mouches (transport mécanique des trophozoïtes), par la nourriture ou l'eau de boisson. Les formes végétatives sont fragiles et la transmission doit s'effectuer rapidement. Cet aléa dans la survie du parasite est compensé par un rythme de multiplication extrêmement élevé.

3.2 *TRICHOMONAS TENAX*

Il ressemble à *T. hominis* par sa taille (8 µm) et sa structure. On le retrouve dans la cavité buccale, sur les gencives, entre les dents, dans la salive. Son pouvoir pathogène est discret; il est cosmopolite (10 à 50 p.100 des individus examinés).

3.3 *TRICHOMONAS VAGINALIS*

Morphologie

De forme ovale et long de 10 à 18 µm, le trophozoïte, très mobile, possède quatre flagelles antérieurs et une membrane ondulante se terminant au niveau du tiers postérieur du parasite (pas de flagelle postérieur). Un axostyle dépasse en arrière le corps du parasite. Il n'y a pas de kystes (figures 7-1, 7-4).

Localisation anatomique

Il se trouve sur les muqueuses et tissus glandulaires uro-génitaux: urètre, vagin chez la femme; urètre, prostate, épидидyme chez l'homme.

Pouvoir pathogène

Il provoque une inflammation aiguë des muqueuses et des glandes annexes du système génital (vaginites, urétrites, prostatites, épидидymites).

Chez la femme, cette inflammation cause une hypersécrétion (pertes blanches contenant des trophozoïtes de *Trichomonas*, des globules blancs et des cellules de desquamation), un prurit intense, une sensation de brûlure, de la dyspareunie. Des saignements sont possibles à cause de l'inflammation aiguë et de la desquamation de la muqueuse vaginale. Le passage à la chronicité est très fréquent, donnant lieu à de longues périodes asymptomatiques (latence) pendant lesquelles le sujet porteur peut éventuellement disséminer l'infection.

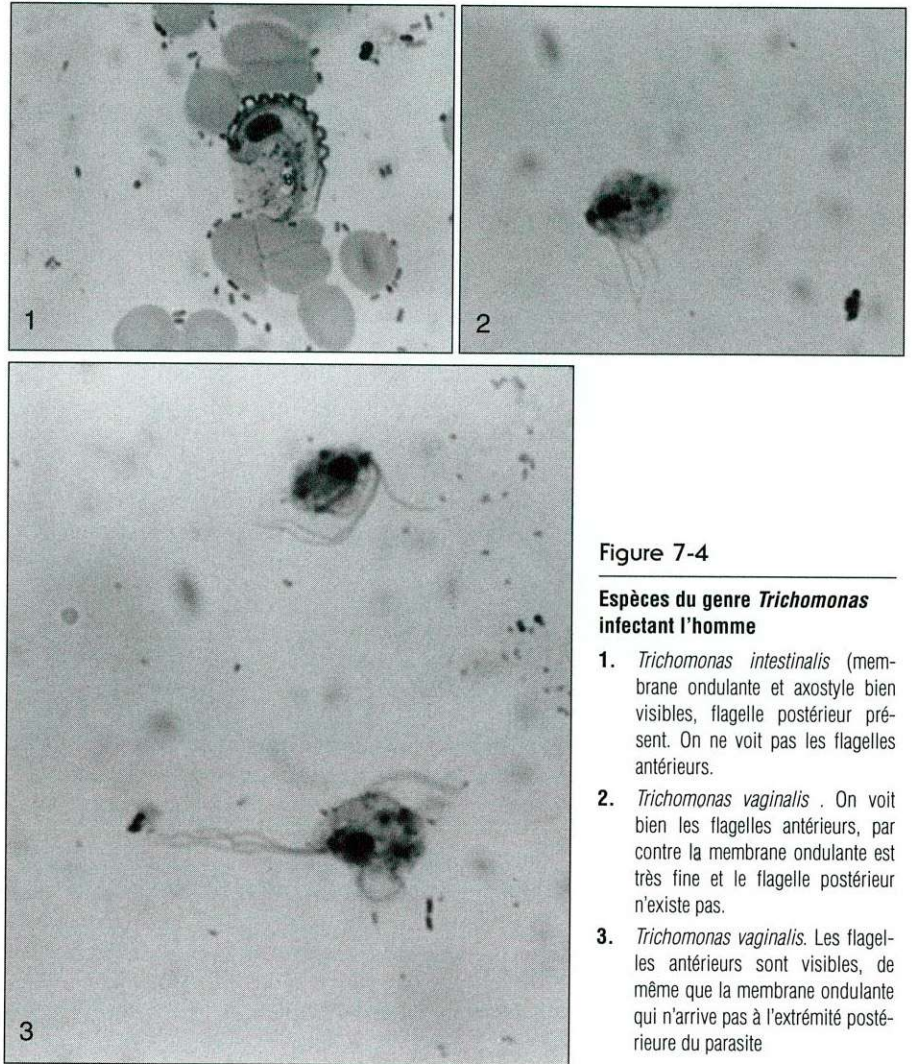


Figure 7-4

Espèces du genre *Trichomonas* infectant l'homme

1. *Trichomonas intestinalis* (membrane ondulante et axostyle bien visibles, flagelle postérieur présent. On ne voit pas les flagelles antérieurs).
2. *Trichomonas vaginalis*. On voit bien les flagelles antérieurs, par contre la membrane ondulante est très fine et le flagelle postérieur n'existe pas.
3. *Trichomonas vaginalis*. Les flagelles antérieurs sont visibles, de même que la membrane ondulante qui n'arrive pas à l'extrémité postérieure du parasite.

Chez l'homme, la discrétion des signes cliniques favorise la dissémination.

Diagnostic de laboratoire

La mise en évidence du parasite mobile à frais entre lame et lamelle, est la plus aisée. Elle utilise les sécrétions vaginales recueillies par écouvillonnage ou raclage des muqueuses, ou le sédiment urinaire après centrifugation. La sensibilité de cet examen microscopique fait en contraste de phase est de 97 p.100.

Les colorations à l'hématoxyline ou au Giemsa après fixation au Schaudinn ou au méthanol procurent à l'examen microscopique une sensibilité d'environ 60 p.100.

Des monoclonaux pour utilisation sur les sécrétions vaginales ou même les urines, par immunofluorescence ou par test ELISA sont en cours d'évaluation. Les résultats sont prometteurs mais des problèmes techniques restent à résoudre.

La culture est possible sur milieux habituels pour flagellates intestinaux, y compris les milieux solides (gélose nutritive) mais il existe des milieux spécialisés pour le diagnostic. Dans les urines ou en culture, on note une prédominance de formes rondes ou ovales, tandis que dans les sécrétions vaginales, environ 30 p.100 des formes sont allongées, en carotte.

Traitement

Métronidazole (Flagyl®) par voie générale ou locale (comprimés vaginaux); Tinidazole (Fasigyn®); Nimorazole (Naxogyn®); Ornidazole (Tiberal®)

Epidémiologie

- TRANSMISSION

Trichomonas ne formant pas de kystes, il est évident que l'infection est transmise généralement par contact sexuel. Cependant on ne peut pas exclure totalement une transmission par l'eau et le linge humide car les trophozoïtes peuvent survivre à température ambiante au contact de ces éléments pendant plusieurs heures (on a pu cultiver *Trichomonas vaginalis* après 12 heures de séjour dans l'eau du robinet à 21 °C et après 23 heures sur du linge souillé, humide, laissé à température ambiante).

- PRÉVALENCE

En 1972, on estimait à 180 millions le nombre d'individus infectés dans le monde. La prévalence observée varie de 2,6 p.100 chez des femmes mariées à 70 p.100 chez des patients d'une consultation d'affections transmises sexuellement. En 1970, dans une ville d'Allemagne, l'examen d'écoulements vaginaux a révélé 9,7 p.100 de *Trichomonas*.

Aux USA (1966), la prévalence dans un échantillon de population blanche de 30 à 45 ans était de 14,5 p.100 au cours d'un examen unique et de 17 p.100 après plusieurs examens. Toutes les enquêtes, effectuées sur des échantillons de populations adultes générales, montrent une prévalence comprise entre 5 et 20 p.100.

4. Description brève de quelques autres flagellates

4.1. *Histomonas meleagridis*

Position taxinomique

Bien qu'un stade amiboïde soit présent, ce parasite est classé dans la famille des Trichomonadidae sur base de la similitude de composition antigénique et enzymatique. Rappelons que le genre *Dientamoeba* a été aussi reconnu proche de cette famille, bien que ne présentant pas de stade flagellé. C'est la raison pour laquelle *Histomonas* est brièvement décrit ici.

Hôtes

Surtout volaille, d'élevage ou sauvage.

Morphologie

On reconnaît un stade trophozoïte flagellé (1 ou 2 flagelles), présent dans la lumière de l'intestin et un stade trophozoïte (6 à 20 µm) sans flagelle mais formant des pseudopodes, présent dans les tissus (paroi intestinale, foie).

Cycle et mode de transmission

La transmission s'effectue par pénétration à l'intérieur des œufs de certains helminthes du cæcum des animaux infectés (par exemple *Heterakis gallinarum*). Le stade parasitaire invasif peut résister dans les œufs, en dehors de l'organisme de l'animal, pendant plusieurs années à des températures de 0 à 4°C. Les larves de ces helminthes peuvent elles-mêmes être porteuses de l'infection lors de l'éclosion et héberger ce protozoaire pendant toute la durée de la vie larvaire et adulte. L'infection est transmise à l'hôte gallinacé par voie digestive, lors de la destruction (lyse par les enzymes) d'un des stades larvaires de l'helminthe.

Il faut noter que les stades parasitaires de l'intestin ou des tissus sont rapidement détruits en dehors de l'hôte. L'helminthe sert donc de vecteur à ce protozoaire.

Pouvoir pathogène

L'atteinte intestinale (diarrhée) et hépatique peut mener à la mort de l'animal en 2 à 3 semaines (foyers de nécrose disséminés dans le tissu hépatique et dans la paroi du cæcum).

4.2 *RETORTAMONAS INTESTINALIS*

Hôte

C'est un parasite cosmopolite de l'homme et du singe.

Morphologie

Le trophozoïte (5 à 8 µm de longueur) est piriforme comme celui de *Chilomastix*. Il possède un cytostome, un à trois flagelles antérieurs et un flagelle récurrent situé au fond du cytostome, un noyau antérieur. Le kyste est ovale ou piriforme avec une paroi épaisse qui renferme toutes les structures du trophozoïte; il ne possède qu'un seul noyau.

Cycle, pathologie, diagnostic

La transmission s'effectue par ingestion de kystes. Les trophozoïtes se multiplient par bipartition dans le côlon et le pouvoir pathogène est inexistant. On retrouve les kystes ou les trophozoïtes dans les selles.

4.3 *ENTEROMONAS HOMINIS*

Hôtes

C'est un parasite cosmopolite de plusieurs hôtes (homme, singe, porc, lapin, rongeurs, certains amphibiens). La prévalence chez l'homme serait de 0,2 à 0,8 p.100.

Morphologie

Le corps du trophozoïte est piriforme et de petite taille (4 à 10 µm de longueur). On remarque un noyau, un cytostome, trois flagelles antérieurs et un flagelle récurrent formant membrane ondulante et se terminant par une partie libre.

Le kyste est ovale, entouré d'une membrane épaisse constituée de matériel filamenteux. Il possède quatre noyaux, situés deux par deux aux pôles du parasite.

Cycle, pathologie, diagnostic

Les trophozoïtes se multiplient par bipartition. Le kyste quadrinucléé participe aussi au processus de multiplication mais on n'a pas pu observer le dékystement.

Parasite commensal du côlon, il n'a aucun pouvoir pathogène. Les méthodes de diagnostic les plus efficaces sont le frottis de selles fixé au Bouin et coloré au protargol ainsi que la culture dans le milieu de Dobell.

4.4 *DIENTAMCEBA FRAGILIS*

Jepps et Dobell 1918

Position taxinomique

Sur base d'analyses antigéniques et iso-enzymatiques, on attribue à cet organisme une position proche de *Histomonas* et de *Trichomonas* qui sont des flagellates du tube digestif de l'homme et des animaux.

C'est donc un organisme qui tient à la fois de l'amibe (par sa morphologie et son mode de locomotion) et de certains flagellés. On le place parfois dans un ordre séparé, les Mastigamoebida, ou amœbo-flagellates.

Dientamoeba fragilis ne possède cependant pas de stade flagellé comme c'est le cas pour les amibes du genre *Naegleria*.

Morphologie

Le trophozoïte amiboïde mesure 7 à 12 µm. On note une prédominance de formes binucléées (2/3 à 4/5 des individus).

Le kyste est inexistant et le cycle évolutif inconnu.

Localisation anatomique

Ce parasite, exclusivement humain, occupe toute l'étendue du côlon. Son pouvoir pathogène discret peut être à l'origine de diarrhées muqueuses en cas d'importante prolifération.

Transmission

Vu l'absence du stade kystique, on a incriminé, pour le passage d'un individu à l'autre, l'intervention de vers intestinaux et particulièrement des œufs d'*Enterobius vermicularis* (oxyures). Il n'y a toutefois pas de preuves expérimentales de cette théorie.

Les amibes qu'on retrouve dans les matières fécales dégénèrent rapidement. Dans ce cas, une grande vacuole se développe dans le cytoplasme et refoule les deux noyaux vers la périphérie, donnant un aspect de *Blastocystis* (voir chapitre 18).

Diagnostic

La présence de ces petits trophozoïtes binucléés est souvent ignorée dans des examens de selles à frais. Les colorations permanentes permettent de mieux les reconnaître sur des frottis de matières fécales.

Traitement

Les drogues utilisées sont les mêmes que pour les autres amibes pathogènes.

BIBLIOGRAPHIE

ANSARI M. (1952) Contribution à l'étude du genre *Giardia* Kunstler 1882 (Mastigophora Octomitidae), *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, **27**, 421-429.

JIROVEC O, PETRU M. (1968) *Trichomonas vaginalis* and Trichomoniasis, In : BEN DAWES (Ed.) *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **6**:117-188.

BEAL CB, VIENS P, GRANT RGL, HUGUES JM. (1970) A new technique for sampling duodenal contents - demonstration of upper small-bowel pathogens, *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **19**, 349-352.

Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (1980) Symposium on Giardiasis, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **74**, 427-448.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ (1982) *Infections intestinales à Protozoaires et à Helminthes*, Série de Rapports techniques, **666**.

KEISTER DB. (1983) Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **77**, 487-488.

- NASHTE, HERRINGTON DA *et al.* (1987) Experimental human infections with *Giardia lamblia*, *Journal of Infectious Diseases*, **156**, 974-984.
- HALL EJ, RUTGERS HC, BATT RM. (1988) Evaluation of the peroral string tests in the diagnosis of canine giardiasis, *Journal of Small Animal Practice*, **29**, 177-183.
- MELONI BP, LYMBERY AJ, THOMPSON RCA. (1988) Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines, *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **38**, 65-73.
- SMITH AL, SMITH HV. (1989) A comparison of fluorescein diacetate and propidium iodide staining and *in vitro* excystation for determining *Giardia intestinalis* cyst viability, *Parasitology*, **99**, 329-331.
- NASH TE. (1989) Antigenic variation in *Giardia lamblia*, *Experimental Parasitology*, **68**, 238-241.
- MELONI BP, LYMBERY AJ, THOMPSON RCA. (1989) Characterization of *Giardia* isolates using a non-radiolabelled DNA probe, and correlation with the results of isoenzyme analysis, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **40**, 629-637.
- UPCROFT J, BOREHAM PFL. (1989) Geographic variation in *Giardia* karyotypes, *International Journal for Parasitology*, **19**, 519-527.
- BAKER RH Jr. (1990) DNA probe diagnosis of parasitic infections, *Experimental parasitology*, **70**, 494-499.
- GOLDIN AJ, APT W *et al.* (1990) Efficient diagnosis of giardiasis among nursery and primary school children in Santiago, Chile, by capture ELISA for detection of fecal *Giardia* antigens, *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **42**, 538-545.
- BOUCHER SEM, GILLIN FD. (1990) Excystation of *in vitro*-derived *Giardia lamblia* cysts, *Infection and Immunity*, **58**, 3516-3522.
- CROUCH AA, SEOW WK, WHITMAN LM, THONG YH. (1990) Sensitivity *in vitro* of *Giardia intestinalis* to dyadic combinations of azithromycin, doxycycline, mefloquine, tinidazole and furazolidone, *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*, **84**, 246-248.
- Mc MILLAN A. (1990) Laboratory diagnostic methods and cryopreservation of trichomonads, In: BN HONIGBERG (Ed.), *Trichomonads Parasitic in Humans*, New York, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, pp. 297-310.
- LOSSICK JG. (1990) Epidemiology of urogenital trichomoniasis, In: BN HONIGBERG (Ed.), *Trichomonads Parasitic in Humans*, New York, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, pp. 311-323.
- OCKERT G. (1990) Symptomatology, pathology, epidemiology and diagnostic of *Dientamoeba fragilis*, In: BN HONIGBERG (Ed.), *Trichomonads Parasitic in Humans*, New York, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, pp. 394-410.
- BINZ N, THOMPSON RCA, MELONI BP, LYMBERY AJ. (1991) A simple method for cloning *Giardia duodenalis* from cultures and fecal samples, *Journal of Parasitology*, **77**, 627-631.
- ISAAC-RENTON JL. (1991) Immunological methods of diagnosis in giardiasis: an overview, *Annals of Clinical and Laboratory Science*, **21**, 116-122.
- SCHANTZ PM. (1991) Parasitic zoonoses in perspective, *International Journal for Parasitology*, **21**, 161-170.
- FAVENNEC L, COCHILLON C *et al.* (1992) A new screening assay for anti-giardial compounds: effects of various drugs on the adherence of *Giardia duodenalis* to Caco2 cells, *Parasitology Research*, **78**, 80-81.
- MAHBUBANI MG, BEJ AK *et al.* (1992) Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes, *Journal of Clinical Microbiology*, **30**, 74-78.
- THOMPSON RCA, REYNOLSON JA. (1993) *Giardia* and Giardiasis, In JR BAKER and R MULLER (Eds), *Advances in Parasitology*, Academic Press London; **32**, 71-160.
- MORGAN UM, CONSTANTINE CC *et al.* (1993) RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzyme data, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **87**, 702.

Protozoaires flagellés (Trypanosomatida)

Parasites du sang et des tissus

Généralités

8

1. Historique

La première observation de trypanosomes est celle de Valentin (Berne, 1841) dans le sang de la truite. Ils ont été ensuite observés chez la grenouille en 1842, par Gluge à Bruxelles, Mayer à Bonn et Gruby à Paris. C'est Gruby qui leur donnera le nom de trypanosome (τρυπανον: tarière, σωμα: corps) qui veut dire corps en forme de vrille (vilebrequin). Puis les découvertes vont émailler la deuxième moitié du 19ème siècle.

1845: observation du trypanosome chez des mammifères par Gros dans le sang de la taupe et du mulot;

1878: travaux de Lewis en Inde, sur les trypanosomes du rat transmis par la puce;

1880: découverte du premier trypanosome pathogène par Evans qui décrit le surra chez les équidés et les camélidés en Inde (*T. evansi*);

1885: publication des travaux de Danilewsky sur les trypanosomes et hématozoaires endoglobulaires des reptiles et des oiseaux;

1894: Rouget décrit la dourine (*T. equiperdum*) à Constantine;

1897: Bruce écrit un mémoire resté fameux sur le nagana au Zouloulouland, avec son agent étiologique (*T. brucei*), la transmission par la glossine et le réservoir de parasites;

1899: la cytologie des trypanosomes est décrite par Rabinowitsch et Kempner grâce à la coloration à l'éosine - bleu de méthylène;

1901: Elmassin décrit le mal de Caderas en Assuncion; Dutton découvre un trypanosome dans le sang d'un homme en Gambie (*T. gambiense*);

1903: culture *in vitro* des trypanosomes du rat et de *T. brucei* par Novy et Mc Neal; les trypanosomes de

la maladie du sommeil sont aperçus dans le liquide céphalo-rachidien de patients par Castellani;

1904: Schaudinn découvre le développement du trypanosome chez la mouche et Kleine décrit en 1909 le cycle de développement avec les changements morphologiques qui l'accompagnent.

2. Aperçu taxinomique et phylogénie

2.1 Systématique

Les protozoaires flagellés tissulaires appartiennent à l'embranchement des Kinetoplasta et à l'ordre des Trypanosomatida. Ils possèdent un à quatre flagelles. Le kinétoplaste qui contient de l'ADN, mis en évidence par les colorations argentiques et de Feulgen, est un organite auto-reproductible lié à la mitochondrie. La plupart des espèces sont parasites.

La famille des Trypanosomatidae contient quatre genres: *Leptomonas*, *Crithidia*, *Trypanosoma* et *Leishmania*. Les deux derniers évoluent chez deux hôtes successivement (hétéroxènes).

Seules certaines espèces des genres *Trypanosoma* et *Leishmania* ont une importance médicale. Le genre *Trypanosoma* est subdivisé en sous-genres sur base du comportement chez les hôtes vertébré et invertébré. Ceux qui sont énumérés ci-dessous comprennent des espèces intéressant le médecin ou le vétérinaire: *Trypanozoon*, *Duttonella*, *Nannomonas*, *Pycnomonas*, *Tejeraia*, *Schizotrypanum*, *Herpetosoma*, *Megatrypanum*, *Endotrypanum*.

Les espèces du genre *Trypanosoma* qui infectent l'homme en Afrique appartiennent au sous-genre *Trypanozoon*, en Amérique au sous-genre *Schizotrypanum*.

Les espèces du genre *Leishmania* qui infectent l'homme sont divisées en deux sous-genres *Leishmania* et *Viannia* d'après leur comportement chez le vecteur.

1. Historique
2. Aperçu taxinomique et phylogénie
 - 2.1 Systématique
 - 2.2 Considérations phylogéniques
3. Caractéristiques morphologiques
4. Description des genres
 - 4.1 Le genre *Leptomonas*
 - 4.2 Le genre *Crithidia*
 - 4.3 Le genre *Trypanosoma*
 - 4.4 Le genre *Leishmania*
5. Ultrastructure, physiologie, cycles
 - 5.1 Morphologie (ultrastructure)
 - 5.2 Métabolisme
 - 5.3 La variation antigénique
 - 5.4 Modulations de l'adaptation à la glossine

Bibliographie

FIGURES

- 8-1 Eléments structuraux des Trypanosomatidae
- 8-2 Famille des Trypanosomatidae: stades des cycles
- 8-3 Morphologie des formes de l'insecte chez *Trypanosoma*
- 8-4 Organites des trypanosomes au microscope électronique

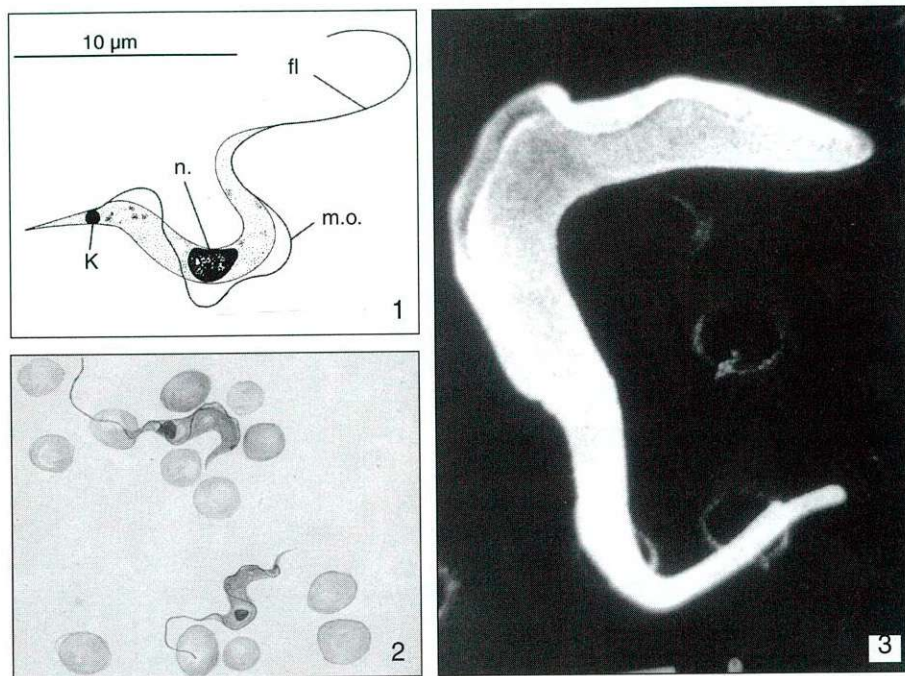


Figure 8-1

Eléments structuraux des Trypanosomatidae

1. Schéma d'un trypanosome montrant le noyau (n), le kinétoplaste (k), le flagelle (fl) et sa membrane ondulante (m.o.) ainsi que le cytoplasme et ses inclusions.
2. Dessins de trypanosomes montrant des variantes des éléments cités en (1).
3. Microscopie en balayage d'un trypanosome montrant la forme générale, le flagelle et son point d'émergence, la membrane ondulante.

2.2 Considérations phylogéniques

Les ancêtres des trypanosomes pathogènes (hémoflagellates) sont les blastocrithidias de l'intestin de divers invertébrés (insectes) non piqueurs, qui se transmettent d'un insecte à l'autre par voie digestive (ingestion de formes parasitaires contenues dans les

- la taille (3 à 30 μm) et la forme (sphérique ou allongée);
- la forme de l'extrémité postérieure (effilée ou arrondie);
- la position du noyau (central, postérieur ou antérieur);
- la taille du kinétoplaste et sa position: postérieur (terminal ou subterminal), juxtanucléaire ou antérieur;
- la présence ou l'absence d'un flagelle libre;
- la présence (discrète ou exubérante) ou l'absence d'une membrane ondulante.

déjections). Ces crithidias ont pu, au cours du temps, parasiter aussi des insectes hématophages et arriver ainsi au contact d'hôtes vertébrés. C'est par cette voie que les protozoaires sont entrés dans la circulation sanguine des vertébrés.

On retrouve encore aujourd'hui, chez des trypanosomes du groupe *stercoraria* adaptés aux vertébrés (voir ci-dessous), un comportement semblable lors du séjour dans l'insecte, qui amène le parasite à parcourir le transit digestif complet et à terminer son évolution dans les déjections.

Les leishmanies pathogènes (flagellates des tissus) se sont développées par le même mécanisme, d'abord parasites monoxènes des phlébotomes (*Psychodidae*), insectes piqueurs aujourd'hui les plus importants vecteurs de leishmanioses. Apparemment les lézards ont été les premiers vertébrés à être parasités: ils ont joué un rôle de pionniers dans l'adaptation de ces parasites d'insectes aux tissus des vertébrés. La plupart des espèces du genre *Leishmania* sont parasites de divers animaux - souvent primitifs - qui jouent encore à l'heure actuelle un rôle important de réservoir pour des parasites adaptés à l'homme.

3. Caractéristiques morphologiques

Les représentants de la famille des Trypanosomatidae sont des organismes très mobiles de forme allongée, aux deux extrémités pointues, avec un noyau central, un kinétoplaste contenant de l'acide désoxyribonucléique, une membrane ondulante et un flagelle libre. Le cytoplasme est plus ou moins granuleux. Certains stades évolutifs, adaptés à la vie intracellulaire font exception: ils sont immobiles, sphériques et ne possèdent ni flagelle extérieur ni membrane ondulante.

Dans les formes allongées, le flagelle libre se trouve à l'avant du parasite et prend son origine près du kinétoplaste. Si le kinétoplaste se trouve à l'arrière, le flagelle sort du cytoplasme à l'arrière du parasite et doit longer la membrane externe dans un repli de celle-ci, créant ainsi la membrane ondulante, avant de se prolonger en avant du corps du parasite (figure 8-1).

On peut distinguer les genres et les espèces par les caractères énumérés au tableau 8-1.

La reconnaissance de ces divers caractères permettra de faire un diagnostic microscopique d'espèce du parasite. La colorabilité par le Giemsa est excellente: le cytoplasme sera coloré en bleu-gris, le noyau et le kinétoplaste en rouge foncé, la membrane externe et le flagelle en bleu foncé.

Tableau 8-1

4. Description des genres

4.1 Le genre *Leptomonas*

Morphologie

Parasite de forme allongée, avec noyau central, kinétoplaste antérieur, sans membrane ondulante mais avec flagelle libre (forme "promastigote"). C'est la forme la plus primitive au point de vue parasitaire (figure 8-2).

Hôtes et cycle

Parasites fréquents du tube digestif des insectes (diptères, hémiptères, acariens), ils se multiplient par division binaire.

Rejetés dans le milieu extérieur avec les déjections de l'insecte, ils peuvent contaminer d'autres individus. La forme de conservation dans les déjections est une forme leishmanoïde, immobile, arrondie, qui a perdu son flagelle. Il s'agit en fait d'une infection intestinale de l'insecte, transmise par contact "féco-oral".

EXEMPLE: *Leptomonas ctenocephali* infecte le tube digestif de la puce du chien.

Remarque importante

La forme "promastigote" représente aussi le stade de multiplication chez l'insecte dans le cycle évolutif des espèces du genre *Leishmania* (voir ci-dessous).

4.2 Le genre *Crithidia*

Morphologie

Parasite de forme allongée, avec noyau central, kinétoplaste juxtanucléaire, il possède une membrane ondulante courte et un flagelle libre (forme "épimastigote") (figure 8.2).

Hôtes

Le parasite se multiplie par division binaire dans le tube digestif de certains arthropodes. La forme de conservation dans le milieu extérieur est une forme leishmanoïde, comme pour *Leptomonas*.

EXEMPLE: *Crithidia hyalommae* infecte les tiques du genre *Hyalomma*. Ce parasite se trouve dans le liquide coelomique et se transmet par les oeufs à la génération suivante de l'insecte; il est donc à l'origine d'une infection héréditaire chez la tique.

Remarque importante

La forme "épimastigote" représente aussi un stade de multiplication chez l'arthropode dans le cycle des trypanosomes (voir ci-dessous).

4.3 Le genre *Trypanosoma*

Hôtes

Parasite du sang des vertébrés (animaux, homme...), il complète généralement son cycle chez un hôte invertébré, le plus souvent un insecte qui joue le rôle de vecteur (hôte intermédiaire).

EXEMPLE: *Trypanosoma gambiense* infecte l'homme et poursuit son évolution chez une mouche (*Glossina*).

Morphologie générale des formes sanguicoles

Dans le plasma sanguin, le parasite adopte une forme allongée, avec noyau central ou légèrement déplacé vers l'avant ou vers l'arrière, kinétoplaste postérieur, membrane ondulante longeant le corps sur toute sa longueur et flagelle libre souvent présent (forme "trypomastigote"). Il se divise par bipartition, avec division nucléaire et kinétoplastique. Les trypanosomes sanguicoles étant ceux que l'on recherche le plus souvent pour poser le diagnostic d'une trypanosomiase, leur morphologie doit être décrite avec précision (figure 8-2).

Morphologie des stades chez l'insecte

Dans les organes de l'insecte vecteur, les trypanosomes ont un kinétoplaste balladeur. D'abord postéro-nucléaire et progressivement détaché de l'extrémité postérieure au début du cycle, dans l'estomac, ensuite juxtanucléaire dans le proventricule et pendant son cheminement vers les glandes salivaires (figure 8-3), il redeviendra postérieur à la fin du cycle dans les formes des glandes salivaires ou de l'intestin postérieur.

Figure 8-2

Famille des Trypanosomatidae: stades des cycles

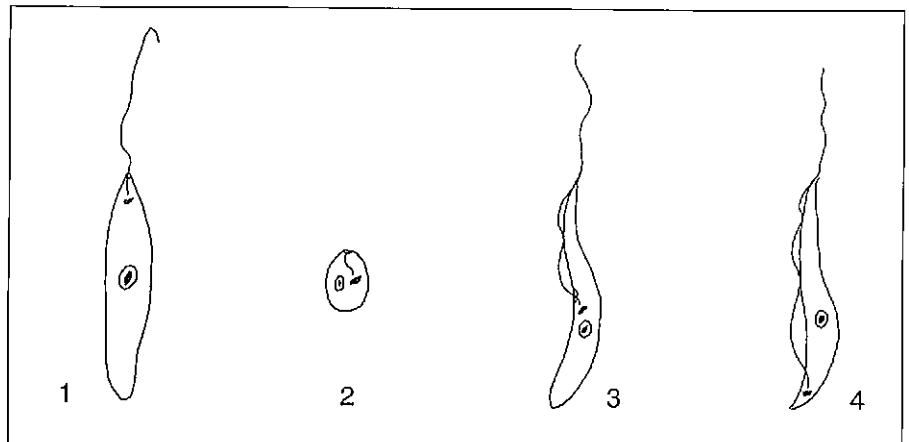
1. Forme promastigote
2. Forme amastigote
3. Forme épimastigote
4. Forme trypomastigote

Le cycle chez le genre *Leptomonas* comporte la forme 1

Le cycle chez le genre *Leishmania* comporte les formes 1 et 2

Le cycle chez *Crithidia* comporte la forme 3

Le cycle chez *Trypanosoma* comporte les formes 3 et 4



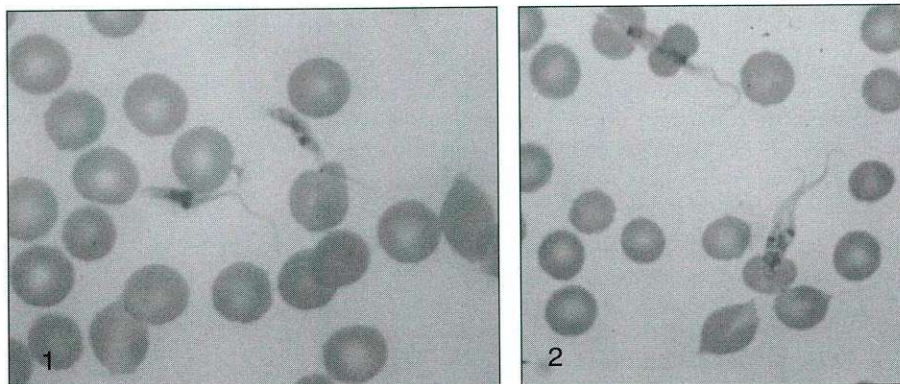


Figure 8-3

Morphologie des formes de l'insecte chez *Trypanosoma*

1, 2. Formes épimastigotes: le kinétoplaste se trouve à proximité du noyau. En conséquence, la membrane ondulante est courte, du point d'émergence du flagelle à l'extrémité antérieure où le flagelle devient libre.

Dans les descriptions du cycle chez le vecteur, on utilise une terminologie spécialisée: on parlera de "procycliques" pour décrire les parasites qui se divisent au début de leur séjour chez l'insecte et de "métacycliques" pour nommer les parasites en fin d'évolution chez l'insecte. Ces derniers ont cessé leurs divisions et sont prêts à passer chez le vertébré (tableau 8-2).

Remarque

Le stade sanguicole chez le vertébré et son précurseur, la forme métacyclique infectante, stade final du cycle chez l'invertébré seront donc des formes "trypomastigotes".

Classification des espèces

Les parasites du genre *Trypanosoma* se divisent en plusieurs sous-genres que l'on peut regrouper, selon leur comportement chez l'hôte invertébré, en deux catégories: les *stercoraria* et les *salivaria*.

Les *stercoraria* se caractérisent par une évolution dans l'intestin de l'hôte invertébré (insecte) qui aboutit

dans l'intestin postérieur, près de l'ampoule rectale. Les formes infectantes pour le nouvel hôte vertébré (trypomastigotes métacycliques infectants) sont formées à partir des épimastigotes procycliques et se retrouvent donc dans les déjections. De plus, la division binaire est discontinuée au cours du cycle: les formes épimastigotes procycliques se divisent activement dans l'estomac et l'intestin postérieur de l'insecte, tandis que les métacycliques ne se divisent pas. *T. (T.) cruzi*, agent étiologique de la maladie de Chagas est un exemple de *stercoraria*.

Les *salivaria* colonisent l'estomac de l'hôte invertébré mais ne passent jamais dans l'intestin postérieur: à partir de l'estomac (ou intestin moyen), ils font demi-tour après s'être multipliés sous forme de trypomastigotes allongés à kinétoplaste détaché de l'extrémité postérieure puis d'épimastigotes procycliques et migrent vers les parties antérieures de l'insecte pour aboutir dans la trompe et/ou dans les glandes salivaires. C'est là que sont formées les formes trypomastigotes métacycliques infectantes qui seront injectées au nouvel hôte vertébré par piqûre de l'insecte. C'est le comportement de *T. (T.) b. gambiense* et *T. (T.) b. rhodesiense*, agents de la maladie du sommeil, ainsi que celui de nombreux autres trypanosomes animaux: *T. (T.) b. brucei*, *T. (N.) congolense*, *T. (D.) vivax* ...

4.4 Le genre *Leishmania*

Morphologie et cycle

Chez l'hôte vertébré, le parasite, intracellulaire, est sphérique et immobile, sans flagelle ni membrane ondulante, avec noyau central et kinétoplaste en périphérie (forme "amastigote").

Tableau 8-2

Evolution de *Trypanosoma* chez l'invertébré

Dénomination	Localisation		Morphologie
	(stercoraria)	(salivaria)	
Trypanosome sanguicole	sang du vertébré	sang du vertébré	trypomastigote avec GPS ^a
procyclique	estomac, proventricule, intestin postérieur de l'insecte	estomac, proventricule, pièces buccales ou glandes salivaires de l'insecte	trypomastigote allongé à kinétoplaste détaché de l'extrémité postérieure, épimastigote, sans GPS ^a
métacyclique	intestin postérieur, déjections de l'insecte	pièces buccales ou glandes salivaires de l'insecte	trypomastigote avec GPS métacyclique ^b
Trypanosome sanguicole	comme en rangée 1		

a. GPS: glycoprotéine de surface (antigène de surface)

b. les antigènes de surface des métacycliques constituent une collection spéciale de types antigéniques.

Chez l'insecte, le stade de multiplication dans l'estomac est une forme allongée avec kinétoplaste antérieur et donc sans membrane ondulante (forme promastigote). Le cycle se termine par l'accumulation de promastigotes infectants dans les pièces buccales (trompe) (figure 8-2, tableau 8-3).

Hôtes

L'hôte vertébré est l'homme ou l'animal. L'hôte invertébré assurant la transmission est un insecte de la famille des Psychodidae.

Classification

La classification traditionnelle des leishmanies est basée sur le pouvoir pathogène, l'organe parasité et la distribution géographique (voir chapitre 11).

Les caractères morphologiques des amastigotes sont peu nombreux et ne permettent pas de distinguer les espèces les unes des autres. Les tendances actuelles de la taxinomie visent à utiliser les paramètres physiologiques du cycle de même que l'analyse antigénique et biochimique pour séparer plus objectivement les espèces, mais la situation reste complexe.

5. Ultrastructure, physiologie, cycles

Au cours de leur cycle évolutif, la plupart des espèces de Trypanosomatidae doivent non seulement survivre mais aussi se multiplier successivement dans des milieux très différents, tels que le sang d'un vertébré et l'estomac d'un insecte. Les différences en fourniture d'oxygène et de glucose entre ces deux biotopes obligent le trypanosome à adapter son métabolisme. Dans les considérations qui suivent, l'espèce *T. brucei* a été prise comme exemple.

5.1 Morphologie (ultrastructure)

La description des organites cytoplasmiques du trypanosome au microscope électronique a permis la compréhension des changements morphologiques survenant au cours du cycle (figure 8-4).

Principaux constituants des trypanosomes

Le noyau, central, est porteur de la partie principale du génome.

Le **kinétoplaste** est remarquable par sa structure dense composée d'ADN (ADN extranucléaire ou kinétoplastique) et ses prolongements, les mitochondries. Sa position dans le parasite est liée au plus ou moins grand développement des mitochondries.

Dénomination	Localisation	Morphologie
<i>Leishmania</i>	intracellulaire: macrophages du vertébré	amastigote
<i>Leishmania</i> procyclique	estomac, proventricule, pièces buccales de l'insecte	promastigote
<i>Leishmania</i> métacyclique	pièces buccales de l'insecte	promastigote
<i>Leishmania</i>	comme en rangée 1	

Deux mitochondries, antérieure et postérieure (par rapport au kinétoplaste), sont présentes. La mitochondrie postérieure est responsable des adaptations métaboliques. Hypertrophiée chez les épimastigotes où elle occupe toute la partie du corps du trypanosome située à l'arrière du noyau, elle s'atrophie lors de la transformation en trypomastigote dans le sang de l'hôte vertébré, entraînant la migration vers l'arrière du kinétoplaste.

Le **flagelle** est un prolongement du cytoplasme soutenu par des fibrilles longitudinales qui lui procurent sa mobilité et enveloppé par un repli de la membrane externe du parasite. A la base du flagelle, une invagination de la membrane externe forme une "poche flagellaire".

Le cytosquelette du parasite est constitué d'une spirale de **microtubules** qui soutend la membrane plasmique. Il fait défaut au niveau de la poche flagellaire, autorisant les déformations de la membrane plasmique et donc la pinocytose. D'où la forte concentration dans cette région et quelle que soit la forme du parasite, des vésicules de pinocytose dérivées du Golgi.

L'**antigène variable**, glycoprotéine apparaissant à la surface du trypanosome au cours de la transformation en trypomastigote métacyclique et persistant chez les stades sanguicoles, représente 15 p.100 environ du poids du trypanosome.

5.2 Métabolisme

Dans la circulation sanguine

Les enzymes de la chaîne glycolytique sont, chez tous les Trypanosomatidae et à la différence des cellules de mammifères, contenus dans les glycosomes, organites cytoplasmiques constants chez toutes les espèces et à tous les stades. Ils sont à l'origine de la production d'acide pyruvique.

Dans le sang, en présence d'un excès de glucose et d'oxygène, la glycolyse chez le trypanosome s'arrête là par manque des enzymes du cycle des acides tricar-

Tableau 8-3

Evolution de *Leishmania* chez l'invertébré

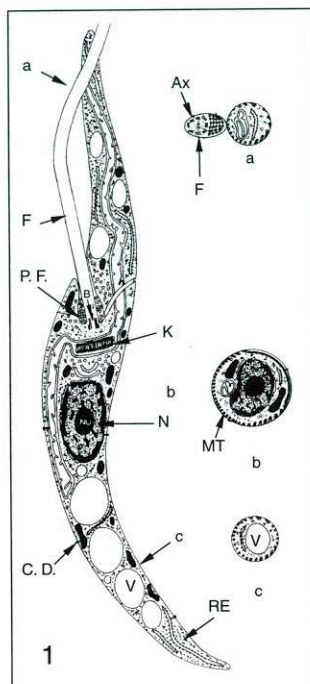


Figure 8-4

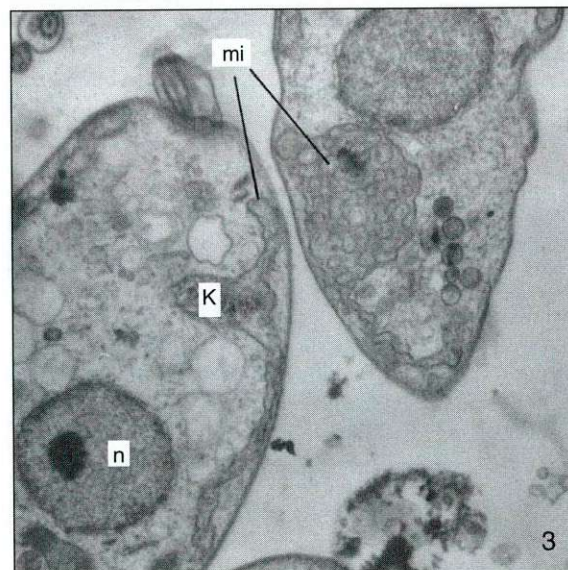
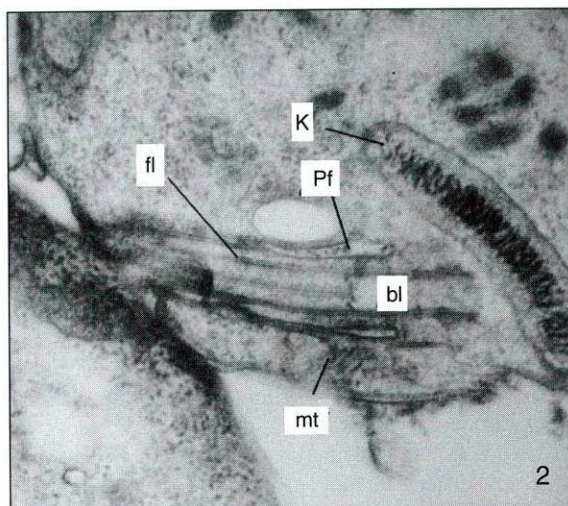
Organites des trypanosomes au microscope électronique

1. Schéma de l'ultrastructure d'un trypanosome (d'après Melhorn et al. 1979)

- AX axonème (du flagelle)
- B corpuscule basal
- F flagelle avec sa structure de 9 paires de fibrilles
- K kinétoplaste
- MT microtubules sous la membrane plasmatique
- N noyau
- NU nucléole
- PF poche flagellaire
- RE réticulum endoplasmique.
- V vacuole

2, 3. Photos au microscope électronique illustrant certains constituants.

- bl corpuscule basal (blépharoplaste)
- fl flagelle
- k kinétoplaste
- mi mitochondrie
- mt microtubules
- n noyau
- pf poche flagellaire



boxyliques (Krebs) contenus dans la mitochondrie, atrophique dans la forme trypomastigote. Ainsi, au stade sanguin, le trypanosome ignore-t-il la partie la plus énergétique du catabolisme du glucose, grand pourvoyeur d'ATP.

D'autre part, un manteau épais de glycoprotéines recouvre la membrane plasmatique du trypanosome parasite du vertébré. Cette protéine antigénique, dont le trypanosome peut modifier la structure (sous contrôle génique) au cours de l'infection, permet au parasite d'échapper à la lyse immunitaire.

Dans l'estomac de l'insecte

Enfermé dans une gouttelette de sang stagnant, le trypanosome ne pourra survivre qu'en réalisant

d'urgence une adaptation métabolique qui lui permettra de tirer le maximum d'énergie d'un environnement appauvri en glucose et en oxygène. Le développement de la mitochondrie, atrophiée et inactive dans les formes sanguicoles, remplit bientôt toute la partie postérieure du parasite, refoulant le kinétoplaste vers l'avant, l'amenant à proximité du noyau et reproduisant ainsi la morphologie d'un épimastigote. La mitochondrie postérieure des trypanosomes est un organe à double paroi, large, ramifié et pourvu de multiples "crêtes", replis de la membrane interne. Elle contient les enzymes du cycle de Krebs et les cytochromes qui autorisent l'oxydation (déshydrogénation) et la décarboxylation de l'acide pyruvique produit par la chaîne glycolytique.

La glycoprotéine de surface n'existe pas: le gène qui la produit est réprimé pendant le séjour chez l'insecte. Il reprend ses activités au moment de la transformation en métacyclique, préparant ainsi l'invasion du sang du vertébré.

5.3 La variation antigénique

La glycoprotéine qui recouvre la membrane plasmatique du trypanosome sanguicole comporte 500 acides aminés dont la séquence peut changer au sein d'une population de trypanosomes se reproduisant par bipartition. Les appellations de glycoprotéine variable, antigène variable, antigène de surface, manteau antigénique ("surface coat"), évoquent cette couche compacte, imperméable, composée de quelques 10^7 molécules solidement ancrées dans la membrane du parasite et pouvant s'en détacher sur commande.

La synthèse de cette molécule, réalisée à l'intérieur du cytoplasme, est sous la dépendance d'une série de plus de 1000 gènes dont un seul à la fois est activé et donc responsable de la structure d'une molécule bien définie, avec une séquence unique d'acides aminés. Chaque gène induit une séquence différente, changeant ainsi la structure de l'antigène et permettant au trypanosome qui en est recouvert d'échapper aux anticorps synthétisés par l'hôte contre la séquence précédente. La population de trypanosomes porteurs d'un antigène déterminé est appelée "type antigénique variable" ("variable antigenic type", VAT). La séquence dans le temps de ces glycoprotéines, donc des antigènes de surface caractérisant la population de parasites qui en sont porteurs, a reçu le nom de "répertoire antigénique variable" ("variable antigenic repertoire", VAR).

5.4 Modulations de l'adaptation à la glossine

Le comportement de trois sous-genres de *Trypanosoma* est évoqué pour faciliter la comparaison.

Le sous-genre *Trypanozoon*

Chez *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei* on observe, au cours du cycle, une colonisation de tous les tissus de la glossine. Leur cycle est le plus complexe: ils doivent franchir des obstacles divers pour transiter de l'estomac jusqu'au terme de leur développement en trypomastigotes métacycliques dans les glandes salivaires. Le cycle complet prend plus de 18 jours et le pourcentage d'infection salivaire chez des glossines nourries sur des animaux infectés par *T. (T.) brucei* est de l'ordre de 1 p.100 ou même moins.

Le sous-genre *Nannomonas*

Ces trypanosomes se cantonnent dans le tube digestif de la glossine: après l'estomac, ils rebroussement chemin et viennent terminer leur cycle dans les pièces buccales (trompe) où la transformation en trypomasti-

gotes métacycliques a lieu. Le cycle complet prend 10 jours et le taux d'infection du proboscis chez des glossines nourries sur des animaux infectés par *T. (N.) congolense* est de l'ordre de 30 p.100.

Le sous-genre *Duttonella*

Ces trypanosomes restent dans le proboscis, ils ne colonisent pas le tube digestif. La multiplication des épimastigotes, attachés à la paroi du canal alimentaire, et la maturation en trypomastigotes métacycliques ont lieu dans les pièces buccales. Le cycle prend 4 jours et le taux d'infection des glossines nourries sur des animaux infectés par *T. (D.) vivax* est de plus de 90 p.100. Ces trypanosomes sont les moins tributaires de l'insecte. De nombreuses espèces de glossines assurent la transmission cyclique (avec les transformations et la multiplication prévues pendant le séjour chez l'insecte). Mais de plus, d'autres genres de mouches piqueuses peuvent les transmettre mécaniquement (simple transport de la forme sanguicole d'un vertébré à un autre). Leur distribution cosmopolite tropicale (dans et hors des zones à glossines) en est la conséquence.

BIBLIOGRAPHIE

- HOARE CA. (1972) *The trypanosomes of mammals. A zoological monograph*. Oxford, Edinburgh, Blackwell Scientific Publications.
- LUMSDEN WHR. (1974) Leishmaniasis and trypanosomiasis: the causative organisms compared and contrasted, In: K ELLIOTT, M O'CONNOR and GEW WOLSTENHOLME (Eds), *Ciba Symposium (new series) Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease*, North Holland Elsevier Excerpta Medica, **20**, 3-27.
- VICKERMAN K. (1974) The ultrastructure of pathogenic flagellates, In: K ELLIOTT, M O'CONNOR and GEW WOLSTENHOLME (Eds), *Ciba Symposium (new series) Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease*, North Holland Elsevier Excerpta Medica, **20**, 171-198.
- TRAGER W. (1974) Nutrition and biosynthetic capabilities of flagellates: problems of *in vitro* cultivation and differentiation, In: K ELLIOTT, M O'CONNOR and GEW WOLSTENHOLME (Eds), *Ciba Symposium (new series) Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease*, North Holland Elsevier Excerpta Medica, **20**, 225-254.
- BOWMAN IBR. (1974) Intermediary metabolism of pathogenic flagellates, In: K ELLIOTT, M O'CONNOR and GEW WOLSTENHOLME (Eds), *Ciba Symposium (new series) Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease*, North Holland Elsevier Excerpta Medica, **20**, 255-284.
- GRAY AR, LUCKINS AG. (1976) Antigenic variation in salivarian trypanosomes, In: WHR LUMSDEN and DA EVANS (Eds) (1976) *Biology of the kinetoplastida*. London, Academic Press, **1**, 493-542.
- D'ALESSANDRO A. (1976) Biology of *T. (Herpetosoma) rangeli* Tejera 1920, In: WHR LUMSDEN and DA EVANS (Eds) (1976) *Biology of the kinetoplastida*. London, Academic Press, **1**, 327-403.
- VICKERMAN K, PRESTON TM. (1976) Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates, In: WHR LUMSDEN and DA EVANS (Eds) (1976) *Biology of the kinetoplastida*. London, Academic Press, **1**, 35-130.
- VICKERMAN K, BARRY D. (1982) African Trypanosomes. In: S COHEN and KS WARREN, *Immunology of parasitic infection*, 2nd ed., Oxford, Blackwell Scientific Publications, pp. 204-260.
- PAYS E, STEINERT M. (1988) Control of antigen gene expression in African trypanosomes. *Annual Review of Genetics*; **22**, 107-126.

Trypanosoma cruzi et les Stercoraria La maladie de Chagas

9

Introduction

Les stercoraria regroupent les Protozoaires du genre *Trypanosoma* dont les formes métacycliques infectantes se trouvent dans les déjections de l'insecte. L'hôte vertébré s'inocule lui-même, en se grattant, les parasites déposés par l'insecte sur sa peau (grattage, voie transmuqueuse...).

Ils se répartissent en quatre sous-genres.

Sous-genre *Megatrypanum*: parasites de mammifères, de grande taille et peu pathogènes, leur kinétoplaste est situé entre l'extrémité postérieure et le noyau.

Sous-genre *Herpetosoma* : parasites des rongeurs, de taille moyenne, possédant un kinétoplaste subterminal et une extrémité postérieure pointue, ils se reproduisent sous forme épimastigote chez l'hôte invertébré.

Sous-genre *Schizotrypanum*: parasites sanguicoles petits ou moyens (15 à 24 µm), remarquables par leur forme typique en C (croissant) et leur kinétoplaste volumineux et situé très près de l'extrémité postérieure pointue, ils se multiplient en phase intracellulaire sous la forme amastigote et sont transmis par les insectes de la famille des réduvidés.

Sous-genre *Endotrypanum*: parasites de certains animaux sauvages, ils sont de petite taille et souvent en position intraglobulaire.

1. *TRYPANOSOMA (MEGATRYPANUM) THEILERI* Laveran 1902

1.1 Morphologie

Le parasite mesure de 40 à 70 µm sur 5 à 6 µm et a des extrémités effilées. Son kinétoplaste est situé à proximité du noyau qui occupe une position centrale. La membrane ondulante large se prolonge par un flagelle libre.

1.2 Hôtes

Les hôtes vertébrés sont des ruminants domestiques (bovidés) et sauvages.

Les hôtes invertébrés (vecteurs) sont des mouches piqueuses à distribution cosmopolite: *Melophagus*, *Tabanus*, *Hippobosca*.

1.3 Cycle et mode de transmission

Le trypanosome se trouve dans le sang des bovidés en très petit nombre: il se multiplie seulement au début de l'infection sous forme épimastigote. Il est repris par l'hôte invertébré avec le repas sanguin, passe par une phase de prolifération dans l'estomac puis se retrouve sous forme métacyclique infectante dans les déjections de l'insecte après avoir parcouru le tube digestif du vecteur dans sa totalité (stercoraria).

1.4 Pouvoir pathogène

Il est très peu important chez le bétail: les animaux peuvent vivre en parfaite santé avec des trypanosomes dans leur sang périphérique. Des parasitémies importantes peuvent toutefois être observées en cas d'affection intercurrente du bétail (piroplasmose, peste bovine).

Remarque

D'autres espèces appartiennent à ce sous-genre: *Trypanosoma (M.) melophagium* (mouton) et *Trypanosoma (M.) ingens* (bétail, antilope), peu pathogènes, ressemblent à *T. (M.) theileri*.

2. *TRYPANOSOMA (HERPETOSOMA) LEWISI* Kent 1880

2.1 Morphologie

Le corps étroit et effilé mesure de 20 à 25 µm de longueur sur 1,5 µm. Les extrémités sont pointues, le kinétoplaste subterminal et le noyau allongé est situé dans la partie antérieure du corps. La membrane ondulante se prolonge par un flagelle libre (figure 9-1).

1. *Trypanosoma theileri*
 - 1.1 Morphologie
 - 1.2 Hôtes
 - 1.3 Cycle et mode de transmission
 - 1.4 Pouvoir pathogène
2. *Trypanosoma lewisi*
 - 2.1 Morphologie
 - 2.2 Hôtes
 - 2.3 Cycle et mode de transmission
 - 2.4 Pouvoir pathogène
3. *Trypanosoma cruzi*
 - 3.1 Historique
 - 3.2 Morphologie (forme sanguicole)
 - 3.3 Hôtes vertébrés
 - 3.4 Hôtes invertébrés
 - 3.5 Cycle évolutif: morphologie, caractères biologiques
 - 3.6 Evolution de l'infection
 - 3.7 Evolution de l'infection chez les patients immunodéprimés
 - 3.8 Pathogénie
 - 3.9 Diagnostic de laboratoire
 - 3.10 Traitement
 - 3.11 Données épidémiologiques
 - 3.12 Méthodes de contrôle
4. Le sous-genre *Endotrypanum*

Bibliographie

FIGURES

- 9-1 Stercoraria sanguicoles
- 9-2 Réduve, vecteur de la maladie de Chagas
- 9-3 Stade hypomastigote de *T. cruzi*
- 9-4 Stade amastigote de *T. cruzi*
- 9-5 Stade épimastigote de *T. cruzi*
- 9-6 Cycle de *T. (S.) cruzi*
- 9-7 Immuno-électrophorèse dans l'infection par *T. cruzi*

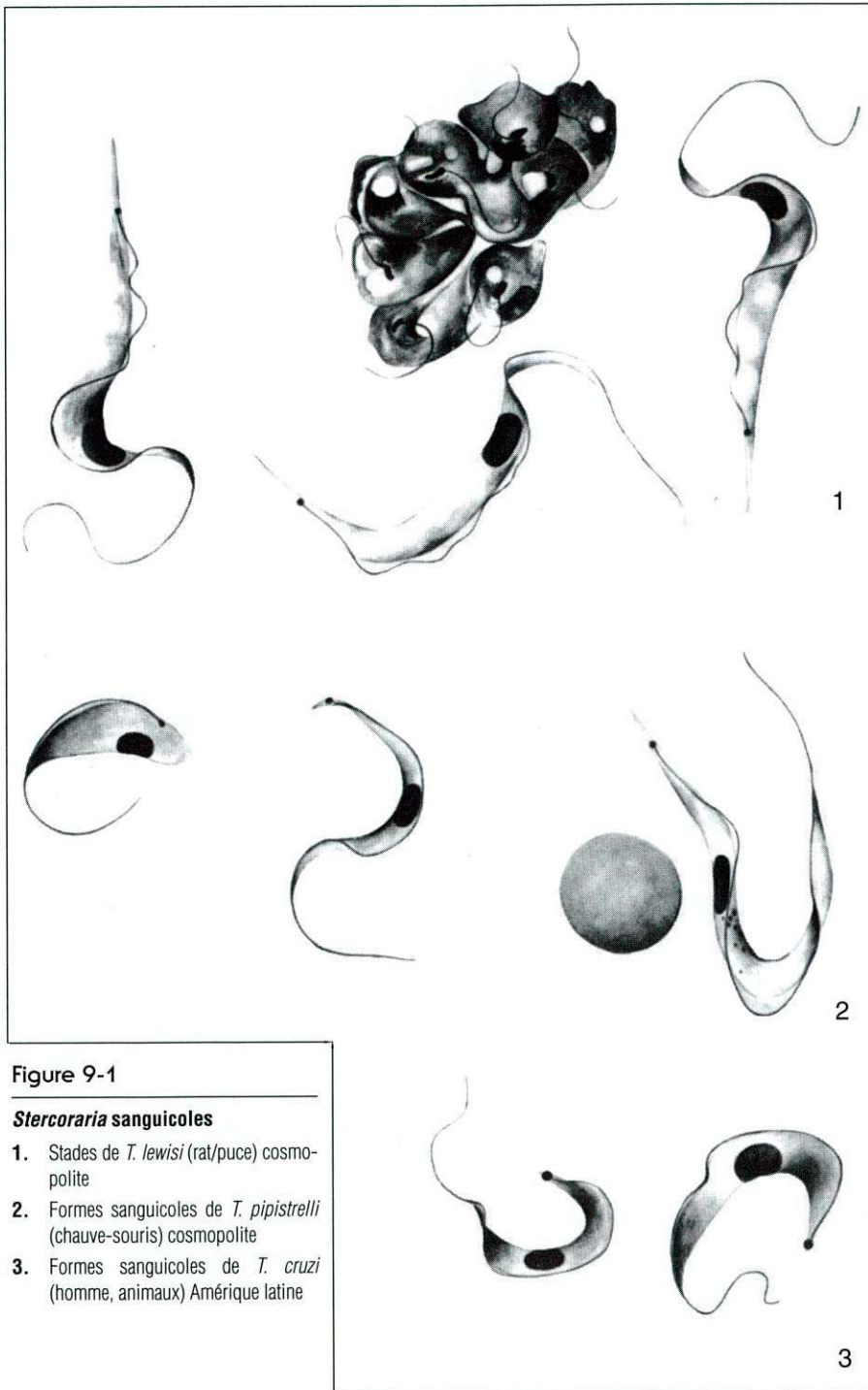


Figure 9-1

Stercoraria sanguicoles

1. Stades de *T. lewisi* (rat/puce) cosmopolite
2. Formes sanguicoles de *T. pipistrelli* (chauve-souris) cosmopolite
3. Formes sanguicoles de *T. cruzi* (homme, animaux) Amérique latine

2.2 Hôtes

Les rongeurs (*Rattus rattus* et autres rats, sauvages et semi-domestiques) en sont les hôtes vertébrés.

L'hôte invertébré est la puce du rat (*Ceratophyllus fasciatus*).

2.3 Cycle et mode de transmission

Chez le rat infecté, les formes de multiplication ont leur kinétoplaste à proximité du noyau (épimastigotes): elles sont majoritaires au cours de la première semaine d'une infection expérimentale. Plus tard, la multiplication se ralentit et l'infection passe à la chronicité. Les parasites se présentent alors sous forme fine, à kinétoplaste nettement postérieur (trypomastigote).

La puce absorbe le sang de rat contenant les parasites. Les trypanosomes pénètrent dans la paroi intestinale et s'y multiplient. Ils s'arrondissent incomplètement pour former une masse piriforme qui se divise par schizogonie. La rupture de la cellule hôte amène la libération des parasites dans la cavité intestinale de la puce. Les parasites nés de cette schizogonie sont des épimastigotes qui se multiplient par bipartition dans l'intestin.

Arrivés dans l'ampoule rectale, un certain nombre évoluent vers la forme métacyclique infectante (forme trypomastigote). On retrouve ces formes dans les déjections de la puce. L'infection du rat se produit par l'intermédiaire des déjections que les animaux avalent en se léchant ou en dévorant les puces.

2.4 Pouvoir pathogène

Aucun. Ce parasite de rongeur a fait l'objet de nombreuses études au laboratoire et a contribué à l'acquisition de connaissances sur les trypanosomes.

Remarque

D'autres trypanosomes de ce sous-genre infectent les rongeurs: *Trypanosoma (H.) musculi*, parasite de la souris grise de maison et *Trypanosoma (H.) microti*, parasite de *Microtus montanus*, rongeur campagnard.

3. *TRYPANOSOMA (SCHIZOTRYPANUM) CRUZI* Chagas 1909**3.1 Historique**

D'abord observé en 1909 dans l'intestin de réduves de la province de Minas Gerais au Brésil par Carlos Chagas, le trypanosome fut transmis à des singes.

Recherché chez des vertébrés, c'est d'abord dans le sang du chat qu'il fut trouvé puis chez l'homme. La maladie et ses lésions anatomo-pathologiques sont décrites dans une série de publications de Chagas et Vianna entre 1909 et 1911.

3.2 Morphologie (forme sanguicole)

C'est ce stade qu'il faudra reconnaître au microscope pour le diagnostic lors d'un examen de sang. Le corps de ce trypomastigote en forme en croissant mesure 17 à 21 µm de long (figure 9-1). Les extrémités sont effilées, le noyau médian et arrondi, le kinétoplaste gros et subterminal. La membrane ondulante se prolonge par un flagelle libre. Des formes minces et épaisses semblent avoir été identifiées. On leur attribuerait une infectivité différente pour le vecteur.

3.3 Hôtes vertébrés

Homme

L'homme infecté sert de réservoir aussi bien à la phase aiguë qu'à la phase chronique (peut-être pas en permanence).

Réservoir sylvatique

Environ 150 espèces animales sont reconnues comme réservoir de *T. cruzi* (armadillos, singes, chauve-souris, rongeurs, carnivores...). Les oiseaux et les amphibiens sont réfractaires à l'infection.

Trois catégories méritent une mention spéciale.

- MARSUPIAUX

L'opossum, petit marsupial (*Didelphis marsupialis*) a des contacts étroits avec les réduves de même qu'avec de petits rongeurs et des chauve-souris souvent parasités dont il se nourrit occasionnellement. De la taille d'un chat, il a un museau pointu, des oreilles nues, une queue recouverte d'écailles et un poil raide et soyeux. Rural ou urbain, il fait son nid aussi bien dans la forêt (arbres) que dans les maisons (combles). Sa distribution géographique est large (40°Nord à 40°Sud).

- EDENTÉS

Le tatou (*Dasypus sp.*) est un mammifère dont la carapace formée de plaques cornées dessine une série de bandes transversales. Il a une queue, peut se rouler en boule comme le hérisson et vit dans des terriers qui sont un refuge pour les réduves. Il est un important réservoir sylvatique. Sa distribution géographique est large.

- CHAUVÉ-SOURIS

L'infection par *T. cruzi* a été identifiée chez 22 espèces au Brésil. Elles entretiennent efficacement le cycle sylvatique. L'infection fréquente de ces animaux par *T. dionisii* (non transmissible à l'homme) peut créer une confusion dans l'appréciation de leur rôle comme réservoir.

Réservoir domestique

Les rongeurs domestiques (*Rattus rattus* entre autres) assurent le lien entre écotopes sylvatique et domestique. La souris de maison mange des réduves et s'infecte. Le chien et le chat entretiennent un contact étroit avec l'homme: le chat mange les souris et s'infecte. Les cobayes (10 à 60 p.100 d'infectés, d'après les enquêtes) élevés autour de la maison, y trouvent refuge pour la nuit. Tous ces animaux sont réceptifs à l'infection.

Les porcs, les chèvres et le bétail vivent autour des endroits habités mais sont rarement trouvés infectés: ils ne constituent qu'un réservoir d'importance secondaire.

La poule et les gallinacés sont réfractaires à l'infection bien qu'ils servent souvent de repas sanguin aux réduves à proximité de la maison.

Tous les animaux qui vivent à l'intérieur des habitations contribuent à augmenter la population de réduves.

3.4 Hôtes invertébrés

Réduves (noms vernaculaires: "Vinchuca", "Ulu-chi")

Insectes de l'Ordre des Hémiptères appartenant à la famille des réduvidés (Reduviidae) et à la sous-famille des triatomes (Triatominae), ils disposent d'une trompe à 3 segments repliée au repos sous le thorax (figure 9-2).

Les trois genres les plus importants comme vecteurs de l'infection humaine sont *Rhodnius*, *Triatoma* et *Panstrongylus* (tableau 9-1).

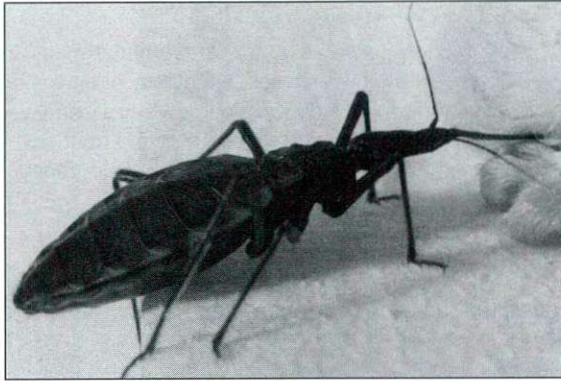
Les critères de distinction entre ces trois genres sont

- la morphologie générale: taille pouvant varier de 5 à 45 mm selon les espèces, tête (allongée chez *Rhodnius*, trapue chez *Panstrongylus*), couleur (jaune clair à noir), taches contrastées du *con-nexivium* sur le pourtour de l'abdomen (jaunes, orangées, blanches, rouges, grises, vertes), dimensions des antennes et des yeux;
- le profil iso-enzymatique;
- l'analyse cytogénétique.

Figure 9-2

Réduve, vecteur de la maladie de Chagas

Triatoma spinolai au début de son repas sanguin

**Remarque**

Le connexivium est une membrane en accordéon qui borde l'abdomen et lui permet, en se dépliant, de se distendre lors du repas sanguin.

Caractères biologiques

Ces insectes peuvent vivre jusqu'à des altitudes de 4.000 m.

En zone habitée, ils se reposent pendant la journée autour de la maison, dans les poulaillers et autres installations annexes construites en bois, paille, pisé, briques empilées non cimentées ou dans la maison, dans les fentes des murs, faux plafonds, derrière les meubles, tableaux, potiches, sous les lits, etc.

Hématophages à tous les stades et dans les deux sexes, ils se nourrissent pendant la nuit à proximité de leur gîte. Le repas de sang (qui peut comporter jusqu'à 0,5 ml) est la seule activité, il est pris indifféremment sur l'homme ou sur l'animal, suivant les disponibilités toutes les 1 à 2 semaines (très variable d'après les espèces et les conditions de température).

Tableau 9-1

Espèces vectrices (domestiques) et préférences trophiques

Espèce	Hôtes préférentiels
<i>Triatoma dimidiata</i>	homme, rongeurs, volaille;
<i>Rhodnius prolixus</i>	homme, volaille, chat, chien, opossum, rongeurs;
<i>T. infestans</i>	homme, volaille, chien, chat;
<i>T. sordida</i>	oiseaux, homme;
<i>Panstrongylus megistus</i>	oiseaux, rongeurs, homme;
<i>T. brasiliensis</i>	oiseaux, homme;
<i>R. pallescens</i>	homme, opossum, volaille.

Remarque importante

La grande majorité (84 à 99 p.100) des repas sanguins sont pris sur l'homme, le poulet, le chien et le chat.

Une femelle pond entre 300 et 1000 oeufs durant son existence de quelques mois. Un cycle complet (œuf, stades larvaires, nymphe, adulte) prend environ 6 mois pour *Rhodnius*, plus longtemps (dépassant souvent un an) pour les espèces sylvatiques.

Voici les gîtes préférentiels de quelques espèces.

Réduvidés des habitations: *T. infestans*, *R. prolixus*.

Réduvidés semi-domestiques pouvant pénétrer dans les habitations: *T. dimidiata*; *T. sordida*, *P. megistus*.

Réduvidés de la campagne et sylvatiques: nombreuses espèces.

3.5 Cycle évolutif: morphologie, caractères biologiques**Chez l'hôte vertébré**

- FORME TRYPMASTIGOTE

Forme mobile dans le sang, pourvue d'un flagelle, elle ne se multiplie pas mais pénètre dans les cellule cibles: macrophages du SRE, cellules musculaires du myocarde, cellules nerveuses (gliales du système nerveux central ou ganglionnaires des relais périphériques). Elle y prendra la forme amastigote. L'abondance de la forme sanguicole dépend de l'intensité de la multiplication en phase intracellulaire et c'est elle qui est reprise par l'insecte lors de son repas sanguin (figure 9-3).

- FORME AMASTIGOTE

Intracellulaire, arrondie et dépourvue de flagelle, cette forme se caractérise par sa petite taille (3 à 5 µm de diamètre), la présence d'un noyau et d'un kinétoplaste. Le parasite se divise activement sous cette forme et cause la destruction de la cellule hôte. Libérés dans le sang, les amastigotes se transforment en trypomastigotes. Certains cependant sont repris tels quels par d'autres macrophages et phagocytés (figure 9-4).

Ne fixant pas les composants du complément, les trypomastigotes utiliseraient, pour adhérer à leur cellule cible, une opsonine plasmatique, la fibrinectine. Pour les cellules non phagocytaires (musculaires, nerveuses), la pénétration se ferait de façon active et la multiplication aurait lieu sans problème sous la forme amastigote.

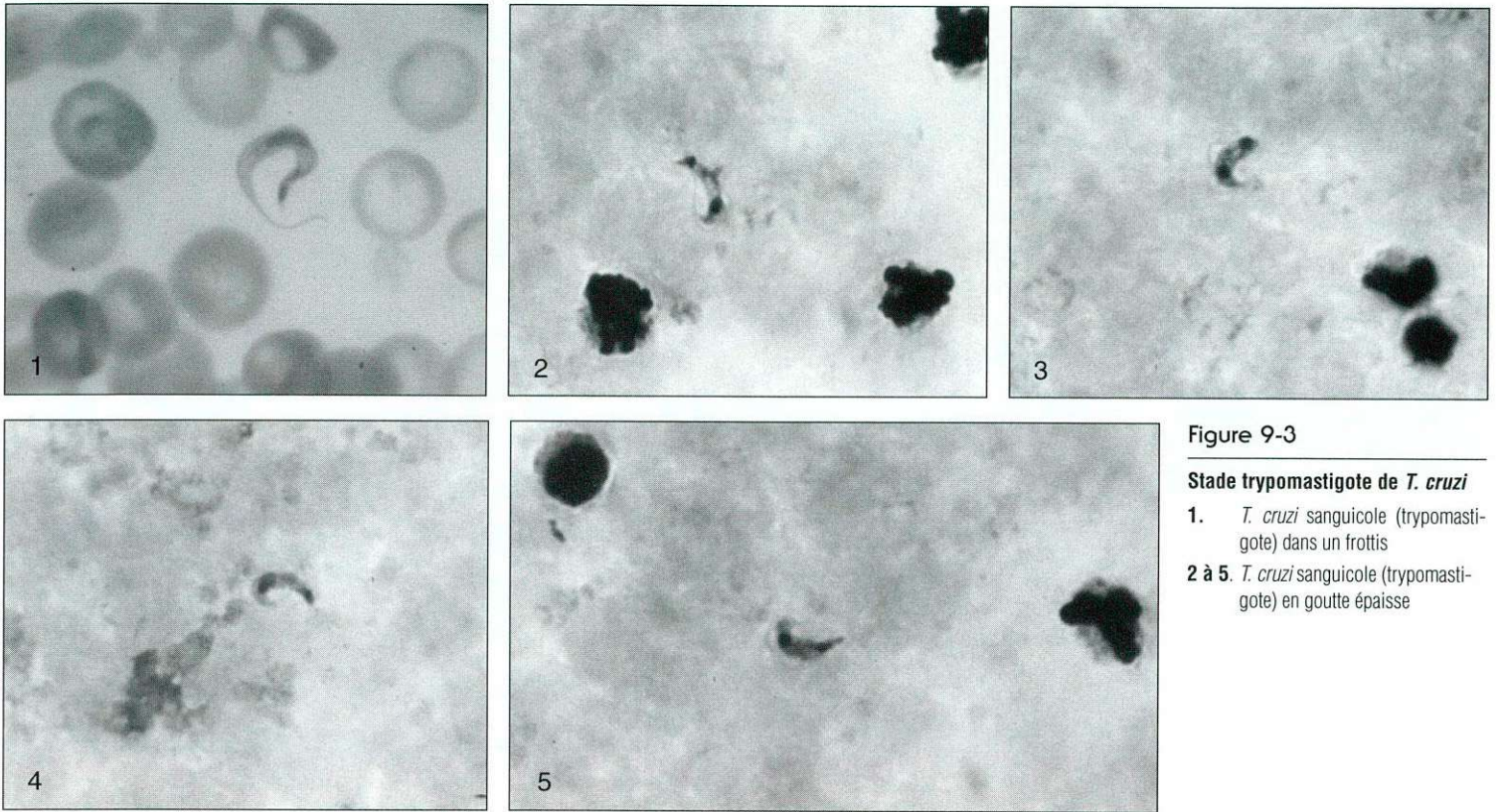


Figure 9-3

Stade trypomastigote de *T. cruzi*

1. *T. cruzi* sanguicole (trypomastigote) dans un frottis
- 2 à 5. *T. cruzi* sanguicole (trypomastigote) en goutte épaisse

Figure 9-4

Stade amastigote de *T. cruzi*

- 1, 2. *T. cruzi* en position intracellulaire (amastigotes) dans du tissu musculaire
3. Dessin d'amastigotes intracellulaires



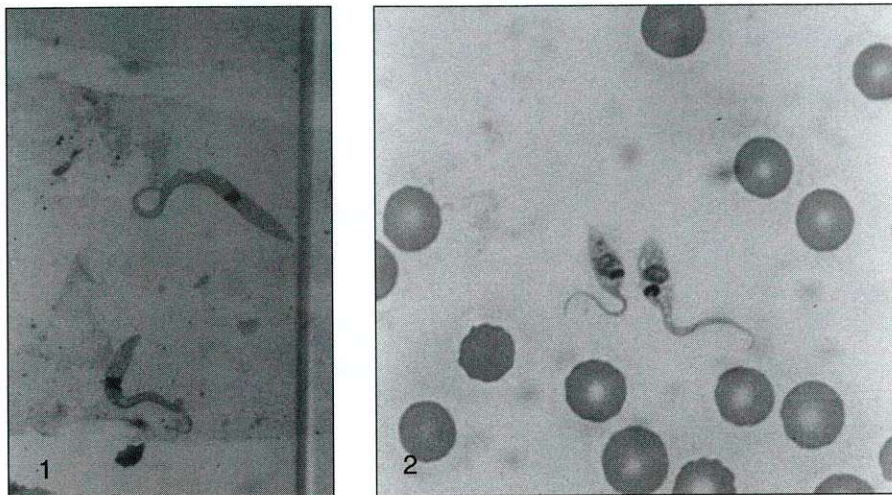


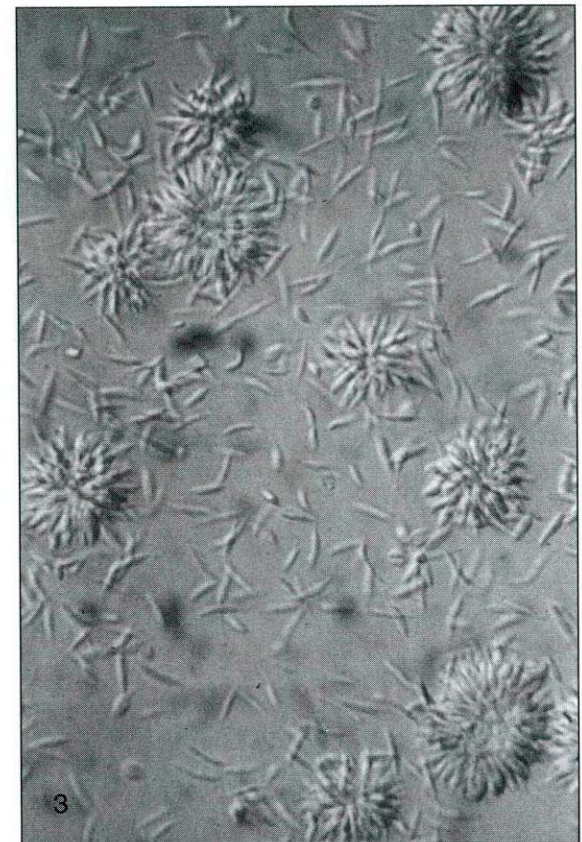
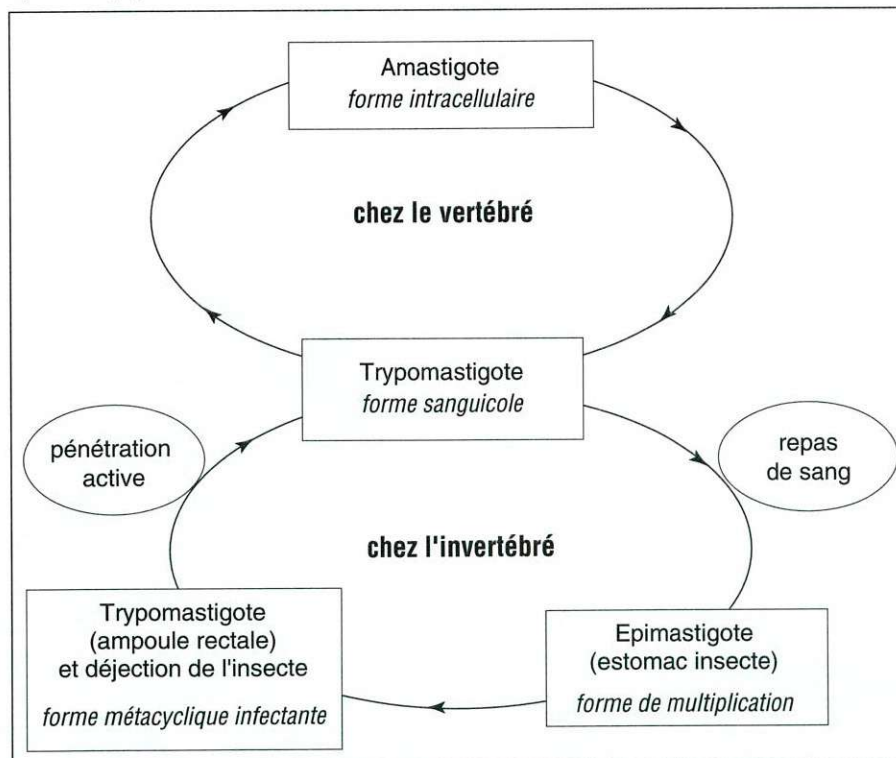
Figure 9-5

Stade épimastigote de *T. cruzi*

- 1, 2 épimastigotes de l'estomac du vecteur (coloration au Giemsa)
3 épimastigotes de culture ("rosaces" vues au contraste de phase)

Figure 9-6

Cycle de *T. (S.) cruzi*



Si la cellule cible est un macrophage, il y a phagocytose. Les trypomastigotes, tout comme les amastigotes immédiatement repris par les macrophages au moment de l'éclatement d'une cellule hôte, sont alors enfermés dans une vacuole parasitophore où ils devraient être détruits lors de la fusion de celle-ci avec les lysosomes. Mais les parasites parviendraient, dans les minutes qui suivent, à détruire la membrane de la vacuole parasitophore et à se réfugier dans le cytoplasme où ils se multiplient impunément sous forme amastigote.

Chez l'insecte

- FORME ÉPIMASTIGOTE

Forme de multiplication dans l'estomac de l'insecte, elle évolue vers la forme métacyclique en parcourant l'intestin postérieur (figure 9-5).

- FORME TRYPMASTIGOTE

Présente dans l'ampoule rectale et dans les déjections (forme métacyclique infectante), elle est déposée au voisinage de la piqûre par la réduve sur la peau du sujet endormi. Les transformations d'une forme à l'autre sont schématisées dans la figure 9-6.

3.6 Evolution de l'infection

Phase aiguë

Au lieu de pénétration (porte d'entrée), on observe une réaction inflammatoire locale (chagome) inconstante

- au niveau de la face (chagome oculaire): œdème palpébral et périoculaire (signe de Romana);
- au niveau de la peau: aspect furonculoïde et adénopathies.

La période aiguë est caractérisée par l'abondance des trypanosomes dans le sang et la fréquence de l'atteinte infantile. La multiplication des amastigotes intracellulaires a lieu principalement dans les macrophages mais aussi dans les cellules musculaires et gliales.

Cette phase dure 8 à 10 semaines et est accompagnée

- de symptômes généraux: fièvre, hépato-splénomégalie, œdèmes généralisés, asthénie, céphalées, myalgies, adénopathies;
- de symptômes de localisation: formes œdémateuses, respiratoires, neurologiques (méningo-encéphalite), gastro-intestinales (anorexie, diarrhée, vomissements), cardiaques (myocardite aiguë).

Phase "indéterminée"

Elle peut durer 10 à 20 ans et évolue vers la phase chronique dans 30 p.100 des cas environ. Elle est asymptomatique mais la sérologie est positive et le xénodiagnostic est positif dans 20 à 60 p.100 des cas. Les patients à ce stade constituent un réservoir de parasites.

Phase chronique

Avec la séropositivité qui est la règle, diverses localisations suggéreront la phase chronique.

Le tropisme cardiaque (myocardite) peut amener des perturbations de l'électro-cardiogramme, l'hypertrophie, l'arythmie (cas de mort subite).

Le tropisme digestif est marqué par des troubles du péristaltisme dus à l'atteinte du système nerveux autonome et conduisant au mégacécum (dysphagie) ou au mégacolon (constipation de plus de 7 jours).

La neuropathie chagastique est une atteinte du système nerveux central, périphérique ou végétatif avec troubles moteurs, sensoriels, cérébelleux, psychiques...

3.7 Evolution de l'infection chez les patients immunodéprimés

Une revue récente (1994) de 23 cas d'infection double à VIH et *T. cruzi* attire l'attention sur la fréquence de la méningo-encéphalite, localisation peu courante dans la maladie de Chagas, observée dans 20 cas dont 9 avec présence constatée de nombreux parasites dans le LCR. Les amastigotes se trouvent dans le cytoplasme de cellules gliales ou de macrophages, principalement dans les zones nécro-hémorragiques.

D'autre part, des poussées de myocardite aiguë peuvent survenir pendant la phase chronique de l'évolution, avec des amastigotes dans les myocytes et les macrophages de l'exsudat inflammatoire.

La fréquence de cette association pourrait croître avec le degré d'urbanisation.

3.8 Pathogénie

Le mécanisme par lequel *T. cruzi* provoque les lésions de la maladie de Chagas est imparfaitement compris. Il peut s'expliquer par un effet direct des amastigotes sur les cellules nerveuses, avec conduction altérée aux niveaux du myocarde et des organes creux. Les cellules musculaires détruites laissent la place à du tissu cicatriciel non fonctionnel. Au niveau des neurones, une destruction importante pendant la phase aiguë (réaction inflammatoire) produira des effets tardifs par désorganisation des fibres.

Il pourrait aussi s'agir d'une réaction auto-immunitaire, s'expliquant par une identité des antigènes de *T. cruzi* et des tissus de l'hôte ou par un mécanisme qui causerait la couverture des cellules de l'hôte par des antigènes de *T. cruzi*. Dans les deux cas, les anticorps spécifiquement dirigés contre le parasite détruiraient les cellules de l'hôte. On a pu montrer récemment, à l'aide d'immuns-sérums de cardiopathies chagastiques, que l'épitope "JL5" d'antigène de *T. cruzi* (peptide constitué d'une séquence de 11 acides aminés) reconnu par les anticorps est identique à une séquence d'une protéine "P" ribosomale humaine. Ceci renforce la théorie de l'auto-immunité.

Au niveau du myocarde, une réaction d'hypersensibilité produira une inflammation chronique par présence de cellules immuno-compétentes, avec composante vasculaire et fibrose, même en l'absence de parasites.

3.9 Diagnostic de laboratoire

En phase aiguë, 95 p.100 des cas ne sont pas diagnostiqués. En phase chronique, 10 p.100 environ pré-

sentent une symptomatologie éloquent et chez des patients asymptomatiques, 20 p.100 peuvent être diagnostiqués par des méthodes d'investigation sensibles.

**Mise en évidence du trypanosome
par examen du sang
(uniquement au stade aigu)**

- EXAMEN À FRAIS, GOUTTE ÉPAISSE, FROTTIS

Dans l'examen à frais, il faudra veiller à ne pas confondre *T. cruzi* et *T. rangeli*, ce dernier n'étant pas pathogène (voir chapitre 10).

- MÉTHODES DE CONCENTRATION

"Buffy coat" suivi d'un examen *in situ* selon Woo (voir chapitre 19) ou entre lame et lamelle;

Méthode de Strout : on laisse coaguler dans un tube 5 ml de sang; après rétraction du caillot, le sérum décanté est centrifugé; on examine alors à frais le culot où sont concentrés les trypanosomes (les parasites, sortis du caillot au cours de la rétraction, conservent leur mobilité dans le sérum).

- XÉNODIAGNOSTIC

Il consiste à faire se nourrir des triatomes élevés au laboratoire sur le patient suspect et à disséquer les insectes ou examiner leurs déjections à intervalles réguliers pendant 60 jours après le repas sanguin. On utilise de préférence des nymphes parce que leur cuticule moins chitinisée que chez l'adulte permet la prise de repas sanguins plus abondants. La multiplication des parasites dans l'intestin procure un enrichissement "biologique".

La sensibilité de l'examen est de 100 p.100 au stade aigu et d'environ 50 p.100 au stade chronique.

- MISE EN CULTURE

C'est la méthode la plus sensible pour le diagnostic parasitologique, utilisant divers milieux (décrits au chapitre 19), comme le "Brain Heart Infusion", le Tobie ou le "kit for *in vitro* isolation" (KIVI®).

L'adaptation facile de ce trypanosome en culture sur milieux semi-synthétiques, dont la composition modèle est le GLSH, permet la production facile de grandes quantités d'épimastigotes. Ces cultures massives fournissent la matière première pour la fabrication des antigènes servant aux tests sérologiques.

- INOCULATION AUX ANIMAUX DE LABORATOIRE

Les jeunes rats, souris, chinchillas, singe *Aotus* présentent de très longues périodes prépatentes et développent des parasitémies très basses quand ils

sont inoculés avec des isolats humains. Cette méthode est à déconseiller pour le diagnostic.

Par contre, au laboratoire, ces animaux permettent d'étudier l'infection et le parasite: selon l'isolat de trypanosomes et l'espèce animale, on peut reproduire des modèles d'infection aiguë (chinchilla), subaiguë ou chronique avec lésions cardiaques (souris).

- SONDAS ADN ET PCR

Ces méthodes sont à l'étude sur le terrain. Des sondes spécifiques de *T. cruzi* sont connues et publiées et on connaît les séquences à amplifier. Il s'agit, dans le cas de la PCR, d'un tel gain de sensibilité sur les méthodes traditionnelles que la surveillance des sangs de transfusion ne devrait plus pouvoir s'en passer.

Sérologie

Au stade aigu, la sérologie reste pratiquement négative. Aux stades indéterminé et chronique, les méthodes sérologiques fournissent un appoint important, tant pour le diagnostic que pour le dépistage et les enquêtes de prévalence.

Le nombre de fractions antigéniques connues est d'environ 30, se répartissant entre Ag somatiques et Ag de surface (l'antigène variable semble peu important).

Les tests utilisés peuvent être regroupés d'après la préparation antigénique utilisée. Les méthodes sont décrites au chapitre 19.

- ANTIGÈNE FIGURÉ (PARASITES INTACTS)

L'immunofluorescence indirecte avec un antigène de culture (formes épimastigotes) ou de formes tissulaires (coupes de tissus d'animaux infectés expérimentalement) a une sensibilité d'environ 98 p.100. Les réactions croisées avec les leishmanies rendent nécessaire la titration des anticorps sur les deux antigènes de genre.

L'agglutination directe avec des épimastigotes traités à la trypsine et fixés au formol offre la possibilité de détecter des IgG et des IgM séparément par traitement secondaire du sérum au dimercapto-éthanol.

- ANTIGÈNE SOLUBLE (EXTRAIT TOTAL DE *T. CRUZI*)

Le test de fixation du complément avec Ag de culture purifié par délipidation donne 75 à 95 p.100 de sensibilité. La titration des anticorps est nécessaire pour éliminer les réactions croisées avec des leishmanies.

La précipitation en gel avec un antigène soluble révèle la présence de plusieurs systèmes précipitants. En analyse immuno-électrophorétique, le repérage du trait de précipitation numéroté en position 5 est particulièrement précieux car il correspond à la reconnaissance par le sérum du patient, d'un antigène spécifique de *T. cruzi*. Les réactions croisées avec les antigènes communs partagés avec d'autres genres et espèces de la famille des Trypanosomatidae, dont les leishmanies, sont donc exclues. Ceci équivaut pratiquement à un diagnostic de certitude (figure 9-7).

Fractions antigéniques purifiées

Un test d'hémagglutination indirecte utilisant comme Ag une fraction glycoprotéique ou polysaccharidique est commercialisé par les laboratoires Hoechst. Les réactions croisées avec les leishmanies rendent nécessaire la titration.

Des fractions purifiées de *T. cruzi* ont aussi été proposées dans des tests ELISA et d'agglutination de particules de latex.

Peptides synthétiques ou recombinants

Divers antigènes de *T. cruzi* ont été clonés: clones 1, 2, 30, 36, SAPA ("shed acute phase antigen"); les séquences géniques responsables ont été identifiées et les peptides décrits d'après la séquence nucléotidique (24 à 60 acides aminés) ont pu être synthétisés.

Le test ELISA, utilisant 5 peptides synthétiques correspondant à des épitopes des principaux antigènes, permet d'analyser plus finement la réponse de l'hôte à l'infection naturelle. Les sérums testés, positifs en IFI sur épimastigotes, ont donné 96 p.100 de résultats positifs avec l'épitope n° 2 à une dilution dépassant 1/100.

En utilisant le "Dot blot immuno-assay", 100 sérums de patients (45 avec symptômes cliniques divers et 55 en phase indéterminée) ont pu être testés sur 8 peptides recombinants. Tous les sérums de chagasiques étaient positifs en IFAT, 95 p.100 d'entre eux réagissant avec un ou plusieurs peptides: 88 p.100 avec les clones 1 et 2, 78 p.100 avec le clone 13. Des différences de réactivité avec les clones 13, 30 et SAPA ont été observées entre patients symptomatiques et asymptomatiques.

Les recherches de cet ordre se poursuivent dans le but d'analyser la réponse immune vis-à-vis des différents constituants antigéniques de *T. cruzi*.

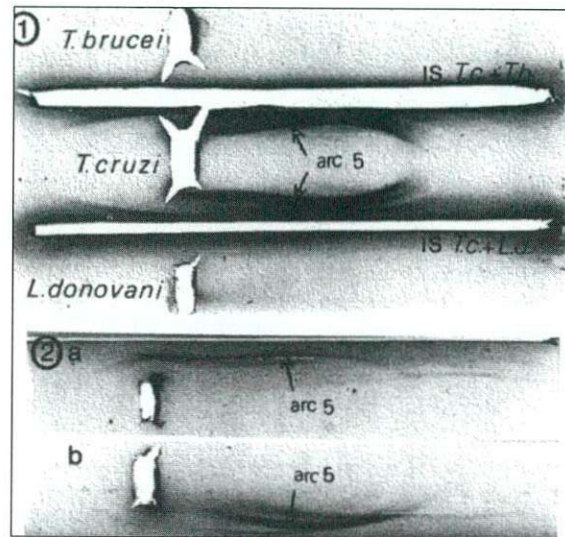


Figure 9-7

Immuno-électrophorèse dans l'infection par *T. cruzi*

Immuno-électrophorèse montrant les composants antigéniques de *T. cruzi* et les arcs de précipitation qu'ils induisent. L'arc n°5, indiqué sur le document, est spécifique de *T. cruzi*.

1. Immuns sérums réagissant contre *T. brucei* (T. b.), *T. cruzi* (T. c.) et *L. donovani* (L. d.)
2. Sérums de patients réagissant contre *T. cruzi*.

Document D. Le Ray.

3.10 Traitement

Dérivé du nitrofurane. Nifurtimox (Lampit®): 10 mg/kg/jour (15 mg chez l'enfant), pendant 60 à 90 jours.

Groupe des nitro-imidazoles. Benznidazole (Rochagas®, Radanil®): 5 à 10 mg/kg/jour pendant 30 à 60 jours. Des études expérimentales chez le lapin ont montré que ce produit tue le trypanosome mais n'arrête pas le développement des lésions myocardiques.

L'atténuation des symptômes de la phase aiguë est généralement obtenue et la guérison (stérilisation du sang et des tissus) est possible. A la phase chronique, aucune cure complète n'a été prouvée parasitologiquement.

3.11 Données épidémiologiques

Distribution géographique

Les cycles à l'intérieur des réservoirs animaux existent entre le nord de la Californie et le sud de l'Argentine et du Chili. La maladie est transmise à l'homme dans les pays d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud, entre le nord du Mexique et les régions nord du Chili et de l'Argentine. L'infection est présente partout où le biotope (température et humidité, altitude) permet le développement du vecteur.

L'OMS (1991) mentionne 100 millions de personnes exposées et 16 à 18 millions de sujets parasités.

Les pays indemnes sont la Guyane, le Surinam et les îles de la mer des Caraïbes.

Origines possibles de l'infection pour l'homme

Elles sont multiples.

Les formes métacycliques d'un réduvidé passent à travers la peau abîmée (excoriations, lésions de grattage, blessures) ou par voie transmuqueuse au voisinage de la piqûre, souvent autour des lèvres ou des yeux ("Kissing bug"). C'est le grattage qui amène le trypanosome au contact de la porte d'entrée: lésion cutanée, conjonctive. La muqueuse buccale peut aussi être traversée (voie "digestive").

Les formes sanguicoles d'un sujet infecté peuvent être transmises par transfusion sanguine (les parasites pouvant survivre plusieurs semaines dans du sang réfrigéré) ou par voie transplacentaire (maladie de Chagas congénitale).

On avance les chiffres de 0,5 à 2 p.100 de nouveaux-nés contaminés chez des mères ayant la maladie de Chagas et jusqu'à 10 p.100 au Brésil, dans une enquête à Bahia.

Les formes sanguicoles ou tissulaires d'animaux peuvent contaminer la nourriture (sécrétions d'opossums envahissant les habitations). Expérimentalement, les chats s'infectent en mangeant des souris infectées (la pénétration des trypanosomes s'effectue au niveau des muqueuses buccales).

L'importance de la transmission sexuelle n'est pas précisée. Des trypanosomes ont été observés dans les urines d'animaux sauvages de même que dans leurs testicules et dans le sperme.

La transmission à l'homme

• EN ZONE RURALE

Les conditions socio-économiques favorisent le contact étroit avec les réduves.

Chez l'insecte, parmi les facteurs qui favorisent la transmission, on peut citer les habitudes physiologiques d'alimentation et de défécation, le degré d'anthropophilie, l'adaptation à la colonisation des habitations, la sensibilité à l'infection, la résistance aux insecticides, la densité des colonies, la présence d'hôtes réservoirs...

De plus, la disponibilité des animaux réservoirs et leur mobilité, le pouvoir infectant (variable) des souches de *T. cruzi* et la viabilité (inconnue) des formes parasitaires ingérées par le vecteur influencent l'efficacité de la transmission.

• EN ZONE URBAINE

Dans les "favelas" en périphérie des grandes villes qui rassemblent 70 p.100 de la population du continent, les réduves pullulent car elles trouvent un habitat à leur convenance dans les maisons faites d'assemblages rudimentaires de matériaux hétéroclites. Le réservoir de trypanosomes y est présent chez les rongeurs et animaux domestiques.

La transmission y est aussi congénitale et transfusionnelle. La prévalence chez la femme enceinte va de 6 p.100 (Argentine) à 51 p.100 (Bolivie) et de 5 à 10 p.100 (Brésil) à 1 à 7 p.100 (Argentine). Près de 20 p.100 des donneurs de sang sont séropositifs pour *T. cruzi* dans les villes de zones endémiques mais même les centres de transfusion des grandes villes en dehors de la zone endémique, comme Santiago, Rio ou São Paulo, ont détecté 0,5 à 2 p.100 de porteurs d'anticorps parmi les donneurs. Or, un million de transfusions sont données par an en Argentine et quatre millions au Brésil.

Prévalence

En Argentine, les enquêtes sérologiques ont indiqué que 6 p.100 des recrues militaires étaient porteurs de l'infection.

Par extrapolation, à partir d'une enquête sérologique de 1960, on estime à plus de 10 millions le nombre de porteurs de *T. cruzi*. Parmi les porteurs, 1 p.100 auraient des symptômes susceptibles d'attirer l'attention du clinicien. La mortalité parmi les patients diagnostiqués a été estimée à 5 à 10 p.100 en période aiguë et à 34 p.100 en période chronique, tandis que l'incapacité de travail due à la maladie chronique serait d'environ 10 p.100.

Variations du pouvoir pathogène et circulation des zymodèmes

L'identification de plusieurs types iso-enzymatiques (zymodèmes) a permis l'étude de la distribution de "souches" de *T. cruzi* entre les différents pays et régions géographiques.

RAPPEL.

Le zymodème est une population de parasites appartenant à un type enzymatique donné.

La maladie peut varier dans sa gravité d'une région géographique à l'autre: fréquence et sévérité des cardiopathies, sévérité des lésions intestinales, fréquence et longueur des épisodes aigus.

Au Vénézuëla où les dilatations de viscères ("mégas") n'existent pas, le zymodème Z1 est prédo-

minant tandis que Z3 est rare. En Amazonie brésilienne où on observe surtout des infections sylvatiques avec des cas humains sporadiques, les deux zymodèmes Z1 et Z3 sont retrouvés. Au Brésil central et oriental (régions côtières) où les "mégas" sont fréquents, on trouve le zymodème Z2.

En Bolivie en dessous de 1.000 mètres d'altitude, les cardiopathies sont bénignes et les "mégas" rares (région de Santa Cruz) tandis qu'entre 1.500 et 3.000 m, on rencontre des cardiopathies sévères et des lésions digestives fréquentes (région de Cochabamba).

Cependant, on n'a toujours pas pu rattacher à des zymodèmes particuliers les tropismes digestifs ou cardiaques, pas plus que la présence ou l'absence de pathogénicité. Une des difficultés de ces études réside dans le fait que de nombreux malades sont infectés par deux ou plusieurs zymodèmes. Or, il n'est pas certain que les essais d'isolement à partir d'un patient permettent le développement de toutes les souches (clones, populations) dont il est porteur.

Les zymodèmes se distribuent aussi de manière différente dans le réservoir animal: le zymodème Z2, par exemple, est plus fréquemment retrouvé chez l'homme ou les animaux domestiques, tandis que les zymodèmes Z1 et Z3 infectent préférentiellement les animaux sauvages et les vecteurs sylvatiques...

3.12 Méthodes de contrôle

Pour les mesures à prendre contre le vecteur, on se reportera au chapitre 20.

Réduction du réservoir de parasites

Le traitement des individus infectés, en vue d'une réduction du nombre de trypanosomes circulant dans le sang, n'a aucun impact épidémiologique vu l'importance du réservoir animal.

Il faut éloigner les animaux domestiques et éviter la présence d'animaux familiers dans la maison. Ils augmentent la population de réduves et la plupart constituent, en plus, un réservoir de parasites.

Contrôle des transfusions

Le dépistage sérologique des donneurs s'impose (nécessité d'étudier sensibilité et spécificité des différentes réactions utilisées).

L'addition de violet de gentiane à la concentration de 1/4.000 tuerait les trypanosomes en 24 heures sans nuire à la conservation des érythrocytes (coloration bleue transitoire des tissus chez le receveur).

Immunisation préventive

Au cours d'essais, des protections partielles ont été obtenues dans des modèles expérimentaux: infection par souches atténuées, injection de fractions antigéniques solubles, infection par espèces antigéniquement apparentées (*Herpetosoma samuel-pessoai*).

4. Le sous-genre *ENDOTRYPANUM* Mesnil et Brimont 1908

Parasites flagellés intraglobulaires des Edentés comme l'armadillo (*Choloepus dactylus*).

Une seule espèce: *T. schaudini*. De petite taille avec kinétoplaste situé aux environs du noyau, il est cultivable sur milieu de Tobie ou NNN (forme épimastigote). Il est transmis par *Lutzomyia sp.*, avec infection de tout le tube digestif de l'insecte et attachement de formes trypomastigotes infectantes à la paroi de l'ampoule rectale.

BIBLIOGRAPHIE

- STROUT RG. (1962) A method for concentrating hemoflagellates, *Journal of Parasitology*, **48**, 100.
- ZELEDON R. (1974) Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. In K ELLIOTT, M O'CONNOR and GEW WOLSTENHOLME (Eds), *Ciba Symposium (new series) Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease*, North Holland Elsevier Excerpta Medica, **20**, 51-85.
- ANSEMI A, MOLEIRO F. (1974) Pathogenic mechanisms in Chagas cardiomyopathy, In K ELLIOTT, M O'CONNOR and GEW WOLSTENHOLME (Eds), *Ciba Symposium (new series) Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease*, North Holland Elsevier Excerpta Medica, **20**, 125-136.
- KÖBERLE F. (1974) Pathogenesis of Chagas' disease, In K ELLIOTT, M O'CONNOR and GEW WOLSTENHOLME (Eds), *Ciba Symposium (new series) Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease*, North Holland Elsevier Excerpta Medica, **20**, 137-158.
- MINTER DM, MINTER-GOEDBLOED E, DE C. MARSHALL TF. (1978) Comparative xenodiagnostic with three Triatomine species of different hosts with natural and experimental chronic infections with *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **72**, 84-91.
- MINTER-GOEDBLOED E, MINTER DM, DE C. MARSHALL TF. (1978) Quantitative comparison between xenodiagnostic and haemoculture in the detection of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in experimental and natural chronic infections, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **72**, 217-225.
- BRENER Z. (1980) Immunity to *Trypanosoma cruzi*. In WHR LUMSDEN, R MULLER, JR BAKER (Eds), *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **18**, 247-292.
- MILES MA, CEDILLOS RA, POVOA MM et al. (1981) Do radically dissimilar *T. cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease? *Lancet*, **I**, 1338-1340.
- BRENIÈRE SF, CARRASCO R, MIGUEZ H et al. (1985) Comparisons of immunological tests for serodiagnosis of Chagas disease in Bolivian patients, *Tropical and geographical Medicine*, **37**, 231-238.
- BRENIÈRE SF, CARRASCO R, SEVALLO R et al. (1989) Chagas disease in Bolivia: Clinical and epidemiological features and zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients, *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **41**, 521-529.
- TEXEIRA ARL, CORDOBA JC, MAIOR IS AND SOLORZANO E. (1990) Chagas'disease: Lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole, *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **43**, 146-158.
- MOTA AE, GUIMARAES AC, SANTANA OO, SHERLOCK I, HOFF R, WELLER T. (1990) A nine years prospective study of Chagas'disease in a defined rural population in North-East Brazil, *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **42**, 429-440.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ (1991) *Lutte contre la maladie de Chagas*, Série de Rapports techniques, **811**.
- VERGARA U, VELOSO C, GONZALEZ A, LORCA M. (1992) Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas disease using synthetic peptides, *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **46**, 39-43.
- LORCA M, GONZALES A, VELOSO C et al (1992) Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic chilean Chagas'disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens, *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **46**, 44-49.
- ROCHA A, OLIVEIRA DE MENESES AC, MOREIRA DA SILVA A et al (1994) Pathology of patients with Chagas'Disease and acquired immunodeficiency syndrome. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **50**, 261-268.

Trypanosoma brucei et les salivaria

Les trypanosomiases africaines

10

Introduction

A l'intérieur du genre *Trypanosoma*, les "salivaria" regroupent les trypanosomes dont les formes métacycliques infectantes se trouvent dans les glandes salivaires ou dans les pièces buccales (trompe) de l'insecte vecteur ("anterior stage"). Les parasites sont injectés par la trompe à travers la peau avec la goutte de salive qui empêche la coagulation du sang à l'endroit de la piqûre. Ils comprennent cinq sous-genres: *Trypanozoon*, *Duttonella*, *Nannomonas*, *Pycnomonas* et *Tejeraia*.

Seul le sous-genre *Trypanozoon* comporte, outre des espèces infectantes pour les animaux, deux espèces infectantes pour l'homme chez qui elles provoquent la maladie du sommeil. Les autres sous-genres comprennent des espèces qui infectent les animaux sauvages et domestiques et ne sont jamais infectantes pour l'homme mais peuvent avoir des répercussions indirectes importantes pour sa santé.

Les trypanosomiases humaines africaines

Elles sont répandues dans 36 pays sub-sahariens et 50 millions de personnes courent le risque de contracter la maladie. Le nombre de nouveaux cas enregistrés chaque année est de l'ordre de 25.000 mais ce nombre est largement sous-estimé, à cause de la précarité des services médicaux couvrant les zones rurales où la maladie sévit à l'état endémique. Le vecteur est une mouche piqueuse du genre *Glossina* (mouche tsé-tsé).

Les trypanosomiases animales

Leur influence sur la production de viande est considérable. Elles ont un intérêt économique important et une influence indirecte sur la santé publique en diminuant la quantité de protéines disponibles. Les bovins, porcs, moutons, chèvres, principales sources de protéines animales par l'élevage industriel ou villa-

geois, sont atteints par ces parasitoses qui, même si elles ne tuent pas l'animal au cours d'une infection aiguë, empêchent son engraissement et sa reproduction au cours d'une maladie chronique. Les vecteurs sont pour certaines, la glossine (figure 10-1) et pour d'autres, des mouches hématophages chez qui le parasite ne séjourne pas longtemps (transmission mécanique).

Classification

Le sous genre *Trypanozoon*

Il est constitué de trypanosomes sanguicoles polymorphes (forme longue et forme courte ou trapue), avec flagelle libre facultatif et kinétoplaste petit et en position subterminale (postérieur) (figure 10-2). Les espèces de ce sous-genre, *T.(T.) brucei* et ses sous-espèces, *T.(T.) evansi* et *T.(T.) equiperdum*, impossibles à distinguer morphologiquement les unes des autres, diffèrent par des caractères biologiques et nosologiques.



Figure 10-1

Mouche tsé-tsé (genre *Glossina*)

Trompe piqueuse, ailes en ciseaux au repos, abdomen à bandes sombres

Introduction

Les trypanosomiases africaines humaines et animales
Classification
Ordonnance du chapitre

1. *Trypanosoma brucei brucei*
2. Historique
3. *Trypanosoma brucei gambiense*
4. *Trypanosoma brucei rhodesiense*
5. Synthèse concernant les sous-espèces de *T. (T.) brucei*.
6. Synthèse générale

Bibliographie

FIGURES

- 10-1 Mouche tsé-tsé (genre *Glossina*)
- 10-2 *T. (T.) brucei* et sous-espèces, trypomastigotes sanguicoles
- 10-3 *T. (D.) vivax*, *T. (N.) congolense* et *T. (T.) rhodesiense*
- 10-4 *Trypanosoma congolense*, forme sanguicole
- 10-5 *Trypanosoma rangeli*, forme sanguicole
- 10-6 *T. (T.) brucei* et sous-espèces, épimastigotes du proventricule
- 10-7 Schéma du cycle de *T. (T.) brucei*
- 10-8 Galerie forestière (gîte habituel de *G. palpalis*)
- 10-9 Signe de Winterbottom
- 10-10 Fréquence relative des signes cliniques
- 10-11 *T. b. gambiense* en goutte épaisse
- 10-12 Schéma de dépistage classique
- 10-13 Schéma de dépistage amélioré
- 10-14 Microscopistes au cours d'une séance de dépistage actif
- 10-15 *T. b. rhodesiense* en frottis et dans le sang non coloré, au contraste de phase

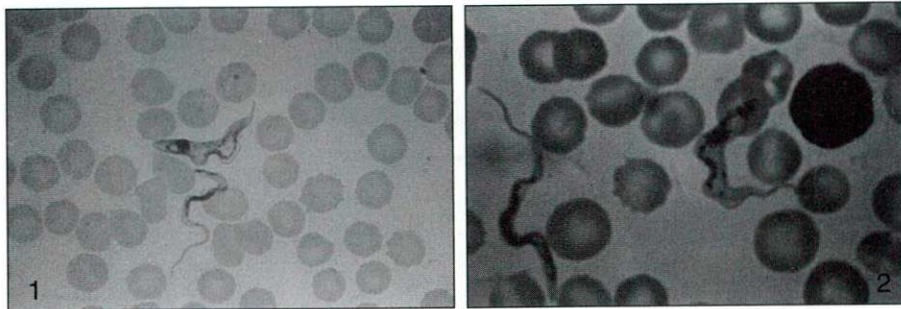
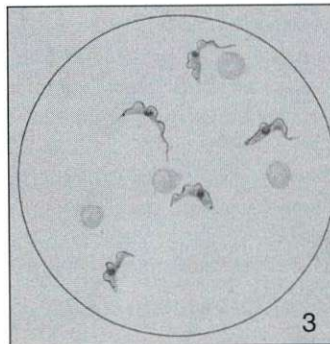


Figure 10-2

***T. (T.) brucei* et sous-espèces, trypanostigotes sanguicoles**

1. Forme longue ("slender form") et forme courte ("stumpy form") voisinent dans le sang (coloration au Giemsa).
2. Forme longue et forme courte au fort grossissement (coloration au Giemsa).
3. Dessin montrant les principaux caractères morphologiques du parasite. Chez les formes longues: le petit kinétoplaste, le noyau central, la membrane ondulante et le flagelle libre. Chez les formes courtes: le petit kinétoplaste, le noyau déplacé vers l'arrière, la membrane ondulante et l'absence de flagelle libre.



T. (T.) brucei et ses sous-espèces (*T.b.brucei*, *T.b.gambiense* et *T.b.rhodesiense*) sont transmis par un diptère du genre *Glossina* (figure 10-1) dont ils colonisent le tube digestif et les glandes salivaires. Ces mouches sont hématophages dans les deux sexes et ont un rôle actif dans la transmission. Elles piquent de jour, sont attirées par les couleurs sombres et leur durée de vie est de l'ordre de trois mois. Leur distribution géographique est restreinte à l'Afrique.

T. (T.) evansi est transmis au bétail, aux chevaux et aux chameaux par des mouches piqueuses autres que les glossines (Tabanidae) de même que par des chauve-souris hématophages en Amérique du Sud. *T. (T.) equiperdum* n'a pas d'hôte invertébré (transmission sexuelle chez les chevaux). Ces deux dernières espèces débordent largement des régions à glossines et sont cosmopolites. Leur morphologie est semblable à celle de *T. brucei* mais elles sont monomorphes (formes longues uniquement).

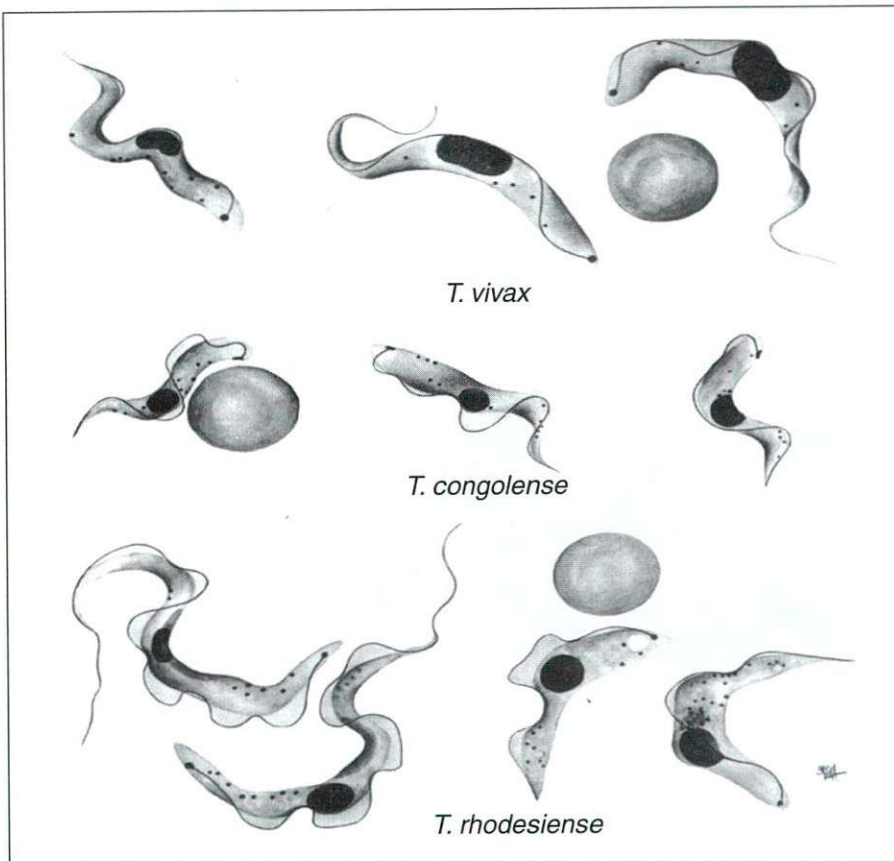
Le sous-genre Duttonella

Les trypanosomes ont une forme de massue ou de gourdin, avec extrémité postérieure arrondie et large, le corps se rétrécissant vers l'extrémité antérieure (figure 10-3). Le kinétoplaste est volumineux, arrondi et en position terminale; la membrane ondulante peu développée, étroite, se termine en flagelle libre. *T. (D.) vivax* et *T. (D.) uniforme*, espèces parasites des ruminants sauvages et domestiques, s'adaptent difficilement aux rongeurs de laboratoire. Transmis par les glossines, ces trypanosomes colonisent exclusivement la trompe et le proventricule (dans l'estomac, les parasites sont digérés). La transmission est aussi possible par simple transport mécanique dans la trompe infectée de mouches piqueuses (Tabanidae).

Figure 10-3

T. (D.) vivax*, *T. (N.) congolense* et *T. (T.) rhodesiense

Dessins montrant la diversité morphologique des trypanosomes. Taille du parasite, morphologie de l'extrémité postérieure hébergeant le kinétoplaste, ampleur de la membrane ondulante, position du noyau, présence ou absence d'un flagelle libre.



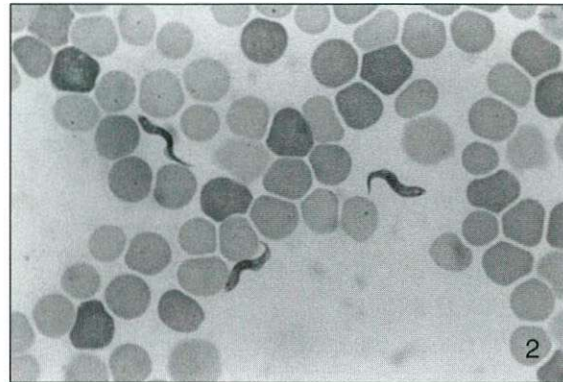
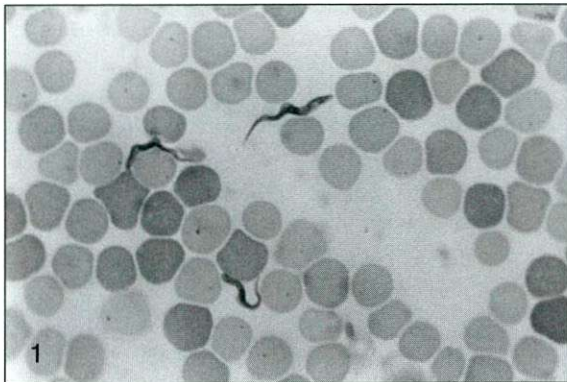


Figure 10-4

***Trypanosoma congolense*,
forme sanguicole**

Ces trypanosomes sont de petite taille, avec extrémité postérieure arrondie, kinétoplaste en position marginale, membrane ondulante étroite. Ils n'ont pas de flagelle libre.

Le sous-genre *Nannomonas*

Trypanosomes de petite taille (8 à 24 μm), ils n'ont de flagelle libre à aucun stade de leur développement. Le kinétoplaste de taille moyenne se trouve en position subterminale ou marginale. L'extrémité postérieure est arrondie et la membrane ondulante étroite. La pathogénicité est importante pour le bétail, le porc et le chien en Afrique. Le développement chez la glossine prend place dans l'estomac et le proboscis exclusivement. Les principales espèces sont *T. (N.) congolense* et *T. (N.) simiae* (figures 10-3, 10-4).

Le sous-genre *Pycnomonas*

Ces trypanosomes monomorphes sont trapus, avec flagelle court, kinétoplaste petit et subterminal. Le développement chez le vecteur (glossine) prend place dans l'estomac et les glandes salivaires. *T. (P.) suis* en est la seule espèce importante.

Le sous-genre *Tejeraia*

Ce sous-genre a été créé spécialement pour classer *T. (T.) rangeli* dont les formes métacycliques se

trouvent dans les glandes salivaires aussi bien que dans l'intestin postérieur du vecteur (réduvidés). Chez l'insecte, la morphologie est très polymorphe (épimastigotes de 20 à 100 μm !).

T. (T.) rangeli est un trypanosome non pathogène pour l'homme que l'on trouve dans certaines régions d'Amérique latine chez les mêmes vecteurs et les mêmes réservoirs que *T. (S.) cruzi*. Sa longueur est en moyenne de 30 μm , le kinétoplaste est peu volumineux et situé à quelque distance de l'extrémité postérieure. Le noyau est déplacé vers l'avant. Il se trouve dans le sang de l'homme mais pas dans les tissus. Il n'existe pas d'immunité de protection croisée entre *T. cruzi* et *T. rangeli*. (figure 10-5)

Remarque importante

Vu sa répartition géographique, le problème du diagnostic différentiel se pose tant en clinique que dans les enquêtes de prévalence de la maladie de Chagas. En fait, *T. rangeli* est très différent de *T. cruzi* dans le sang de l'hôte vertébré. Chez l'insecte, par contre, la distinction est plus subtile (on peut trouver plus de 10 p.100 de réduves infectées).

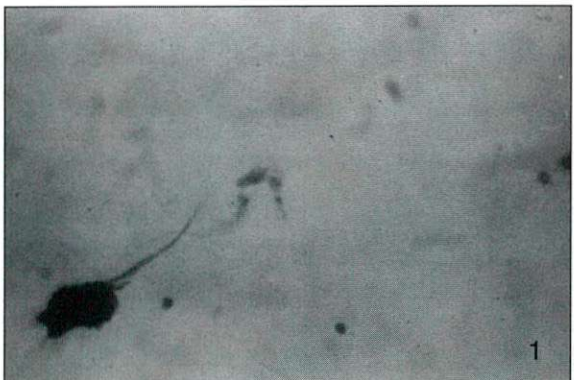


Figure 10-5

***Trypanosoma rangeli*,
forme sanguicole**

Deux exemplaires de ce trypanosome non pathogène qui brouille les pistes d'observation de *T. cruzi*. Cette forme trouvée dans le sang de l'homme et d'animaux réservoirs de *T. cruzi* s'écarte notablement de ce dernier par sa morphologie : kinétoplaste de taille moyenne et situé à distance de l'extrémité postérieure, noyau déplacé vers l'avant, membrane ondulante et flagelle libre bien développés, pas de forme en croissant.

Ordonnance du chapitre

Les descriptions qui suivent sont regroupées d'après les sous-genres. On y trouvera les principales espèces et sous-espèces qui infectent l'homme. Les caractères des sous-genres et espèces infectant l'homme ou l'animal sont résumés dans un tableau en fin de chapitre.

1. *TRYPANOSOMA (TRYPANOZOON)* *BRUCEI BRUCEI* Plimmer et Bradford 1899

C'est un trypanosome africain polymorphe *non* infectant pour l'homme.

1.1 Morphologie chez l'hôte vertébré

La forme trypomastigote est polymorphe et se présente sous deux aspects: la forme longue ("slender form") et la forme courte ("stumpy form"). La forme longue de 25-35 µm sur 2-3 µm présente un petit kinétoplaste subterminal, une membrane ondulante bien développée, un flagelle libre, une extrémité postérieure pointue et un noyau central. La forme courte de 14-22 µm sur 4-5 µm de large n'a pas de flagelle libre mais possède tous les autres caractères de la forme longue (figure 10-2).

1.2 Hôtes

Les hôtes vertébrés sont les animaux domestiques (bovins, mouton, chèvre, cheval, chameau, chien) et sauvages (antilope, buffle, etc...). L'homme est réfractaire à l'infection (effet léthal du sérum humain sur le trypanosome).

Les hôtes invertébrés trouvés infectés dans la nature (voir plus loin les difficultés de ces études) sont: *Glossina morsitans*, *G. submorsitans* et *G. pallidipes*

(groupe *morsitans*); *G. brevipalpis*, *G. medicorum* (groupe *fusca*); *G. tachinoides*, *G. palpalis*, *G. fuscipes* (groupe *palpalis*).

1.3 Distribution géographique

Le parasite a été isolé chez des glossines du Nigeria, du Burkina Faso, de Tanzanie, du Burundi et du Zululand, mais l'aire géographique de sa distribution est sans doute beaucoup plus grande, vu le grand nombre d'espèces de glossines trouvées infectées dans la nature.

L'infection a été identifiée chez de nombreuses espèces animales dans tous les pays où existent des glossines. Les observations sont rendues laborieuses par les parasitémiées basses existant chez la plupart des animaux examinés (tant sauvages que d'élevage).

1.4 Cycle et mode de transmission

L'infection de la glossine aboutit à l'infection de la totalité de son tube digestif y compris les glandes salivaires (figure 10-7).

Remarque

Pour identifier l'infection chez une glossine, on doit, au minimum (Chardome et Peel 1967)

- avoir une description morphologique des parasites provenant de l'estomac, des pièces buccales et des glandes salivaires;
- connaître la morphologie précise des métacycliques et la comparer avec celle des formes sanguicoles d'animaux infectés;
- pouvoir transmettre l'infection à partir de glossines sauvages sur des animaux réceptifs et à partir de ceux-ci à des glossines élevées en laboratoire.

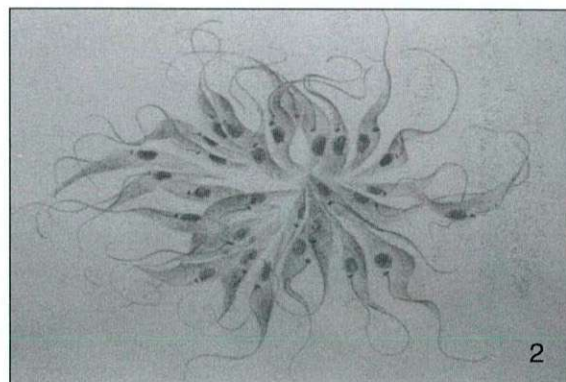
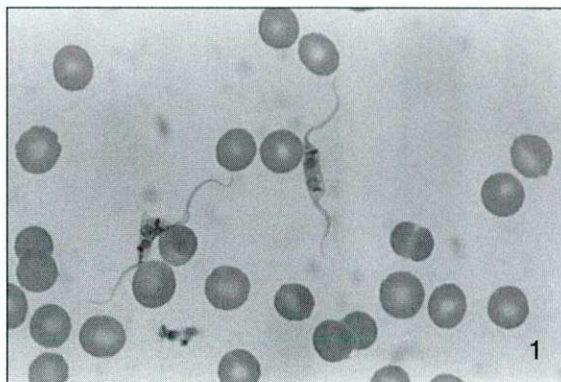
Ceci explique la rareté des observations péremptoires publiées...

Avec les techniques modernes (sondes nucléiques, anticorps monoclonaux), on peut actuellement, au laboratoire, identifier les espèces de trypanosomes avec leur localisation anatomique précise chez les glossines capturées (proventricule, estomac, glandes salivaires...). Ces méthodes ne sont pas encore utilisées en routine mais cela ne devrait pas tarder.

Figure 10-6

T. (T.) brucei et sous-espèces, épimastigotes du proventricule (chez le vecteur)

1. Formes en division. Kinétoplaste juxta-nucléaire caractéristique de l'épimastigote.
2. Dessin montrant le résultat de la division rapide: la formation de rosaces d'épimastigotes.



La détermination d'un taux d'infection des glossines sauvages par *T. brucei* est rendue difficile par l'infection simultanée par d'autres trypanosomes (particulièrement *T. vivax* et *T. congolense*). Il y a aussi, alors, invasion du tube digestif et des pièces buccales mais les glandes salivaires sont épargnées.

Concernant le comportement de *T. brucei* chez la mouche, Laveran écrivait en 1912: "Présents au début chez toutes les mouches, les flagellés n'existent plus que dans 8 p.100 environ après 6 ou 7 jours; il y a chez ces 8 p.100 un développement considérable dans tout l'intestin qui persiste jusqu'à la mort de l'insecte. On ne trouve pas d'infections de la trompe. Une fois sur deux, on en trouve dans le proventricule, c'est là que s'accomplit le développement. A partir du 25ème jour, on observe des trypanosomes dans les glandes salivaires, c'est seulement là qu'on retrouve les formes sanguicoles, surtout la forme trapue. On ne sait comment se fait l'invasion des glandes salivaires. Il y a une corrélation parfaite entre l'infectivité des mouches et la présence des trypanosomes dans les glandes salivaires".

On n'a pas fait de progrès marquants depuis ces observations: le proventricule est la plaque tournante de l'infection mais on ne connaît pas le chemin suivi pour atteindre les glandes salivaires. Il semble que la seule voie possible pour le trypanosome soit de descendre jusqu'au bout de la trompe pour pénétrer dans l'hypopharynx par son extrémité et remonter ensuite jusqu'aux glandes salivaires.

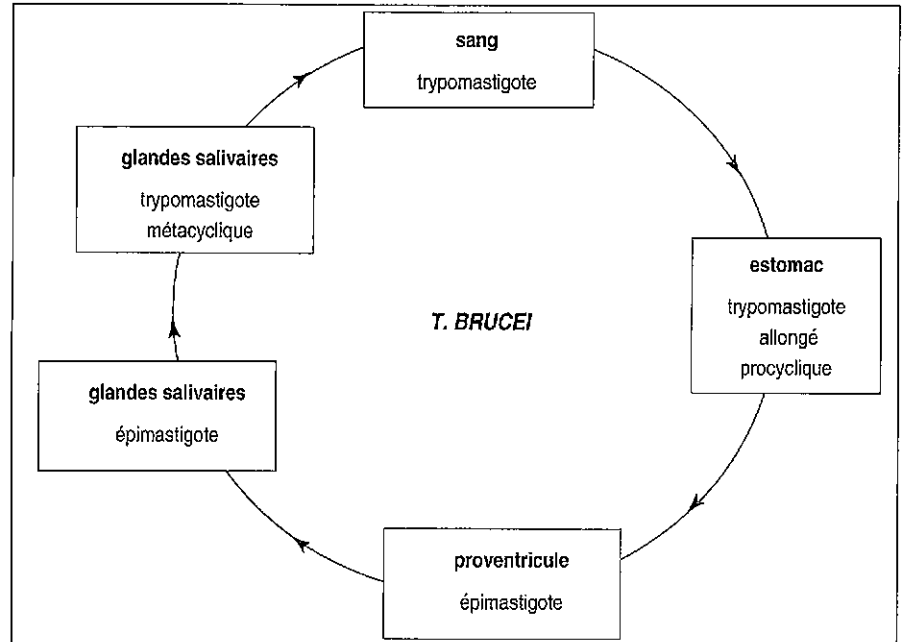
Chez la glossine, le développement va se dérouler en plusieurs étapes (tableau 10-1).

Les formes courtes qui se trouvent éventuellement dans le sang de l'animal se transforment dans l'estomac de la mouche en formes procycliques, trypomastigotes allongés à kinétoplaste situé à moitié chemin entre l'extrémité postérieure et le noyau et dépourvus d'antigène de surface. Il faut noter à ce sujet que l'infection de la glossine est plus facile si le repas sanguin est pris au début de l'infection chez l'hôte vertébré.

La multiplication des formes procycliques a lieu dans l'estomac, dans le proventricule, dans l'hypopharynx en route vers les glandes salivaires. Dans les glandes salivaires elles-mêmes, la multiplication se poursuit sous forme épimastigote (figure 10-6).

De nouvelles formes métacycliques, infectantes pour l'hôte vertébré, sont formées à partir des générations d'épimastigotes se succédant dans les glandes salivaires.

Pour pouvoir transmettre le trypanosome, la glossine devra remplir plusieurs conditions:



- le repas infectant devra être le premier repas sanguin de son existence. Ensuite, la solidification de la membrane péritrophique rendra impossible le passage du parasite;
- elle devra se nourrir régulièrement (au moins toutes les 48 heures) pendant le cycle de multiplication des épimastigotes (apport d'énergie);
- elle devra survivre plus de 20 à 25 jours car ce n'est qu'à partir de ce moment qu'apparaissent les formes métacycliques dans les glandes salivaires.

Figure 10-7

Schéma du cycle de *T. (T.) brucei*

Tableau 10-1

Stades de *Trypanosoma brucei* (et sous espèces) au cours du cycle

Localisation	Morphologie	Fonction
Sang de l'hôte vertébré	Trypomastigotes (Formes longues)	Multiplication, envahissement du sang et des tissus de l'hôte
	Trypomastigotes (Formes courtes)	Capables d'évoluer chez la glossine
Estomac de la glossine	Trypomastigotes à kinétoplaste avancé (tryp. procycliques)	Multiplication dans l'espace ecto-péritrophique ^a
Proventricule	Epimastigotes	Multiplication
Glandes salivaires	Epimastigotes	Multiplication
	Trypomastigotes (tryp. métacycliques)	Arrêt de la multiplication, attente

a. la membrane péritrophique est constituée par la solidification (polymérisation) d'un film muqueux sécrété dans l'estomac de la glossine autour du sang ingéré lors des premiers repas. L'espace ecto-péritrophique est compris entre cette membrane et la paroi de l'estomac.

1.5 Pouvoir pathogène

L'infection est aiguë, souvent mortelle chez le chameau et le chien. Elle est plus légère chez le porc, le mouton, la chèvre qui sont rarement trouvés infectés naturellement. Chez les bovins il existe, suivant les races, une résistance non négligeable à l'infection. La maladie est appelée "nagana" et sévit dans toute l'Afrique tropicale. Elle est surtout marquée par une anémie, une hyperplasie lymphoïde, des lésions du tissu conjonctif, des lésions testiculaires menant à l'aspermato-genèse.

1.6 Epidémiologie

Il existe un important réservoir de parasites (animaux sauvages, porcs semi-sauvages, antilopes) à partir duquel les mouches tsé-tsé se réinfectent régulièrement et disséminent le trypanosome. Les taux d'infection chez les mouches sont très variables selon les études: 0,2 à 5p.100 dans les glandes salivaires.

Remarque importante

Dans les zones où *T. b. rhodesiense* sévit, il est encore plus difficile de faire la part de *T. b. brucei* dans ces infections de la glossine car les deux espèces se retrouvent dans les mêmes organes et leur morphologie est identique. Leur distinction peut se faire par l'étude de leur résistance au sérum humain ("Blood Incubation Infectivity Test") de même que par l'analyse de leurs isoenzymes. Voir tableau de synthèse des trois sous-espèces de *T. b. brucei*.

2. Historique de la maladie du sommeil

La maladie du sommeil est africaine, liée au continent par l'activité d'une mouche exclusive, casanière, avare de mouvements et pauvre en progéniture mais boulimique et exigeante dans ses menus.

On savait que la piqûre de la "tsé-tsé" était toxique. Livingstone en 1857 parlait de son venin et de ses effets léthargiques à long terme mais le parasite responsable ne fut décrit qu'en 1902 chez un de ces malades, par Castellani en Ouganda.

Les caboteurs aventureux du dix-huitième siècle avaient observé la maladie le long des côtes. J. Atkins parle de "sleeping distemper" en Guinée dès 1734. Winterbottom (celui du signe) décrivant la "lethargus" en 1793, mentionne, au Bénin, l'hypertrophie ganglionnaire cervicale déjà connue des négriers qui triaient leurs victimes sur cette anomalie visible. Et aux Antilles, à l'arrivée des esclaves, les observations cliniques s'enrichissent au début du dix-neuvième siècle: durée d'incubation de plusieurs années parfois,

oedème de la face, incontinenances, maladresse des mouvements, accès narcoleptiques ... Puis les descriptions cliniques s'affinent, surtout à partir de 1840, sous l'influence de Clarke en Sierra Leone, de Corré au Sénégal et de Guérin à la Martinique: céphalées, prurit, changement de comportement, oedème des paupières et ptosis, appétit capricieux, disparition de la libido, démarche incertaine, convulsions, sommeil léthargique, apathie extrême, mouvements choréiformes, hypothermie terminale sont relatés comme signes pathognomoniques.

A partir de 1885, la liberté de commerce et de navigation à l'intérieur du continent ainsi que l'effort d'occupation des territoires, avec l'établissement de comptoirs sur les voies fluviales navigables et le va-et-vient des récolteurs, trafiquants, commerçants accompagnés de leurs caravanes à travers les zones à glossines, précipite la dissémination et exalte la virulence des trypanosomes, comme d'autres germes infectieux d'ailleurs. C'est l'origine de foyers nouveaux, parfois épidémiques, comme en Ouganda autour de 1900.

Les connaissances concernant le comportement du parasite datent du début du vingtième siècle: en 1901, Dutton et Todd trouvent des trypanosomes dans le sang d'un européen rapatrié à Liverpool; en 1903, Castellani fait en Ouganda son illustre observation de parasites dans le LCR et évoque le rôle de la glossine comme transmetteur; la même année, Novy et McNeal réussissent la culture *in vitro* sur gélose au sang; en 1904, Schaudinn observe les alternances de générations au cours des changements d'hôte entre l'homme et la glossine; enfin, Laveran en 1912 consacre aux trypanosomiasés un traité de plus de mille pages.

Côté thérapeutique, dès 1905, les arsenicaux trouvent ici une nouvelle indication sous forme de combinaisons d'arsenic et d'aniline (Atoxyl®) puis un détour par les colorants d'Erlich (rouge trypan et con-sorts) apportera la suramine (Bayer 205®) en 1920. Enfin, les sulfamides hypoglycémiantes aideront à découvrir les propriétés des diamidines apparues en 1940. Pendant ce temps-là, les arsenicaux restent à l'honneur en permanence car ils sont les seuls à atteindre le parasite où qu'il se trouve dans l'organisme: le tryparsamide (Tryponarsyl®), arsenical pentavalent, détrône l'Atoxyl® vers 1920 et cédera, vers 1950, la place à l'arsobal, un trivalent encore utilisé actuellement, détoxiqué tant bien que mal par le dimercaprol (BAL).

La lutte contre l'endémie sommeilleuse est organisée à grand renforts de réglemets, passeports sani-

taires, recensements médicaux etc... Comme actions spectaculaires autant qu'héroïques, il faut citer les équipes mobiles de dépistage actif (sur base de recherche des ganglions cervicaux) mises sur pied dans les années 30 et la pentamidinisation généralisée (une injection de diamidine tous les six mois à tout le monde, à titre préventif) dans les années 50. C'est l'attaque du réservoir de parasites.

La lutte contre les glossines décourage les mieux intentionnés. Les insecticides sur les troncs d'arbres dans les forêts galeries, le lâcher de mâles stériles et plus récemment le piégeage sur grande échelle donnent des résultats souvent sans lendemain. Le piégeage fait aujourd'hui merveille dans une situation épidémique observée en Uganda (l'histoire se répète!)...

3. *TRYPANOSOMA (TRYPANOZOON) BRUCEI GAMBENSE*

3.1 Morphologie

Polymorphe, elle est identique à celle de *T. b. brucei*.

3.2 Hôtes

C'est essentiellement l'homme, très accessoirement le porc et le chien (qui a parfois servi de modèle pour étudier l'évolution de la maladie).

Les vecteurs appartiennent au groupe *palpalis*, mouches hygrophiles, vivant en forêt ou le long des forêts galeries (figure 10-8), liées à l'ombre et à la fraîcheur: *Glossina palpalis*, *G. tachynoides*, *G. fuscipes*.

3.3 Distribution géographique

Elle est liée à l'écologie de *G. palpalis* (grande forêt tropicale et équatoriale, savane boisée, forêts galeries longeant les cours d'eau): Angola, Cameroun, Congo, Côte d'Ivoire, Dahomey, Gabon, Gambie, Ghana, Guinée, Haute Volta, Kenya (Nord), Libéria, Mali, Niger, Nigeria, Sénégal, Sierra Leone, Soudan (Equatoria), Tchad, Togo, Ouganda (Nord), Zaïre (toutes les régions). L'endémie sommeilleuse se présente en foyers, souvent situés à proximité de cours d'eau et leurs forêts galeries. Le comportement du trypanosome est différent d'un foyer à l'autre, prenant parfois (Côte d'Ivoire) l'allure d'une infection à *T. rhodesiense*.

3.4 Cycle et mode de transmission

Ce sont les mêmes que pour *T. b. brucei*

3.5 Pouvoir pathogène

Chez l'homme, ce trypanosome provoque la maladie du sommeil (forme chronique). La maladie évolue en trois phases.

Le chancre d'inoculation (papule érythémateuse)

Lors de la piqure d'une glossine infectée, les trypanosomes métacycliques sont déposés sous la peau et injectés dans la circulation; la multiplication locale provoque, après 4-5 jours, une réaction avec les anticorps circulants nouvellement synthétisés. On assiste à une précipitation locale des complexes immuns provoquant l'activation des fractions C3a et C5a du complément et donc un appel de polynucléaires. Le relargage des enzymes lysosomiaux de ces polynucléaires provoque l'induration et l'oedème. Les lésions artériolaires et l'aggrégation plaquettaire peuvent conduire à la nécrose. Il y a donc apparition d'oedème, d'érythème avec desquamation cutanée concentrique et induration sous-cutanée.

L'envahissement hémo-lymphatique

Les trypanosomes se multiplient dans le sang et la lymphe, la parasitémie s'élève; suit une lyse de la population de trypanosomes sanguicoles par les anticorps circulants, la parasitémie s'effondre. Une mutation survient chez quelques trypanosomes rescapés qui modifient la structure de leur antigène de surface (glycoprotéine), leur permettant d'échapper à l'action des anticorps. La multiplication de ces mutants (appelés "variants antigéniques") va donner une deuxième population parasitaire qui, à son tour, subira la lyse immunitaire et ainsi de suite...

Les gènes responsables de la synthèse de ces différentes glycoprotéines sont connus. L'activation successive de parties du génome détermine la séquence



Figure 10-8

Galerie forestière (gîte habituel de *G. palpalis*)

Glossina palpalis, vecteur de *T. gambiense*, est tributaire de l'ombre des arbres. Elle ne s'écarte guère de son gîte forestier. Ici, une forêt-galerie de la savane zaïroise.

des variants observés. Cette séquence, appelée répertoire antigénique, est caractéristique d'un isolat (stock) de trypanosomes et a permis la mise au point de tests sérologiques basés sur l'identification des variants précoces et dominants.

La succession de variants antigéniques est responsable d'une succession de vagues de parasitémie. L'extériorisation clinique de cette parasitémie fluctuante est une symptomatologie grippale ou malarienne avec fièvre irrégulière, malaise général, maux de tête, douleurs articulaires. Il faudra répéter les examens de sang pour augmenter la sensibilité de l'examen microscopique.

Il se forme des infiltrats périvasculaires dans les organes lymphatiques entraînant d'abord splénomégalie et engorgement ganglionnaire (50 à 75 p.100 des cas), puis envahissement progressif et insidieux de la plupart des organes et glissement vers la troisième période.

Le mécanisme de production de ces infiltrats périvasculaires est encore discuté. Ou bien, ils sont le résultat de l'immunité cellulaire: l'afflux d'antigène à un endroit où se trouvent déjà des cellules immuno-compétentes, au préalable sensibilisées par ce même antigène, provoque une brusque multiplication de ces cellules. Ou bien, l'augmentation de la perméabilité capillaire, provoquée par les complexes antigène-anticorps formés dans la circulation par la lyse successive de populations parasitaires et circulant dans le plasma, permet la diapédèse.

Envahissement tissulaire extra-vasculaire (stade nerveux)

L'espacement des poussées parasitémiques s'accompagne d'une diminution du nombre de parasites dans le sang et d'un envahissement du compartiment extra-vasculaire. L'apparition de symptômes plus caractéristiques en résulte: signes de méningo-encéphalite, de myocardite, parfois de néphrite, œdèmes généralisés, anémie...

Les infiltrations périvasculaires sont présentes dans tous les organes, mais le cœur et le cerveau sont les plus atteints. L'encéphalite est d'ailleurs la cause des symptômes cardinaux de la trypanosomiose humaine africaine. Le fait que les infiltrats périvasculaires en couche monocellulaire dans le cerveau du trypanosé soient identiques aux lésions de l'encéphalite allergique expérimentale du lapin, suggère l'hypothèse que les principales lésions anatomopathologiques, non seulement du cerveau mais aussi des autres organes, seraient d'origine immunitaire et

que le trypanosome ne jouerait que le rôle d'inducteur.

Certains lymphocytes prennent, dans les infiltrats et dans le liquide céphalo-rachidien, un aspect très caractéristique causé par la vacuolisation du cytoplasme: les cellules de Mott. Cette vacuolisation serait le signe d'une dégénérescence précédant la mort cellulaire, à moins que cette transformation morphologique ne soit le signe d'une sécrétion augmentée d'IgM.

Classification des malades trypanosomés

Dans les trois paragraphes précédents sont décrits les trois "périodes" ou "stades" classiquement reconnus dans l'évolution de la maladie du sommeil. Il est préférable de ne pas trop schématiser les étapes d'une infection qui progresse de manière continue et d'admettre que ces stades se recouvrent partiellement. En particulier, il est maintenant admis, et démontré sur modèle expérimental, que les trypanosomes quittent très tôt le système circulatoire et qu'on les retrouve en position extravasculaire dès la deuxième semaine d'une infection chronique de 18 mois chez le rat. Le seul signe objectif du stade nerveux est l'inflammation du liquide céphalo-rachidien.

D'autre part, dans la pratique du contrôle de la maladie, une autre classification des malades est utilisée: nouveau cas; guérison provisoire (pendant la durée des contrôles après traitement); guérison définitive (après deux années de suivi du LCR); ancien cas (traité antérieurement et guéri).

3.6 Diagnostic

Remarque importante

Le diagnostic clinique de la maladie du sommeil doit toujours être confirmé par le laboratoire.

La démarche diagnostique se base sur une suspicion clinique, suivie de la mise en évidence du parasite dans le sang, la lymphe ganglionnaire ou le liquide céphalo-rachidien. Les parasites étant généralement rares dans les prélèvements, la recherche d'anticorps (Ig totales anti-antigène variable) dans le sérum ou IgM non spécifiques dans le liquide céphalo-rachidien sera utile en apportant une présomption supplémentaire. La biochimie (protéines) et la cytologie (numération de cellules inflammatoires) du LCR permettront de déterminer le stade d'évolution de la maladie.



Figure 10-9

Méthodes conduisant à une présomption

Ce seront d'abord l'interrogatoire et l'examen clinique (recherche de signes subjectifs ou des troubles du comportement, de signes d'inflammation au niveau des ganglions cervicaux ou de signes d'atteinte nerveuse).

Ce seront ensuite les examens de laboratoire: sérologie, biochimie et cytologie du LCR.

• INTERROGATOIRE DU PATIENT ET DE L'ENTOURAGE

Les plaintes sont peu nombreuses: maux de tête, poussées de fièvre. L'entourage aura remarqué des modifications du caractère: apathie (le sujet est soudain devenu "paresseux"), indifférence, hilarité ou colère injustifiées, insomnie nocturne...

• EXAMEN PHYSIQUE DU PATIENT

On recherchera les signes cutanés (oedèmes de la face, trypanides difficiles à repérer sur une peau noire), les adénopathies cervicales (figure 10-9) ou sus-claviculaires (signe de Winterbottom), les troubles sensoriels ou moteurs, une hyperesthésie profonde (signe de Kérandel). Un examen neurologique complet décèlera des signes très variés, comme la rigidité extrapyramidale.

Remarque importante

Le diagnostic des trypanosomiasis africaines reste très difficile à poser si on ne tient compte que des signes cliniques. Ceux-ci sont peu nombreux, peu spécifiques et manquent dans un nombre non négligeable de cas:

- les adénopathies, qui restent le signe sur lequel se base le dépistage traditionnel de la maladie à *T. b. gambiense*, font défaut chez plus de la moitié des malades le jour de l'examen;
- la bouffissure de la face, le facies figé et inexpressif sont parfois évidents mais l'observateur doit avoir une certaine expérience pour les apprécier correctement;
- les réflexes caractéristiques, "ancestraux" comme le fameux "palmo-mentonner", doivent être recherchés dans des conditions idéales (calme,

malade isolé) et par un observateur averti (et l'expérience dans ce domaine doit s'acquérir sur le terrain, au contact de nombreux patients).

Dans une série de plus de 300 observations (Boa *et al* 1988), la fréquence des signes retrouvés est indiquée à la figure 10-10.

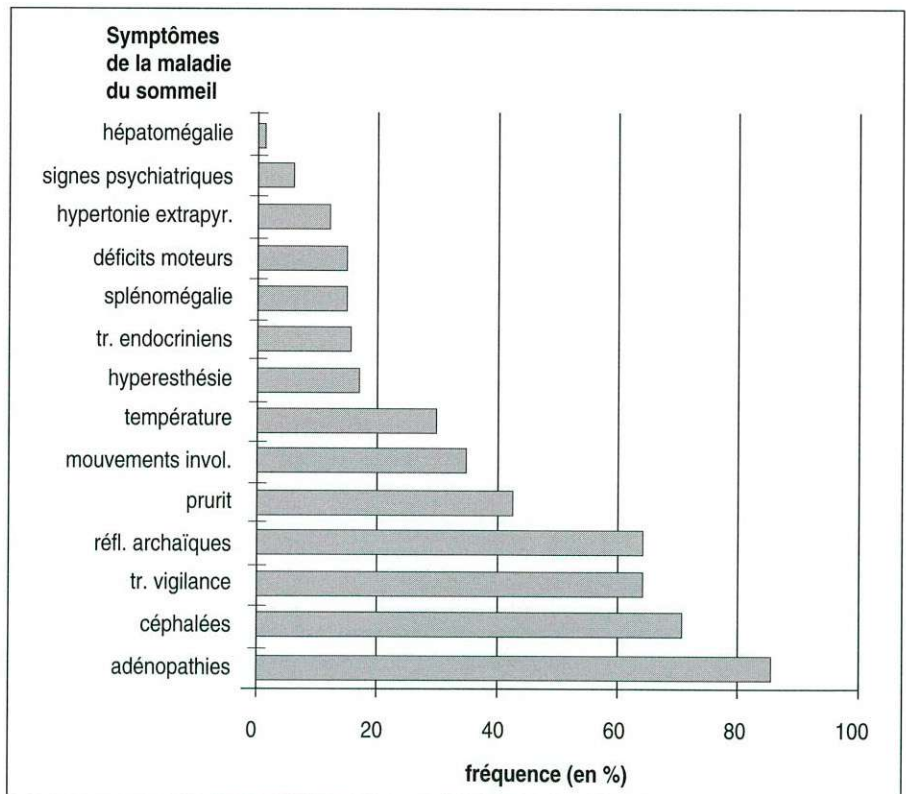
Signe de Winterbottom

L'hypertrophie ganglionnaire est parfois volumineuse et très superficielle. Le plus souvent, une palpation minutieuse de la région s'avère nécessaire.

1 à 3. Ganglions visibles dans la région cervicale postérieure de malades trypanosomés

Figure 10-10

Fréquence relative des signes cliniques



- EXAMENS DE LABORATOIRE DE PRÉSUMPTION

La sérologie

L'infection chronique par *T. b. gambiense* induit la production d'anticorps circulants dirigés contre plusieurs antigènes du parasite. Ces anticorps peuvent être détectés par des examens immunologiques pratiqués sur le sérum ou le LCR.

La sélection de l'antigène utilisé dans les réactions est très importante: le diagnostic le plus précoce est réalisé avec les antigènes de surface (glycoprotéines) puisque c'est par eux que le parasite entre en contact avec l'hôte dès le début de l'infection. Cependant, vu leur propriété de variation, il faudra choisir un variant ou un choix de plusieurs variants précoces (dans l'infection), dominants (revenant plus souvent) et ubiquitaires (présentés par différents isolats de trypanosomes provenant de régions géographiques différentes).

Sous forme d'antigène figuré, il s'agira de trypanosomes fixés par le formol ou la glutaraldéhyde, en frottis ou en suspension purifiée. La fixation rend les antigènes somatiques (du cytoplasme) inaccessibles aux immunoglobulines en laissant intacts les antigènes de surface. Sous forme d'antigène soluble, il faudra purifier les glycoprotéines de surface par des manipulations biochimiques. Ces préparations antigéniques peuvent être lyophilisées, ce qui les rend aptes à une distribution et une utilisation sur large échelle.

En choisissant un parasite non fixé (conservation des antigènes somatiques), on retarde le diagnostic et les réactions croisées avec d'autres parasites sont plus fréquentes. Ces antigènes sont communs à tous les trypanosomes d'une même espèce mais aussi à plusieurs espèces. Sous forme d'antigène figuré, il s'agira de parasites non fixés (le plus souvent en frottis). Sous forme d'antigène soluble, on utilisera un broyat total de trypanosomes.

La recherche d'anticorps anti-trypanosomes dans le sérum des sujets se fait par agglutination directe avec des trypanosomes fixés au formol et colorés au bleu de Comassie ("Card Agglutination Trypanosomiasis Test", CATT), par immunofluorescence indirecte avec des trypanosomes en gouttes séchées sur des lames multispot et fixés par le formol (IFI), par test immuno-enzymatique avec une fraction purifiée de glycoprotéines de surface (ELISA), par agglutination de particules de latex sensibilisées avec une fraction purifiée de la glycoprotéine de surface ("Latex agglutination test", LAT), par hémagglutination avec des globules rouges de mouton fixés et sensibilisés avec un

lysât de trypanosomes (IHA: Cellognost® Behringwerke). On trouvera la description de ces réactions au chapitre 19.

Dans toutes ces réactions, les antigènes sont figurés ou solubles et les fractions antigéniques utilisées sont les glycoprotéines de surface, en choisissant des variants ubiquitaires et dominants.

Remarque importante

La sérologie permet un diagnostic précoce: en effet, des anticorps sont produits dès le début de la multiplication des parasites dans la circulation hémolympatique. Toutefois, vu la toxicité de la chimiothérapie, il sera nécessaire d'avoir mis le parasite en évidence chez un suspect sérologique avant d'instaurer la thérapeutique.

Le dosage des IgM dans le sérum

La stimulation antigénique permanente, due à la succession des alternances multiplication/lyse, induit une production constante d'IgM aspécifiques. Leur concentration atteint au moins quatre fois le taux normal, ce qui a fait de ce dosage un moyen supplémentaire de diagnostic et de dépistage.

Le dosage des protéines et des IgM dans le LCR

Le taux de protéines totales du LCR est significativement plus élevé que les 0,32 g par litre considérés comme la teneur normale. Le dosage des protéines se fait soit par le couplage des protéines à un colorant suivi de la comparaison de la couleur obtenue à celle de tubes contenant des solutions connues de protéines ("dye-binding protein assay"), soit par flocculation sous l'effet de l'acide trichloracétique et mesure de la hauteur du précipité blanc (méthode de Sicard et Cantaloube).

De plus, il est reconnu que, dans la maladie du sommeil, le liquide céphalo-rachidien des patients contient des IgM. Ce fait est dû à une excitation permanente des cellules sécrétrices d'anticorps locales suite à la multiplication des parasites dans le système nerveux central. La détection des IgM se fait par précipitation en gel ou par agglutination de particules de latex.

Les techniques de dosage des IgM (sérum, LCR) et des protéines (LCR) sont décrites au chapitre 19.

Cytologie du LCR

L'examen doit se faire sur du liquide fraîchement prélevé. La numération des cellules de type inflammatoire (lymphocytes et polynucléaires) par unité de volume se fait sur le liquide non dilué dans une cellule à numération (voir chapitre 19). Les cellules de Mott peuvent y être présentes.

On peut tolérer dans un LCR normal jusqu'à 3 à 5 cellules par μL .

Remarques importantes

Ces examens n'ont de sens que s'ils sont pratiqués sur un liquide de ponction clair, ne contenant pas de sang, ce qui perturberait tant la teneur en protéines que le nombre de cellules!

Dans la trypanosomiase, une altération du liquide céphalo-rachidien indique le début de la phase "nerveuse" (méningo-encéphalitique) de la maladie. Cet examen déterminera la longueur et les modalités du traitement à mettre en oeuvre.

Les autres examens

L'anémie pourra être appréciée par la recherche de la valeur hématocrite (les tubes capillaires et la centrifugeuse sur batterie font partie de l'arsenal normal du laboratoire de terrain). Elle progresse avec l'évolution de la maladie.

La leucocytose à tendance lymphocytaire et la perturbation des tests inflammatoires généraux n'ont rien de très caractéristique.

Méthodes conduisant à une certitude

L'examen microscopique permettant de constater la présence du parasite se fait sur le sang, la lymphe ganglionnaire, le liquide céphalo-rachidien ou la moelle osseuse.

Les méthodes suivantes pourront être utilisées.

• EXAMENS SANS CONCENTRATION

Ce sont les examens de base où les prélèvements ne subissent aucune préparation spéciale (sauf la coloration éventuelle) avant l'examen microscopique.

La morphologie des trypanosomes africains infectants pour l'homme est toujours la même: trypanosomes polymorphes, présentant dans le sang et les liquides biologiques des formes courtes et des formes longues. Les détails morphologiques sont mieux mis en évidence par la coloration mais l'examen à frais permet aussi de reconnaître le parasite grâce à sa forme et à ses mouvements vifs.

Examen du sang à frais

Il se fait extemporanément, entre lame et lamelle, à l'objectif X40. Une goutte de sang prise au doigt est placée sur une lame porte-objet, recouverte d'une lamelle pour obtenir un étalement régulier puis immédiatement examinée. Les trypanosomes sont repérés grâce à leur mobilité. Ils bousculent les globules rouges avoisinants.

Les microfilaires *Loa loa* et *Dipetalonema persians* (300 μm de long) ainsi que les gamètes mâles de *Plasmodium* (0,5 μm d'épaisseur) libérés *in vitro* à partir des gamétocytes sont mobiles dans le sang et constituent une source d'erreur pour un microscopiste non averti.

Examen à frais de sang clarifié

(Van Meirvenne et Büsscher, 1989)

Une lyse partielle des érythrocytes est obtenue en mélangeant une goutte de sang hépariné avec une goutte de solution à 1p.100 de dodécylsulfate de sodium (SDS). Cela facilite la détection de trypanosomes restés mobiles.

Goutte épaisse (GE)

Non fixée mais défibrinée et colorée au Giemsa, elle sera examinée à l'objectif X100 à immersion (figure 10.11).

Remarque

Le frottis n'est guère utile, par manque de sensibilité.

Examen de la lymphe ganglionnaire

Il est toujours pratiqué à frais pour tirer parti de la mobilité des parasites. Les adénopathies sous cutanées, souvent cervicales, sont le résultat de l'inflammation lymphatique généralisée provoquée par la présence *in situ* des trypanosomes pendant la première période d'évolution de la maladie. Il sera donc utile de ponctionner.

Une aiguille à biseau court et de calibre assez important sera enfoncée perpendiculairement à la peau dans le ganglion hypertrophié, immobilisé entre deux doigts et malaxé pour faire monter dans l'aiguille un peu de suc (lymphe). Le contenu de l'aiguille est alors rejeté sur une lame porte objet en y adaptant une seringue contenant un peu d'air.

La lymphe ganglionnaire est un liquide blanchâtre, suspension de lymphocytes. L'examen se fera obliquement à frais, à l'objectif X10 ou X40, en recouvrant la préparation d'une lamelle pour obtenir une couche fine. Un microscopiste expérimenté découvrira les trypanosomes grâce à leurs mouvements dans cette purée de lymphocytes. La coloration est à proscrire et le contraste de phase n'est guère utile pour le repérage des trypanosomes vu la densité cellulaire dans ce prélèvement.

Examen de la moelle osseuse

Si tout est négatif, le frottis de moelle, recueilli par ponction sternale ou de la crête iliaque et coloré au Giemsa permet parfois la découverte de parasites.

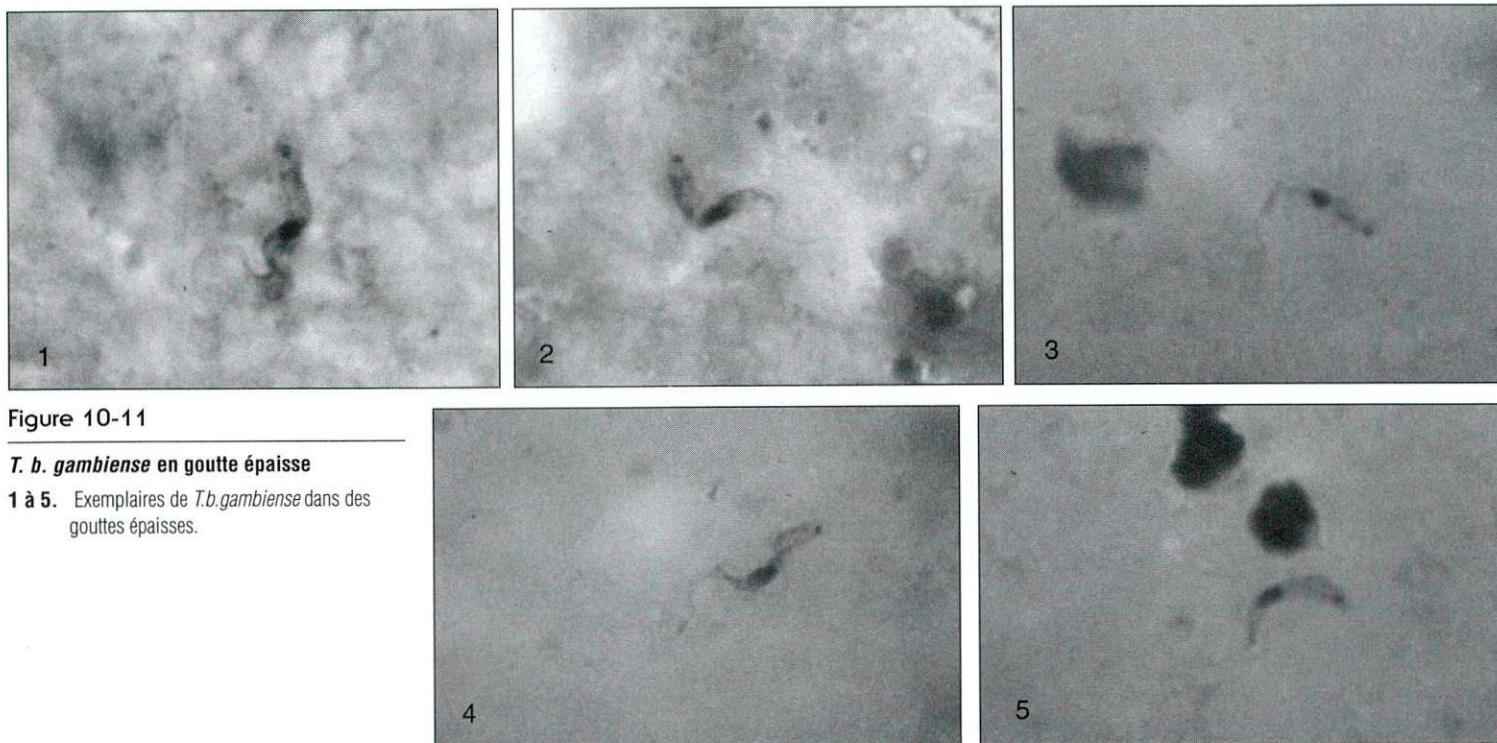


Figure 10-11

***T. b. gambiense* en goutte épaisse**

1 à 5. Exemplaires de *T.b.gambiense* dans des gouttes épaisses.

Examen du liquide céphalo-rachidien

Au cours de la maladie, l'inflammation méningo-encéphalitique est provoquée par la présence de trypanosomes. Ceux-ci sont présents dans tous les compartiments cérébraux mais surtout dans les plexus choroïdes, formations chargées de sécréter le LCR. La dilution des parasites est cependant importante et leur présence n'est pas toujours mise en évidence dans le produit d'une ponction lombaire non concentré. Leur découverte pourra être fortuite à l'occasion d'une numération cellulaire.

- EXAMENS APRÈS CONCENTRATION

Vu sa rareté dans les prélèvements, les méthodes de concentration parasitaire ont une grande utilité pour la recherche de *T. gambiense*.

Dans le sang ou le LCR, les parasites peuvent être concentrés avant examen microscopique.

La concentration peut se faire suivant deux principes: la centrifugation ou la filtration sur cellulose.

Centrifugation du sang

La densité (poids spécifique) des trypanosomes est proche de celle des leucocytes mais nettement différente de celle des érythrocytes. Ceci permet de sépa-

rer trypanosomes et globules rouges par centrifugation. La classique triple centrifugation de 10 ml de sang prélevés à la veine a été abandonnée et remplacée par une microméthode (technique du "buffy-coat" ou de Woo) qui permet de centrifuger quelques gouttes de sang pris au doigt dans un tube capillaire du type hématocrite et d'obtenir ainsi une séparation des différentes cellules et la concentration des trypanosomes avec les leucocytes au niveau de l'interface érythrocytes - plasma (voir chapitre 19).

Centrifugation du liquide céphalo-rachidien (simple ou double)

Prélevé par ponction lombaire en période "nerveuse" de la maladie, il contient, outre des cellules inflammatoires, des parasites qui se trouvent dans un grand volume, donc à l'état très dilué.

Après numération des éléments inflammatoires, le liquide pourra être centrifugé et le culot, non coloré, examiné entre lame et lamelle. Les trypanosomes se reconnaîtront à leur motilité (centrifugation simple).

Le culot peut être repris dans un tube capillaire et centrifugé une deuxième fois (centrifugation double).

Filtration sélective du sang

Elle est basée sur la taille du parasite et sur la charge électrique de sa membrane, différente de celle des cellules sanguines (élution). On fera passer le sang mélangé à un tampon à travers une colonne de cellulose spéciale qui en retient les éléments figurés et laisse passer les trypanosomes. Le liquide recueilli au bas de la colonne est ensuite centrifugé pour concentrer les trypanosomes dans le culot. La méthode de Lanham et son adaptation en microméthode, la minicolonne de Lumsden ("mini-Anion Exchange Column", mAEC) sont décrites au chapitre 19.

Remarque importante

Dans la trypanosomiase à *T. b. gambiense*, la mise en évidence du parasite est difficile au début de la maladie. De plus, le trypanosome est toujours rare dans les prélèvements qu'il faut répéter patiemment (en utilisant si possible des techniques de concentration parasitaire) les jours suivants en cas de suspicion. Et c'est là que les méthodes de présomption (la sérologie en particulier) prennent toute leur valeur car elles font persévérer dans des examens fastidieux.

- RECHERCHE D'ANTIGÈNES CIRCULANTS DE TRYPANOSOMES DANS LE PLASMA ET DANS LE LCR

Des anticorps monoclonaux dirigés contre un antigène invariable de *T. b. rhodesiense* ont été utilisés avec succès pour détecter, dans un test ELISA, des antigènes de parasites chez des patients atteints d'infection à *T. b. gambiense* ou à *T. b. rhodesiense*. Le test s'est montré utile tant pour le diagnostic que pour le contrôle de la guérison après traitement. Les antigènes circulants disparaissent environ 6 mois après un traitement réussi. Dans des études faites au Zaïre et en Côte-d'Ivoire, le test a dépisté 89 p.100 des patients dans le plasma et 45 p.100 dans le LCR. La recherche conjointe dans les deux prélèvements a porté la sensibilité à 95 p.100.

- CULTURE *IN VITRO* DES TRYPANOSOMES

La mise en culture est possible sur GLSH modifié. La trousse "KIVI" ("kit for *in vitro* isolation") permet l'isolement de trypanosomes à partir d'un prélèvement. Les formes qui se multiplient en culture (en une à deux semaines à température ambiante) sont des trypomastigotes.

- ISOLEMENT SUR ANIMAUX (POUR LA RECHERCHE)

L'inoculation de sang, de LCR ou de lymph ganglionnaire est possible aux animaux de laboratoire: rat albinos, cobaye, souris blanche, *Cricetomys gambianus* (rat de Gambie), *Mastomys natalensis*, *Microtus montanus*, rats nouveaux-nés. On observera la parasitémie subséquente.

- XÉNODIAGNOSTIC

Utilisant des glossines écloses au laboratoire, il peut aussi être utilisé: dissection de l'estomac entre le 3^e et le 5^e jour après le repas de sang sur le malade suspect et observation des formes procycliques trypomastigotes en cours de multiplication. Le sang du patient, conservé au froid, peut être aussi expédié au laboratoire où il servira à nourrir des glossines (sur membrane). A partir du tube digestif des glossines (stade procyclique), il est possible d'initier des cultures *in vitro* et à partir de leur glandes salivaires (stade métacyclique), d'inoculer des animaux.

Evaluation des différentes techniques

- TECHNIQUES DE MISE EN ÉVIDENCE DU PARASITE

Globalement, l'examen de la lymphe ganglionnaire est moins sensible que les techniques d'examen du sang: il a détecté 52 p.100 de 95 nouveaux cas en Côte d'Ivoire alors que la technique de Woo ("buffy-coat") en a détecté 86 p.100; il a détecté 31 p.100 de 84 nouveaux cas au Zaïre alors que la goutte épaisse en a détecté 90 p.100 et l'examen du sang à frais 78 p.100.

D'après une étude au laboratoire, chez des animaux infectés expérimentalement avec *T. b. gambiense*, le nombre minimum de parasites détectables par chaque méthode est de:

6 trypanosomes/ml pour la mAEC (prélèvement de 500 µl),

600 trypanosomes/ml pour le "buffy-coat" (prélèvement de 70 µl),

2000 trypanosomes/ml pour la GE (prélèvement de 10 µl)

6000 trypanosomes/ml pour le sang examiné à frais (prélèvement de 10 µl).

- TECHNIQUES SÉROLOGIQUES

Le problème des réactions de dosage d'anticorps réside dans la mesure aussi exacte que possible de leur sensibilité et de leur spécificité. Il est universellement reconnu, en effet, qu'il existe des faux positifs, sujets ayant des anticorps et pourtant non infectés (mais combien d'examens parasitologiques faut-il faire avant de déclarer qu'un patient n'est pas infecté?) et des faux négatifs, sujets n'ayant pas d'anticorps détectables et pourtant bel et bien infectés (de 5 à 15 p.100 d'après la technique sérologique utilisée et la région géographique considérée).

Le débat est difficile mais deux conclusions s'imposent.

En ce qui concerne les faux positifs, il faut s'entourer de précautions maximales avant de déclarer un individu infecté et donc passible de mise en traitement (toxicité !): faire plusieurs tests sérologiques, soit espacés dans le temps, soit sur le même échantillon par des techniques différentes ou mieux, mettre les parasites en évidence chez le patient, ce qui est la démonstration irréfutable de son infection.

En ce qui concerne les faux négatifs, le maximum de 15 p.100 observé indique néanmoins une sensibilité de loin supérieure à celle du dépistage par la palpation ganglionnaire.

3.7 Traitement

Les médicaments doivent être divisés en deux groupes: ceux qui sont actifs seulement dans le sang et la lymphe et ceux qui atteignent les tissus nerveux (qui passent la barrière hémato-méningée).

Médicaments actifs en période hémolymphatique

- Suramine (Moranyl[®], Germanin[®]), en ampoules contenant 10 mg de poudre à reconstituer dans 10 ml d'eau distillée, pour injection IV : une injection hebdomadaire de 15 à 20 mg/kg pendant 5 à 10 semaines.
- Iséthionate de pentamidine (Pentacarinat[®]), en ampoules de 300 mg de poudre à reconstituer: 5 injections IM de 4 mg/kg à raison d'une tous les 2 jours.
- Acéturate de diminazène (Bérénil[®]), en solution injectable à 5 p.100 de produit actif: 10 injections IM de 5 mg/kg à raison d'une injection par jour pendant 10 jours.

Plus aucun schéma curatif n'ose proposer l'utilisation exclusive de ces produits. Par contre, ils ont été utilisés en monothérapie par certains dans des programmes qui visent à diminuer le réservoir de parasites, pour stériliser le sang périphérique chez les séropositifs, par exemple.

Médicaments actifs en toute circonstance

- Mélasoprol (Arsobal[®], Mel B), en solution à 3,6 p.100 (36 mg/ml) dans le propylèneglycol: 3,6 mg/kg par injection lente et strictement IV (solvant caustique!). Deux à quatre séries de quatre injections seront administrées, espacées de 7 jours, d'après le degré d'inflammation du LCR. La toxicité de cet arsénical rend son usage périlleux mais il n'y a souvent pas d'autre choix.

- Nifurtimox (Lampit[®]), un nitrofurane: 12,5 à 17 mg/kg/jour pendant 60 jours par voie orale.
- Eflornithine, α -Difluorométhyl-ornithine (α -DFMO, Ornidy[®]), inhibiteur de l'ornithine décarboxylase: 100 mg/kg en IV quatre fois par jour pendant 14 jours, suivi de 75 mg/kg quatre fois par jour par voie orale pendant 21 à 30 jours.

Combinaison de plusieurs médicaments

Le traitement comprendra successivement l'administration d'une injection de suramine et de trois ou quatre séries de 3 ou 4 injections (d'après le résultat de l'examen du LCR) IV de 3,6 mg/kg d'Arsobal[®] à une semaine d'intervalle.

La suramine et le nifurtimox en combinaison ont été utilisés avec succès pour traiter des patients ayant rechuté après mélasoprol.

Des schémas thérapeutiques expérimentaux proposent actuellement l'association de plusieurs produits, sur base d'une meilleure connaissance du métabolisme des trypanosomes:

- Eflornithine et mélasoprol (la déplétion en polyamines provoquée par le premier facilite l'action du second);
- Eflornithine et 2-Nitro-imidazoles (traitement expérimental de souris infectées par *T. b. brucei*).

3.8 Epidémiologie

La transmission du parasite à un sujet sain se fait essentiellement par la glossine (évolution de 21 jours environ avant que les glandes salivaires ne soient infectées).

Elle est possible aussi, beaucoup plus rarement, par d'autres insectes piqueurs (transmission mécanique par trompe infectée), par transmission congénitale à travers le placenta et par transfusion sanguine (risque faible car les transfusions se font en ville et la trypanosomiose n'est pas une maladie urbaine).

Réservoir de parasites

Pour *T. b. gambiense*, il n'existe pas de réservoir animal d'importance épidémiologique. On a trouvé des porcs et des chiens infectés naturellement et il est possible d'infecter certains animaux par transmission cyclique au laboratoire (porc - glossine - porc). Le rat sauvage pourrait également jouer le rôle de réservoir parce qu'il est réceptif à l'infection et que certains rats infectés expérimentalement font une maladie chronique.

C'est l'homme lui-même qui est le réservoir le plus important de *T. b. gambiense*. En effet, la maladie est de longue durée et le sujet infecté, non diagnostiqué et non traité, se fait piquer par des glossines et leur transmet le trypanosome. De plus, il est prouvé qu'un certain nombre d'individus peuvent héberger *T. b. gambiense* pendant de longues périodes sans être malades. Ce sont des porteurs sains ou sujets trypanotolérants. Ces personnes peuvent infecter des glossines qui vont éventuellement transmettre ce trypanosome à d'autres personnes qui, elles, pourront faire la maladie.

Contact homme-mouche

Ce facteur, très variable d'une région à l'autre, dépend de deux conditions importantes: limitation des déplacements des glossines (*G. palpalis* est tributaire de l'ombre des forêts et des forêts galeries) et possibilité pour la mouche de se nourrir ailleurs que sur l'homme.

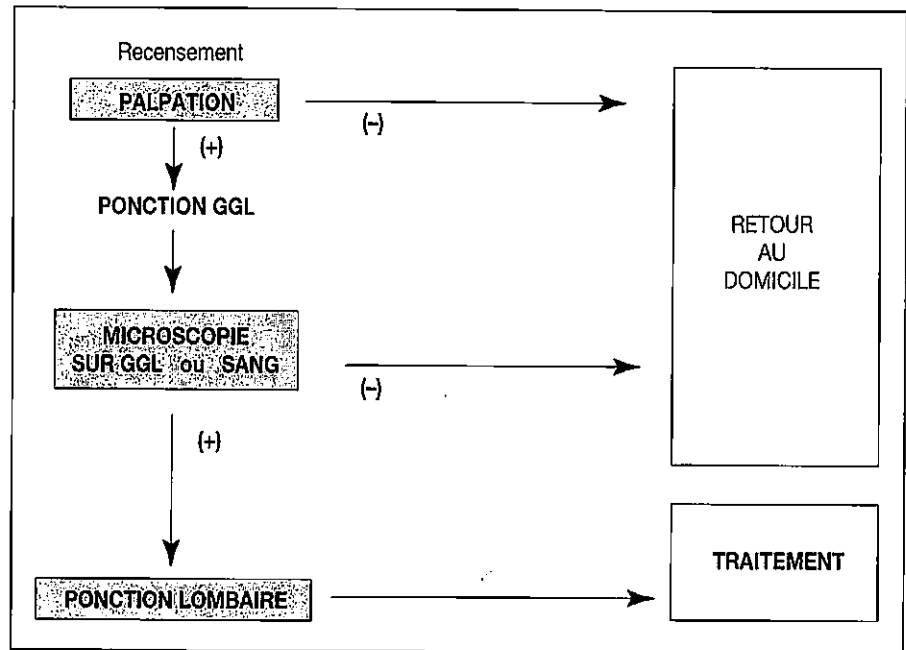
Si des animaux sont présents, l'homme a moins de chance d'être piqué souvent. D'où le danger de concentrations humaines à proximité de gîtes à glossines car ces agglomérations éloignent les animaux sauvages et d'élevage et les tsé-tsé iront, dès lors, piquer exclusivement l'homme. Il faut rappeler ici que les glossines prennent un repas sanguin presque tous les jours et que les mâles piquent comme les femelles.

Des niveaux d'endémie très élevés de maladie du sommeil peuvent être observés dans des villages situés en savane, à proximité d'une rivière et de sa galerie d'arbres. Les villageois se rendent chaque jour à la rivière pour le ménage et la baignade, empruntant un sentier qui traverse la galerie forestière. Les mêmes glossines piqueront quotidiennement les mêmes individus et, s'il y a l'un ou l'autre trypanosomé parmi eux, un cercle vicieux pourra s'installer. On connaît des cas où jusqu'à 15 à 20 p.100 des habitants ont été infectés au cours d'une année.

3.9 Le contrôle de la trypanosomiase à *T. b. gambiense*

Réduction du réservoir par le dépistage actif

Cette méthode de lutte contre la maladie du sommeil consiste à mettre sur pied des équipes mobiles qui auront pour mission d'aller, dans les villages des zones endémiques, examiner périodiquement (tous les 6 mois) tous les individus afin de déceler chez eux les premiers signes de l'infection et de les mettre aussitôt en traitement, tant dans leur intérêt que dans celui de la communauté.



En pratique, ce dépistage s'effectue comme suit: (figure 10-12)

- palpation de la région cervicale postérieure de tous les individus afin de découvrir les ganglions (GGL) hypertrophiés;
- recherche du trypanosome chez tous ceux qui ont des ganglions engorgés, par ponction ganglionnaire et par goutte épaisse (figure 10-14);
- ponction lombaire et examen du LCR pour préciser le stade de la maladie en cas de découverte du parasite et éventuellement rechercher des parasites si les autres examens sont restés négatifs.

Une variante moderne du dépistage consiste à doubler la recherche des ganglions hypertrophiés par la recherche, chez tous les individus de la communauté à examiner, des anticorps antitrypanosomes dans le sérum (prélèvement de sang sur papier filtre ou en tube capillaire). Les suspects sérologiques seront ensuite examinés afin de mettre, chez eux, le trypanosome en évidence dans le sang, la lymphe ganglionnaire ou le liquide céphalo-rachidien (figure 10-13).

La méthode du dépistage par sérologie possède deux avantages sur celle par recherche des ganglions hypertrophiés:

- diagnostic très précoce, avant que des parasites ne soient visibles facilement dans le sang et que l'hypertrophie ganglionnaire ne se manifeste;

Figure 10-12

Schéma de dépistage classique

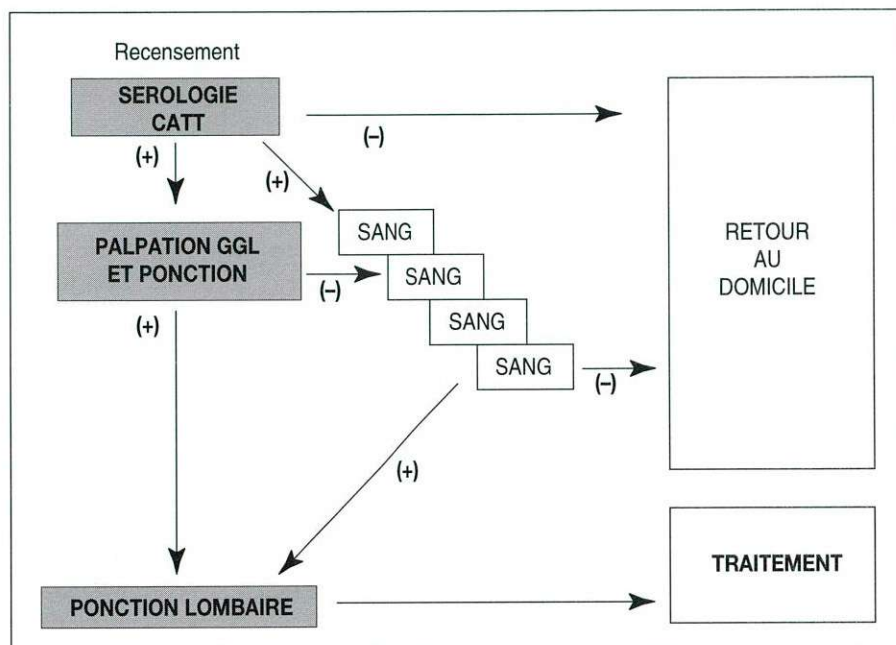


Figure 10-13

Schéma de dépistage amélioré par l'utilisation d'un test sérologique

- diagnostic très sûr (90 à 95 p.100 des sujets infectés sont repérés, contre 50 à 75 p.100 environ par la recherche des adénopathies).

L'IFI nécessite une infrastructure de laboratoire qui n'existe pas partout mais le CATT (ou le test au latex) sont utilisables sur le terrain et la réponse est immédiate. Ils constituent un progrès important dans le dépistage de la maladie.

Mesures prophylactiques

La pentamidine a été utilisée avec succès mais il y a des problèmes de résistance du trypanosome et de logistique. La vaccination n'est pas au point. Elle se heurte à la difficulté des antigènes varia-



Figure 10-14

Microscopistes au cours d'une séance de dépistage actif

Quelle que soit la méthode de sélection des suspects, l'escadron de microscopistes constitue l'élément de base d'une équipe mobile de dépistage.

bles de surface qui permettent aux trypanosomes d'éluder la réponse immune.

Lutte antivectorielle

La lutte contre les glossines peut être entreprise au moyen de méthodes très diverses: insecticides par avion ou hélicoptère, lâcher de mâles stériles, piégeage... (voir chapitre 20).

4. TRYPANOSOMA (TRYPANOZOON) BRUCEI RHODESIENSE Stephens et Fantham 1910

4.1 Morphologie

Elle est identique à celle de *T. b. brucei* (trypanosome polymorphe).

4.2 Hôtes

En plus de l'homme, il a été prouvé qu'il existe un énorme réservoir animal: animaux sauvages (lions, antilopes, buffles), animaux domestiques (bétail).

Les vecteurs appartiennent au groupe *morsitans*, mouches xérophiles, circulant librement dans les zones de hautes savanes: *Glossina morsitans*, *G. swynertoni*, *G. pallidipes*, *G. fuscipes*.

4.3 Distribution géographique

Elle est limitée à celle des vecteurs, les glossines de savane, vivant en climat relativement sec et frais (plateaux et leurs vallées avec végétation d'arbustes et de hautes herbes et peuplés d'abondant gibier). La trypanosomiase à *T. rhodesiense* sévit sur les plateaux de l'Afrique orientale, dans la savane clairsemée de bouquets d'arbres: Burundi (Mosso), Ethiopie, Kenya (rives du Lac Victoria), Malawi, Mozambique, Rwanda (Akagera), Soudan (Equatoria, à l'Est du Nil), Tanzanie, Uganda (régions situées sur la rive nord du lac Victoria), Zambie, Zimbabwe.

4.4 Cycle et mode de transmission

Ce sont ceux de *T. b. brucei*.

4.5 Pouvoir pathogène

Chez l'homme, c'est une forme aiguë de maladie du sommeil, à évolution rapide: l'altération du LCR peut apparaître en un mois. Des formes plus chroniques, ressemblant à des infections à *T. b. gambiense*, ont été observées en Zambie.

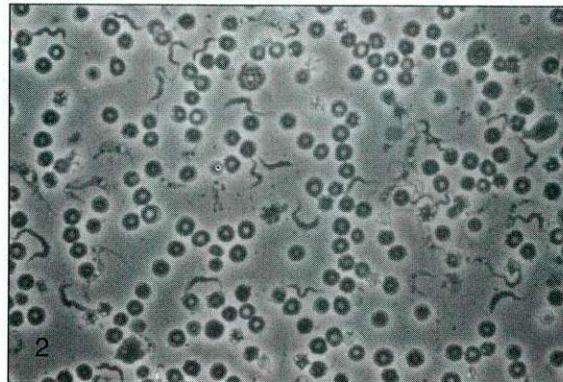


Figure 10-15

T. b. rhodesiense en frottis et dans le sang non coloré, au contraste de phase

1. Trypanosomes en frottis, colorés au Giemsa.
2. Préparation après "buffy-coat" examinée au contraste de phase.

4.6 Diagnostic

La comparaison avec l'approche diagnostique décrite pour *T. gambiense* fait ressortir les différences suivantes:

- le malade consultera spontanément beaucoup plus tôt, car les symptômes de début sont plus accusés (fièvre, maux de tête);
- l'examen microscopique de la goutte épaisse ou du frottis de sang mettra en évidence de nombreux parasites (facilité du diagnostic parasitologique) (figure 10.15).
- les méthodes sérologiques sont moins utiles car elles sont prises de vitesse par les symptômes cliniques et la recherche des parasites.

Comme pour la maladie à *T.b. gambiense*, l'examen du liquide céphalo-rachidien est indispensable pour connaître le stade d'évolution de la maladie.

4.7 Traitement

Le traitement de la trypanosomiase à *T. b. rhodesiense* se base sur les mêmes principes mais est plus difficile que celui de l'infection à *T. b. gambiense*. Les médicaments efficaces ne sont que deux: la suramine et le mélarsozol. De plus, le passage rapide au stade nerveux impose l'association de ces deux produits dans tous les cas. La suramine d'abord, pour éliminer les trypanosomes du sang et de la lymphe, ensuite le mélarsozol à une dose correcte, déterminée par le degré d'atteinte du LCR.

La pentamidine est sans action et le DFMO peu efficace.

4.8 Épidémiologie

La maladie du sommeil provoquée par *T. b. rhodesiense* est une zoonose. Les mouches tsé-tsé s'infectent à partir de l'énorme réservoir animal et lorsqu'elles

piquent l'homme, elle lui transmettent l'infection. Les malades eux-mêmes ne constituent pas une source d'infection importante pour les glossines car ils sont rapidement hors d'état de circuler, une symptomatologie aiguë s'installant d'emblée.

En zone d'endémie, les cas sont disséminés à cause de la circulation très libre de *G. morsitans*. Parfois, la maladie prend une allure épidémique locale plus explosive que pour *T. b. gambiense* si la transmission homme-homme par les glossines devient majoritaire, comme dans le cas de la transhumance de troupeaux.

Tableau 10-2

Caractéristiques	<i>T. b. brucei</i>	<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>T. b. gambiense</i>
Infectant pour l'homme	non	oui	oui
Animaux infectés dans la nature	oui	oui	non (?)
Réservoir de parasites	Animaux sauvages	Animaux sauvages et élevages	Homme, (porc)
Vecteurs	Groupes <i>G. morsitans</i> , <i>G. palpalis</i> , <i>G. fuscus</i>	Groupe <i>G. morsitans</i>	Groupe <i>G. palpalis</i>
Distribution en Afrique sub-saharienne	Occidentale, orientale et centrale	Orientale	Occidentale et centrale
Allure de la maladie chez l'homme	Inexistante	Rapide	Lente
Résistance au sérum humain (B.I.I.T.) ^a	Infectivité diminuée	Infectivité conservée	Infectivité conservée
Efficacité pentamidine	non	non	oui

- a. B.I.I.T. ("Blood Incubation Infectivity Test") de Rickman et Robson: une suspension de trypanosomes isolés à partir d'un animal (bovidé, gibier...) est placée en présence de sérum humain normal à 37° C pendant une heure avant d'être injectée à un animal sensible. Ce test permet de savoir s'il s'agit de *T. b. brucei* ou de *T. b. rhodesiense* (sensible ou résistante au sérum humain).

5. Synthèse concernant les sous-espèces de *T. (T.) brucei*.

Les principaux caractères distinctifs des trois sous-espèces de *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei* sont repris dans le tableau 10-2.

En outre, au laboratoire, une série de techniques modernes permettent actuellement de distinguer ces trois sous-espèces:

- analyse antigénique par immuno-électrophorèse;

- analyse de l'ADN par dénaturation à la chaleur, par les enzymes de restriction, par hybridation *in situ* des ARN (acide ribonucléique) du trypanosome avec des ARN connus;

- analyse des iso-enzymes cytoplasmiques intervenant dans le métabolisme du parasite (amino-transférases);

- comparaison des répertoires antigéniques de surface par tests de lyse. Ces répertoires sont très semblables pour *T. b. brucei* et *T. b. rhodesiense* et sont nettement distincts chez *T. b. gambiense*.

6. Synthèse générale

Un résumé des principaux caractères des sous-genres et espèces du groupe salivaria sera trouvé dans le tableau ci-dessous.

PARASITE Ss genre	Hôtes vertébrés naturels	Vecteurs	Formes métacycliques	Hôtes pour isolement	Distribution	Pouvoir pathogène
Duttonella						
<i>T. (D.) vivax</i>	Bovins, mouton, chèvre, équidés, chien	<i>Glossina, Tabanus</i>	Proboscis	Rongeurs (adaptation difficile)	Afrique tropicale	++ à ++++ (Souma)
<i>T. (D.) uniforme</i>	Bovins, mouton, chèvre, antilope	<i>Glossina</i>	Proboscis	aucun	Afrique tropicale (centre et Est)	++
Nannomonas						
<i>T. (N.) congolense</i>	Bovins, mouton, chèvre, porc, équidés, chien	<i>Glossina</i>	Proboscis	Rongeurs	Afrique tropicale	+ à ++++
<i>T. (N.) simiae</i>	Porc + (bovins, équidés, chameau).	<i>Glossina</i>	Proboscis	Singes, lapins	Afrique tropicale	++++
Pycnomonas						
<i>T. (P.) suis</i>	Porc	<i>Glossina</i>	Glandes salivaires	Aucun	Tanzanie, Burundi	++
Trypanozoon						
<i>T. (T.) brucei brucei</i>	Chameau, chien, porc, bovins, mouton, chèvre, animaux sauvages	<i>Glossina</i>	Glandes salivaires	Rongeurs et autres Culture <i>in vitro</i>	Afrique tropicale	+ à ++++ (Nagana)
<i>T. (T.) brucei rhodesiense</i>	Homme, bovins, animaux sauvages	<i>Glossina</i>	Glandes salivaires	Rongeurs et autres Culture <i>in vitro</i>	Afrique tropicale orientale	Maladie du sommeil aiguë
<i>T. (T.) brucei gambiense</i>	Homme, (porc, chien?)	<i>Glossina</i>	Glandes salivaires	Rongeurs et autres Culture <i>in vitro</i>	Afrique tropicale Ouest et centre	Maladie du sommeil chronique
<i>T. (T.) evansi</i>	Bovidés, équidés, chameau, chien, etc.	<i>Tabanidae etc...</i>	Inexistantes (transmission mécanique)	Rongeurs et autres	Afrique du Nord, Asie, Amérique latine	+ à ++++ (Surra)
<i>T. (T.) equiperdum</i>	Equidés	Inexistants (transmission sexuelle)	Inexistantes	Lapins, rongeurs	Afrique du Nord, Afrique du Sud, Europe, etc..	+ à ++++ (Dourine)
Tejeraia						
<i>T. (T.) rangeli</i>	Animaux divers, homme	<i>Réduviidae</i>	glandes salivaires et déjections	rongeurs	Amérique latine	Aucun

BIBLIOGRAPHIE

- LAVERAN A ET MESNIL F. (1912) *Trypanosomes et Trypanosomiasés*. Paris, Masson Editeurs.
- CHARDOME M ET PEEL J. (1967) Les trypanosomes transmis par *Glossina morsitans* au Bugesera (Rwanda et Burundi), Bruxelles, Goemare.
- APTED FIC. (1970) The epidemiology of rhodesian sleeping sickness, In: HW MULLIGAN *The African Trypanosomiasés*, London, Georges Allen and Unwin, pp. 645-660.
- SCOTT HD. (1970) The epidemiology of gambian sleeping sickness, In: HW MULLIGAN *The African Trypanosomiasés*, London, Georges Allen and Unwin, pp. 614-644.
- BAKER JR. (1970) Techniques for the detection of trypanosome infections, In: HW MULLIGAN *The African Trypanosomiasés*, London, Georges Allen and Unwin, pp. 67-88.
- FORD J. (1970) The geographical distribution of *Glossina*, In: HW MULLIGAN *The African Trypanosomiasés*, London, Georges Allen and Unwin, pp. 274-297.

- APTED FIC (1970) Clinical manifestations and diagnosis of sleeping sickness, In: HW MULLIGAN *The African Trypanosomiasis*, London, Georges Allen and Unwin, pp. 661-683.
- BURKE J. (1971) Historique de la lutte contre la maladie du sommeil au Congo, *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*, **51**, 187.
- HOARE CA. (1972) *The trypanosomes of mammals*, Oxford, Edinburgh, Blackwell Scientific Publications.
- BAKER JR. (1974) Epidemiology of African sleeping sickness, In: K ELLIOTT, M O'CONNOR and GEW WOLSTENHOLME (Eds), *Ciba Symposium (new series) Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease*, North Holland Elsevier Excerpta Medica, **20**, 29-50.
- GOODWIN LG. (1974) The African scene: mechanisms of pathogenesis in trypanosomiasis, In: K ELLIOTT, M O'CONNOR and GEW WOLSTENHOLME (Eds), *Ciba Symposium (new series) Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease*, North Holland Elsevier Excerpta Medica, **20**, 108-124.
- Colloque de l'Institut de Médecine tropicale "Prince Léopold" (1977) *Human African Trypanosomiasis*, Annales de la Société belge de Médecine tropicale, **57**, 188-538.
- MAGNUS E, VERVOORT T, VAN MEIRVENNE N. (1978) A card-agglutination test with stained trypanosomes (C. A. T. T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis, *Annales de la Société belge de Médecine tropicale*, **58**, 169-176.
- GIBSON WC, DE C. MARSHALL TF, GODFREY DG. (1980) Numerical analysis of enzyme polymorphism: a new approach to the epidemiology and taxonomy of the subgenus Trypanozoon, In: WHR LUMSDEN, R MULLER, JR BAKER (Eds), *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **18**, 176-246,
- MURRAY M, MORRISSON WL, WHITELAW DD. (1982) Host susceptibility to African Trypanosomiasis: trypano-tolerance, In: WHR LUMSDEN, R MULLER, JR BAKER (Eds), *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **21**, 2-68.
- STEPHEN LE. (1986) *Trypanosomiasis, a veterinary perspective*. Pergamon Press.
- BOA YE, TRAORE MA, DOUA F *et al.* (1988) Les différents tableaux cliniques actuels de la trypanosomiase humaine africaine à *T. b. gambiense*. Analyse de 300 dossiers du foyer de Daloa, Côte d'Ivoire, *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **81**, 427-444.
- FAIRLAMB AH. (1990) Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis. 1. Novel approaches to the chemotherapy of trypanosomiasis, *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*, **84**, 613-617.
- GODFREY DG, BAKER RD, RICKMAN LR, MEHLITZ LR. (1990) The distribution, relationships and identification of enzyme variants within the subgenus Trypanozoon, In: JR BAKER, R MULLER (Eds), *Advances in Parasitology* London, Academic Press, **29**, 2-74.
- HIDE G, CATTAND P, LE RAY D, BARRY JD, TAIT A. (1990) The identification of *Trypanosoma brucei* subspecies using repetitive DNA sequences, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **39**, 213-226.
- YARLETT NI, QUAMINA A, BACCHI CJ. (1991) Protein methylases in *Trypanosoma brucei brucei*: Activities and response to DL- α -Difluoromethyl-ornithine, *Journal of General Microbiology*, **137**, 717-724.
- NANTUYA VM, DOUA F, MOLISHO S. (1992) Diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness using antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay, *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*, **86**, 42-45.
- WÉRY M. (1994) Drugs used in the treatment of sleeping sickness (human african trypanosomiasis: HAT), *International Journal of Antimicrobial Agents*, **4**, 227-45.

Le genre *Leishmania*

Les leishmanioses

11

1. Historique

C'est Cunningham qui, en 1885, reconnaît pour la première fois "des organismes parasitaires particuliers contenant des spores": ce sont en fait les macrophages parasités.

Il faudra attendre 1903, année décisive, pour que Leishman suspecte la présence d'infections à trypanosomes en Inde, reconnaissant la similitude des corpuscules décrits chez des malades atteints de la "maladie noire" avec les corps arrondis observés dans certaines trypanosomiasés. Donovan, la même année, décrit les "corpuscules dans des infections à trypanosomes" tandis que Laveran et Mesnil pensent à des piroplasmés. Ross range finalement (à tort) les parasites décrits dans les sporozoaires et les baptise "*Leishmania*".

En 1904, Rogers observe l'apparition de flagellés dans des suspensions de pulpe splénique contenant *L. donovani* maintenues *in vitro* dans une solution de citrate. Il y reconnaît des leptomonas. Cette dernière forme parasitaire est trouvée, les années suivantes, chez le pigeon, les rongeurs, les lézards...

Nicolle, en 1909, donne le nom de *L. infantum* à l'organisme causant le kala-azar méditerranéen et fait le rapprochement entre les parasites viscéraux et les cutanés de l'Ancien Monde (décrit par d'autres sous le nom de *Ovoplasma orientale*) tandis que Vianna décrit *L. braziliensis* en Amérique latine.

2. Bases de la distinction en espèces

Les parasites du genre *Leishmania* présentent deux formes au cours de leur cycle évolutif:

- chez l'hôte vertébré, une forme amastigote, arrondie, possédant un noyau, un kinétoplaste et une ébauche de flagelle qui ne sort pas de la cellule;

- dans le tube digestif de l'insecte, une forme promastigote, allongée, possédant un noyau central, un kinétoplaste situé dans la partie antérieure du parasite et un flagelle libre, sans membrane ondulante.

Les caractères morphologiques très uniformes des espèces appartenant au genre *Leishmania* ne permettent pas de les distinguer les unes des autres. Pourtant, les comportements de ce parasite au cours de sa multiplication chez l'homme et l'animal sont très variés. Ces variations portent essentiellement sur trois points: l'*extériorisation clinique*, la *distribution géographique* et la liste des *animaux réceptifs* dans la nature (réservoir animal).

Depuis quelques années, les laboratoires ont développé des techniques de comparaison des isoenzymes métaboliques, d'étude de l'ADN ainsi que la description plus précise du comportement chez le vecteur. Ceci procure une base plus objective à la taxonomie et permet de regrouper les isolats faits à partir de l'homme ou d'animaux dans n'importe quelle région géographique, en deux sous-genres (*Leishmania* et *Viannia*) et six complexes d'espèces (*Leishmania* (*L.*) *donovani*, *L.* (*L.*) *tropica*, *L.* (*L.*) *major*, *L.* (*L.*) *aethiopica*, *L.* (*L.*) *mexicana*, *L.* (*V.*) *braziliensis*).

Remarque

Chacun des complexes d'espèces mentionnés ci-dessus peut être subdivisé en plusieurs espèces dont l'identité ne fait pas l'unanimité des auteurs.

2.1 Extériorisation clinique

Les leishmanioses sont classées par les cliniciens en viscérales, cutanées simples ou récidivantes, cutanées diffuses ou anergiques et cutanéomuqueuses.

Remarque importante

La localisation de la phase intracellulaire chez l'hôte vertébré n'est pas une caractéristique stricte d'une espèce ou sous-espèce: des agents responsables de leishmanioses viscérales peuvent envahir la peau (lésions post kala-azar) et certaines leishmanioses cutanées peuvent se "viscéraliser" dans certaines circonstances.

1. Historique
 2. Bases de la distinction en espèces
 3. Hôtes des leishmanies
 4. Cycle évolutif et caractères biologiques
 5. Diagnostic au laboratoire
 6. Traitement
 7. Description des complexes d'espèces
 8. Méthodes de lutte et contrôle
 9. Synthèse
- Bibliographie

FIGURES

- 11-1 Phlébotome, vecteur de leishmanioses
- 11-2 Macrophages et formes amastigotes
- 11-3 Formes promastigotes (vecteur, culture)
- 11-4 Cycle évolutif des leishmanies
- 11-5 Communautés antigéniques chez les Trypanosomatidae
- 11-6 Immuno-électrophorèse: arcs 4 et 24 spécifiques de *Leishmania*
- 11-7 Sérums de chiens et antigènes de *L. donovani*
- 11-8 Ulcère leishmanien

2.2 Distribution géographique

Ancien Monde (Europe, Asie, Afrique), Nouveau Monde (du Mexique à l'Argentine et au Chili); urbaine, rurale ou forestière; restreinte, large.

2.3 Espèces animales réceptives

On distingue les leishmanioses anthroponosiques, causées par des parasites infectants pour l'homme uniquement et les leishmanioses zoonosiques dont les parasites sont infectants pour l'homme et certains animaux.

2.4 Combinaison de caractères

La classification épidémiologique suivante provient de l'amalgame des caractères "hôtes" et "localisation chez l'homme": L (leishmaniose); V (viscérale); C (cutanée); A (anthroponosique); Z (zoonosique) .

LVA	<i>L. donovani</i>
LVZ	<i>L. infantum</i> et <i>L. chagasi</i>
LCA	<i>L. tropica</i>
LCZ	<i>L. major</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. pifanoi</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. peruviana</i> , <i>L. guyanensis</i> .

3. Hôtes des leishmanies

3.1 Hôtes vertébrés

Les hôtes réservoirs principaux sont

- domestiques ou péri-domestiques: chien, *Rattus rattus* (rat de maison);

- sauvages dans l'Ancien Monde: canidés sauvages (chacal, loup, renard), rongeurs (rats des champs), daman (mammifère ongulé herbivore de la taille d'un lapin rencontré en Afrique et en Asie mineure);
- sauvages dans le Nouveau Monde: paresseux (mammifère d'Amérique du Sud, arboricole de 60 cm de longueur environ, aux mouvements lents et possédant des articulations vertébrales particulières); petit fourmilier arboricole et opossum (déjà décrit pour la maladie de Chagas); procyonidés (raton laveur, carnivore des régions forestières d'Amérique à fourrure fauve et à la queue longue, souvent dressée, ornée de bandes annulaires); rongeurs (rats des champs ou forestiers).

On trouvera la liste des animaux réservoirs dans les paragraphes décrivant les différents complexes d'espèces. La longévité de l'hôte et l'intensité de ses contacts avec le vecteur, la proportion d'individus infectés, la faible pathogénicité du parasite et sa présence dans le sang ou la peau sont des facteurs importants dans la détermination du statut d'hôte réservoir.

3.2 Hôtes invertébrés

Le vecteur des leishmanies est le phlébotome ou "sand fly" (mouche des sables), décrit comme un "petit moucheron bossu" (la tête, le thorax et l'abdomen font en effet un angle donnant l'aspect d'un insecte faisant le gros dos). Seule la femelle est hématophage et joue le rôle de vecteur. Son activité est maximale la nuit, à la tombée du jour (figure 11-1).

Les vecteurs piquent dans les habitations (endophages) ou en dehors (exophages). Selon les régions, ils piquent de préférence l'homme (anthropophilie) ou les animaux (zoophilie).

Moucheron des pays relativement secs, très sédentaire (rayon de vol de 50 à 100 mètres), ses larves se développent dans le sable, les fissures de pierres, les failles rocheuses, les crevasses de troncs d'arbres. Elles ne sont pas tributaires de l'eau mais une humidité de plus de 70 p.100 leur est favorable. Elles se nourrissent de déjections d'insectes ou de lézards ainsi que de débris végétaux en décomposition.

Deux genres appartenant à la famille des Phlebotominae sont les principaux vecteurs. Ce sont, pour l'ancien Monde, le genre *Phlebotomus* et, pour le Nouveau Monde, les genres *Lutzomyia* et *Psychodopygus*.

Figure 11-1

Phlébotome, vecteur de leishmanioses

Le "petit moucheron bossu" aux ailes poilues, pendant son repas.



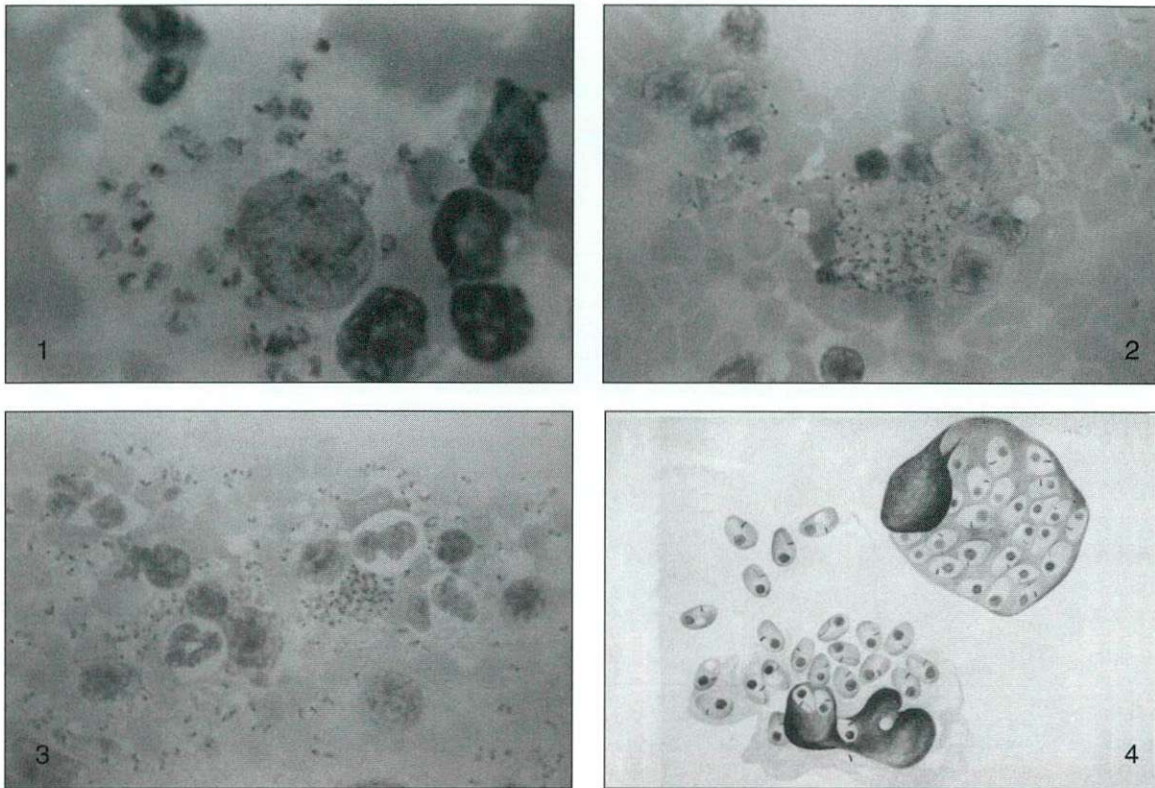


Figure 11-2

Macrophages et formes amastigotes

1. Amastigotes libres en frottis (macrophages éclatés).
2. Amastigotes dans un macrophage.
3. Amastigotes dans un macrophage et éparpillés dans la préparation.
4. Dessin de macrophages parasités montrant les éléments constitutifs des amastigotes.

La reconnaissance du statut de vecteur implique que l'insecte incriminé permette la multiplication des parasites dans son tube digestif, qu'il soit porteur de parasites infectants, qu'il pique l'homme ainsi que les hôtes réservoirs.

4. Cycle évolutif et caractères biologiques

4.1 Chez l'hôte vertébré

Le parasite (injecté par l'insecte) se retrouve dans les macrophages, histiocytes, monocytes de différents organes où il se multiplie sous forme amastigote. La destruction de la cellule hôte provoque la dissémination dans le sang et la lymphe des parasites qui seront phagocytés par de nouvelles cellules réticulo-endothéliales (figure 11-2).

La prolifération des parasites viscérotropes cause une hyperplasie du SRE et celle des parasites dermatropes cause l'apparition d'un histiocytome cutané.

C'est lorsqu'ils se trouvent dans le sang et le derme que les parasites sont repris par l'hôte invertébré, le phlébotome.

4.2 Chez l'hôte invertébré

Les parasites sont entraînés avec le repas sanguin jusque dans la partie postérieure de l'estomac de l'insecte où ils se transforment en promastigotes. Dès le premier jour, on les retrouve dans l'intestin moyen jusqu'au pylore chez le sous-genre *Leishmania* et occupant déjà la totalité du tube digestif (y compris l'intestin postérieur) chez le sous-genre *Viannia*. A partir du 2ème jour, les parasites ayant résisté aux enzymes digestifs de l'insecte entament une migration vers la partie antérieure. On les retrouve alors dans la partie moyenne de l'estomac.

Du troisième au cinquième jour, la multiplication sous forme promastigote très rapide dans la partie antérieure de l'estomac et dans le proventricule aboutit au stade de "rosette", amas de parasites restés accolés après la division (figure 11-3).

Il faut attendre les neuvième et dixième jours après le repas infectant pour voir apparaître, en grand nombre, des formes promastigotes dans le pharynx et

Figure 11-3

Formes promastigotes (vecteur, culture)

- 1, 2. Formes promastigotes retrouvées dans le tube digestif et la trompe du vecteur: le kinétoplaste se trouve à l'avant du parasite.
3. Dessin de promastigotes et formation d'une rosace, résultat d'une multiplication rapide.

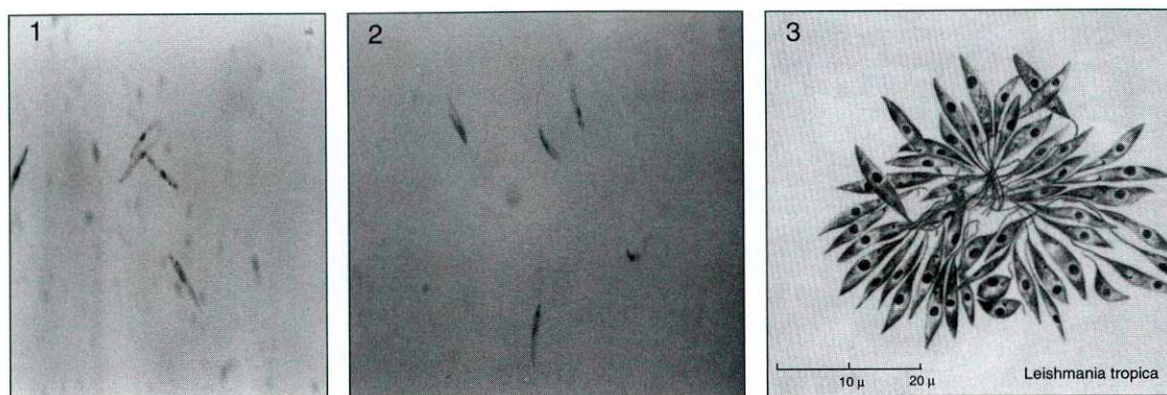
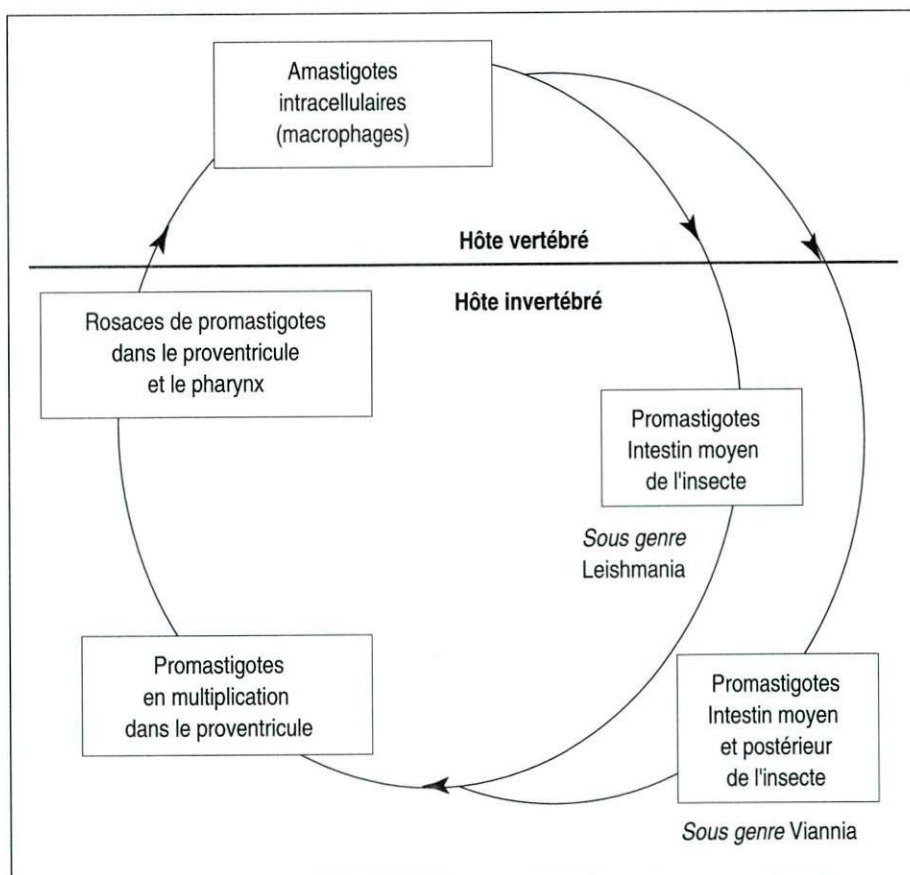


Figure 11-4

Cycle évolutif des leishmanies



le proventricule qui communiquent avec la trompe. Ces amas de parasites bloquent l'intestin antérieur de l'insecte, obligeant celui-ci à produire des efforts de pompage lors du repas sanguin. Ces efforts favorisent l'injection des parasites à l'hôte vertébré par un mécanisme de régurgitation. L'écrasement sur la peau d'un insecte porteur de promastigotes peut aussi être à l'origine de la transmission. Une fois introduit dans la circulation d'un hôte à sang chaud, le promastigote est repris par un macrophage où il se multipliera sous forme amastigote (figure 11-4).

4.3 Biologie du parasite

Chez l'invertébré

Les promastigotes de l'estomac sont non-infectants pour l'hôte vertébré. Ils acquièrent la capacité d'infection au cours de leur maturation chez l'insecte. Lorsqu'ils arrivent dans les pièces buccales et la salive, ils ont synthétisé, sur leur membrane externe, des récepteurs qui facilite leur phagocytose par le macrophage: les lipo-phosphoglycannes (LPG) et une glycoprotéine (gp63) à activité protéinase.

Des LPG sont retrouvées à la surface du macrophage qui vient de phagocyter des promastigotes et y restent présentes pendant 2 à 3 jours, au stade initial de l'infection. Ces molécules ont également été tenues pour responsables de la spécificité d'une espèce donnée de *Leishmania* pour son vecteur préféré. Il s'agirait d'une reconnaissance des cellules de l'estomac.

Remarque

Le parasite ne persiste après digestion du repas de sang que chez un vecteur adapté à l'espèce; chez un vecteur inadapté, il est éliminé par la trypsine.

La glycoprotéine gp63, également présente à la surface et différente d'une espèce à l'autre, favoriserait la phagocytose du promastigote par le macrophage,

aidant ainsi à l'établissement de l'infection chez l'hôte vertébré. Son rôle ne s'arrête pas là: par son activité protéinase elle inhiberait la libération des radicaux libres supposés détruire les microorganismes phagocytés par les macrophages. Cette famille de protéines, codées par des gènes répétés, est considérée comme un facteur de virulence, chaque protéine de la famille conférant au parasite qui la porte le caractère de virulence qui le caractérise.

D'autre part, les promastigotes sont résistants à la lyse immune complément-dépendante car ils ne permettent pas à la fraction C9 du complément de se fixer sur leur membrane externe.

L'identification de l'origine des repas sanguins peut être réalisée sur le terrain, à l'aide de tests immuno-enzymatiques pratiqués sur bandelettes portant des antisérums dirigés contre le sang d'animaux cibles. D'autre part et à condition d'avoir une présomption de la souche cible, la recherche de l'infection chez les insectes capturés peut se faire par utilisation des anticorps monoclonaux ou des sondes nucléiques auxquelles la technique PCR confère une sensibilité hors du commun. Ces techniques ont facilité les études sur le pouvoir vectoriel des phlébotomes.

Chez l'hôte vertébré

La phagocytose des amastigotes par les macrophages est également facilitée par la présence à la surface de ce stade parasitaire, des deux protéines signalées chez le promastigote, la LPG et, dans une moindre mesure, la gp63.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer la survie des parasites amastigotes à l'intérieur des macrophages où ils résistent aux mécanismes antimicrobiens oxygène-dépendants induits par les cytokines. L'explosion respiratoire n'a pas lieu car

- il y aurait destruction par la protéase leishmanienne gp 63, de l'enzyme lysosomal β -galactosidase;
- ce stade parasitaire aurait développé un mécanisme (inconnu) de détoxification des métabolites oxygénés.

Des équilibres très différents existent d'une espèce à l'autre, entre la force de multiplication des parasites et les modalités de la réponse immunitaire des hôtes avec, pour conséquence, une variété considérable d'altérations dégénératives (lésions) résultantes.

On a démontré que l'infection expérimentale par *L. major* se résolvait d'elle-même chez deux races de

souris (C57Bl.6 et CH3) tandis qu'elle aboutissait à une généralisation chez les Balb/C ayant des caractères immunologiques différents:

- la guérison survient par activation des cellules T4 (T_H1) qui produisent l'IFN γ et IL-2, une activation des macrophages et une hypersensibilité retardée aux antigènes du parasite;
- la généralisation survient par activation des cellules T4 (T_H2) et production d'IL4 ("granulocyte-macrophage colony stimulating factor") qui fournit au parasite de nouvelles cellules cibles.

5. Diagnostic au laboratoire

5.1 Mise en évidence du parasite

Examen microscopique

Il permet la recherche des amastigotes intracellulaires (corps de Leishman-Donovan, "L-D bodies") dans les macrophages sur frottis ou coupes histologiques. On y reconnaîtra le noyau et le kinétoplaste.

Remarque

Il est parfois possible de trouver des amastigotes dans le sang.

• FROTTIS

Ils seront faits à partir de matériel prélevé par ponction de moelle osseuse, de rate ou de lymphé dermique. Pour les lésions cutanées, le prélèvement se fera sur le bord après injection d'une goutte d'eau physiologique *in situ*. Les frottis, fixés au méthanol, seront colorés au Giemsa.

La numération des parasites est utile (nombre de parasites ou de cellules parasitées par 1, 10, 100, 1000 champs microscopiques).

La sensibilité de l'examen est de pratiquement 100 p.100 pour la rate, de 80 p.100 pour la moelle osseuse et de 60 p.100 pour les ganglions dans les cas de kala-azar.

Remarque importante

La ponction de la rate présente un danger certain, surtout si elle est effectuée sur une rate hypertrophiée, dont la capsule est fragilisée. On préfère habituellement la ponction de moelle osseuse.

• COUPES

Les tissus seront prélevés par ponction biopsie du foie ou ponction cutanée (faite sur le bord de la lésion). Les coupes seront examinées après fixation au formol, enrobage et coloration au Giemsa ou à l'hématoxyline-

éosine. Les amastigotes sont plus difficiles à identifier en coupe que sur frottis car un des deux éléments caractéristiques, noyau ou kinétoplaste, fait souvent défaut.

Culture

Elle permet la croissance de formes promastigotes (les mêmes que celles du phlébotome) à partir de ponctions ou de biopsies, dans des milieux d'isolement des hémoflagellates (voir chapitre 19). Des milieux de culture pour isolement sont disponibles dans le commerce. L'ensemencement doit évidemment être fait à partir de matériel stérile au point de vue microbien et mycotique. La croissance prend plus d'une semaine à 26° C.

Inoculation aux animaux

Le hamster doré de Syrie et le cobaye sont les animaux les plus réceptifs. L'inoculation se fera dans le coussinet plantaire pour les parasites de la peau, par voie intra-péritonéale pour les parasites viscéraux. Une période prépatente de plusieurs semaines est souvent observée. Les animaux sont aussi utilisés comme intermédiaires entre un prélèvement impossible à stériliser et la mise en culture, lorsqu'il est important d'isoler la souche.

Techniques modernes permettant la détection du parasite

Elles permettent de mettre en évidence d'infimes quantités de matériel nucléaire parasitaire dans un prélèvement (ponction ou biopsie). Elles permettent aussi de déterminer avec précision l'espèce de *Leishmania* responsable.

La détection des antigènes excrétés par les amastigotes se fera par des anticorps monoclonaux et celle des acides nucléiques du parasite, par hybridation moléculaire (sondes marquées aux isotopes) ou ampli-

fication de séquences identifiées (PCR) suivie d'hybridation.

La PCR a été utilisée sur le terrain, à partir de biopsies traitées à l'ADNase, à laquelle résiste l'ADN kinétoplastique. Ce dernier contient des séquences spécifiques, identifiées, des grands groupes de *Leishmania*. Des amorces sont donc disponibles, spécifiques par exemple du complexe *brasiliensis*, permettant de détecter rapidement et de manière très spécifique, ces parasites rares dans les prélèvements et difficiles à cultiver. Les problèmes techniques sont aisément surmontés, même en zone rurale, mais les contaminations d'une biopsie à l'autre, par les lames ou les pinces à biopsies insuffisamment décontaminées, restent une difficulté majeure. On peut citer comme décontaminant efficace, l'eau de Javel (hypochlorite).

Les applications les plus prisées sont: un diagnostic plus spécifique, la recherche des facteurs de risque de développer une espundia, la recherche des sites de développement des leishmanies.

5.2 Sérologie: recherche d'anticorps spécifiques

Les antigènes utilisés proviennent généralement des promastigotes de culture entiers ou soniqués suivant le type de réaction sérologique utilisée: fixation du complément, hémagglutination indirecte, ELISA, immunofluorescence indirecte. Pratiqué sur des promastigotes de culture ou amastigotes en culture sur rein de singe, ce dernier test est le plus sensible et le plus spécifique du groupe. On observe cependant aussi des réactions croisées avec *T. cruzi* et *M. tuberculosis*.

Dans la précipitation en gel utilisant des antigènes solubles (figure 11-5), la réponse est qualitative par le nombre de systèmes précipitants et peut être analysée par immuno-électrophorèse (présence des arcs de précipitation n° 4 et 24, spécifiques des leishmanies) (figure 11-6).

D'autres réactions sont en développement: agglutination directe de promastigotes de culture fixés et colorés (comme le CATT pour la trypanosomiase) et agglutination de particules de latex sensibilisées par un extrait soluble de promastigotes.

Remarque importante

Les affections causées chez l'homme par les différents complexes d'espèces peuvent être distinguées par la sérologie à la condition que les réactions utilisées fassent intervenir aussi bien les antigènes excrétés (exoantigènes) que les antigènes de surface et les antigènes somatiques.

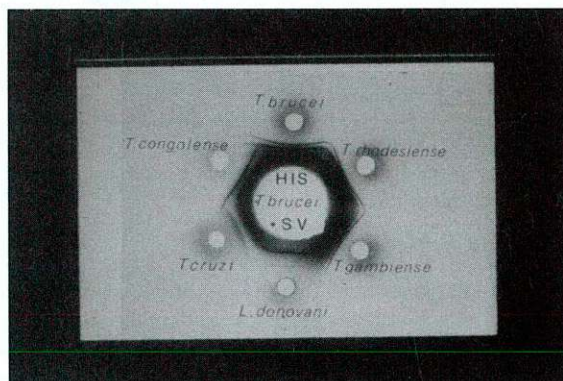
Figure 11-5

Communautés antigéniques chez les Trypanosomatidae

Une immunodiffusion montre qu'un hyperimmunsérum (HIS) contre *T. brucei* reconnaît des antigènes des différentes espèces de trypanosomes ou de leishmanies.

Des communautés antigéniques entre *T. gambiense*, *T. rhodensiense* et *T. brucei* sont mis en évidence, de même qu'entre *T. cruzi* et *L. donovani*.

Document D. Le Ray



5.3 Intradermo-réaction de Monténégro à la leishmanine

C'est une réaction d'hypersensibilité retardée provoquée par l'injection intradermique de promastigotes de culture, lavés et mis en suspension dans une solution saline contenant 0,5 p.100 de phénol. L'espèce de leishmanie utilisée n'a pas d'importance (il n'y a pas de spécificité d'espèce). La "leishmanine" contient un million de parasites par ml. La dose individuelle comporte 0,1 ml, c'est-à-dire 100.000 parasites. Une injection de 0,1 ml de solution phénolée sans parasites est faite à proximité, comme témoin d'une éventuelle sensibilité du patient au phénol.

Après 48 à 72 heures, une réaction positive donne un nodule induré entouré d'érythème. On facilite la mesure en traçant au bic, sur la peau avoisinante et suivant les diamètres, des lignes qui s'arrêtent au bord de l'induration. Les degrés sont exprimés de 1 à 4, d'après le diamètre (de < 4 mm à > 8 mm).

Cette réaction est positive chez les sujets ayant fait une leishmaniose viscérale antérieurement. Elle reste positive après la guérison pendant toute la vie du patient et est utilisée en épidémiologie du kala-azar. Pour les leishmanioses cutanées, elle peut aider au diagnostic.

5.4 Constantes biologiques

Dans les leishmanioses viscérales, une forte augmentation des γ globulines est mise en évidence par

- l'électrophorèse du sérum qui indique une inversion du rapport albumine/globuline due à la très haute teneur en gamma globulines;
- la formol-gélification (solidification et opacification d'un mélange de 1 ml de sérum et d'une goutte de formol, après 20 minutes, à 37°C). Cette réaction ne devient positive qu'après plusieurs semaines d'évolution (citée pour mémoire).

Les paramètres hématologiques montrent une pancytopenie avec perturbation des tests de coagulation.

6. Traitement

Principes actifs

Antimoniés pentavalents

Ils sont administrés par voie générale ou locale: antimoniate de méglumine (8,5 p.100 d'anti-

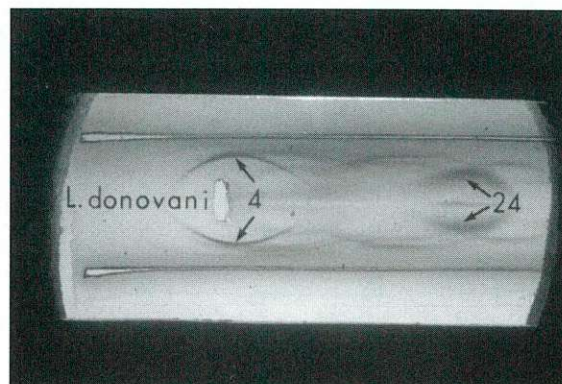


Figure 11-6

Immuno-électrophorèse: arcs 4 et 24 spécifiques de *Leishmania*

Immuno-électrophorèse montrant les antigènes de leishmanies reconnus par des immuns-sérums. Les arcs n° 4 et 24 sont spécifiques de *Leishmania sp.*

Document D. Le Ray

moine) ou stibogluconate de sodium (10 p.100 d'antimoine)

Iséthionate de pentamidine
Amphotéricine B®
Kétoconazole et Itraconazole
Allopurinol

Chez les patients séropositifs, le traitement de choix serait l'amphotéricine B, de préférence la présentation dans des liposomes qui évite les effets secondaires gênants. Une prévention à vie par une injection mensuelle de pentamidine éviterait en même temps la pneumocystose. Cependant, le développement d'un diabète insulino-dépendant serait une contre-indication de ce schéma au long cours.

7. Description des complexes d'espèces

7.1 Leishmanioses viscérales: le complexe *Leishmania (L.) donovani*

Parasites des macrophages de la rate, du foie et autres organes lymphoïdes, ils sont les agents étiologiques du kala-azar (maladie noire). On y retrouve *L. donovani*, *L. infantum*, *L. archiblandi* et *L. chagasi* (tableau 11-1).

Remarques

Lorsque l'homme est le seul réservoir, des épidémies peuvent survenir lors des déplacements de populations le long d'axes de communication, parfois de manière inexplicable. Lorsqu'il y a un réservoir animal, la maladie persiste à l'état endémique, produisant des cas sporadiques.

Les similitudes entre *L. chagasi* et *L. infantum* portent à croire que *L. infantum* de l'ancien Monde aurait été introduit en Amérique latine par les Conquistadors et leurs chiens.

Pouvoir pathogène

Après une période d'incubation de 10 jours à plus d'un an, au cours de laquelle une lésion peut se manifester à l'endroit de l'inoculation (phénomène surtout observé au Soudan), les parasites se développent dans les cellules de la rate et du foie, principalement les macrophages. L'intense multiplication des formes amastigotes remplit rapidement la totalité du cytoplasme de la cellule.

Deux syndromes sont décrits dans l'évolution de la maladie: l'hyperplasie du système réticulo-endothélial et les lésions cutanées post-kala-azar.

La destruction des macrophages et des histiocytes par multiplication des formes amastigotes aura comme conséquences une augmentation importante du volume de la rate, du foie (cellules de Kupffer) et de tous les tissus lymphoïdes (ulcération possible des plaques de Peyer) ainsi que le remplacement progressif, dans la moelle osseuse, du système hématopoïétique par le SRE d'où l'anémie, la leucopénie et la thrombocytopénie.

Les lésions cutanées post-kala-azar consistent en taches dépigmentées, macules hypopigmentées ou érythémateuses de la face, du cou ou d'autres régions anatomiques. L'évolution est possible vers des papules et nodules surtout à la face, sans ulcération. Elles peuvent apparaître jusqu'à deux ans après la guérison et sont infectantes pour le phlébotome (présence de nombreux parasites viables à l'endroit des lésions et même dans la peau saine). Ces manifestations cutanées, fréquentes en Inde et au Soudan, sont rares dans les régions méditerranéennes.

Tableau 11-1

Le complexe *Leishmania* (*L. donovani*) : espèces, distribution géographique et hôtes

Espèce	Géographie	Hôtes vertébrés	Vecteurs
<i>L. donovani</i>	Asie	homme, chien (sauf en Inde)	<i>P. chinensis</i> , <i>P. argentipes</i>
<i>L. infantum</i>	Europe méditerranéenne (Espagne, France, Italie, etc...) Afrique du Nord	Homme, chien	<i>P. perniciosus</i> <i>P. ariasi</i> (Cévennes) <i>P. major</i> (partie orientale du bassin)
<i>L. archibaldi</i>	Afrique de l'Est (Ethiopie, Soudan, Kenya)	Homme uniquement	<i>P. martini</i>
<i>L. chagasi</i>	Toute l'Amérique latine, sauf Chili, Equateur et Uruguay	Homme, chien et canidés sauvages, rongeurs	<i>L. longipalpis</i>

Leishmanioses et SIDA

Dans les zones endémiques du Sud de l'Europe, et particulièrement en Espagne, de plus en plus de cas d'infections leishmaniennes sont diagnostiquées chez des patients sidéens. En Espagne, parmi 111 HIV séropositifs présentant de la fièvre, 17 p. 100 des moëlls examinées montraient des amastigotes. A l'époque du SIDA, l'excédent de diagnostics de leishmaniose chez l'enfant a cédé la place aux 80 p. 100 de diagnostics chez l'adulte séropositif.

Il faut rappeler ici la fréquence des infections inapparentes: jusqu'à 30 p. 100 des chiens sont séropositifs pour *Leishmania* en France méridionale et en Italie, plus de la moitié d'entre eux sans aucun symptôme (figure 11-7). Les chiens asymptomatiques infectent les phlébotomes avec la même fréquence que ceux présentant des lésions. Chez l'homme, dans les mêmes régions, on trouve jusqu'à 30 p. 100 de tests cutanés à la leishmanine positifs, alors que les cas diagnostiqués chez l'homme immunocompétent sont rares. L'infection à VIH donne au parasite l'occasion de se manifester.

L'infection, dans ces cas, montre une tendance à la diffusion des lésions (avec papules de leishmaniose cutanée diffuse bourrées d'amastigotes), à la récurrence après traitement correct d'une leishmaniose viscérale et se présente dans des localisations atypiques. La dissémination des parasites est due à l'effondrement du nombre de lymphocytes T CD4⁺.

Diagnostic

• CLINIQUE

La leishmaniose viscérale peut être confondue avec le paludisme et d'autres parasitoses généralisées. Son diagnostic repose sur les observations suivantes: fièvre ondulante, mauvais état général, perte de poids et émaciation, splénomégalie, adénopathies, anémie, pigmentation de la peau.

• LABORATOIRE

Mise en évidence du parasite

L'examen microscopique se fait sur le produit de ponction médullaire ou splénique (dangereuse) ou sur le sang périphérique en frottis. On retrouvera les parasites intracellulaires ou extracellulaires (cellules éclatées au cours des manipulations).

La culture de toutes les espèces viscérales est facile.

L'isolement sur animaux est sans problèmes, même pour des souches de *L. donovani* infectant l'homme uniquement.

Les techniques modernes sont en plein essor (monoclonaux, sondes, PCR).

Sérologie

Tous les tests donnent une réponse très positive dans 99 p.100 des cas. Un suivi post-thérapeutique est possible par surveillance de la négativation des tests en 6 à 12 mois. Les rechutes sont détectées avant l'alerte clinique.

Constantes biologiques

Les modifications des paramètres déjà mentionnés sont très éloquentes.

Epidémiologie

La maladie peut être endémique au départ de réservoirs animaux ou épidémique par transmission interhumaine, avec des vecteurs très nombreux en contact étroit avec l'homme.

La transmission est réalisée habituellement par *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde, par *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde.

Le chien dans le bassin méditerranéen joue un rôle important comme réservoir de parasites.

Traitement

• DÉRIVÉS DE L'ANTIMOINE

20 mg/kg/jour (850 mg maximum) de Sb pendant 20 jours en moyenne.

- antimoniate de méglumine (Glucantime®): 10 ml en injection intramusculaire;
- stibogluconate de sodium (Pentostam®): 8,5 ml en injection intramusculaire ou intraveineuse.

Les doses seront proportionnellement plus élevées chez l'enfant que chez l'adulte.

Remarque

En cas de résistance (rechutes), on donnera une nouvelle cure d'antimoniés ou l'Amphotéricine B® à raison de 1 mg/kg (dose à atteindre progressivement par paliers de 5 - 10 mg) trois fois par semaine. La dose totale à atteindre est de 1 à 3 grammes.

• ISÉTHIONATE DE PENTAMIDINE

Pentacarinat®: 4 mg/kg, trois fois par semaine pendant 5 à 25 semaines.

• ALLOPURINOL

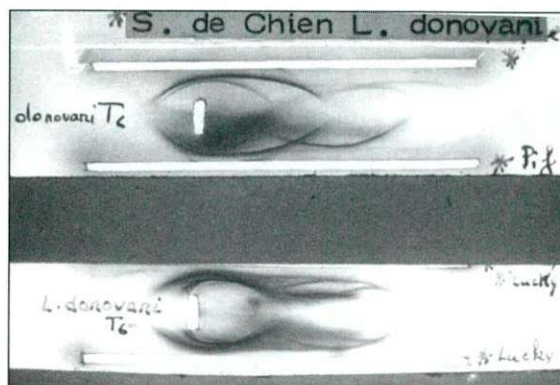


Figure 11-7

Sérums de chiens et antigènes de *L. donovani*

Le chien joue dans la leishmaniose méditerranéenne un rôle important comme réservoir de parasites. Des sérums de chiens infectés reconnaissent plusieurs antigènes de *Leishmania donovani*, proche de *L. infantum*.

Document D. Le Ray

Il a été proposé d'associer le Zyloric® au stibogluconate, à raison de 20 mg/kg/jour, en trois prises par voie orale. Les avis sont partagés sur son activité.

7.2 Les leishmanioses cutanées de l'Ancien Monde

Caractéristiques générales

Il s'agit de parasites des macrophages du derme.

La lésion débute par une papule, évoluant vers un nodule (tissu inflammatoire constitué de lymphocytes, plasmocytes, cellules réticulo-endothéliales remplies de parasites). Une ulcération peut apparaître, souvent très tardivement, au centre de la papule (après deux à trois mois d'évolution). Les surinfections sont fréquentes. L'apparition du tissu granulomateux conduit à la cicatrisation qui survient souvent spontanément au bout d'une année ou plus. Les lésions métastatiques sont rares (figure 11-8).

Le parasite sera mis en évidence par examen microscopique sous forme de frottis, culture (facile) ou inoculation à l'animal du produit de ponction des bords de l'ulcère faite par l'extérieur de la lésion. Le frottis sera coloré au Giemsa. La biopsie, elle aussi,



Figure 11-8

Ulcère leishmanien

Ulcère à bords taillés à pic, dont le fond est occupé par du tissu de cicatrisation; les parasites seront retrouvés en bordure de la lésion.

sera faite sur les bords de la lésion: le fond de l'ulcère ne contient pas de parasites.

En immunofluorescence et en précipitation en gel, les anticorps ne sont détectables que chez 50 p.100 environ des patients atteints d'une ulcération simple.

L'intradermo-réaction à la leishmanine est utile pour le diagnostic épidémiologique (rétrospectif, dans une population).

Le complexe *Leishmania* (L.) *tropica* (tableau 11-2)

- POUVOIR PATHOGÈNE

Agent de la leishmaniose cutanée urbaine (bouton d'Orient, clou de Biskra, bouton d'Alep, "Oriental Sore"), *L. tropica* cause une ulcération sèche, le plus souvent unique, survenant à l'endroit de la piqûre et guérissant spontanément. La localisation et le nombre des lésions dépendra donc des endroits et de la superficie exposés; on a observé jusqu'à 40 lésions simultanées chez un même individu (chacune se développant à l'endroit d'une piqûre infectante). L'évolution peut s'étaler sur une période allant d'une semaine à un an. Elle aboutit à la guérison, laissant une cicatrice ines-

thétique ou passe à la chronicité (lésion continuellement inflammatoire).

- TRAITEMENT

L'objectif principal pourrait en être la diminution du réservoir de parasites. Il consiste en l'injection d'antimoniés ou de quinacrine au niveau de la lésion (à deux ou trois reprises). L'exérèse chirurgicale a été aussi proposée.

Le complexe *Leishmania* (L.) *major* (tableau 11-3)

- POUVOIR PATHOGÈNE

L. major est responsable d'une lésion humide, plus rapide d'évolution, ayant tendance à métastaser le long des trajets lymphatiques ou à récidiver (leishmaniose cutanée rurale). C'est un granulome exubérant avec surface exsudative.

- TRAITEMENT

Les lésions bénignes ne nécessitent aucun traitement.

Les lésions ulcérées, enflammées avec lymphangite, seront traitées par l'administration d'antimoniés par voie générale (10 à 20 mg/kg/jour) jusqu'à obtention de la guérison clinique et parasitologique.

Le complexe *Leishmania* (L.) *aethiopica* (tableau 11-4)

- POUVOIR PATHOGÈNE

La lésion de *L. aethiopica* ressemble à celle de *L. tropica* mais l'ulcération est très tardive ou inexistante. La durée totale, du début à la guérison, est de 2 à 3 ans. Les sujets anergiques ou immunodéprimés montrent une tendance à la métastase et à l'évolution vers la généralisation de lésions nodulaires ressemblant à la lèpre lépromateuse (leishmaniose cutanée diffuse: voir description sous *L. mexicana*).

- TRAITEMENT

On laissera les lésions guérir spontanément sauf en cas de localisations nasales ou buccales où l'administration de pentamidine (4 mg/kg deux fois par semaine) est justifiée jusqu'à régression des lésions (plusieurs semaines).

7.3 Les leishmanioses cutanées du Nouveau Monde

Le complexe *Leishmania* (L.) *mexicana*

Parasites des macrophages de la peau provoquant l'apparition de lésions ulcéraives ou proliférati-

Tableau 11-2

Espèce	Géographie	Hôtes vertébrés	Vecteurs
<i>L. tropica</i>	Afrique du Nord; Pourtour de la méditerranée orientale; Asie centrale; (Zones urbaines)	Homme (parfois le chien?)	<i>P. sergenti</i> autres vecteurs ?

Tableau 11-3

Espèce	Géographie	Hôtes vertébrés	Vecteurs
<i>L. major</i>	Zone sèche d'Afrique au Nord de l'équateur; Moyen Orient; Asie centrale, Inde. (Zones rurales)	Homme Rongeurs	<i>P. papatasi</i> <i>P. dubosqi</i>

Tableau 11-4

Espèces	Géographie	Hôtes vertébrés	Vecteurs
<i>L. aethiopica</i>	Ethiopie, Kenia et pays limitrophes	Homme Rongeurs Daman	<i>P. longipalpis</i> <i>P. pedifer</i>

ves uniques ou multiples, ils présentent une distribution géographique par petits foyers. (tableau 11-5)

• POUVOIR PATHOGÈNE

L. mexicana est responsable de l'ulcère du "chiclero" (ouvrier travaillant à la récolte du latex dans les plantations d'hévéa), qui guérit généralement spontanément sauf s'il siège au niveau du pavillon de l'oreille (endroit préférentiel de piqure de *L. olmeca*). Le cartilage du pavillon peut être complètement détruit par une lésion à l'emporte-pièce avec perte de substance, finissant par cicatriser. Ce type de lésion peut être provoqué par d'autres espèces de *Leishmania* du Nouveau Monde si la piqure a eu lieu sur le pavillon de l'oreille. On incrimine la température plus basse des tissus auriculaires pour expliquer l'exaltation du pouvoir pathogène.

L. pifanoi donne des lésions cutanées simples sans caractère particulier.

L. amazonensis: lésion cutanée unique sans caractère clinique particulier.

Remarque importante

La leishmaniose cutanée diffuse survient en Amérique latine chez des sujets à réponse immunitaire altérée, après inoculation de *L. amazonensis* ou de *L. pifanoi*. Ses caractères sont les suivants

- il s'agit de lésions non ulcératives mais prolifératives (ressemblant à la lèpre lépromateuse);
- on note histologiquement la présence de nombreux macrophages vacuolés (cellules spumeuses), bourrés d'amastigotes;
- il n'y a pas de disséminations viscérales;
- l'intradermo réaction à la leishmanine est négative;
- elle est réfractaire à tout traitement;
- elle évolue inexorablement vers un envahissement de toute la surface cutanée (sauf la plante des pieds et la paume des mains).

• DIAGNOSTIC

Le diagnostic se fait par examen microscopique (empreinte ou frottis) du produit de ponction ou de biopsie du pourtour des lésions. La culture est facile, les formes promastigotes apparaissant en 20 à 30 jours à 26°C.

L'inoculation aux animaux de laboratoire donne des ulcérations aux extrémités (coussinets plantaires et museau chez le hamster).

Les tests sérologiques (immunofluorescence indirecte, précipitation en gel), à l'aide d'antigènes spécifiques sont en général positifs.

Le test à la leishmanine n'est positif que dans 50 p.100 des cas et négatif dans les cas de leishmaniose cutanée diffuse.

Tableau 11-5

Le complexe *Leishmania (L.) mexicana*

Espèces	Géographie	Hôtes vertébrés	Vecteurs
<i>L. mexicana</i>	Amérique centrale (zones forestières)	Homme Rongeurs	<i>L. olmeca</i>
<i>L. pifanoi</i>	Venezuela	Homme	?
<i>L. amazonensis</i>	Forêt amazonienne Ile de la Trinité	Homme Rongeurs forestiers, marsupiaux	?

• TRAITEMENT

Les antimoniés seront administrés localement en cas de lésion unique et par voie générale en cas de lésions diffuses.

La chaleur (par irradiation infra-rouge ou par bains chauds) ralentirait l'évolution des lésions.

La leishmaniose cutanée diffuse répond mal aux traitements.

Le complexe *Leishmania (V.) brasiliensis*

Parasites intracellulaires des macrophages de la peau et des muqueuses, causant l'espundia (leishmaniose muco-cutanée), le pian-bois (lésions cutanées disséminées ou récidivantes) ou l'uta (lésion cutanée simple à guérison spontanée) (tableau 11-6).

Tableau 11-6

Le complexe *Leishmania (V.) brasiliensis*

Espèces	Géographie	Hôtes vertébrés	Vecteurs
<i>L. brasiliensis</i>	Am. centrale: Belize, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Panama. Régions forestières de l'Amérique du sud	Homme <u>Dans les zones urbanisées:</u> chien, cheval, âne; <u>Forêt:</u> réservoir inconnu	<i>Psychodopygus wellcomei</i>
<i>L. peruviana</i>	Hautes vallées, du Pérou au nord de l'Argentine	Homme, chien; pas de réservoir sylatique	<i>Lutzomyia verrucarum</i> <i>L. peruensis</i>
<i>L. guyanensis</i>	Brésil, Honduras, Guyane française, Guyane, Surinam	Homme, <i>Didelphis marsupialis</i> Edentés arboricoles: <i>Choloepus</i> , <i>Tamandua</i> (paresseux)	<i>Lutzomyia umbratilis</i>
<i>L. panamensis</i>	Costa Rica, Honduras, Nicaragua, Panama, Colombie, Equateur (région côtière)	Homme Edentés arboricoles Cheval, chien, rongeurs Marsupiaux, primates	<i>Lutzomyia</i> ???

Remarques

L. peruviana: le parasite a pratiquement été éradiqué depuis l'introduction des insecticides dans les habitations, vu l'absence de réservoir sylvatique.

L. guyanensis: le réservoir forestier est le paresseux, mais l'opossum (*Didelphis marsupialis*) se charge d'héberger le parasite autour des endroits habités et dans la forêt secondaire.

- POUVOIR PATHOGÈNE

La lésion primaire de *L. brasiliensis* est une ulcération unique survenant à l'endroit de la piqure. Des récurrences peuvent survenir (parfois plusieurs années plus tard) de même que des métastases siégeant le plus souvent au niveau de la face. Ces lésions prennent une extension souvent considérable. Elles peuvent être ulcérales ou non. Ulcérales, elles aboutissent à une destruction plus ou moins complète des lèvres, du nez, du carrefour naso-pharyngé. Le patient peut mourir de surinfections, de troubles graves de la déglutition et de la respiration. C'est cette situation que décrit le terme "espundia." Les lésions non ulcérales sont des polypes et des granulomes, accompagnés d'œdème et de fibrose, provoquant des obstructions des voies respiratoires supérieures et des déformations du faciès (profil de tapir).

L. peruviana est l'agent causal de l'Uta, constitué de plusieurs lésions primaires, véritables ulcérations évoluant spontanément vers la guérison sans séquelles. On a prétendu qu'il s'agissait de *L. tropica* importé de l'Ancien Monde mais la ressemblance biochimique avec *L. brasiliensis* est évidente et cette hypothèse doit donc être rejetée.

L. guyanensis provoque le pian-bois, consistant en lésions ulcérales initiales multiples avec dissémination le long des trajets lymphatiques. Elles peuvent évoluer vers la formation d'excroissances kératinisées surélevées (jusqu'à 1 cm au dessus du plan de la peau avoisinante).

L. panamensis cause un ulcère unique, guérissant spontanément comme la lésion primaire de *L. brasiliensis* ; il n'y a jamais de métastases ni de récurrence et donc pas d'espundia. Des adénopathies de drainage sont observées, à partir desquelles il est possible d'isoler le parasite responsable. La guérison spontanée est moins régulière que pour *L. mexicana*.

- DIAGNOSTIC

Pour l'examen microscopique, se référer aux méthodes décrites pour l'ensemble des leishmanioses cutanées de l'Ancien Monde. Dans les frottis colorés au Giemsa, les parasites sont très rares.

En culture, la croissance des représentants du groupe *L. brasiliensis* est difficile.

L'inoculation au hamster entraîne l'apparition d'une ulcération unique à l'endroit de l'inoculation; pas de métastase à distance.

L'immunofluorescence indirecte et la précipitation en gel, l'intradermo-réaction à la leishmanine sont utiles au diagnostic.

- TRAITEMENT

Dans le cas de *L. guyanensis*, la lésion cutanée nodulaire sera traitée aux RX mous ou enlevée chirurgicalement.

S'il existe des extensions lymphatiques, on devra recourir aux antimoniés par voie générale (10 à 20 mg/kg/jour) jusqu'à guérison.

L'injection unique de pentamidine est utilisée en Guyane.

A part la suggestion de traiter de manière intensive la lésion primaire (banale) de *L. brasiliensis* à l'aide d'antimoniés par voie générale pendant 4 semaines, il n'y a pas de traitement réellement efficace de l'espundia; la chirurgie reconstructive serait souvent nécessaire dans des endroits où les soins médicaux rudimentaires sont seuls assurés.

8. Méthodes de lutte et contrôle

8.1 Réservoir de parasites

Leishmanioses anthroponosiques

La surveillance passive avec notification et le dépistage actif avec identification du parasite devront être instituées.

Pour la leishmaniose viscérale, le diagnostic pré-somptif des cas sera basé sur les symptômes cliniques; le sérodiagnostic pourra être appliqué sur la population à risque.

Pour la leishmaniose cutanée, on recherchera les cicatrices ou on pratiquera le test cutané à la leishmanine.

L'identification des parasites est nécessaire pour le choix des mesures de lutte et la prescription du traitement. Les techniques utilisées sont diverses: isoenzymes, anticorps monoclonaux, sondes nucléiques avec ou sans PCR. Ces dernières ont été employées avec succès dans les zones rurales au Pérou.

Les cas devront être traités. Les schémas thérapeutiques sont différents d'une leishmaniose à l'autre (voir paragraphes spécifiques).

Remarque

Il faut assurer la fiabilité du diagnostic! La population apprendra à reconnaître les premiers symptômes et le principe de la gratuité des médicaments doit être institué.

Leishmanioses zoonosiques

Les chiens errants seront abattus; chez les autres, la recherche de signes cliniques ou la sérologie seront utilisées. Des mesures somme toute superposables à celles du contrôle de la rage.

Les rongeurs seront repérés ainsi que leurs terriers. La destruction des terriers par un labourage profond dans les champs cultivés ou les appâts empoisonnés sont les méthodes les plus utilisées.

8.2 Vecteurs

Pour les mesures proposées, consulter le chapitre 20.

8.3 Vaccins

De bons résultats, supérieurs dans certains cas au traitement médicamenteux, ont été obtenus par l'injection de leishmanies tuées mélangées à du BCG (vaccin antituberculeux).

De nombreux autres vaccins sont à l'étude. Il s'agit surtout de molécules antigéniques purifiées, extraites du parasite. Deux molécules ont récemment attiré l'attention: la glycoprotéine majeure de surface (GP 63), dont la séquence génomique identifiée a été transférée chez *E. coli* pour production d'antigène recombinant et des lipophosphoglycannes (LPG) dont l'action aurait lieu chez le vecteur.

9. Synthèse Pouvoir pathogène et répartition géographique des espèces

Leishmaniose	Espèces de l'Ancien Monde	Espèces du Nouveau Monde	Clinique	Réservoir
Viscérale	<i>L. donovani</i>		Kala azar	homme
	<i>L. infantum</i>		Kala azar	chien
		<i>L. chagasi</i>	Kala azar	chien, renard
Cutanée simple	<i>L. tropica</i>		Lésion sèche (Bouton d'orient)	homme
	<i>L. major</i>		lésion humide	rongeurs
		<i>L. mexicana</i>	ulcère du «chiclero»	rongeurs, marsupiaux
		<i>L. peruviana</i>	uta	chien
		<i>L. guyanensis</i>	pian-bois	fourmilier, paresseux
		<i>L. panamensis</i>	ulcère unique	paresseux, singes
Cutanée diffuse (si immunité déficiente)	<i>L. aethiopica</i>		diffuse et grave	Daman
		<i>L. amazonensis</i>	id.	homme
		<i>L. pifanoi</i>	id.	rongeurs
Cutanéo-muqueuse		<i>L. brasiliensis</i>	espundia	rongeurs, chien

Tableau 11-7

Leishmania tableau comparatif des espèces

BIBLIOGRAPHIE

- GARNHAM PCC. (1971) The genus *Leishmania*. *Bulletin of the World Health Organization*, **44**, 477-489.
- BRAY RS. (1972) Leishmaniasis in the Old World. *British Medical Bulletin*, **28**, 39-43.
- LAINSON R AND SHAW JJ. (1972) Leishmaniasis of the New World, Taxonomic problems, *British Medical Bulletin*, **28**, 44-48.
- LE RAY D, AFCHAIN D, JADIN J *et al.* (1973) Diagnostic immunoélectrophorétique de la leishmaniose viscérale à l'aide d'un extrait antigénique hydrosoluble de *Leishmania donovani*. Résultats préliminaires, *Annales de la Société belge de Médecine tropicale*, **53**, 31-41.
- WILLIAMS P, DE VASCONCELLOS COELHO M. (1978) Taxonomy and transmission of *Leishmania*. In WHR LUMSDEN, R MULLER, JR BAKER (Eds), *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **16**, 1-42.
- MARINKELLE CJ. (1980) The control of leishmaniasis, *Bulletin of the World Health Organisation*, **58**, 807-818.
- DEDET JP, DEROUIN F, HUBERT B. (1982) Ecologie d'un foyer de Leishmaniose cutanée dans la région de Thiès (Sénégal, Afrique de l'Ouest), *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*, **75**, 561-630.
- MOLYNEUX DH, ASHFORD RW. (1983) *The Biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of Man and Domestic Animals*, London, Taylor and Francis.
- ASHFORD RW, BETTINI S. (1987) Ecology and epidemiology (Old World), In: W PETERS, R KILLICK-KENDRICK (Eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, London, Academic Press, **1**, 365-424.
- SHAW JJ, LAINSON FRS. (1987) Ecology and epidemiology (New World), In: W PETERS, R KILLICK-KENDRICK (Eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, London, Academic Press, **1**, 291-363.
- RIDLEY DS. (1987) Pathology, In: W PETERS, R KILLICK-KENDRICK (Eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, London, Academic Press, **2**, 665-701.
- MANSON-BAHR PC. (1987) Diagnosis, In: W PETERS, R KILLICK-KENDRICK (Eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, London, Academic Press, **2**, 703-729.
- Organisation Mondiale de la Santé (1988) *Directives applicables à la lutte contre la leishmaniose aux niveaux régional et sous-régional*, Document WHO/Leish/88, 25
- GRIMALDI G, TESH JR RB, MCMAHON-PRATT D. (1989) A review of the geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World, *American Journal of tropical medicine and hygiene*, **41**, 687-725.
- Organisation Mondiale de la Santé (1990) *Lutte contre les leishmanioses*, Série de Rapports Techniques, **793**
- LOCKSLEY RM, SCOTT PH. (1991) Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function, *Parasitology Today*, **7**, A58-A61.
- FENTON HALL B, JOINER KA. (1991) Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences, *Parasitology Today*, **7**, A22-A27.
- LIEW FY, O'DONNELL CA. (1993) Immunology of leishmaniasis, In JR BAKER, R MULLER (Eds), *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **32**, 162-259.
- MEDINA-ACOSTA E, BEVERLEY SM AND RUSSEL DG. (1993) Evolution and expression of the *Leishmania* surface proteinase (gp63) gene locus, *Infectious agents and disease*, **2**, 25-34.
- DESCOTEAUX A, TURCO SJ. (1993) The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C, *Parasitology Today*, **9**, 468-471.
- ALVAR J. (1994) Leishmaniasis and AIDS co-infection: the spanish example, *Parasitology Today*, **10**, 160-163.

Les caractères du genre *Plasmodium*

Introduction

L'embranchement des Sporozoa est appelé par Levine "Apicomplexa" pour évoquer la présence, constante chez les stades invasifs du cycle de ces parasites (responsables de la pénétration dans une cellule de l'hôte), d'un "complexe apical" comprenant l'anneau polaire, les micronèmes, les microsphères et les rhoptries. Cet embranchement comprend les plasmodiums, les coccidies monoxènes et hétéroxènes ainsi que les piroplasmes.

Le plasmodium est un parasite intracellulaire, amiboïde, produisant du pigment (provenant de la dégradation de l'hémoglobine). Il présente, au cours du cycle évolutif, une alternance de reproduction asexuée (schizogonie) chez l'hôte vertébré et de reproduction sexuée (sporogonie) chez l'hôte invertébré. On dénombre 146 espèces différentes capables d'infecter divers hôtes: homme, singes, oiseaux, rongeurs, reptiles, amphibiens, chauve-souris, ongulés (antilopes, etc.). Quatre espèces se retrouvent dans le sang de l'homme: *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*.

La spécificité d'hôte est très stricte pour les plasmodiums de mammifères et en particulier pour les plas-

modiums humains qui ne peuvent, dans la nature, se développer que chez l'homme.

1. Taxinomie

(selon Levine 1988, amendée par Cox 1991)

1.1 Embranchement, classes, ordres

Le groupe des Sporozoaires (ou Apicomplexa) comprend trois classes.

Il y a trois ordres dans l'embranchement, un dans chaque classe: Haemosporida Danilevski 1885, Eimeriida et Piroplasmida.

Les caractères de l'ordre des Haemosporida qui contient les plasmodiums sont les suivants: micro et macrogamétocytes se développant indépendamment; pas de conoïde; microgamétocyte produisant 8 microgamètes; zygote mobile (ookinète); sporozoïtes nus; endodyogénie absente; hétéroxène; schizogonie (mérogonie) chez le vertébré; pigment (hémozoïne) visible au microscope optique; sporogonie chez l'invertébré; transmission par insectes hématophages.

Introduction

1. Taxinomie

- 1.1 Embranchement, classes, ordres
- 1.2 Famille
- 1.3 Genres
- 1.4 Sous-genres et espèces

2. Cycle évolutif des plasmodiums humains

- 2.1 Description du cycle
- 2.2 Dénomination des stades et principaux caractères

3. Morphologie

- 3.1 Stade de la schizogonie pré-érythrocytaire
- 3.2 Le mérozoïte stade invasif
- 3.3 Stades de la schizogonie sanguine
- 3.4 Stades sporogoniques

4. Caractères biologiques

- 4.1 Pénétration dans le globule rouge
- 4.2 Le plasmodium dans le globule rouge
- 4.3 Le plasmodium chez l'anophèle
- 4.4 La schizogonie pré-érythrocytaire

Bibliographie

FIGURES

- 12-1 Schéma du cycle des plasmodiums
- 12-2 Schizontes hépatiques
- 12-3 Ultrastructure des stades invasifs de *Plasmodium*
- 12-4 Stades de la schizogonie érythrocytaire
- 12-5 Stades de la sporogonie
- 12-6 Etapes de la pénétration du mérozoïte dans le globule rouge
- 12-7 Le plasmodium dans le globule rouge

EMBRANCHEMENT : SPOROZOA (APICOMPLEXA)

CLASSES	ORDRES	Familles	Genres
HAEMOSPORIDEA	HAEMOSPORIDA	Plasmodiidae	<i>Plasmodium</i>
COCCIDEA	EIMERIIDA	Eimeriidae	<i>Eimeria</i>
		Cryptosporiidae	<i>Cryptosporidium</i>
		Sarcocystiidae	<i>Sarcocystis</i> <i>Toxoplasma</i>
PIROPLASMIDEA	PIROPLASMIDA	Babesiidae Theileriidae	<i>Babesia</i> <i>Theileria</i>

1.2 Famille

L'ordre des Haemosporida comporte une seule famille: les Plasmodiidae Mesnil 1903. Les caractères de la famille sont les mêmes que ceux de l'ordre: l'hôte invertébré est un moustique; il y a une schizogonie dans le sang; les gamétocytes mûrs sont dans les érythrocytes et au cours de la maturation dans l'érythrocyte, il y a apparition de pigment malarien.

1.3 Genres

Plusieurs genres, *Plasmodium* Marchiafava et Celli 1885, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon*, *Hepatocystis* sont reconnus chez les Plasmodiidae.

Le genre *Plasmodium* possède les caractéristiques suivantes: les gamétocytes mâle et femelle sont de même taille et situés dans les érythrocytes; les mâles produisent un nombre limité (8) de microgamètes; le résultat de la fécondation est un ookinète mobile qui se transforme en oocyste dont la taille augmente au cours de la maturation et qui donne naissance à de très nombreux sporozoïtes; la schizogonie

(mérogonie) a un développement synchrone chez l'hôte vertébré et aboutit à la formation de schizontes présents dans les érythrocytes et dans certains autres tissus.

1.4 Sous-genres et espèces

Les espèces du genre *Plasmodium* sont regroupées en 9 sous-genres dont 3 sous-genres parasites des mammifères, 4 sous-genres parasites des oiseaux et 2 sous-genres parasites des sauriens (lézards).

L'initiale majuscule du nom du sous-genre se met entre parenthèses à la suite du nom du genre mais ce niveau de classification est peu utilisé et n'est pas mentionné dans la pratique.

Les trois sous-genres parasites des mammifères sont *Plasmodium* (P.), *Vinckeia* (V.) et *Laverania* (L.). Leurs caractères sont décrits ci-dessous.

***Plasmodium*:** schizontes érythrocytaires grands, gamétocytes arrondis, parasites des primates. Les espèces infectant l'homme sont *P. (P.) vivax* Grassi et Feletti 1890, *P. (P.) ovale* Stephens 1922 et *P. (P.) malariae* Feletti et Grassi 1889.

***Vinckeia*:** schizontes érythrocytaires petits, gamétocytes arrondis, parasites des antilopes, rongeurs et autres mammifères à l'exclusion des primates. L'espèce *P. (V.) berghei* Vincke et Lips 1948 qui infecte les rongeurs constitue un modèle de laboratoire très utilisé. Ce plasmodium peut être transmis par des anophèles élevés en insectarium (*A. stephensi*).

***Laverania*:** schizontes érythrocytaires grands, gamétocytes allongés (falciformes), parasites des primates. L'espèce *P. (L.) falciparum* Welch 1897 infecte l'homme.

2. Cycle évolutif des plasmodiums humains

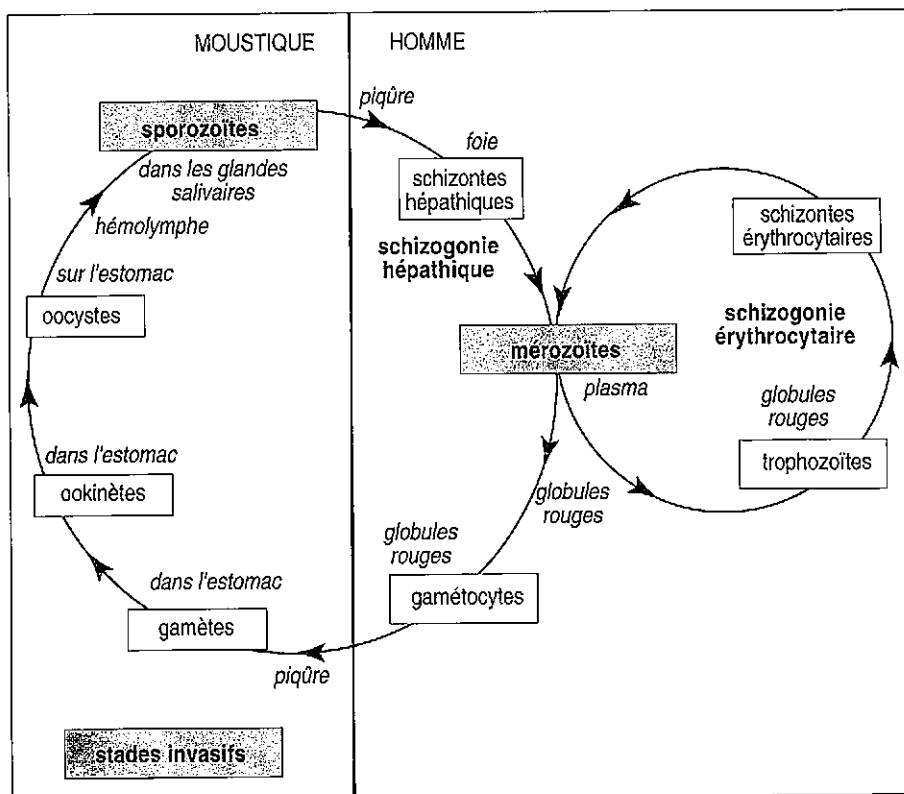
2.1 Description du cycle

Schéma général (figure 12-1)

Après l'inoculation à l'homme par l'anophèle, le plasmodium envahit successivement, chez l'hôte vertébré, deux types de cellules: d'abord les hépatocytes puis les érythrocytes. Il s'y multiplie par schizogonie (divisions nucléaires multiples suivies du morcellement du cytoplasme). Ce sont les deux phases de reproduction asexuée: la schizogonie hépatique (ou pré-érythrocytaire) et la schizogonie érythrocytaire.

Figure 12-1

Schéma du cycle des plasmodiums



Les stades "invasifs", responsables de la reconnaissance de la cellule hôte et de la pénétration, étapes essentielles du cycle chez le vertébré, sont le sporozoïte et le mérozoïte.

Les sporozoïtes sont formés chez le moustique à l'issue de la maturation de l'oocyste, résultat de la reproduction sexuée. Injectés à l'homme lors de la piqûre, ils constituent le stade infectant. Ils disparaissent du sang en moins d'une heure et ne peuvent pénétrer que dans les hépatocytes (cellules du foie).

Les mérozoïtes sont formés à l'issue des schizogonies (hépatique unique ou érythrocytaires multiples). Ils ne peuvent pénétrer que dans un globule rouge (érythrocyte).

Schizogonie (mérogonie) pré-érythrocytaire

Dans les hépatocytes, la présence et la multiplication du parasite passent inaperçues: le patient est en période d'incubation. La cellule hépatique parasitée par un schizonte (provenant du sporozoïte) s'hypertrophie considérablement (30 à 40 µm de diamètre) et sera détruite par le développement du parasite mais les phénomènes inflammatoires restent très discrets. La schizogonie hépatique est asymptomatique.

La maturation de ce schizonte dure une à deux semaines et produit de nombreux (jusqu'à 20.000) mérozoïtes, stade parasitaire qui envahit le sang. La schizogonie hépatique est unique dans le cycle, les cellules hépatiques ne pouvant être infectées que par des sporozoïtes.

Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, une schizogonie hépatique retardée (hypnozoïtes) peut amener la libération dans le sang de mérozoïtes jusqu'à 18 mois après la piqûre du moustique, causant les rechutes tardives de malaria. Dans les infections à *P. falciparum* et à *P. malariae*, les hypnozoïtes n'existent pas.

Schizogonie (mérogonie) érythrocytaire

Dans les érythrocytes, la pénétration d'un mérozoïte et sa maturation en schizonte qui prend 48 ou 72 heures (d'après l'espèce) conduit à la destruction du globule rouge hôte et à la libération de 8 à 32 nouveaux mérozoïtes. Les étapes de la maturation portent des noms: anneau, trophozoïte, forme amiboïde (accroissement de la taille du cytoplasme), schizonte immature, schizonte mûr (série de divisions nucléaires). Cette évolution suppose une synthèse d'ADN importante et rapide, surtout dans le dernier quart de la période. Chaque mérozoïte libéré par le schizonte mûr

recommence un cycle de multiplication dans un autre globule rouge: la parasitémie s'élève, le sujet devient fébrile, c'est l'accès de paludisme.

Sporogonie (figure 12-5)

A partir du sang, le parasite passe chez le vecteur (moustique du genre anophèle dont seule la femelle est hémaphophage) sous forme d'un stade sexué provenant aussi d'un mérozoïte, apparemment semblable aux autres mais ayant subi dans le globule rouge une maturation d'une dizaine de jours, accompagnée d'une différenciation sexuée (gamétocytes mâles et femelles).

L'anophèle, au cours d'un repas sanguin pris chez un sujet infecté, ingère donc des gamétocytes mâles (microgamétocytes) et femelles (macrogamétocytes). Dans son estomac, les gamètes mâles se forment à partir du microgamétocyte au cours d'un processus d'exflagellation: il s'agit d'une division rapide du noyau en huit (octoploïdie) et de la protrusion, à la périphérie de la cellule, de huit fins filaments cytoplasmiques pourvus de microfibrilles (synthèse de tubuline) et dans chacun desquels un noyau s'engage. Ces fins filaments cytoplasmiques se détachent et nagent librement dans le contenu stomacal du moustique: ce sont les microgamètes ou gamètes mâles. Ce processus est explosif, il est complété en 10 minutes. Les macrogamétocytes (femelles) ne subissent aucun changement mais ils se débarrassent de l'enveloppe érythrocytaire et deviennent réceptifs. Ils exercent un pouvoir d'attraction sur les microgamètes. Leur rencontre et la fusion des noyaux d'un microgamète et d'un macrogamète réalise la fécondation.

De cette rencontre naît un organisme mobile, diploïde, appelé "ookinète", c'est-à-dire "œuf mobile". Les zygotes (œufs fécondés) ainsi formés sortent activement de l'estomac, échappant ainsi au processus de digestion et deviennent des oocystes. La réalisation de ces phénomènes ne prend que 24 heures.

A l'intérieur de l'oocyste (situé sur la paroi externe de l'estomac), les cellules parasitaires se multiplient activement provoquant un accroissement de taille: c'est la maturation de l'oocyste. La première division est réductionnelle, cette méiose donnant d'emblée des cellules haploïdes pour tout le reste du cycle. Après plusieurs jours de maturation (la durée dépend de la température ambiante), chaque oocyste libère quelques centaines de sporozoïtes autour de l'estomac du moustique. Ceux-ci constituent, comme on l'a vu, le stade infectant pour l'homme. Ils vont migrer et s'accumuler dans les cellules des glandes salivaires, attendant l'occasion d'être injectés avec la

salive, lors d'une piqûre, à un nouvel hôte vertébré. Un nouveau sujet s'infecte, l'infection débutant par une schizogonie hépatique.

Les sporozoïtes sont des parasites hybrides résultant de la fécondation. Le gamète femelle et le gamète mâle peuvent provenir de lignées parasitaires différentes coexistant chez un sujet parasité en zone d'endémie et reprises par un moustique lors du repas sanguin. Ce fait est important pour la compréhension de la diversité des lignées parasitaires à l'intérieur d'une espèce comme *P. falciparum*.

2.2 Dénomination des stades et principaux caractères (tableau 12-1)

Tableau 12-1

DESIGNATION	LOCALISATION		ACTIVITÉ
	HÔTE	ORGANE OU CELLULE	
Sporozoïte	Anophèle	Cellules des glandes salivaires;	Reconnaissance hépatocyte; adhérence et pénétration
	Homme	Sang	
Schizonte exoérythrocytaire	Homme	Foie hépatocyte	Multiplication: synthèse ADN et divisions nucléaires
Mérozoïte	Homme	Circulation	Reconnaissance érythrocyte; adhérence et pénétration
Anneau (trophozoïte jeune)	Homme	Erythrocyte	Accroissement de taille
Forme amiboïde	Homme	Erythrocyte	Accroissement de taille; pinocytose du cytoplasme de l'érythrocyte
Schizonte jeune (érythrocytaire)	Homme	Erythrocyte	Accroissement de taille; divisions nucléaires
Schizonte mûr	Homme	Erythrocyte	Eclatement et libération des mérozoïtes
Gamétocytes (mâle et femelle)	Homme;	Erythrocyte;	Accroissement de taille
	Anophèle	Estomac	Exflagellation; fécondation
Ookinète	Anophèle	Estomac	Mobile, sort de l'estomac
Oocyste jeune	Anophèle	Surface externe de l'estomac	Divisions cellulaires; accroissement de taille
Oocyste mûr	Anophèle	Surface externe de l'estomac	Eclatement; libération des sporozoïtes
Sporozoïtes	Anophèle	Hémocèle; glandes salivaires	Migration vers les glandes salivaires

3. Morphologie

3.1 Stade de la schizogonie pré-érythrocytaire

A leur maturité, les schizontes hépatiques ("corps bleus") atteignent 35 à 50 µm de diamètre et possèdent 15.000 à 20.000 noyaux. Sur des coupes de tissu hépatique colorées au Giemsa, leur forme est ronde, ovale ou polylobée, les noyaux sont petits, arrondis ou anguleux, le cytoplasme est bleu.

Avant leur maturité, les schizontes sont difficiles à repérer dans le tissu hépatique car leur cellule hôte n'est pas encore augmentée de volume et ils sont forcément très peu nombreux par rapport au nombre d'hépatocytes (figure 12-2).

3.2 Le mérozoïte, stade invasif

Petit parasite extracellulaire ovale de 2 à 3 µm de diamètre, stade fugace, le mérozoïte possède dans son cytoplasme, à un des pôles de l'ovale, une structure spécialisée dans la pénétration composée d'un anneau polaire, de micronèmes et de rhoptries. Le mérozoïte n'est pas vu, ni recherché à l'examen microscopique d'un frottis (figure 12-3).

3.3 Stades de la schizogonie sanguine

Ces stades, intra-érythrocytaires, sont responsables de l'accès de paludisme (poussée de fièvre qui coïncide avec la libération des mérozoïtes) et permettent au microscopiste de poser le diagnostic.

Rappelons qu'avec la coloration de Giemsa, le cytoplasme des parasites est coloré en bleu tandis que les noyaux sont colorés en rouge. Il est inutile de vouloir examiner ici des préparations à frais, les parasites étant intracellulaires et pratiquement immobiles. Et si Laveran a découvert *P. falciparum* dans des préparations non colorées du sang d'un malade, c'est grâce aux mouvements du seul stade mobile dans une préparation de sang, le gamétocyte mâle en exflagellation.

Les principaux caractères distinctifs des formes sanguines sont les suivants:

- taille de l'anneau (trophozoïte jeune);
- contours de la forme amiboïde (trophozoïte âgé);
- nombre et disposition des noyaux dans le schizonte mûr;
- forme des gamétocytes;
- abondance, localisation et couleur du pigment;
- altérations du globule parasité (modifications de la taille, de la forme, de la colorabilité, présence de granulations).

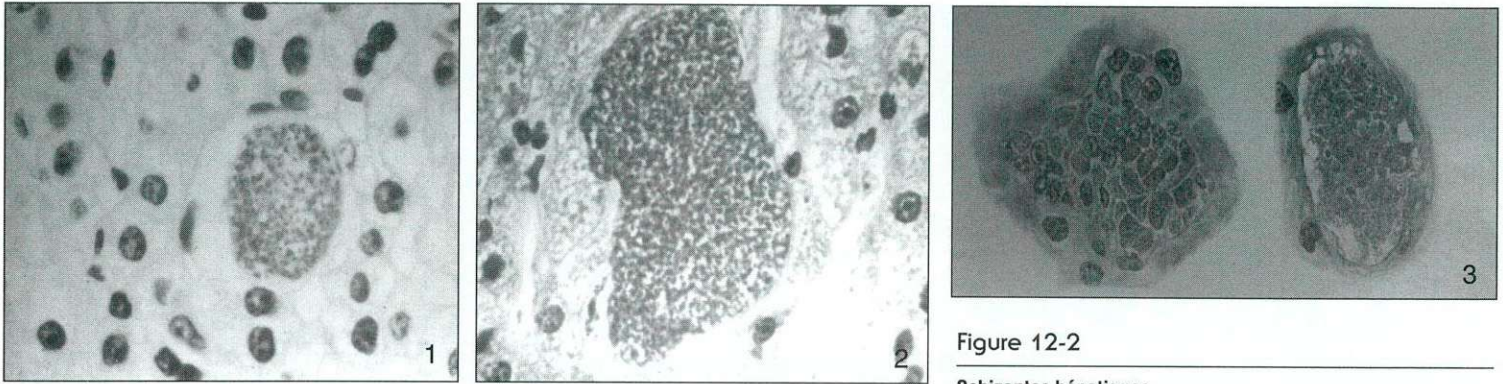


Figure 12-2

Schizontes hépatiques

1. Schizonte immature
2. Schizonte mûr de *P. vivax* montrant le noyau de l'hépatocyte hôte
3. Dessin de schizontes en voie de maturation, montrant la disposition variable des noyaux

A l'aide de ces caractères, il est possible de distinguer l'une de l'autre les différentes espèces de *Plasmodium* (humains ou autres) (figure 12-4).

3.4 Stades sporogoniques

Par dissection on pourra repérer, chez le moustique, les différents stades de la sporogonie.

Ookinète

Dans l'estomac, les ookinètes résultant de la fécondation sont présents de 12 à 24 heures après le repas infectant, sous l'aspect de vermicules de 10 µm de longueur sur 3-4 µm de largeur, pointus aux deux extrémités, avec noyau central, cytoplasme parsemé de grains de pigment accumulés en plus grande quantité à une extrémité du parasite. Ce stade est mobile. Il adhère aux cellules de la paroi puis, par des mouvements de reptation, sort activement de l'estomac du moustique (figure 12-5).

Oocyste

Les oocystes à des stades différents d'évolution sont visibles autour de l'estomac, appliqués sur la face externe de sa paroi. Les oocystes jeunes ont 8 à 10 µm de diamètre, ils sont sphériques et n'ont pas de structure interne, à part les grains de pigment hérités du gamétoocyte femelle, arrangés en figure (lignes parallèles, lignes se croisant, gerbes de lignes divergentes). Les oocystes mûrs ont 50 à 80 µm de diamètre. Ils sont remplis de petites cellules allongées, rangées en faisceaux ou en roue de chariot, chacune avec son noyau propre et son cytoplasme: ce sont les sporozoïtes. Libérés par les oocystes mûrs, ils flottent dans le liquide dans lequel l'estomac a été disséqué (figure 12-5).

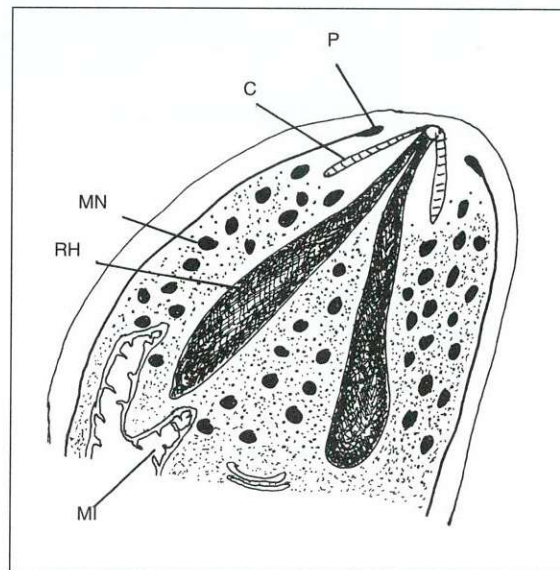


Figure 12-3

Ultrastructure des stades invasifs de Plasmodium

Pôle apical du mérozoïte et du sporozoïte montrant l'appareil de pénétration

- P anneau polaire
C conoïde
MN micronèmes
RH rhoptries
MI mitochondrie

Ces structures sont communes aux "Api-complexa" qui comprennent aussi les coccidies.

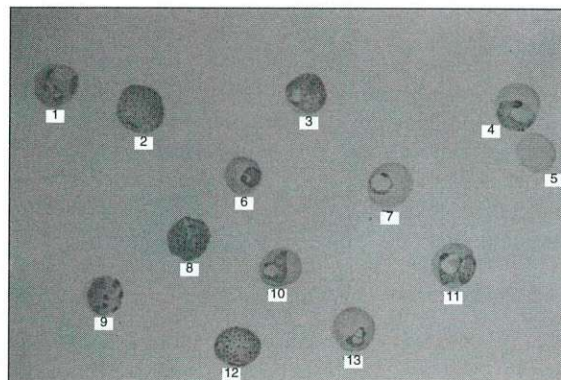


Figure 12-4

Stades de la schizogonie érythrocytaire

- 4, 6, 7, 13 trophozoïtes (anneaux)
10. schizonte jeune
1, 8. schizontes en maturation
2, 3, 9, 12. gamétocytes (pigment disséminé dans le cytoplasme)
11. infection double: un gamétoocyte et un trophozoïte (vacuolé)
5. érythrocyte non infecté

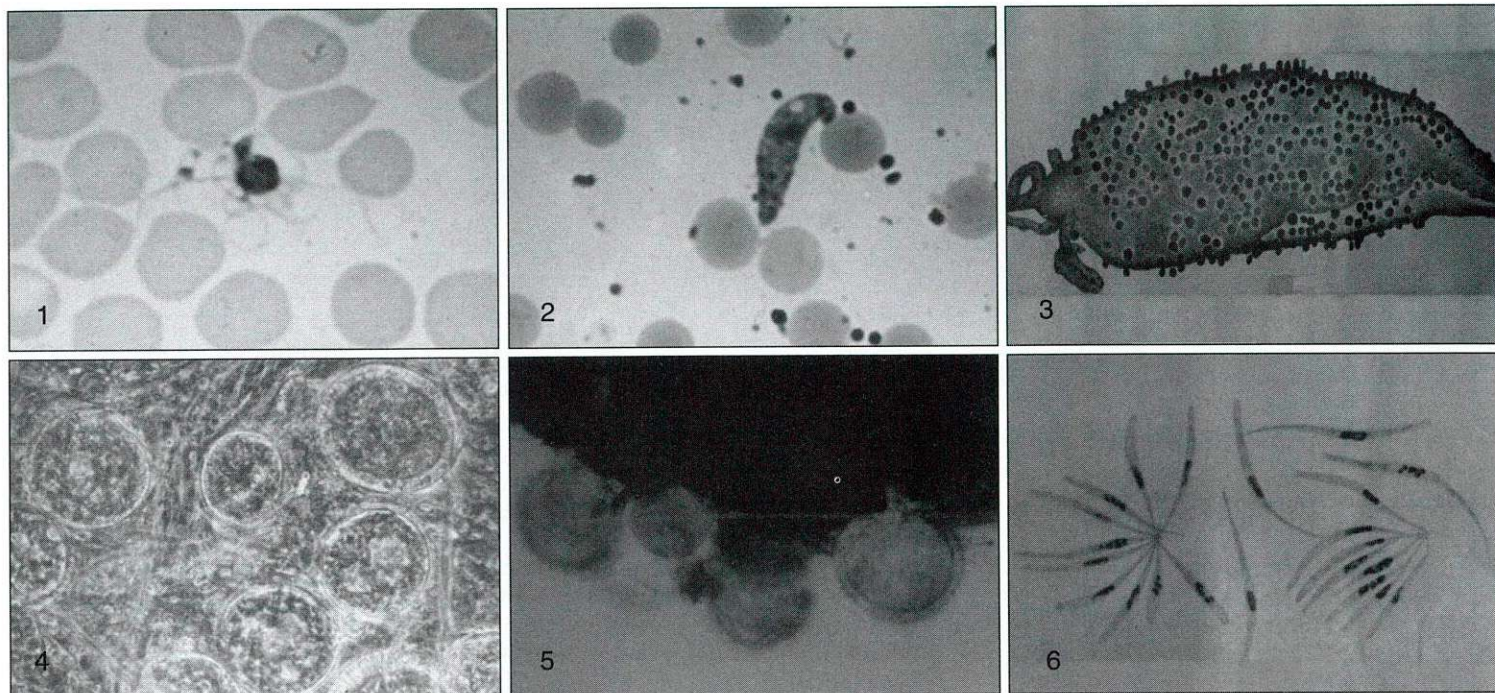


Figure 12-5

Stades de la sporogonie

1. gamétocte mâle en exflagellation (formation et libération de huit gamètes mâles, mobiles)
2. ookinète
3. dessins d'un estomac disséqué avec oocystes
4. photo d'oocystes proches de la maturité
5. photo d'oocystes (profil d'estomac)
6. sporozoïtes

Sporozoïte, stade invasif

Il est doué d'une mobilité paresseuse, se courbant dans un sens puis dans l'autre. Il a 11 à 14 µm de long sur 0,5 à 1 µm d'épaisseur. Son noyau est central et le cytoplasme est réduit à un fin filament. Tout comme le mérozoïte, il est pourvu de micronèmes, rhoptries et anneau polaire (figures 12-3, 12-5).

4. Caractères biologiques**4.1 Pénétration dans le globule rouge**

Les mérozoïtes, libres dans le plasma pendant quelques instants, doivent pénétrer dans un érythrocyte. Plusieurs antigènes de ce stade jouent un rôle important dans la pénétration: trois protéines de surface ("Merozoïte Surface Antigens", MSA I, II et III), plusieurs protéines des rhoptries et une protéine des micronèmes transférée, lors de la pénétration, à la surface de l'érythrocyte infecté ("Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen", RESA). Ce processus peut être décomposé en deux phases (figure 12-6).

Adhérence

La présence, sur la surface du globule rouge, de récepteurs spécifiques est indispensable pour que le

mérozoïte puisse reconnaître sa cellule hôte. Ces récepteurs sont, dans le cas de *P. vivax*, des antigènes de groupes sanguins (glycoprotéines Duffy) et pour *P. falciparum*, des glycophorines (acide sialique en particulier). Grâce à la présence de ligands, le mérozoïte adhère d'abord par une quelconque partie de sa surface, puis il s'oriente de manière à ce que son pôle antérieur, qui est porteur des organites de pénétration, arrive en contact avec la paroi globulaire. Le contenu des rhoptries est alors déversé sur la membrane externe du globule rouge, provoquant l'invagination de celle-ci. A l'endroit de la jonction, de courts filaments sont visibles, unissant la surface de l'érythrocyte, riche à cet endroit en protéines intramembranaires, et la surface du mérozoïte.

Une conséquence pratique de ces observations est que le paludisme à *P. vivax* n'existe pas en Afrique centrale et de l'Ouest: environ 85 p.100 de la population y étant Duffy A(-) B(-), leurs globules sont dépourvus de la protéine de reconnaissance nécessaire à l'attachement des mérozoïtes de *P. vivax*.

Pénétration

Le mérozoïte est aspiré par une invagination de la membrane globulaire qui forme une vacuole "parasitophore" dans l'érythrocyte. Celle-ci se referme derrière le parasite. Dans ce processus, le rôle du

cytosquelette (chaînes permettant la cohérence et l'élasticité de la membrane érythrocytaire: spectrine, actine, ankyrine) est évidemment important. Les ovalocytes, fréquents chez les Mélanésien et dont le cytosquelette est altéré, rendant la membrane externe plus rigide, sont résistants à l'invasion par les mérozoïtes de *P. falciparum*.

A l'intérieur du globule rouge parasité, la fabrication du supplément de membrane (bicouche lipidique) requis pour former la vacuole parasitophore au moment de la pénétration entraîne un besoin accru en lipides. Cette membrane est très différente de la membrane globulaire externe: pas de particules intramembranaires, pas de protéines du cytosquelette, croissance forcée accompagnant l'accroissement de taille du parasite. D'où les modifications du métabolisme des lipides dans l'infection plasmodiale.

P. ovale, *P. vivax* et *P. malariae* sont restrictifs dans le choix de leur cellule hôte. Les deux premiers ont une nette prédilection pour les réticulocytes et *P. malariae* préfère les globules rouges âgés de sorte que les parasitémies dépassent rarement 1 à 2 p.cent. *P. falciparum*, au contraire, envahit des globules rouges de tous âges et peut atteindre des parasitémies très élevées.

4.2 Le plasmodium dans le globule rouge

Formes asexuées sanguines

• SYNTHÈSE D'ADN

L'activité du parasite à l'intérieur de l'érythrocyte consiste essentiellement en la maturation rapide du stade d'anneau, qui contient 10^{-13} g d'ADN, au stade de schizonte qui en contient 20^{-12} g. Cela implique une augmentation de 20 fois. Dans cette synthèse d'ADN, la voie métabolique partant de l'acide para-aminobenzoïque et passant par l'acide folique est utilisée, d'où la sensibilité de ce stade aux sulfamidés et aux antifoliques du type pyriméthamine (inhibiteur de la dihydrofolate réductase).

Remarque

Le régime exclusivement lacté (dépourvu d'acide para-aminobenzoïque) empêche la multiplication des plasmodiums et protège l'hôte.

• PIGMENT MALARIEN ET MÉTABOLISME (figure 12-7)

Le plasmodium ingère plus de 80 p.100 de l'hémoglobine de sa cellule hôte par pinocytose et par l'action du cytostome, invagination de la membrane externe entourée de deux anneaux denses. L'invagina-

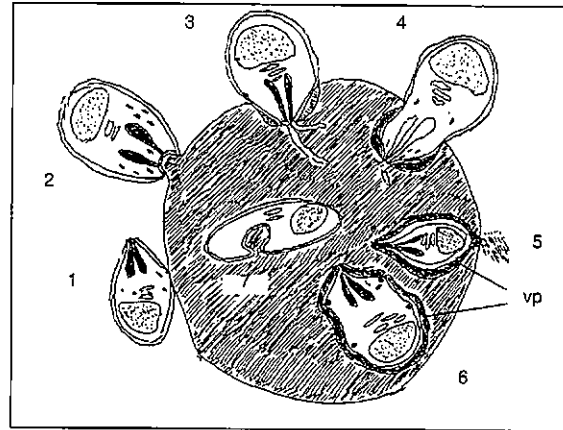


Figure 12-6

Etapes de la pénétration du mérozoïte dans le globule rouge

1. Attachement
2. Orientation du pôle apical contre l'érythrocyte
- 3, 4. Invagination de la membrane de l'érythrocyte
5. Fermeture de la vacuole parasitophore (VP)
6. Perte des organites de pénétration, mouvements amiboïdes
7. Début de la pinocytose de l'hémoglobine par le parasite

tion progressant, la fermeture au niveau de la membrane externe la transforme en vacuole alimentaire.

L'utilisation de l'hémoglobine, grâce à des protéases très spécialisées actives en milieu acide, n'est pas complète. La globine est scindée en acides aminés, utilisés au même titre que des acides aminés importés du plasma pour la synthèse protéique du plasmodium. L'hème libéré de la molécule est aussitôt oxydé en protoporphyrine ferrique toxique et inhibitrice des protéases dans le cytoplasme du parasite. Une polymérisation intervient *in situ* sous l'influence de l'hème-polymérase produisant un matériel cristallin insoluble, l'hémozoïne ou pigment malarien qui précipite dans le cytoplasme du parasite au cours de la maturation. Il est visible au microscope sous forme de grains brun-jaunâtres. Une hypothèse avancée pour l'action des médicaments du groupe quinoléine est l'inhibition de la polymérisation provoquant l'accumulation de la protoporphyrine ferrique, toxique pour le parasite.

Les hémoglobines anormales, HbF impliquée dans les thalassémies et HbS causant la drépanocytose, seraient plus difficilement utilisables par *P. falciparum* au cours de son développement érythrocytaire. La schizogonie serait perturbée et la virulence du parasite s'en trouverait diminuée.

Remarque

L'hémoglobine foetale (HbF) persiste pendant les premières semaines de la vie extra-utérine; elle contribue à protéger le nouveau-né contre les crises graves de paludisme.

Le plasmodium absorbe également des acides aminés importés du plasma à travers la membrane globulaire dont la perméabilité augmente. De plus, il est capable d'en synthétiser lui-même, à partir des élé-

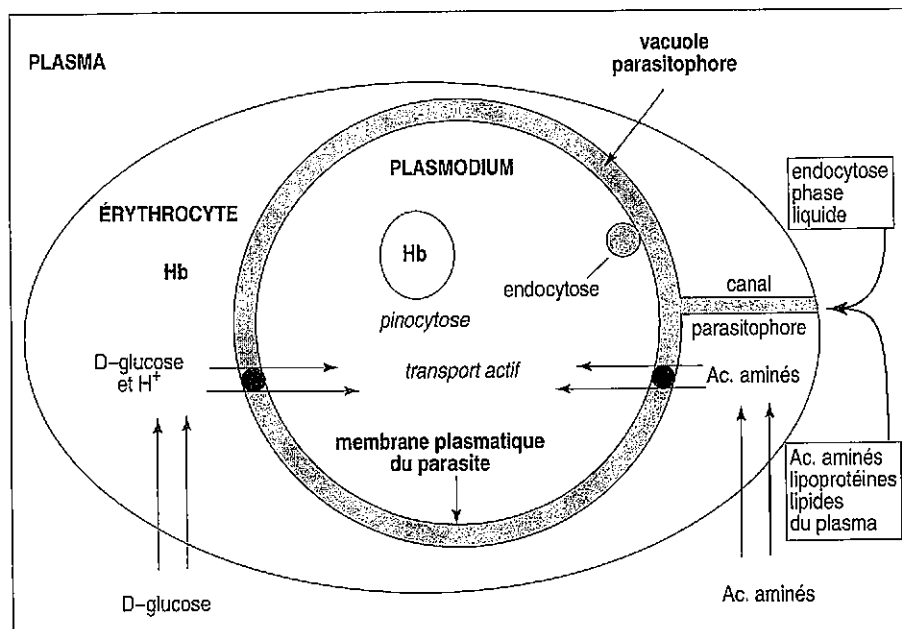


Figure 12-7

Le plasmodium dans le globule rouge

ments les plus simples, comme les atomes de carbone du CO_2 .

Remarque

Certains auteurs ont prétendu que la malnutrition protéique grave serait "protectrice", le plasmodium privé de certains métabolites essentiels étant freiné dans sa multiplication.

Le transport du glucose en provenance du plasma est accéléré au niveau, à la fois, de la membrane érythrocytaire (dont la perméabilité est par ailleurs augmentée) et de la membrane plasmatique du parasite grâce à une abondance de protéines assurant un transport actif du dextrose.

Le plasmodium fabrique une quantité importante de membranes, entourant les mitochondries, noyaux, cytotome, vacuoles alimentaires, rhoptries. La source des acides gras semble être le plasma: le globule parasité a en effet une teneur nettement augmentée en lipides.

Vu l'importance du métabolisme des lipides dans l'infection plasmodiale, des investigations sont en cours pour déterminer l'importance éventuelle de l'avitaminose A sur la gravité du paludisme. Cette vitamine liposoluble ne pourrait-elle pas jouer un rôle dans la défense contre l'infection et conférer une protection contre les chocs oxydatifs qui l'accompagnent? D'autre part, les lipides de basse densité joueraient un rôle important dans le métabolisme des plasmodiums au cours de cette phase du cycle, d'où l'hypothèse

avancée que l'infection paludéenne protégerait contre les taux élevés de cholestérol plasmatique.

La déficience en G-6-PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase) freine aussi le développement du parasite qui a besoin de cet enzyme pour sa maturation.

• MODIFICATIONS DE L'ÉRYTHROCYTE

Le globule rouge infecté subit des modifications de structure et de taille qui ne sont pas encore bien comprises. Les granulations de Schüffner (*P. vivax*, *P. ovale*) sont de petites cavités en rapport avec la membrane globulaire. Les taches de Maurer (*P. falciparum*) sont des évaginations de la membrane parasitophore, truffées de particules intramembranaires. Des protubérances ("knobs") apparaissent à la surface du globule rouge parasité par certaines souches de *P. falciparum*; elles seraient responsables de l'adhérence des érythrocytes parasités à l'endothélium des capillaires et sont constituées d'accumulation de protéines spécifiques d'espèces, riches en histidine et de haut poids moléculaire. L'accroissement de taille est considérable (11 à 12 μm de diamètre) dans les invasions par *P. vivax*.

L'érythrocyte infecté passe d'une forme biconcave à une forme globuleuse de sphère crénelée. Sa déformabilité est diminuée et les protéines de surface sont profondément modifiées.

Des altérations surviennent dans le contenu de la membrane globulaire en protéines, hydrates de carbone et lipides, procurant une perméabilité passive augmentée (influençant peut-être l'accessibilité aux médicaments) mais également une plus grande fragilité osmotique. De plus, de nombreux épitopes d'antigènes polymorphiques de plasmodium sont enchâssés dans la membrane globulaire et induisent chez l'hôte une réponse immune protectrice.

Les gamétocytes

On ne sait toujours pas à la suite de quel stimulus certains mérozoïtes vont, après la pénétration dans le globule rouge, devenir des gamétocytes. La gamétogénèse prend de quatre à douze jours chez *P. falciparum*. À maturité, le gamétocyte remplit le globule rouge et son noyau ne s'est pas divisé. De plus, une différenciation sexuelle a lieu en mâle et femelle, morphologiquement différents par la taille du noyau et la colorabilité du cytoplasme.

Ce stade parasitaire doit s'adapter à deux hôtes différents: sa maturation a lieu chez l'homme, tandis que la fécondation du gamétocyte femelle par un gamète mâle s'effectue dans l'estomac de l'anophèle.

On sait que l'immunité antiplasmodium diminue le nombre de gamétocytes viables (c'est-à-dire capables d'évoluer chez l'anophèle). De plus, les gamétocytes peuvent, dans certaines infections aiguës, manquer des substances indispensables à leur développement ou être inhibés par des toxines.

Le fait de produire des gamétocytes ne dépend pas seulement de l'environnement, c'est aussi une qualité intrinsèque d'une lignée parasitaire. Il y a de bons et de moins bons producteurs de gamétocytes. Au laboratoire, lorsqu'on entretient une lignée parasitaire sur l'hôte vertébré seulement (plasmodiums de rongeurs sur souris par exemple) en injectant un animal avec le sang parasité de l'animal précédent, la lignée perd progressivement la faculté de produire des gamétocytes, devenus inutiles à la survie du parasite dans ces conditions artificielles.

4.3 Le plasmodium chez l'anophèle

Dès l'arrivée chez l'anophèle, les phénomènes se bousculent: en 10 minutes, les gamètes mâles sont formés par exflagellation et prêts à féconder une femelle.

La durée du processus de développement chez le vecteur dépend de la température ambiante: le moustique devient infectant pour l'homme à partir du moment où les sporozoïtes, libérés par les oocystes mûrs sont arrivés dans les glandes salivaires. Plus la température est élevée, plus courte est la sporogonie (8 jours à 30°C pour *P. falciparum*). En dessous de 18°C et au dessus de 33°C, le développement de *P. falciparum* est arrêté chez le moustique. Les climats chauds facilitent donc la transmission du paludisme.

Remarque

P. vivax supporte 16°C, ce qui explique sa répartition géographique.

Les stades de la sporogonie

Le temps passé par le plasmodium chez l'anophèle peut se décomposer en trois parties très inégales: fécondation, croissance des oocystes, libération et migration des sporozoïtes.

- VIABILITÉ DES GAMÉTOCYTES

Le nombre de gamétocytes ingérés par le moustique est très variable. Il suffit de quelques femelles et d'un mâle pour qu'à l'autre bout du cycle, des centaines de sporozoïtes s'accumulent dans les glandes salivaires. La viabilité des gamétocytes n'est que de quelques jours mais chez l'homme infecté, de nouveaux gamétocytes sont produits à la fin de chaque

schizogonie, c'est-à-dire toutes les 48 heures (72 heures pour *P. malariae*).

- FÉCONDATION ET FORMATION DES OOKINÈTES

Exflagellation des gamètes mâles, fécondation, formation de l'ookinète et sortie de l'estomac prennent environ 24 heures. Les ookinètes doivent pouvoir adhérer aux cellules de la paroi stomacale et les traverser impunément. Ceux qui réussissent à sortir de l'estomac se transforment en oocystes.

On peut, au laboratoire, réaliser la fécondation *in vitro* des gamétocytes femelles prélevés dans le sang d'un sujet infecté. Les ookinètes obtenus, offerts au moustique dans un repas artificiel, poursuivent leur évolution et sortent de l'estomac à condition que l'espèce d'anophèle convienne (adaptation du parasite à son hôte).

- MATURATION DES OOCYSTES

La croissance de l'oocyste prend de 4 à 21 jours selon la température ambiante dans laquelle se trouve l'anophèle. Plusieurs centaines de sporozoïtes sont formés, à partir de la cellule initiale de l'œuf fécondé, à l'intérieur de la paroi de l'oocyste alors que le diamètre passe de 8 à 65 µm. On ne sait pas de quelles substances se nourrit l'oocyste en cours de maturation. L'anophèle porteur d'oocystes peut se nourrir exclusivement de solution glucosée ou prendre des repas sanguins, sans que cela influence le rendement ni le rythme de la maturation.

C'est le seul stade dont la culture *in vitro* n'a pas encore été réussie.

- LIBÉRATION DES SPOROZOÏTES ET MIGRATION VERS LES GLANDES SALIVAIRES

Les sporozoïtes, libérés dans l'hémolymphe par l'éclatement des oocystes situés autour de l'estomac, se dirigent vers le thorax où ils se concentrent, en 24 heures, dans les cellules des *acini* des glandes salivaires. Ils peuvent y rester entreposés pendant plusieurs jours, jusqu'à 2 ou 3 semaines, sans perdre leur viabilité c'est-à-dire leur capacité, une fois injectés dans la circulation de l'hôte vertébré, de pénétrer dans un hépatocyte et d'y produire un schizonte pré-érythrocytaire. Ici encore, une migration réussie et une survie longue dans les cellules des glandes salivaires sont tributaires d'une bonne adaptation à l'hôte invertébré.

Les sporozoïtes acquièrent leur viabilité une fois sortis de l'oocyste, en même temps qu'est synthétisée la protéine circumsporozoïtique, épais manteau antigénique spécifique du stade. Cette protéine a été isolée et sa structure est connue. Certains de ses épitopes ont

servi, dans les années quatre-vingt, aux premiers essais, infructueux, de vaccination antipaludique. D'autre part, des anticorps monoclonaux spécifiques sont utilisés dans un test ELISA pour la repérer dans les moustiques capturés sur le terrain.

Le nombre de sporozoïtes injectés lors d'une piqûre est très variable, en général de quelques dizaines à quelques centaines. Dans le modèle expérimental du paludisme de rongeurs (*P. berghei*), le nombre de sporozoïtes contenus dans les glandes salivaires des anophèles infectés peut atteindre plus de 20.000 et le nombre minimal de sporozoïtes nécessaire pour induire à coup sûr une infection chez un rongeur réceptif est de l'ordre de 50.

- ADAPTATION DU *PLASMODIUM* À SON VECTEUR

On peut le constater, le développement des différentes phases de la sporogonie nécessite une adaptation, réalisée au cours de l'évolution, d'une lignée parasitaire donnée à une espèce d'anophèle. *Anopheles atroparvus* (européen) transmet facilement *P. falciparum* du Sud de l'Europe mais très difficilement une souche de *P. falciparum* provenant d'Afrique centrale. D'autre part, il est possible, dans une population anophélienne, de sélectionner au cours de plusieurs générations, des femelles très sensibles ou au contraire des femelles réfractaires à une population parasitaire (c'est-à-dire à l'hébergement des gamétocytes et de leurs activités). Les caractères biochimiques responsables de l'adaptation sont actuellement l'objet de recherches actives au niveau des récepteurs de l'estomac des insectes et des protéines de reconnaissance de l'ookinète.

4.4 La schizogonie pré-érythrocytaire

Le contraste est frappant entre la léthargie des sporozoïtes en place dans les glandes salivaires de l'anophèle et l'activité déployée par ces mêmes parasites, une fois arrivés dans l'organisme de l'hôte vertébré (une heure, au maximum, dans la circulation sanguine et de 6 à 15 jours dans un hépatocyte pour produire un schizonte à 20.000 noyaux).

- PÉNÉTRATION DANS L'HÉPATOCTE

La protéine circumsporozoïtique joue un rôle dans la reconnaissance de la surface de l'hépatocyte. On retrouve en effet des traces de cette protéine à la surface des hépatocytes infectés. Un rôle actif de transport des sporozoïtes vers l'hépatocyte a été attribué aux cellules de Küpffer.

- SCHIZOGONIE PRÉ-ÉRYTHROCYTAIRE ET HYPNOZOÏTES

Deux espèces présentent un développement pré-érythrocytaire rapide, provenant d'une population de sporozoïtes homogène se développant dans les hépatocytes en 6 jours (*P. falciparum*) et en 15 jours (*P. malariae*). Passés ces délais, il n'y a plus de parasites dans le foie (en l'absence de nouvelle inoculation de sporozoïtes).

Pour les deux autres, *P. vivax* et *P. ovale*, les sporozoïtes injectés par le moustique constituent un mélange de deux populations. Les uns atteignent le stade de schizonte mûr rapidement (9 jours) dans les hépatocytes tandis que les autres entrent en léthargie dès leur entrée dans l'hépatocyte. Ils restent inchangés (hypnozoïtes), avant de poursuivre leur développement pour atteindre la maturité après des périodes allant de 1 à 18 mois, de sorte que l'envahissement du sang est différé d'autant. Les hypnozoïtes sont à l'origine des rechutes de paludisme, accès aigus survenant longtemps après la piqûre infectante.

Il est probable que *P. vivax*, adapté aux pays tempérés où l'hibernation est problématique chez le moustique, aurait trouvé le moyen d'hiberner dans le foie et de ressortir dans le sang lorsque les moustiques ont repris leur activité, dans le courant de l'été de l'année suivante.

Au cours de la schizogonie hépatique, des antigènes spécifiques de ce stade, liés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1, sont exprimés à la surface des hépatocytes infectés et sont la cible des lymphocytes T cytotoxiques (T CD8⁺).

BIBLIOGRAPHIE

AIKAWA M and SEED T. (1980) Morphology of Plasmodia, In : JP KREIER (Ed) *Malaria*, Academic press, Harcourt Brace Janovich, Publishers, **1**, 285-343.

HOMEWOOD CA and NEAME KD. Biochemistry of Malaria Parasites, In : JP KREIER (Ed) *Malaria*, Academic press, Harcourt Brace Janovich, Publishers, **1**, 345-405.

COHEN S. (1982) Malaria, *British Medical Bulletin*, **38**, 115-218.

SHERMAN IW. (1991) The biochemistry of malaria: an overview. In: G COOMBS and M NORTH (Eds), *Biochemical Protozoology*, London, Taylor and Francis, pp. 6-34.

SLEIGH MA. (1991) The nature of the Protozoa, In: JP KREIER and JR BAKER (Eds) *Parasitic protozoa*, **1**, 1-53.

COX FEG. (1991) Systematics of parasitic protozoa, In: JP KREIER and JR BAKER (Eds) *Parasitic protozoa*, London, Academic Press, **1**, 55-80.

POUVELLE B, SPIEGEL R, HSIAO L *et al.*, (1991) Direct access to serum macromolecules by intraérythrocytic malaria parasites, *Nature*, **353**, 73-75.

GOLDBERG DE, SLATER AFG. (1992) The pathogenicity of hemoglobin degradation in malaria parasites, *Parasitology Today*, **8**, 280-283.

Les plasmodiums parasites de l'homme Paludisme ou malaria

13

1. Historique

C'est la fièvre qui domine les observations cliniques à travers la période historique et c'est la quinine qui, à partir de 1663, fera l'unanimité pour la combattre.

1.1 La fièvre et les marais

Hippocrate, parlant de "fièvres atrabillaires" (à la bile noire), a donné une description extrêmement précise de l'accès fébrile et de sa périodicité. Les fièvres périodiques sont citées par les Grecs ou les Egyptiens; les Chinois, quant à eux, donnent de l'accès une description particulièrement imagée faisant succéder au chevet du patient, des démons armés du brasero, du marteau et de la marmite d'eau froide.

Mal-aria (en italien: mauvais air), fièvre des marais ou paludisme (du latin *palus*: marais), noms donnés officiellement à l'infection plasmodiale évoquent tous, la responsabilité des eaux de surface. "Ces eaux croupissent et, se résolvant par l'évaporation, remplissent l'atmosphère de miasmes pestilentiels", c'est la description d'un certain Gautier (1863).

1.2 Le cinchona et la quinine

Ce sont les Jésuites installés en Equateur qui remarquent que les mineurs indiens mâchaient l'écorce d'un certain arbre lorsqu'ils sentaient venir les frissons. Ils transfèrent cette observation au Pérou où le nom de la princesse de Cinchon, qui en reçoit la bien-faisante action lors d'un accès fébrile, sera donné au genre botanique (*Cinchona*). L'importation et la dissémination de l'écorce en Europe en passant par Séville fera beaucoup de bruit. La poudre vaut son pesant d'argent. En 1679 Louis XIV achète pour la somme de 48.000 livres, à un apothicaire anglais du nom de Talbot, le secret d'une préparation à base de quinquina: ce sera la panacée universelle. Pelletier et Caventou isolent le principe actif, la quinine, en 1870.

Les semences importées par Charles Ledger en 1865 pour le "Kiew Garden" de Londres ne suscitent pas l'enthousiasme des agronomes anglais; ce sont les hollandais qui s'y intéressent, en achètent 450 grammes et implantent avec succès *Cinchona ledgeriana* à Java. Ils veillent à maintenir l'espèce sans hybridation pour conserver ses qualités dont une teneur de l'écorce en quinine de 5 à 10 p.100. Ces plantations feront la réputation de la toute puissante "Amsterdamsche Chinine Fabriek" et satisferont, jusqu'à la deuxième guerre mondiale, la demande en quinine qui va en augmentant.

1.3 Le plasmodium et l'anophèle

Depuis longtemps, le pigment produit par le parasite avait été observé sous forme de granulations foncées dans les organes. En 1717, Morton et Giovanni Lancisi écrivent un mémoire intitulé "*De Noxii Paludum Effluviis eorumque remediis*" dans lequel le pigment est décrit dans la rate et le cerveau, observation faite par plusieurs autres auteurs et que Meckel renouvelle en 1847. Le travail d'Afanasiev en 1879 ajoute que le pigment semble contenu dans des "corps protoplasmiques". Il précède de peu la découverte par Laveran à Bône (Algérie) du parasite du paludisme. C'est en 1880 en effet, que ce médecin de l'armée française observe dans une préparation de sang d'un malade fiévreux, outre le pigment bien connu, des filaments très mobiles s'agitant autour d'un globule rouge: ce sont les microgamètes, sortis par exflagellation. La description des parasites progressera de manière décisive grâce à la coloration de Romanovski, dans laquelle le bleu de méthylène d'Ehrlich est remplacé par un colorant polychromatique, colorant les structures cytoplasmiques en bleu tandis que les noyaux prennent une couleur rouge. Il s'agit du même bleu de méthylène ayant subi l'oxydation qui le transforme en "azurs" auxquels est ajoutée de l'éosine. Le colorant de Romanovski est le précurseur du colorant de Leishman et de l'universel Giemsa. Les stades du cycle du plasmodium sont décrits et nommés par Schaudinn en 1900 tandis que

1. Historique
2. Rappel de la biologie des plasmodiums
3. Variations géographiques du paludisme
4. Morphologie et caractères biologiques des parasites
5. L'immunité dans le paludisme
6. Physiopathologie du paludisme
7. Diagnostic du paludisme
8. Traitement du paludisme
9. Epidémiologie
10. Le contrôle du paludisme
11. Perspectives de vaccination

Bibliographie

FIGURES

- 13-1. Modallrés d'évolution de la parasitémie
- 13-2. Distribution du paludisme dans le monde
- 13-3. *Anopheles stephensi*, un vecteur de paludisme
- 13-4. *P. vivax* dans le sang
- 13-5. *P. ovale* dans le sang
- 13-6. *P. malariae* dans le sang
- 13-7. *P. falciparum* dans le sang
- 13-8. La fièvre, symptôme cardinal
- 13-9. Mesure de l'hypertrophie de la rate
- 13-10. Actions possibles en zone endémique

la distinction entre espèces sera faite par Golgi, Marchiafava et Bignami en Italie.

Le rôle du moustique des marécages est évoqué par Lancisi en 1717: le poison serait concentré par le moustique dans ses pièces buccales. Laveran, en 1884, attribue au moustique le même rôle pour la malaria que celui, récemment découvert, qu'il joue pour les filarioses. La preuve expérimentale est apportée par Ross en 1897, lorsqu'il nourrit des moustiques sur un patient chez qui il a observé des formes en croissant (gamétocytes de *P. falciparum*) et constate chez eux, autour de l'estomac, l'apparition de cellules pigmentées qui croissent de jour en jour. Il continue ses observations déterminantes sur les plasmodiums d'oiseaux, trouve que les oocystes de l'estomac libèrent des parasites filiformes qui s'accumulent dans les glandes salivaires et réussit la transmission expérimentale chez les oiseaux. Chez l'homme, la transmission expérimentale est réussie par Grassi à Rome en 1898 qui, après s'être acharné à nourrir sans succès des *Culex*, essaye par hasard des anophèles qui permettent enfin d'observer des formes sporogoniques de *P. falciparum* et de *P. vivax*. Le cycle complet du parasite chez l'anophèle est décrit en Italie par Bignami et Grassi en 1898.

Schaudinn prétend en 1903 avoir vu les sporozoïtes inoculés par la piqûre du moustique pénétrer dans les globules rouges. Cette observation ne sera jamais répétée. Peu de temps après, on constate, au contraire, que les parasites inoculés disparaissent de la circulation après une heure environ, car le sang des sujets infectés reste non infectieux pour d'autres sujets réceptifs pendant plusieurs jours. Il faut attendre l'apparition dans les prélèvements, des parasites intra-érythrocytaires pour réussir la subinoculation. D'où l'hypothèse d'un stade préliminaire de développement du parasite en dehors de la circulation sanguine. Ce développement pré-érythrocytaire sera découvert, d'abord chez les plasmodiums d'oiseaux en 1938 par Kikuth et Mudrow, puis chez les plasmodiums de l'homme par Shortt et Garnham en 1948.

1.4 Le DDT, la chloroquine et le paludisme

Jusqu'en 1935, on se contente de la quinine comme thérapeutique du paludisme: c'est un bon médicament, fiable, bon marché et peu toxique. Il faut attendre les guerres, accompagnées de difficultés d'approvisionnement en écorce de quinquina, pour voir la recherche thérapeutique se mettre en action: entre 1930 et 1940, la pamaquine (Schuleman), la quinacrine (Mausse et Mietsh) et la chloroquine (Ander-sag) sont synthétisées; entre 1945 et 1950, Burckhalter

découvre l'amodiaquine et la primaquine, Hitchings la pyriméthamine, Curd le chlorproguanil, Davey et Rose le proguanil.

En 1939, Muller décrit les propriétés insecticides du DDT. Cette découverte, avec celle de la chloroquine, amène l'espoir de pouvoir un jour se débarrasser du paludisme à l'échelle de la planète et, entre 1950 et 1970, l'Organisation Mondiale de la Santé lance le programme global d'éradication du paludisme (LE MONDE UNI CONTRE LE PALUDISME).

Dès avant 1960, certains anophèles deviennent résistants au DDT. Les produits de remplacement sont plus chers, parfois plus toxiques et moins efficaces.

Entre 1962 et 1970, l'apparition dans certaines régions du monde, de souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine relance la recherche de nouvelles molécules actives, mais les résultats sont assez décevants.

Sans que les phénomènes de résistances en soient la cause exclusive, l'échec de l'éradication est reconnu à partir de 1970 et on ne parle plus que du "contrôle".

En 1994, ces vers, extraits du premier livre des Poèmes de Pierre de Ronsard (1560), sont toujours d'actualité:

*"En attendant que de mes veines parte
Cette exécration, horrible fièvre quarte
Qui me consomme et le corps et le cœur,
Et me fait vivre en extrême langueur ... ,"*

2. Rappel de la biologie des plasmodiums et les relations hôte-parasite

2.1 Le plasmodium chez l'homme

Considérations générales

L'infection survient suite à l'inoculation de sporozoïtes par les anophèles femelles. L'homme héberge les deux schizogonies hépatique et érythrocytaire ainsi que la maturation de mérozoïtes en gamétocytes (début de la sporogonie).

Le porteur de gamétocytes (stade sexué sanguin mature) est le seul réservoir des plasmodiums humains pour la transmission. Il n'y a pas de réservoir animal.

Le parasitisme des globules rouges par les stades de la schizogonie (cycle asexué sanguin) est le seul à provoquer une pathologie.

Dans le sang d'un sujet infecté, on pourra donc trouver, en théorie, des globules rouges parasités par les stades schizogoniques: jeunes anneaux, trophozoïtes, schizontes jeunes et mûrs, ainsi que des gamétocytes. La succession des cycles schizogoniques érythrocytaires toutes les 48 ou 72 heures fait monter la parasitémie qui devient patente puis dépasse le seuil clinique à partir duquel le patient devient fébrile.

Chez le sujet qui vit dans une zone endémique et est régulièrement infecté par des plasmodiums, une résistance immune s'installe, qui va freiner la multiplication du parasite. Les accès cliniques deviennent plus rares mais la parasitémie persiste à un niveau plus bas, asymptomatique.

Conséquences de l'infection pour l'homme

A partir de l'état de sujet indemne, l'homme peut développer les états suivants (figure 13-1) :

- porteur d'hypnozoïtes dans le foie: rien dans le sang;
- sujet infecté asymptomatique: parasitémie présente mais basse;
- malade (accès simple de paludisme): parasitémie élevée, causant des symptômes;
- malade grave (paludisme sévère ou compliqué, accès pernicieux, cérébral): parasitémie très élevée à *P. falciparum*.

A tous les niveaux d'infection sanguine, des gamétocytes peuvent être présents dans le sang périphérique: l'anophèle s'infecte en se nourrissant sur un homme infecté ou malade qui joue le rôle de réservoir de l'infection.

Définitions

Dans une **parasitémie patente**, les parasites sont visibles à l'examen microscopique d'une goutte épaisse ou d'un frottis de sang tandis qu'une **parasitémie subpatente** est caractérisée par la présence de parasites dans le sang mais en nombre insuffisant pour être visibles dans une goutte épaisse, au cours d'un examen de 10 minutes, soit 100 champs microscopiques (moins de 20 parasites par μ l de sang). Les parasitémies subpatentes peuvent être suspectées par recherche d'anticorps ou mises en évidence par PCR (pas encore en routine!).

Le **paludisme clinique** est décrit comme une succession de poussées fébriles et tout autre symptôme accompagnant la présence de parasites dans le sang d'un individu. Les parasitémies donnant lieu à des symptômes cliniques sont généralement de plus de 10.000 parasites/ μ l de sang. En dessous de ce niveau,

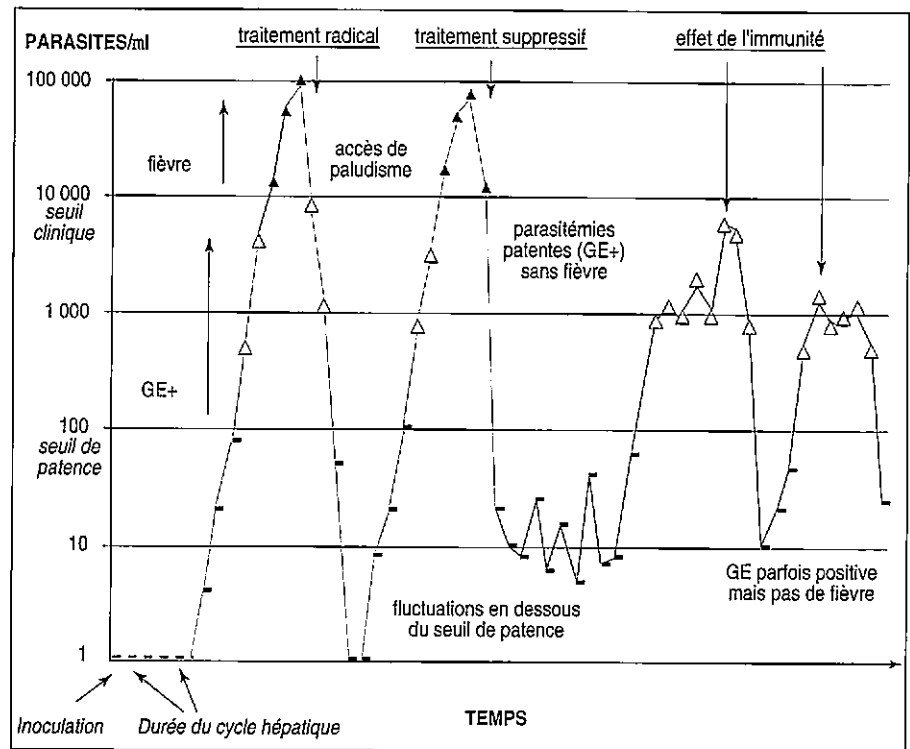


Figure 13-1

Modalités d'évolution de la parasitémie

Inoculation, par piqûre d'un anophèle infecté.

Durée du cycle hépatique: entre l'inoculation de sporozoïtes par le moustique et la première arrivée des mérozoïtes dans le sang.

Seuil de patente: niveau de parasitémie à partir duquel on peut détecter les parasites au microscope; il dépend de la sensibilité de l'examen microscopique (frottis, GE ou concentration).

Seuil clinique: niveau de parasitémie à partir duquel le sujet présente des symptômes (fièvre etc...). Il dépend de la sensibilité individuelle, de l'état de protection immune, de l'espèce de *Plasmodium* etc...

Immunité, acquise par les contacts antérieurs avec le même parasite.

Traitement radical: fait disparaître tous les parasites.

Traitement suppressif: fait disparaître les symptômes; abaisse la parasitémie en dessous du seuil clinique (le patient est "guéri").

la parasitémie patente non accompagnée de signes cliniques est décrite comme **paludisme asymptomatique**.

Lorsqu'un sujet fait un nouvel accès après guérison du précédent, il peut s'agir d'une **réinfection** (nouvelle piqûre par un anophèle infecté), d'une **recrudescence** de parasitémie ayant comme origine des parasites sanguins (parasitémie généralement subpatente persistant après traitement incomplet ou inefficace, ou persistant au long cours chez des sujets partiellement immuns) ou encore d'une **rechute**, poussée de parasitémie ayant comme point de départ des schizontes exo-érythrocytaires à développement lent (hypnozoïtes de *P. vivax* ou de *P. ovale*).

La **période d'incubation**, en cas de primo-infection, sépare le moment de la piqûre infectante du moustique de l'apparition des premiers symptômes. Elle comprend la durée du cycle schizogonique exo-érythrocytaire (hépatique), d'évolution silencieuse, plus deux ou trois cycles schizogoniques érythrocytaires (48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, 72 heures pour *P. malariae*) qui élèvent la parasitémie à un niveau suffisant, d'abord pour être décelable au microscope, puis pour provoquer des symptômes.

Paramètres de la biologie humaine qui influencent le parasite

- DIMINUTION DE LA VIRULENCE

L'immunité, acquise au contact du parasite et entretenue par sa présence, freine (sans pouvoir l'empêcher tout-à-fait) la multiplication des parasites dans le sang. C'est la prémunition ou "semi-immunité".

L'immunité congénitale, anticorps passés de la mère immune au nouveau-né, protège celui-ci pendant environ 6 mois contre les accès graves.

Les hémoglobulines anormales, HbF (thalassémies) et HbS (drépanocytose) perturbent la schizogonie et diminuent donc la virulence du parasite. L'hémoglobine foetale est un des éléments qui protègent le nouveau-né, pendant les premières semaines, contre les accès de paludisme grave.

La déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PD) gêne considérablement le développement du parasite.

Un régime exclusivement lacté, par sa déficience en acide para-aminobenzoïque, empêche la synthèse d'ADN par le parasite et entrave donc la schizogonie.

La malnutrition protéique, par la pénurie grave d'acides aminés, gêne également la croissance du parasite: les enfants atteints de kwashiorkor ne font pas de paludisme grave mais au moment où la correction de l'apport protéique survient, on assiste à des augmentations spectaculaires de parasitémie.

La chimioprophylaxie, prise régulièrement, empêche la multiplication exubérante du parasite et protège donc contre les accès de paludisme, tout en laissant la parasitémie évoluer à des niveaux bas.

- OBSTACLES À L'INFECTION

L'absence des antigènes de groupe sanguin Duffy sur la paroi de l'érythrocyte protège contre l'infection à *P. vivax*.

L'ovalocytose, une anomalie du cytosquelette du globule rouge qui rend la membrane externe plus rigide, empêche la pénétration du mérozoïte.

2.2 Le plasmodium chez l'anophèle

L'efficacité de la transmission dépendra de l'abondance des moustiques, de leur longévité et de la fréquence avec laquelle ils piquent l'homme. On trouvera les détails concernant les stades sporogoniques au chapitre précédent et les paramètres influençant la transmission au paragraphe traitant de l'épidémiologie.

3. Variations géographiques du paludisme

La répartition actuelle des zones d'endémie paludéenne ou à potentiel paludogène est illustrée sur la planisphère (figure 13-2).

Le paludisme est souvent évoqué à l'échelle mondiale, comme une maladie unique, invariable. On en a organisé l'éradication mondiale, dans les articles de presse, il est fait allusion aux pays "endémiques", à la prophylaxie et au traitement des cas, récemment à la vaccination, sans distinction, globalement.

Or, sur le terrain, le paludisme est une maladie qui prend des allures épidémiologiques, des gravités, des répartitions dans le temps et dans l'espace, extrêmement variables. D'après Swenllengrebel, "le paludisme doit être envisagé comme une maladie locale".

Au point de vue parasitologique, on a affaire à quatre espèces de plasmodiums dont le comportement chez l'homme diffère par plusieurs caractères importants.

Au point de vue climatique, facteur essentiel qui influence la transmission, il ne suffit pas de distinguer régions polaires, tempérées, subtropicales, tropicales: il faut aussi considérer l'altitude, l'humidité, les régions côtières, les forêts inondées, les zones désertiques et les oasis, bref chaque "localité" possède un microclimat qui doit être défini avec précision.

Le vecteur est, lui aussi, très différent d'un endroit à l'autre. Chaque espèce d'anophèle (figure 13-3) possède des caractères de longévité, d'adaptation au parasite, de préférence nutritionnelle (homme ou animaux), de fréquence de repas sanguins ainsi que des choix des lieux de repos et de gîtes larvaires qui lui sont propres.

L'homme lui-même, hôte vertébré du parasite, sera génétiquement sensible ou résistant à telle espèce de plasmodium; il va acquérir une immunité plus ou moins rapidement; il exerce des activités qui modifient l'environnement (irrigations, créations de collections d'eau, barrages) ou qui l'amènent en contact plus fréquent avec le vecteur (activités nocturnes: pêche, chasse, danses); il vit dans des habitations qui permettent aux anophèles d'entrer ou au contraire dans des constructions qui le mettent à l'abri des vecteurs dont les activités sont essentiellement nocturnes (développement socio-économique).

4. Morphologie et caractères biologiques des parasites

4.1 *Plasmodium vivax*

Cycle pré-érythrocytaire

Une proportion des sporozoïtes se développent dès leur arrivée dans l'hépatocyte et arrivent à maturité en 8 jours. L'invasion du sang par les mérozoïtes initie la parasitémie.

L'existence d'hypnozoïtes allonge considérablement le cycle pré-érythrocytaire (et donc retarde l'invasion du sang par les mérozoïtes). On a observé, d'après l'origine géographique des souches de *P. vivax*, des comportements différents (tableau 13-1).

Dans les pays tempérés, *P. vivax* s'est adapté à l'alternance des saisons; en termes anthropocentriques, on pourrait prétendre qu'il passe l'hiver dans la cellule hépatique, alors que toute activité est arrêtée chez le vecteur et que la température ambiante est insuffisante pour assurer une sporogonie dans les délais.

Morphologie dans le sang

La maturation en schizonte passe par les étapes suivantes (les morphologies sont celles observées dans des frottis colorés au Giemsa) (figure 13-4).

Le **jeune trophozoïte** (anneau) présente, autour d'une vacuole centrale incolore, une mince bande de cytoplasme bleu et un petit noyau rouge.

Le **trophozoïte âgé** (forme amiboïde) présente une forme tourmentée avec cytoplasme plus abondant et vacuole fragmentée. Le noyau est toujours unique.

Le **schizonte jeune**, de forme arrondie ou irrégulière, possède 2 à 4 noyaux et ne remplit pas le globule rouge. Les vacuoles ont disparu de son cytoplasme où les granulations pigmentaires font leur apparition.

Le **schizonte mûr** possède 16 à 24 noyaux disposés au hasard dans une forme arrondie remplissant entièrement le globule rouge. Le pigment est rassemblé au centre du cytoplasme bleu.

Les **gamétocytes** mâle et femelle matures présentent une forme arrondie qui remplit le globule rouge, avec cytoplasme parsemé de granulations pigmentaires. Chez la femelle, le cytoplasme est intensément coloré en bleu et le noyau unique est petit et rouge vif. Chez le mâle, le cytoplasme est bleu-gris délavé et le noyau est plus grand et rose pâle.

Les **modifications du globule rouge parasité** apparaissent très tôt après l'entrée du mérozoïte (4 ou 5 heures). On note l'augmentation de volume (diamètre

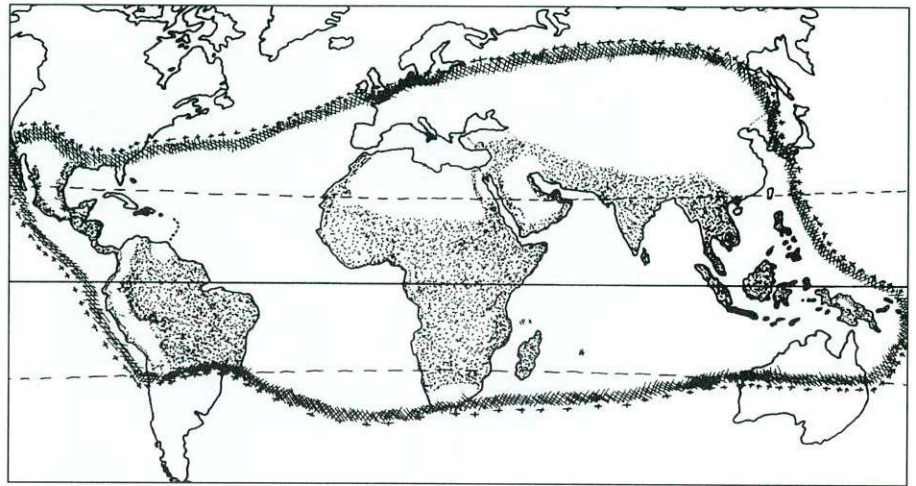


Figure 13-2

Distribution du paludisme dans le monde

Les croix et la zone ombrée marquent les limites historiques de la transmission du paludisme. Les zones pointillées sont les régions endémiques actuelles.

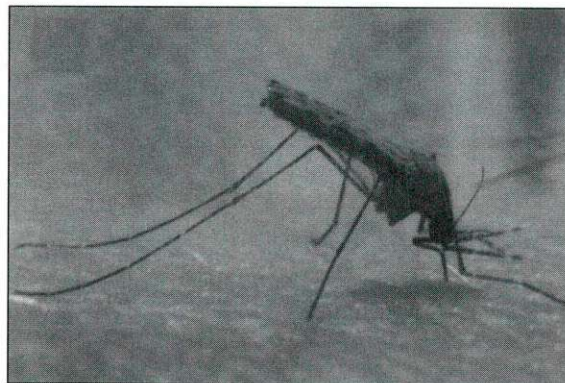


Figure 13-3

Anopheles stephensi, un vecteur de paludisme

On remarque la position, oblique par rapport au support, de l'anophèle au cours de son repas sanguin comme au repos, d'ailleurs.

Souche nord-coréenne

Primo invasion du sang: 8 jours; rechutes: 8-9 mois, 16-18 mois

Souches Madagascar et Inde du nord

Primo-invasion: 8 jours; rechutes: 8-9 mois, 10-11 mois, 12-13 mois;

Souche Chesson

Primo-invasion: 8 jours; rechutes: tous les mois, de 1 à 7 mois;

Souche Nicolaev (*P. vivax hibernans*)

Primo-invasion tardive: 8-9 mois; rechutes: 10-11 mois, 12-13 mois.

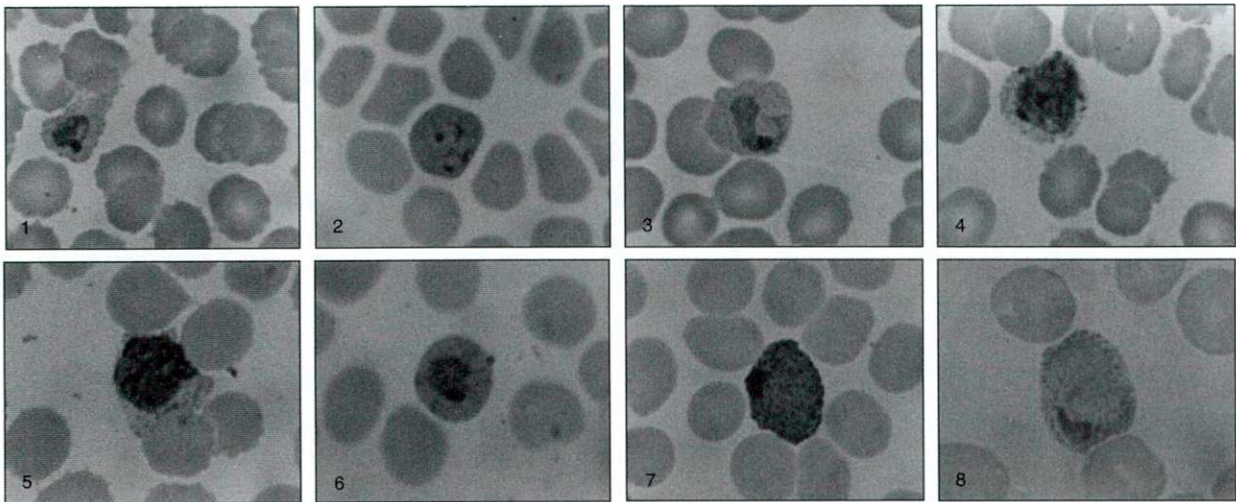
Tableau 13-1

Comportement variable de *P. vivax*

tre 10 µm), la décoloration du cytoplasme et la présence de granulations de Schüffner (colorables par le Giemsa si le pH de l'eau de coloration n'est pas inférieur à 7,2).

Figure 13-4

- P. vivax* dans le sang
- 1. Trophozoïte
 - 2. Trophozoïtes (infection multiple)
 - 3. Trophozoïte agé
 - 4, 5. Schizontes en cours de maturation
 - 6. Gamétocyte immature
 - 7. Gamétocyte femelle
 - 8. Gamétocyte mâle



Chronologie de développement et longévité de l'infection

La durée du cycle complet dans les conditions de transmission existant à un endroit donné, peut se décomposer comme indiqué au tableau 13-2.

La longévité spontanée de l'infection chez l'homme en l'absence de réinfection est de 3 à 5 ans.

Pouvoir pathogène

P. vivax est l'agent de la fièvre tierce bénigne. La poussée fébrile, correspondant à la libération des méro-

zoïtes par les schizontes, survient toutes les 48 heures, durée du cycle schizogonique érythrocytaire (de l'anneau au schizonte mûr).

La période d'incubation est de 11 à 15 jours (le cycle hépatique pré-érythrocytaire rapide de 8 jours plus deux ou trois cycles schizogoniques érythrocytaires de 48 heures).

Après traitement d'un accès de primo-infection, des rechutes peuvent survenir pendant plus d'une année, à partir des hypnozoïtes qui ne sont pas affectés par les schizonticides sanguins (traitement de l'accès).

Fièvre et splénomégalie sont les symptômes majeurs et les complications sont rares (bénigne).

Distribution géographique

La distribution en est cosmopolite, entre les isothermes d'été de 16 à 20 °C dans l'hémisphère nord et de 20 °C dans l'hémisphère sud. Dans les régions d'altitude des pays tropicaux, la température plus basse tend à favoriser *P. vivax* vis-à-vis de *P. falciparum*.

- Europe: éradication achevée mais encore quelques cas isolés.
- Bassin méditerranéen: Turquie, Moyen-Orient, Afrique du nord.
- Asie: endémicité importante dans toute la partie tropicale
- Afrique tropicale: suprématie des trois autres espèces. *P. vivax* est pratiquement absent de l'Afrique de l'ouest, entre l'Angola et la Mauritanie. Distribution par petits foyers dans le reste de l'Afrique tropicale.

Tableau 13-2

1	fécondation et formation d'ookinètes	24 à 48 heures	
2	maturation de l'oocyste	9 jours à 25°C	
3	délai d'invasion des glandes salivaires (cases 1+2)		11 jours
4	séjour des sporozoïtes dans la circulation sanguine de l'hôte vertébré	1 heure max.	
5	schizogonie hépatique normale (forme rapide)		8 jours
6	schizogonie hépatique lente (hypnozoïtes)	4 - 18 mois	
7	schizogonie érythrocytaire	48 heures	
8	gamétogenèse (jusqu'à maturité) à partir des mérozoïtes issus des schizontes hépatiques		4 jours
9	Durée minimale du cycle complet (gamétocyte donneur - gamétocyte receveur) (cases 3+5+8)		23 jours

P. vivax ne reconnaît pas les globules rouges dépourvus des antigènes de groupes sanguins Duffy, circonstance extrêmement fréquente (85 p.100) chez les populations bantoues en Afrique centrale et occidentale.

- Iles de Madagascar, Maurice et Comores: endémicité élevée mais prédominance de *P. falciparum*.
- Amériques, du sud des Etats-Unis à l'Argentine et au nord du Chili: dans toutes les régions de basse altitude, endémicité variable avec suprématie de *P. falciparum*.

Hôtes

Parasite de l'homme, *P. vivax* a pu être adapté aux primates après splénectomie.

Anopheles labranchiae atroparvus (Europe), *An. quadrimaculatus*, *An. freeborni* (Amérique du Nord et centrale), *An. stephensi* (Asie-Inde) en sont les principaux vecteurs.

Remarque

Garnham (1966) cite 40 espèces d'anophèles vecteurs potentiels de *P. vivax* (trouvés infectés dans la nature ou infection expérimentale réussie).

4.2 Plasmodium ovale

Schizogonie pré-érythrocytaire

Le comportement des sporozoïtes de *P. ovale* est semblable à celui des sporozoïtes de *P. vivax*. A côté du développement rapide de 9 jours, les hypnozoïtes mûrissent après 3 à 6 mois (dans les observations faites jusqu'à présent) mais sans doute y a-t-il des réense-

mencements du sang jusqu'à 18 à 20 mois, comme dans le cas de *P. vivax*.

Morphologie dans le sang

Elle est assez semblable à celle de *P. vivax* mais les schizontes ont des noyaux moins nombreux (figure 13-5).

Le **jeune trophozoïte** est un anneau semblable à celui de *P. vivax*.

Le **trophozoïte âgé** est peu amiboïde, souvent de forme ovale régulière.

Le **jeune schizonte**, de forme arrondie avec ses deux à quatre noyaux, présente dans son cytoplasme des granulations pigmentaires très foncées à reflets verdâtres, concentrées au centre du parasite. Il ne remplit pas le globule rouge.

Le **schizonte** mûr contient de 4 à 16 noyaux volumineux qui font saillie à l'extérieur (schizonte bosselé, mûriforme). Les grains de pigment sont gros et concentrés au centre du cytoplasme.

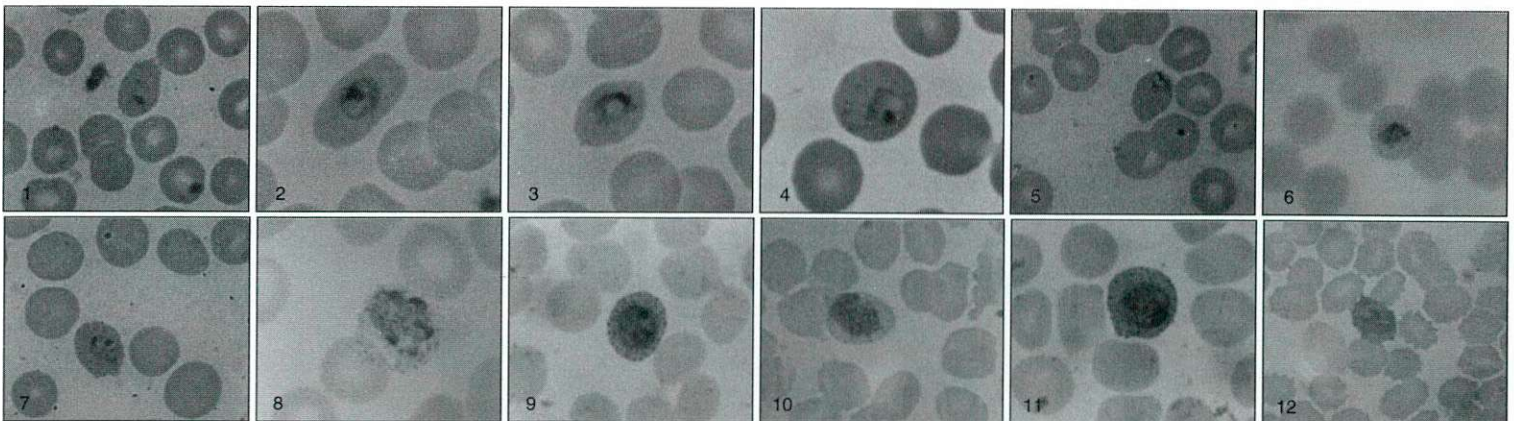
Les **gamétocytes** sont arrondis avec grains de pigment disséminés dans tout le cytoplasme et plus grossiers que chez *P. vivax*.

Les **modifications du globule rouge parasité** surviennent dès le stade trophozoïte: augmentation de volume, déformation en ovale avec contour souvent crénelé ou effiloché aux pôles de l'ovale, décoloration du cytoplasme. Les granulations de Schüffner sont abondantes et très grossières.

Figure 13-5

P. ovale dans le sang

- 1 à 6. Trophozoïtes à différents stades de maturation
- 7, 8, 9. Schizontes immatures
10. Schizonte mûr
11. Gamétocyte immature
12. Gamétocyte mâle



1	fécondation et formation d'ookinètes	24 à 48 heures	
2	maturation des oocystes	14 jours à 25 °C	
3	délai d'invasion des glandes salivaires (cases 1+2)		16 jours
4	séjour des sporozoïtes dans la circulation sanguine de l'hôte vertébré	1 heure max.	
5	schizogonie hépatique normale (forme rapide)		9 jours
6	schizogonie hépatique lente (hypnozoïtes)	18 - 20 mois	
7	schizogonie érythrocytaire	48 heures	
8	gamétogénèse (jusqu'à maturité) à partir des mérozoïtes issus des schizontes hépatiques		4 jours
9	Durée minimale du cycle complet (gamétocyte donneur - gamétocyte receveur) (cases 3+5+8)		29 jours

Tableau 13-3

Chronologie de développement et longévité de l'infection

La durée du cycle complet se décompose en comme indiqué au tableau 13-3.

La longévité de l'infection en l'absence de réinfection est souvent de moins de 3 ans (la longévité de l'infection sanguine est courte).

Pouvoir pathogène

P. ovale est l'agent d'une fièvre tierce bénigne: période d'incubation de 12 à 15 jours (comme chez

P. vivax); poussées de fièvre survenant toutes les 48 heures; rechutes possibles à partir de schizontes hépatiques à développement lent; peu de complications.

Distribution géographique

Il s'agit d'un parasite essentiellement africain: Afrique centrale et surtout occidentale (pays de la côte du golfe de Guinée) où des prévalences de l'ordre de 10 p.100 sont observées chez les jeunes enfants. Des infections sont aussi observées en Extrême-Orient (Philippines, Malaisie etc...). C'est l'espèce la plus rare. On a attribué cette rareté des infections aux parasitémiées basses et à la sensibilité du parasite aux anticorps spécifiques produits par l'hôte.

Hôtes

Parasite de l'homme, il est facilement adaptable au chimpanzé dont le rôle comme réservoir n'est cependant pas prouvé.

Anopheles funestus, *An. gambiae* en sont les principaux vecteurs en Afrique. L'adaptation imparfaite aux espèces des autres continents est sans doute aussi responsable de la rareté des infections.

4.3 Plasmodium malariae

Cycle pré-érythrocytaire

La durée de la maturation des schizontes hépatiques est de 15 jours. Il n'y a pas de preuves de l'existence d'hypnozoïtes et donc pas de rechutes à long terme qui aient leur origine prouvée dans le foie.

Morphologie dans le sang (figure 13-6)

Le **jeune trophozoïte** est un anneau semblable à celui de *P. vivax*.

Le **trophozoïte âgé**, à contours réguliers, ovale ou allongé, traverse parfois diamétralement le globule d'un côté à l'autre (forme en bande ou en drapeau). Le pigment brun foncé est rassemblé en mottes dans le cytoplasme, à côté du noyau encore unique.

Le **schizonte mûr** contient 8 noyaux rouges disposés en périphérie du parasite tandis que les grains de pigment foncé sont rassemblés au centre du cytoplasme bleu (forme en marguerite).

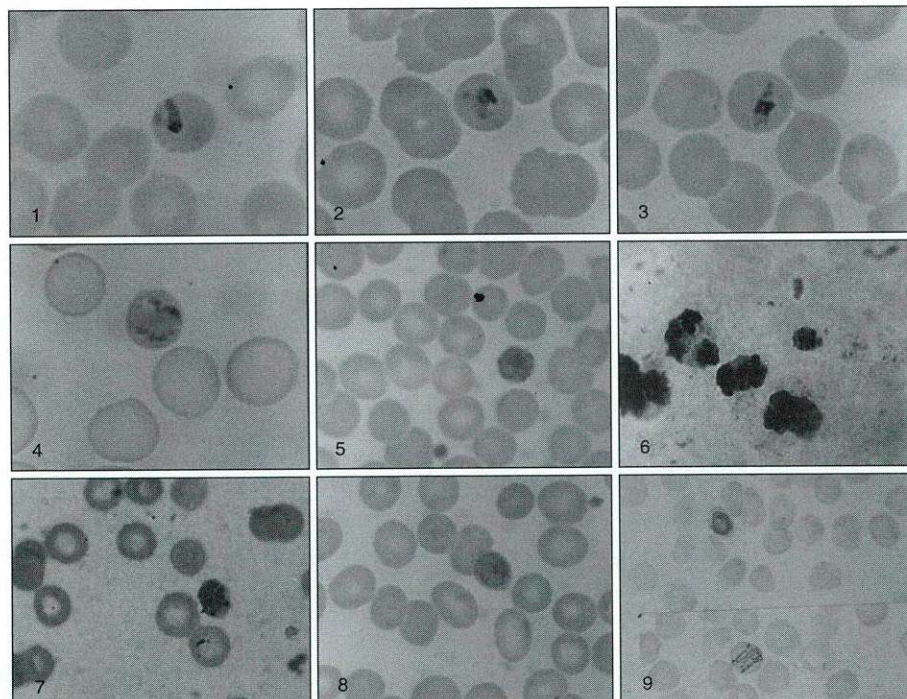
Les **gamétocytes** sont arrondis et remplissent le globule rouge. Le pigment noir est disséminé dans le cytoplasme.

Le **globule rouge parasité** est de taille et de coloration normales. On a décrit des granulations de Ziemann, difficiles à mettre en évidence, fines et peu nombreuses (les colorations habituelles ne les montrent pas).

Figure 13-6

P. malariae dans le sang

- 1 à 3. Trophozoïtes
4. Schizonte immature
- 5 à 7. Schizontes mûrs (6, dans une goutte épaisse)
8. Gamétocyte
9. Dessin de trophozoïtes



Chronologie de développement et longévité de l'infection

Le cycle complet se décompose comme indiqué au tableau 13-4.

La longévité de l'infection chez l'homme en l'absence de réinfection est de 21 à 53 ans (observations de la littérature). La longévité exceptionnelle de cette espèce de plasmodium pourrait s'expliquer par le rythme lent de la schizogonie érythrocytaire (72 heures), le parasite n'étant pas complètement éliminé par les doses habituelles de chloroquine ou d'autres schizonticides sanguins. Le système immunitaire ne parvient pas non plus à l'éliminer totalement. Les recrudescences sont donc possibles à partir de parasitémies subpatentes en l'absence de toute réinfection.

Pouvoir pathogène

Agent de la fièvre quarte, la poussée de température correspondant à la libération des mérozoïtes par les schizontes survient toutes les 72 heures, durée du cycle schizogonique érythrocytaire (de l'anneau au schizonte mûr).

Elle est dominée par l'anémie, la splénomégalie, le dépôt de pigment dans les organes et l'augmentation des immunoglobulines. La néphrose, la glomérulonéphrite aspécifique et la sclérose secondaire du rein, d'origine vraisemblablement immunologique, sont des complications fréquentes de l'infection à *P. malariae*.

Distribution géographique

Ce plasmodium est le plus fréquent en Afrique tropicale, avec des prévalences parfois très élevées si on se donne la peine de le chercher (les parasitémies sont souvent à la limite de la patence). Quelques foyers existaient en Afrique du Nord avant l'éradication (par exemple le Cap Bon en Tunisie) et en Europe (actuellement en voie de disparition). Par ordre de fréquence décroissante, on range ensuite la Mer des Caraïbes et le Golfe du Mexique, les Amériques centrale et du Sud et enfin l'Asie.

La prévalence est très variable suivant l'endroit, à cause de la très longue période nécessaire pour le développement chez le moustique. Là où la survie des anophèles est courte, la transmission devient problématique. Les espèces de moustiques présentent d'ailleurs de grandes variations dans leur aptitude à transmettre *P. malariae*.

1	fécondation et formation d'ookinètes	24 à 48 heures	
2	maturation des oocystes	17-20 jours à 25 °C	
3	délai d'invasion des glandes salivaires (cases 1+2)		20 jours
4	séjour des sporozoïtes dans la circulation sanguine de l'hôte vertébré	1 heure max.	
5	schizogonie hépatique normale (forme rapide)		15 jours
6	schizogonie hépatique lente (hypnozoïtes)	inexistante	
7	schizogonie érythrocytaire	72 heures	
8	gamétogenèse (jusqu'à maturité) à partir des mérozoïtes issus des schizontes hépatiques		6 jours
9	Durée minimale du cycle complet (gamétocyte donneur - gamétocyte receveur) (cases 3+5+8)		41 jours

Tableau 13-4

Hôtes

L'homme et le singe (chimpanzé) hébergent *P. malariae*.

Anopheles funestus, *An. gambiae*, *An. darlingi* et 20 autres espèces citées par Garnham permettent le cycle sporogonique complet.

4.4 *Plasmodium falciparum* (figure 13-7)

Schizogonie pré-érythrocytaire

La maturation du schizonte est complète après 6 jours et il n'y a pas d'hypnozoïtes.

Morphologie dans le sang périphérique

(figure 13-7)

Les **jeunes trophozoïtes** sont des anneaux souvent très petits (1-2 µm de diamètre) comportant, autour de la vacuole habituelle, une couronne de cytoplasme extrêmement fine et un noyau proéminent parfois scindé en deux petits fragments. L'infection multiple du globule rouge est fréquente (2 ou 3 parasites dans le même globule) et certains trophozoïtes sont parfois aplatis, accolés à la paroi du globule rouge, la vacuole étant alors difficilement visible et le noyau (rouge) situé entre deux petits traits bleus cytoplasmiques.

Les **gamétocytes** falciformes sont allongés, aux extrémités arrondies, légèrement incurvés avec une face concave et une face convexe (formes en banane, en croissant). Le pigment, contrairement aux gamétocytes des autres espèces humaines, est rassemblé autour du noyau central.

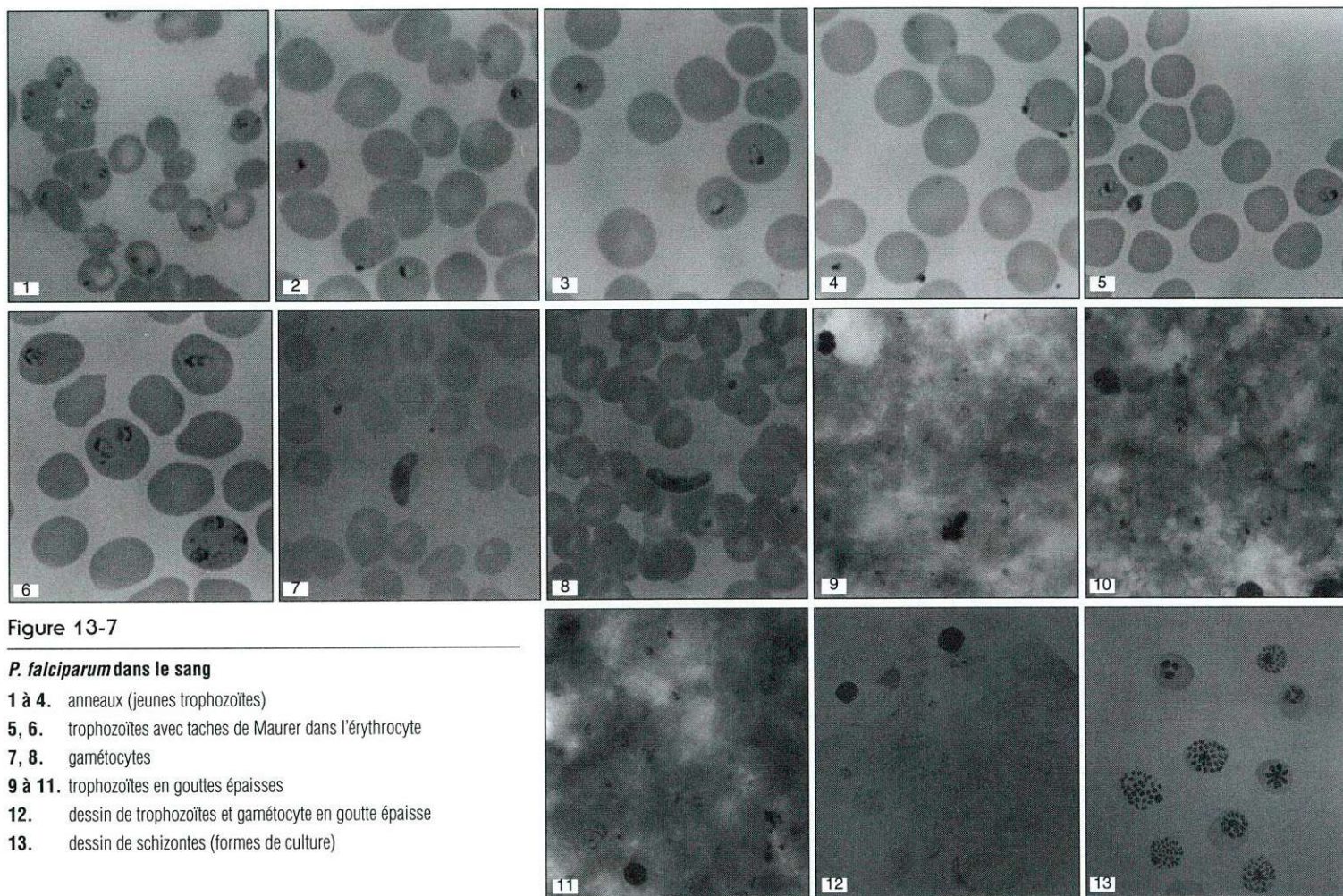


Figure 13-7

***P. falciparum* dans le sang**

- 1 à 4. anneaux (jeunes trophozoïtes)
- 5, 6. trophozoïtes avec taches de Maurer dans l'érythrocyte
- 7, 8. gamétocytes
- 9 à 11. trophozoïtes en gouttes épaisses
- 12. dessin de trophozoïtes et gamétocyte en goutte épaisse
- 13. dessin de schizontes (formes de culture)

Le **globule rouge parasité** présente une taille peu modifiée, une coloration plus pâle que normalement et un rougissement de la paroi globulaire. Les taches de Maurer dans le cytoplasme sont spécifiques de l'espèce *falciparum* et, plus généralement, du sous-genre *Laverania*. Elles apparaissent comme des petites billes décolorées entourées d'une fine membrane, colorables par le Giemsa à condition de pratiquer une surcoloration de plus de 30 minutes avec un colorant dilué dans une eau de pH compris entre 7,2 et 7,4 sur des frottis frais (pas plus de quelques heures) et très fins. Les **modifications du globule rouge parasité** commencent très tôt. Les taches de Maurer sont concomitantes aux modifications de la membrane externe visibles au microscope électronique et qui provoquent la formation de "rosettes" (adhérence de globules normaux à un globule parasité) et l'adhérence des globules parasités à l'endothélium vasculaire.

Remarque importante

Les trophozoïtes âgés, de même que les schizontes, ne se retrouvent pas à l'examen du sang périphérique, les globules parasités par des formes en cours de maturation étant retenus dans les capillaires des organes internes.

Morphologie des stades schizogoniques

Le trophozoïte âgé est peu amiboïde et n'a pas de vacuole.

Le **schizonte mûr** contient en moyenne 16 grands noyaux; il est de forme ovale ou irrégulière, ne remplit pas complètement le globule rouge et le pigment est rassemblé au centre.

On peut observer les stades avancés de la schizogonie dans la rate, la moelle osseuse, le placenta chez la femme enceinte (séquestration d'érythrocytes parasités).

Chronologie de développement et longévité de l'infection

Durée des étapes du cycle (tableau 13-5)

La longévité de l'infection chez l'homme en l'absence de réinfection est de 6 mois à 3 ans.

Pouvoir pathogène

P. falciparum est l'agent de la fièvre tierce maligne (fièvre en théorie à périodicité de 48 heures). De graves complications peuvent survenir au cours de l'accès, d'où le nom d'"accès pernicieux".

La séquestration des érythrocytes contenant des schizontes de *P. falciparum* est la cause d'importants ralentissements circulatoires dans la plupart des viscères. Au niveau du cerveau, l'anoxie provoque des troubles de la conscience.

Les manifestations du paludisme grave ou compliqué ont été énumérées dans de nombreuses études cliniques, les plus fréquemment citées étant le paludisme cérébral (coma) et la fièvre bilieuse hémoglobi-nurique.

Distribution géographique

Parasite cosmopolite avec nette prédominance dans les pays tropicaux, il a été éradiqué du bassin méditerranéen et du sud des Etats-Unis d'Amérique. Il constitue toujours un grave problème dans la plupart des pays tropicaux: Afrique au sud du Sahara, Asie du Sud et du Sud-Est, Amérique centrale, Amérique du Sud.

Hôtes

P. falciparum peut infecter l'homme et, expérimentalement, quelques singes splénectomisés (Chimpanzé, *Aotus*, *Saimiri*).

Les vecteurs sont nombreux: *Anopheles gambiae*, *An. funestus* en Afrique, *An. labranchiae atroparvus* en Afrique du Nord, *An. quadrimaculatus*, *An. albimanus* en Amérique centrale, *An. dirus*, *An. minimus*, *An. stephensi* en Asie, etc. Soixante six espèces d'anophèles transmettrices sont citées par Garnham.

1	fécondation et formation d'ookinètes	24 à 48 heures	
2	maturation des oocystes	9 jours à 25 °C	
3	délai d'invasion des glandes salivaires (cases 1+2)		10 jours
4	séjour des sporozoïtes dans la circulation sanguine de l'hôte vertébré	1 heure max.	
5	schizogonie hépatique normale (forme rapide)		6 jours
6	schizogonie hépatique lente (hypnozoïtes)	inexistante	
7	schizogonie érythrocytaire	48 heures	
8	gamétogenèse (jusqu'à maturité) à partir des mérozoïtes issus des schizontes hépatiques		10 jours
9	Durée minimale du cycle complet (gamétocyte donneur - gamétocyte receveur) (cases 3+5+8)		26 jours

Tableau 13-5

5. L'immunité dans le paludisme

5.1 Définitions

Immunité naturelle

Eat réfractaire d'un hôte vis-à-vis d'un parasite, relevant de la constitution génétique de l'hôte (incapacité de *P. berghei* du rongeur à se développer dans les globules rouges de l'homme; impossibilité pour des mérozoïtes des plasmodiums humains à entrer dans des ovalocytes, etc...).

Immunité acquise de type "prémunition"

Eat immunitaire (permanent en zone endémique), conférant une protection relative acquise progressivement (2 à 6 ans), provoqué et entretenu par la présence du parasite dans l'organisme de l'hôte. Il s'estompe après le départ de la zone d'endémie, peu après la disparition des parasites (12 à 24 mois).

Immunité congénitale

Transmission à l'enfant d'immunoglobulines (IgG) synthétisées chez la mère, par passage transplacentaire: le nouveau-né sera protégé pendant environ 6 mois contre les accès graves.

5.2 Les antigènes de *Plasmodium*

Une série de protéines antigéniques ont été isolées de *P. falciparum* au cours de son cycle et définies biochimiquement. Elle ont fait l'objet d'un inventaire poussé en vue de la production d'un vaccin.

Une protéine, appelée "circumsporozoïtique" ("circumsporozoïte protéine", CSP), située à la surface de la membrane externe, domine le stade sporozoïte. Elle comporte 412 acides aminés, dont 40 p.100 sont des séquences répétées en tandem. L'épitope le plus immunogène est un petit peptide de quatre acides aminés: asparagine (N), alanine (A), asparagine (N) et proline (P), soit la séquence NANP. Elle a été essayée comme vaccin et utilisée comme antigène pour les tests sérologiques. La CSP ne se retrouve pas dans les autres stades du plasmodium.

Remarque

Pour évoquer la variabilité qui existe d'un plasmodium à l'autre, il est intéressant de noter que la structure du peptide épitope (CSP) des sporozoïtes de *P. vivax* diffère de celui de *P. falciparum* par les acides aminés qui le composent : arginine (R), acide aspartique (D), glycine (G), glutamine (Q), proline (P), alanine (A).

Le stade schizogonique hépatique, phase de transition entre sporozoïte et mérozoïtes, exprime des antigènes spécifiques à la surface des hépatocytes parasités. Plusieurs protéines spécifiques ont été identifiées en même temps que, déjà, des antigènes de mérozoïtes.

Dans les stades schizogoniques sanguins, les principaux antigènes sont ceux de la surface et des rhoptries du mérozoïte, ceux du schizonte mûr et de la vacuole parasitophore et celui de la surface de l'érythrocyte parasité au stade anneau.

Plusieurs protéines spécifiques du stade gamétocyte ont été décrites ainsi qu'une protéine présente sur les zygotes et les ookinètes.

La plupart de ces antigènes varient d'une souche à l'autre de *P. falciparum* et, a fortiori, d'une espèce à l'autre de plasmodium.

5.3 Réponse immune

Au cours de l'infection plasmodique, le système immunitaire est tenu de réagir contre tous les antigènes relargués par le parasite. La majorité des antigènes n'induisent pas d'immunité protectrice: les anticorps concernés sont des témoins d'un contact récent avec le parasite, ni plus ni moins.

Les antigènes qui induisent la protection sont situés à la surface du parasite. Ils sont spécifiques de stade, d'où l'absence de protection croisée entre immunité anti-sporozoïte, anti-mérozoïte et anti-gamétocyte.

De plus, il est étonnant de constater qu'une protection efficace contre les formes asexuées du sang

n'est acquise, en zone endémique, qu'après plus de 6 ou 8 ans de contact avec les parasites. C'est en effet vers cet âge que les densités parasitaires baissent de manière significative chez les enfants pourtant continuellement infectés. Une explication plausible serait que les parasites qui se succèdent chez l'enfant, suite aux multiples inoculations par le moustique, présentent une diversité génétique énorme qui se traduit au niveau des schizontes sanguins par des contenus antigéniques différents (polymorphisme antigénique). Le sporozoïte est en effet un stade hybride résultant de la fécondation de deux gamètes pouvant avoir des origines différentes.

5.4 Mécanismes de protection

Les anticorps participent à la protection aussi bien que les cellules T et les monocytes sécréteurs de monokines.

La formation de complexes antigènes-anticorps au niveau de la CSP facilite la phagocytose des sporozoïtes et leur destruction dans les macrophages.

Pour le stade hépatique, ce sont les lymphocytes T cytotoxiques qui sont responsables de la cytotoxicité sur l'hépatocyte infecté exprimant l'antigène parasite en surface par l'intermédiaire du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. L'immunité anti-sporozoïte comme l'immunité anti-mérozoïte pourrait agir indirectement sur le parasite et sa cellule hôte, respectivement au début et à la fin du développement du schizonte, au moment où les antigènes spécifiques de ces stades sont exprimés par l'hépatocyte infecté: sécrétion de cytokines, particulièrement l'interféron γ (IFN γ) et l'interleukine 6 (IL6).

Au niveau de la surface des mérozoïtes, c'est une opsonisation qui a lieu. Elle neutralise les sites de reconnaissance cellulaire et interfère donc avec le mécanisme d'invasion des érythrocytes. Les parasites intracellulaires pourraient être atteints par les lymphokines et les globules rouges infectés peuvent également subir l'opsonisation par les anticorps reconnaissant les antigènes parasites exposés en surface.

La reconnaissance des antigènes de surface des gamétocytes et leur opsonisation les rend inaptes à la fécondation.

5.5 Immunité congénitale

Les accès graves de paludisme s'observent rarement chez le nouveau-né d'une mère vivant en région d'endémie, alors qu'il est soumis, dès sa naissance,

aux piqûres des anophèles. Toutefois, une parasitémie peut apparaître.

Cette protection s'explique par le fait que le nouveau-né reçoit les anticorps protecteurs (IgG) de sa mère par la voie transplacentaire, puis par le colostrum et même par le lait (très peu). Ces anticorps acquis passivement par le nourrisson, sans qu'aucune cellule de son organisme ne soit capable de les synthétiser, sont métabolisés progressivement et bientôt, l'enfant ne recevant plus l'aide maternelle dans ce domaine, sera soumis au risque d'infection aiguë par manque d'un système de défense spécifique. A ce moment, on observe simultanément chez le nourrisson, une baisse du taux des IgG anti-plasmodium et une augmentation de son taux d'IgM spécifiques, ceux-ci étant les premiers à apparaître, synthétisés par l'enfant en présence d'une stimulation antigénique (présence du parasite).

6. Physiopathologie du paludisme

Elle est encore très imparfaitement connue.

6.1 Effets généraux

Remarque importante

Les stades exo-érythrocytaires ne donnent lieu à aucune pathologie.

La schizogonie érythrocytaire provoque une anoxie dans tous les organes par trois mécanismes différents.

L'activité de multiplication du parasite entraîne la sécrétion du "Tumor Necrosis Factor" (TNF) par les macrophages activés par les interleukines des lymphocytes T CD4⁺. Cette cytokine jouerait un rôle dans la production des lésions vasculaires, causant des nécroses hémorragiques.

Des ralentissements circulatoires sont causés au niveau des capillaires par la perte d'élasticité des érythrocytes parasités. S'il s'agit de *P. falciparum*, l'adhérence des érythrocytes parasités à l'endothélium du réseau veineux post-capillaire pourra aller jusqu'à l'anoxie tissulaire.

L'anémie s'installe progressivement, due à l'hémolyse permanente.

6.2 Effets sur les principaux organes

Le sang

Les érythrocytes sont détruits par les parasites qu'ils hébergent.

Quant aux hématies non parasitées de sujet en accès de paludisme, elles peuvent être agglutinées par le sérum de Coombs, preuve qu'elles sont recouvertes d'immunoglobulines plasmatiques. La présence de ces dernières ne s'explique que si des antigènes plasmodiques solubles dans le plasma ont au préalable adhéré à la surface de ces globules. En présence de complément, ces érythrocytes opsonisés subissent l'hémolyse ou sont phagocytés par les macrophages.

L'hémoglobine libérée par l'hémolyse provoque une surcharge rénale et est partiellement transformée dans le foie en bilirubine. L'excès est éliminé dans les urines (hémoglobinurie).

L'hémolyse brutale et massive est la cause du syndrome appelé "fièvre bilieuse hémoglobino-urique" ("Blackwater Fever"). On a accusé la quinine d'être le facteur déclenchant chez des sujets présentant de fortes parasitémies.

D'autre part, l'utilisation de l'hémoglobine par le parasite amène la précipitation dans son cytoplasme, de granules de pigment (hémozoïne). Le pigment accumulé dans le cytoplasme du schizonte est relargué dans le plasma lors de la libération des mérozoïtes. Il est phagocyté par les macrophages et les histiocytes (leucocytes mélanifères). L'hémossidérine de couleur jaune sombre provient de la transformation de l'hémoglobine et de l'hémozoïne par les histiocytes.

Les thrombocytes, enfin, sont détruits par des mécanismes encore mal précisés.

La moelle osseuse

La lignée érythrocytaire est hypertrophiée pour compenser l'anémie. Les lignées leucocytaires sont peu perturbées. En cas d'infection à *P. falciparum*, des schizontes y sont retrouvés.

La rate

L'augmentation de volume notée dans l'infection paludéenne est provoquée par l'hypertrophie de la pulpe blanche (lymphocytes petits et grands, cellules réticulaires, macrophages).

L'érythrophagocytose est accélérée par deux phénomènes: activation des macrophages et fixation d'immunoglobulines sur la paroi des érythrocytes, infectés ou non. L'activité de phagocytose concerne aussi le pigment parasitaire et les débris cellulaires.

On observe une rate congestive, de consistance molle. Sa rupture est aisée à cause de la fragilité augmentée de la capsule. Sa couleur rouge foncé, parfois

brune est due à l'accumulation du pigment repris par les phagocytes.

Remarque

Le poids moyen de la rate chez des sujets autopsiés est de 3,2 p.1000 du poids du corps en Grande-Bretagne et de 5 à 8 p.1000 en Afrique centrale.

La splénomégalie constitue un signe qui accompagne le développement de la parasitémie. Il sert de base à une observation épidémiométrique: l'index splénique. Celui-ci rend compte de la fréquence des rates hypertrophiées dans une population et constitue une mesure de l'endémie malarienne dans une zone donnée.

Le syndrome de "splénomégalie hyperréactive palustre", connu anciennement sous le nom de "splénomégalie tropicale", est une maladie des immunocomplexes provoquée par une réaction démesurée de la rate à la stimulation prolongée des éléments réticulo-endothéliaux par des immuns complexes circulants. Il en résulte une splénomégalie chronique, un hypersplénisme avec chute des trois lignées sanguines et production d'anticorps IgG et IgM en quantité exagérée.

Dans le "paludisme viscéral évolutif mineur", appelé aussi "paludisme subaigu de longue durée", la splénomégalie est souvent massive et accompagnée de signes cliniques liés à l'anémie (adynamie, pâleur des conjonctives...).

Le foie

La schizogonie exo-érythrocytaire ne produit aucune lésion inflammatoire. La destruction par les schizontes d'un certain nombre de cellules parenchymateuses passe inaperçue.

L'hypertrophie du SRE (cellules de Küpffer) chargé de la phagocytose des débris et des pigments arrive à obstruer les veines lobulaires. L'hépatomégalie est légère et ne survient qu'à la longue, chez les sujets qui ont fait des accès de malaria à répétition.

Les reins

La formation de complexes antigènes-anticorps et leur dépôt dans la membrane basale cause une surcharge du rein et une diminution de la capacité d'épuration de cet organe, déjà anormalement sollicité en cas d'hémolyse.

La thrombose des artérioles des glomérules rénaux, l'anoxie des cellules des tubes contournés et l'apparition de signes de glomérulonéphrite sont des phénomènes souvent observés. Une dégénérescence

locale est possible, pouvant aboutir à la néphrose (complication fréquente pour *P. malariae*).

Le blocage rénal par destruction massive de globules rouges est le danger principal de la fièvre bilieuse hémoglobinurique.

Le système nerveux central

La schizogonie profonde de *P. falciparum* est à l'origine de complications redoutables dont la malaria cérébrale. Celle-ci consiste en des thromboses capillaires responsables de lésions vasculaires et hémorragiques, provoquant des altérations dégénératives des cellules nerveuses, entourées d'infiltrats cellulaires.

Plusieurs théories sont en présence pour expliquer ces phénomènes:

- obstacles mécaniques sur la circulation micro-capillaire et veineuse à cause d'une déformabilité diminuée des érythrocytes parasités et de la formation de "rosettes" constituées d'un globule rouge parasité auquel adhèrent, par un mécanisme non élucidé (les antigènes et les immunoglobulines exposés à sa surface joueraient un rôle), des érythrocytes normaux; ces phénomènes causent une diminution du débit circulatoire et un coma métabolique réversible;
- adhérence immunologique de globules parasités à l'endothélium vasculaire post-capillaires causant des ralentissements circulatoires importants; cette adhérence serait sous la dépendance de certaines protéines de surface des globules parasités visibles au microscope électronique (protubérances ou "knobs"), des lymphocytes T CD4⁺, de certaines interleukines, en particulier du TNF, et de récepteurs endothéliaux du type ICAM-1.

L'expression symptomatologique consistera en une hémiplégie ou des convulsions (zones motrices), des troubles thermorégulateurs avec hyperpyrexie (hypothalamus), une altération progressive de la conscience si le cerveau entier est entrepris.

Le placenta

Les villosités placentaires baignent dans de larges sinus où le sang maternel circule au ralenti. Les espaces entre les villosités sont un excellent refuge pour les globules rouges parasités par *P. falciparum*. L'accumulation des globules parasités, collant les uns aux autres, détruits sur place, crée un appel de macrophages. Cet engorgement peut causer un blocage des espaces intervillositaires et une thrombose placentaire. La diminution des échanges foeto-maternels est une des raisons pour lesquelles la chimioprophylaxie est pré-

conisée chez la femme enceinte: elle vise à abaisser le nombre de parasites en circulation.

7. Diagnostic du paludisme

7.1 Diagnostic clinique

C'est la constatation d'un accès fébrile, décrit classiquement avec sa périodicité et sa séquence: frissons, chaleur et transpiration (figure 13-8).

En zone d'endémie, l'immunité et les infections mixtes embrouillent le tableau clinique. La difficulté vient des parasitémies asymptomatiques.

En pathologie d'importation, la profession, les notions de voyage récent et d'interruption prématurée d'une chimioprophylaxie doivent faire envisager ce diagnostic. L'éventualité du paludisme chez les voyageurs à leur retour est généralement ignorée.

7.2 Le diagnostic spécifique

Les techniques de diagnostic actuellement en usage comprennent la mise en évidence de parasites dans le sang et la titration des anticorps antiplasmodium dans le sérum.

Actuellement à l'étude, la détection d'antigène plasmodial dans le sang total à l'aide d'anticorps monoclonaux ou le repérage d'ADN plasmodial par hybridation avec des sondes marquées ou après amplification du type "polychain reaction" (PCR) détrôneront peut-être les méthodes microscopiques traditionnelles, éprouvées mais imparfaites et exigeant, pour être effectuées correctement, un personnel suffisamment expérimenté.

Microscopie: la goutte épaisse et le frottis

Sur ces techniques seules, repose actuellement le diagnostic de certitude.

Pour les parasites sanguicoles, la mise en évidence du parasite se fait habituellement par l'examen au microscope d'une goutte épaisse (GE) et d'un frottis de sang colorés au Giemsa. Dans la GE, les éléments du sang sont concentrés sur une surface beaucoup plus petite que dans le frottis, ce qui accélère la recherche. La destruction des érythrocytes rendra la reconnaissance des parasites plus difficile mais le gain de sensibilité par rapport au frottis est d'environ 20 fois (tableau 13-6). On peut estimer que l'examen de 100 champs microscopiques (oculaire X10, objectif X100) correspond à un volume examiné de 0,25 μ l.

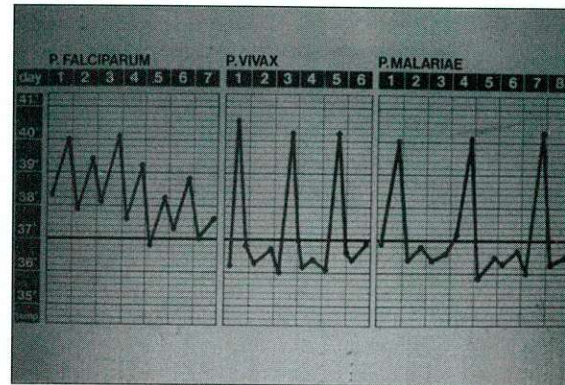


Figure 13-8

La fièvre, symptôme cardinal

Courbes thermiques pour les fièvres tierces (un jour sans fièvre entre les accès) et quartes (deux jours sans fièvre).

Le frottis est indispensable pour le diagnostic d'espèce avec répercussion sur le traitement: pour *P. falciparum*, complications possibles et résistance probable aux traitements habituels; pour *P. vivax* et *P. ovale*, existence de rechutes (hypnozoïtes insensibles aux traitements usuels de l'accès); pour *P. malariae*, complications rénales.

Il faut signaler l'existence fréquente d'infections mixtes où *P. falciparum* est accompagné de *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. malariae*.

• GOUTTE ÉPAISSE

L'examen de la GE peut détecter des parasitémies de 10-20 parasites par μ l.

La numération parasitaire se fait en comptant le nombre de parasites par 200 leucocytes. On admet que la leucocytémie moyenne est de 6000 par μ l. En multipliant le nombre de parasites comptés par 30, on obtient une approximation du nombre de parasites par μ l.

Une méthode plus rapide consiste à compter, dans 100 champs microscopiques, le nombre de champs contenant un ou des parasites. Le résultat est exprimé en pourcentage de champs positifs. Il a été calculé qu'à partir de 500 parasites par μ l, tous les champs contiennent au moins 1 parasite.

• FROTTIS

L'examen des frottis permet de détecter des parasitémies de l'ordre de 200 parasites par μ l.

Dans le frottis, l'utilisation d'un oculaire quadrillé, permettra la numération des globules rouges parasités par champ. Le rapport de ce nombre sur le nombre total d'hématies par champ donne le pourcentage d'hématies parasitées et donc le nombre de parasites par μ l, en admettant que le nombre normal de globules rouges par μ l soit de 4 à 5 millions. Si le sujet est très anémié, il faudra ajuster les valeurs mais

	G.R. dans 100 ch.	G.B. dans 100 ch.	Volume examiné	Sensibilité en 10 min. d'examen
FROTTIS	80.000	125	0,010-0,016 µl	100-300 parasites/µl
GOUTTE EPAISSE	détruits	2500	0,25-0,31 µl	10-20 parasites/µl

Tableau 13-6

Sensibilité de l'examen microscopique

L'approximation reste acceptable entre 3 et 5 millions de globules rouges par µl.

- INTÉRÊT DE LA NUMÉRATION PARASITAIRE

L'importance de la détermination de la densité parasitaire est relative: des sujets semi-immuns peuvent héberger des parasites du paludisme sans symptômes de maladie tandis qu'en l'absence d'immunité spécifique, toute présence de parasites dans le sang est à l'origine d'une pathologie aiguë en incubation ou chronique.

On peut évoquer trois niveaux: le seuil de patence, le seuil clinique et, dans les infections à *P. falciparum*, le seuil de danger du paludisme pernicieux.

*Seuil de patence et seuil clinique
en région endémique*

En Afrique au sud du Sahara, la parasitémie peut être observée chez 60 à 70 p.100 de la population saine lors d'un seul examen en GE et chez presque 100 p.100 des individus si des examens répétés sont pratiqués. Les parasitémies en dessous de 10.000/µl ne sont pas souvent symptomatiques et lorsqu'on les découvre chez des patients fébriles, on recherche une autre étiologie. Cette densité seuil de 10.000/µl représente 0,2 p.100 de globules rouges parasités (environ 2 par champ dans un frottis). La tolérance est variable d'un sujet à l'autre, elle se situe généralement entre 5.000 et 15.000 parasites par µl.

De façon générale, il existe une corrélation entre la parasitémie et l'apparition des signes cliniques et leur gravité. Cependant les enfants et, dans une moindre mesure les adultes, peuvent dans les régions africaines, tolérer des parasitémies très élevées sans présenter de symptômes cliniques. Au Niger, Rougemont a observé des parasitémies de plus de 100.000/µl chez des sujets non fébriles!

Chez les personnes non immunes, des parasitémies faibles peuvent donner lieu à des phénomènes pathologiques.

Seuil de gravité

En l'absence d'immunité surtout, la corrélation entre la densité parasitaire de *P. falciparum* et la gra-

vité des symptômes est nette. La grande majorité des patients avec malaria cérébrale ont une hyperparasitémie.

Chez les enfants atteints de malaria cérébrale, les parasitémies qui excèdent 1 million/µl (20 p.100 de GR parasités) sont associées de manière significative à une issue fatale.

Dans les régions où le paludisme n'est pas stable (endémicité fluctuante, prémunition peu efficace), les patients infectés par *P. falciparum* et présentant plus de 100.000 parasites par µl (plus de 250 parasites par champ de GE ou 2 p.100 de globules rouges parasités) nécessitent une attention particulière, surtout si l'hématocrite est bas.

Remarques importantes

La présence de schizontes (formes parasitaires plurinucléées) de *P. falciparum* dans le sang périphérique est un signe de gravité.

Dans les infections à *P. falciparum*, l'examen de séries de frottis prélevés toutes les 6 à 12 heures montre d'importantes fluctuations dans les densités parasitaires. Ceci est dû à la séquestration des érythrocytes parasités au moment de la schizogonie. Dans les infections où le développement des parasites est synchrone, ceux-ci peuvent disparaître temporairement des prélèvements.

L'auto-médication et la prophylaxie peuvent réduire la parasitémie à des niveaux subpatents: on fera des frottis en séries tant qu'il subsiste un doute quant au diagnostic. Les méthodes d'enrichissement peuvent d'avérer utiles.

De toutes façons, un traitement présomptif sera administré devant tout syndrome clinique grave évocateur, sans attendre l'apparition des parasites dans les prélèvements.

Méthodes d'enrichissement

Une technique basée sur une centrifugation différentielle et le fait connu que l'acridine orange colore les cellules contenant de l'acide nucléique y compris les plasmodiums, a été proposée par Becton-Dickinson sous le nom de "quantitative buffy coat" (QBC, voir chapitre 19).

Dans le tube QBC (capillaire tapissé d'acridine orange, d'un anticoagulant et muni d'un flotteur) et après centrifugation, les hématies contenant des trophozoïtes sont concentrées au dessus des hématies non parasitées, au niveau du flotteur et étalées autour de celui-ci contre la paroi du capillaire. Les parasites apparaissent nettement sous éclairage ultraviolet grâce à l'émission, par le noyau du parasite, de lumière fluorescente. Le pigment malarien est bien visible sous forme de granules foncés dans les phagocytes ou dans les parasites eux-mêmes et contraste avec la fluorescence de la chromatine nucléaire.

Le principal avantage de la méthode QBC par rapport à la GE est certainement la rapidité des manipulations et de la lecture. Par ailleurs, le volume examiné étant de 60 μl de sang, on peut s'attendre à une meilleure sensibilité par rapport à la GE (où 500 champs examinés équivalent à 1,2 μl). Cependant les auteurs qui ont testé la méthode ne sont pas tous d'accord sur ce point.

Méthodes d'introduction récente

Elles permettent la reconnaissance de molécules spécifiques du parasite.

- DÉTECTION D'ANTIGÈNES DE PLASMODIUM

Des anticorps monoclonaux permettent la détection et de l'identification des agents pathogènes. La détection d'un antigène parasitaire (produit du métabolisme ou de la lyse parasitaire, soluble dans le plasma) témoigne d'une infection actuelle de façon plus rapide et plus sensible que la microscopie. Elle devrait pouvoir identifier le parasite avec précision et théoriquement distinguer non seulement l'espèce plasmodiale mais aussi des sous-populations à l'intérieur d'une même espèce.

Antigènes solubles de formes asexuées sanguines dans le plasma

Depuis quelques années, de nombreuses protéines de stades schizogoniques ont été décrites et les anticorps monoclonaux correspondants s'accumulent. Cependant, les molécules utiles sont des peptides (épitopes) provenant de la scission des protéines natives du parasite et dénaturées au cours des manipulations d'extraction.

Face à une telle abondance de réactifs monospécifiques différents, il faudra attendre pour qu'une hiérarchie apparaisse dans leur valeur respective pour le diagnostic du paludisme aigu ou des infections inapparentes.

Une capture d'antigène riche en histidine ("histidine-rich protein", HRP-II) de *P. falciparum* a cependant été essayée par Becton-Dickinson sous forme d'un "dip-stick test" (ParaSight F®). Il s'agit d'un bâtonnet en fibres de cellulose, imprégné d'un IgG1 monoclonal dirigé contre un peptide synthétique constitutif de la protéine. Ce bâtonnet est d'abord trempé dans un échantillon de sang hémolysé du sujet suspect de paludisme et ensuite dans un sérum polyclonal anti-HRP-II conjugué à des liposomes contenant un colorant rose. Par rapport à la microscopie, la sensibilité du test est de 58 p.100 pour des parasitemies moyennes de 63

parasites/ μl et de 90 à 100 p.100 pour des parasitemies moyennes de 1290 parasites/ μl .

Antigènes figurés dans le sang

La recherche de parasites au microscope peut se faire après une réaction d'immunofluorescence. Le test "monofluo kit" pour détection de *P. falciparum* est commercialisé par l'Institut Pasteur, Paris.

L'utilité n'est pourtant pas évidente car le temps consacré à la préparation est considérable et le gain de sensibilité n'est pas significatif par rapport à la GE colorée au Giemsa.

- RECHERCHE DE MATÉRIEL GÉNIQUE DANS UN PRÉLÈVEMENT

Sondes nucléiques

Le choix judicieux des séquences de nucléotides permettra en théorie, dans l'avenir, le repérage dans un prélèvement (sang parasité) des différentes espèces de *Plasmodium* ou même d'une lignée possédant des caractères particuliers, par exemple la résistance à un médicament antipaludique. Ces séquences constituent des réactifs très spécifiques à condition d'avoir une longueur suffisante.

Une sonde à *P. falciparum* décèle régulièrement des parasitemies de 500/ μl . Dans une étude comparative par rapport à la microscopie, la sensibilité d'une sonde a été de 65 p.100.

L'amplification génique ("polymerase chain reaction", PCR)

La PCR, beaucoup plus sensible, amplifie les séquences reconnues et les rend facilement repérables. L'amplification génique n'est pas encore évaluée dans le diagnostic du paludisme (ou plutôt dans la détection de plasmodiums dans un prélèvement, ce qui est très différent, on l'a vu, du diagnostic du paludisme clinique). Il restera à déterminer dans quel cas, mis à part les contrôles de sang de transfusion en dehors des zones d'endémie et certains programmes de recherche pointus, il est nécessaire et utile de s'assurer que la dernière trace de parasite a disparu du sang d'un sujet.

Sérologie

- ANTIGÈNES ET RÉACTIONS UTILISÉS

Protéines constitutives du parasite ou produits excrétés de son métabolisme, chacun des quelques 30 antigènes de plasmodium a une localisation qui lui est propre: cytoplasme ou membrane du parasite et de l'érythrocyte parasité, plasma.

Ces antigènes peuvent actuellement être séparés et purifiés chimiquement, après destruction du parasite.

Antigènes de sporozoïtes

Une fraction antigénique purifiée de sporozoïte est maintenant disponible. C'est un épitope de la protéine "circumsporozoïtique" (CSP, déjà citée dans le paragraphe traitant des antigènes de plasmodium), utilisé avec succès par les épidémiologistes dans une réaction immuno-enzymatique pour titrer chez les sujets exposés aux piqûres infectantes, les anticorps spécifiques dirigés contre les sporozoïtes. Ces antigènes ne sont pas utiles pour le diagnostic d'un accès clinique mais ils donnent un renseignement précis d'ordre épidémiologique (fréquence des inoculations de sporozoïtes).

Antigènes de la schizogonie érythrocytaire

Ce sont les antigènes des formes asexuées du sang qui sont utilisés en routine clinique ou épidémiologique puisque c'est ce stade qui provoque les symptômes par sa prolifération et celui qui persiste chez le sujet asymptomatique immun.

Parmi les protéines déjà connues des formes sanguines, il n'en existe aucune qui puisse à elle seule, jusqu'à présent, jouer le rôle d'antigène de diagnostic précoce d'une infection plasmodiale. On continue donc à utiliser, en sérologie de routine, des parasites entiers, sous forme d'antigène figuré (intacts morphologiquement) ou de solutions de protéines parasitaires (parasites détruits et repris en solution dans un tampon).

Pour un diagnostic sensible et spécifique de l'infection plasmodiale, on est obligé de choisir, en outre, l'espèce qui a le plus de chance d'être en cause (réaction homologue). D'où la nécessité de doser les anticorps vis-à-vis de plusieurs espèces parasitaires (idéalement, les quatre espèces de parasites de l'homme) s'il s'agit, comme dans les centres de transfusion sanguine de régions non endémiques, de garantir l'absence de plasmodiums humains dans le sang des donneurs.

Dans la pratique, les schizontes endo-érythrocytaires de *P. falciparum* peuvent être obtenus par maturation synchrone *in vitro* (cultures continues) tandis que les parasites de la schizogonie érythrocytaire de *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. malariae*, qui ne sont pas cultivables, doivent être récoltés chez des patients atteints de paludisme aigu. A défaut de patients ou de cultures, il est également possible de recourir à des infections expérimentales d'animaux splénectomisés (singe

Aotus pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. malariae*, chimpanzé pour *P. ovale*).

Réactions utilisées

L'immunofluorescence indirecte (IFI), l'héماغlutination passive et les tests immuno-enzymatiques du type ELISA sont actuellement les plus utilisés.

Ces trois techniques, dans l'état actuel des préparations antigéniques, sont grossières et décèlent un contact global, passé ou présent, de l'organisme avec les parasites. La mosaïque antigénique est présentée en vrac soit sous forme d'antigène figuré (plasmodiums en frottis ou étalement plus épais, sur une lame), soit sous forme d'un antigène soluble (mélange de protéines parasitaires en solution aqueuse).

• UTILITÉ DES MÉTHODES SÉROLOGIQUES

La présence de plasmodiums dans l'organisme d'un sujet est à l'origine de la synthèse d'anticorps dirigés contre les antigènes de ce parasite. Le nombre et la diversité, déjà mentionnés, des antigènes dans les stades de la schizogonie érythrocytaire compliquent l'interprétation de la réponse immune. D'autre part, les caractéristiques mêmes de cette réponse immune limitent l'utilité pratique de la sérologie dans le domaine du diagnostic.

La quantité d'anticorps dosée par les méthodes sérologiques sera proportionnelle à l'intensité et à la durée de l'infection. La sérologie est plus sensible que la mise en évidence du parasite car elle est indépendante des fluctuations à court terme de la parasitémie et reste positive en cas de parasitémie subpatente. De ce fait, l'existence dans les pays endémiques de très nombreux porteurs asymptomatiques de parasites, jouissant à l'âge adulte d'une immunité protectrice induite par un contact prolongé et contemporain avec le parasite, y anéantit la valeur diagnostique des tests sérologiques.

Dans l'accès de paludisme clinique, l'abondance de parasites dans le sang facilite l'examen microscopique, toujours péremptoire, et produit, après un délai variable, une élévation du titre d'anticorps anti-stades de la schizogonie érythrocytaire. Lors d'une primo-infection, les anticorps ne deviennent en effet décelables que lorsque la parasitémie a atteint, depuis plusieurs jours, des niveaux cliniques. Ce délai n'est pas observé lors d'une réinfection.

La sérologie possède cependant trois indications précises:

- dans les cas de fièvre d'origine indéterminée. Lorsque le patient a suivi une chimioprophylaxie irrégulière d'efficacité douteuse ou que le traitement curatif a été commencé sans attendre le

prélèvement, la parasitémie peut être masquée. La constatation d'un titre élevé d'anticorps précitera souvent la cause de la fièvre, tandis que leur absence permettra d'exclure l'étiologie malarienne.

- dans les centres de transfusion sanguine des zones non endémiques. Les donneurs de sang ayant voyagé récemment pourront être porteurs de parasites en dehors d'accès francs. Dans ce cas aussi, il s'agira d'exclure la présence d'une parasitémie asymptomatique et souvent subpatente.
- dans les études épidémiologiques. Le titre moyen d'anticorps anti-formes asexuées sanguines dans un échantillon de population permet d'évaluer l'intensité du contact avec les parasites, qui lui-même est tributaire de la transmission locale.

7.3 Le diagnostic biologique non spécifique

Il est utile surtout pour surveiller l'apparition des formes graves. Les chiffres donnés entre parenthèses sont des cotes d'alerte laissant présager des complications d'une extrême gravité!

Anémie hémolytique

L'hémolyse est présente dans tous les cas de paludisme. Même le paludisme viscéral évolutif, d'allure chronique, déterminera une hémolyse avec anémie grave d'installation progressive. L'anémie de type hémolytique est donc constante.

D'importance variable, normochrome ou hypochrome, elle est mise en évidence par le dosage de l'hémoglobine (< 7 g/dl), la mesure de l'hématocrite ou la numération des hématies. Ces valeurs pourront être faussées par l'existence d'une hémococoncentration mise en évidence par le dosage du sodium plasmatique. La numération des réticulocytes est très utile pour déceler une anémie en cours de régénération.

Le dosage d'urobilinogène dans l'urine confirmera l'hémolyse. Dans le plasma, on recherchera la diminution de l'haptoglobine (utilisée pour fixer l'hémoglobine libre et former avec elle de grosses molécules métabolisées par la rate et le foie) et l'augmentation de la bilirubine.

Glycémie

Le paludisme grave à *P. falciparum* cause une hypoglycémie, aggravée par l'effet hypoglycémiant de la quinine. On surveillera la glycémie ($< 0,40$ g/l).

Paramètres hépatiques

Les altérations de la fonction hépatique sont courantes dans le paludisme aigu. Généralement sans extériorisation clinique, elles peuvent être recherchées par le dosage des enzymes habituels: élévation de la lactate déshydrogénase (LDH) et de la glutamate pyruvate transaminase (SGPT). Le rapport albumine/globuline sériques est fortement abaissé du fait du déficit de la synthèse de l'albumine combinée à une hyperproduction d'immunoglobulines.

Le cholestérol est presque toujours diminué et les triglycérides augmentés dans les premiers jours de l'accès. Il faut quelques semaines pour la normalisation après traitement.

Paramètres rénaux

La fonction rénale devra donc être surveillée par le dosage de l'urée ($> 0,60$ g/l) ou de la créatinine plasmatique (> 30 mg/l). C'est dans le paludisme au long cours ou chronique que ces phénomènes sont les plus marqués. *P. malariae* est parfois responsable d'un syndrome néphrotique qui se caractérise par une albuminurie élevée accompagnée d'une hypo-albuminémie (< 30 g/l).

8. Traitement du paludisme

8.1 Définitions

Le traitement suppressif, curatif ou prophylactique, a pour but de guérir ou de prévenir un accès clinique sans pour autant viser à faire disparaître tous les parasites.

Le traitement radical a pour but d'éliminer tous les parasites de l'organisme.

Le traitement antirechute a pour but d'éliminer les schizontes pré-érythrocytaires à développement lent.

Le traitement présomptif est administré sans attendre le diagnostic de certitude.

La prophylaxie causale est une prévention totale d'infection érythrocytaire par action sur les formes pré-érythrocytaires.

La prophylaxie suppressive est la prévention de l'accès clinique. C'est la chimioprophylaxie comme on l'entend habituellement, par administration régulière de schizonticides sanguins.

Un schizonticide sanguin est un produit actif contre les formes asexuées du sang (cause des manifestations cliniques) et guérit l'accès de paludisme.

Un **schizonticide tissulaire** est un produit actif contre les hypnozoïtes murissant lentement dans les hépatocytes et prévient les rechutes.

Un **gamétocytocide** est un produit actif contre les gamétocytes, qui vise à interrompre la transmission.

Un **sporonticide** inhibe la maturation des gamétocytes et les rend inaptes à continuer le cycle sporogonique et interrompt la transmission.

8.2 Inventaire des produits (Tableau 13-7) et des associations

Tableau 13-7

PRODUITS	ACTION	UTILISATION
Quinine (<i>Quinimax</i> ®, <i>Pharmakina</i> ®)	Schizonticide sanguin	Per os: curatif de l'accès en cas de résistance à la chloroquine I.V. dans les accès pernicieux
4-amino quinoléines		
Chloroquine (<i>Nivaquine</i> ®, <i>Resochine</i> ®, <i>Aralen</i> ®, etc...)	Schizonticide sanguin	Traitement curatif des accès, attention aux résistances
Amodiaquine (<i>Flavoquine</i> ®)	Schizonticide sanguin	Traitement curatif des accès
8-aminoquinoléines		
Primaquine	Gamétocytocide et schizonticide tissulaire	Prévention des rechutes chez <i>P. vivax</i> et <i>P. ovale</i>
Acridines		
Quinacrine (<i>Atébrine</i> ®, <i>Mépacrine</i> ®)	Schizonticide sanguin	N'est plus employé
Antifoliniques	Schizonticides sanguins (action lente) et sporonticides	
Pyriméthamine (<i>Daraprim</i> ®, <i>Malocide</i> ®)		N'est plus jamais employée seule
Triméthoprime		
Proguanil (<i>Paludrine</i> ®)		Prophylaxie, en association avec la chloroquine
Sulfamides		
Sulfadoxine	Schizonticide sanguin (action lente)	Toujours associé aux antifoliniques (voir <i>Fansidar</i> ®)
Sulfaméthoxazole	Idem	Toujours associé aux antifoliniques (voir <i>Bactrim</i> ®)
Sulfones		
Dapsone	Idem	Toujours associé aux antifoliniques (voir <i>Maloprim</i> ®)
Cyclines		
Tétracycline	Schizonticide sanguin	Curatif de l'accès résistant (associé à la quinine)
Doxycycline (<i>Vibramycine</i> ®, <i>Vibratab</i> ®)	Idem	Prophylaxie; Curatif de l'accès résistant (associé à la quinine)
Lincosamine		
Clindamicine (<i>Dalacin</i> ®)	Schizonticide sanguin	Traitement curatif de l'accès résistant
Quinolone-méthanol		
Méfloquine (<i>Lariam</i> ®)	Schizonticide sanguin	Prophylaxie; Traitement curatif de l'accès
Phénanthrène-méthanol		
Halofantrine (<i>Halfan</i> ®)	Schizonticide sanguin	Traitement curatif de l'accès
Extraits de <i>Artémisia annua</i>		
Quinghaosu (<i>Artémisinine</i>) Artémether Artésunate	Schizonticide sanguins Action rapide	Traitement curatif de l'accès Accès pernicieux

Associations commercialisées

Sulfadoxine (500 mg) + pyriméthamine (25 mg) (*Fansidar*®)

Sulfaméthoxazole (400 mg) + triméthoprime (80 mg) (*Bactrim*®)

Dapsone (100 mg) + pyriméthamine (25 mg) (*Maloprim*®)

Sulfadoxine (500 mg) + pyriméthamine (25 mg) + méfloquine (250 mg) (*Fansimef*®)

8.3 Schémas prophylactiques

Outre la protection contre les moustiques (moustiquaires imprégnées d'insecticides, insecticides en spray dans la maison, répulsifs antimoustiques et fumigations) qui est la mesure de prévention la plus sûre, la prise d'une chimioprophylaxie reste recommandée pour les voyageurs et les immigrants non immuns entrant dans une région endémique.

Aucun schéma n'offre une sécurité totale à cause de la résistance de *P. falciparum* vis-à-vis des antipaludiques utilisables au long cours (prix, compliance, innocuité). Une mise à jour des recommandations détaillées par pays est effectuée chaque année dans le Bulletin Épidémiologique hebdomadaire publié par l'OMS.

Quatre schémas sont aujourd'hui préconisés.

Méfloquine: un comprimé (250 mg)/semaine. Il est recommandé de ne pas dépasser 16 semaines, à cause de l'accumulation du produit qui a une demi-vie de 20 jours dans le plasma. Des effets secondaires gênants sont à redouter chez 5 à 10 p. 100 des sujets.

Chloroquine: 100 mg/jour ou 300 mg en une prise/semaine. Efficace uniquement en Amérique Centrale et au Proche Orient.

Choroquine + proguanil, répartis comme suit (pour l'adulte): chloroquine, une prise de 300 mg (trois comprimés de 100 mg)/semaine plus proguanil, une prise de 200 mg (deux comprimés de 100 mg)/jour. L'efficacité de cette association est meilleure que celle de la chloroquine seule mais des résistances fréquentes sont à craindre dans certaines régions d'Afrique, en Amérique du Sud et en Asie à l'est de l'Inde.

Doxycycline: un comprimé ou une gélule de 100 mg/jour. Il faut la réserver à des cas exceptionnels (intolérance aux autres produits) et ne pas dépasser huit semaines d'administration.

8.4 Schémas thérapeutiques les plus employés

Monothérapies

Chloroquine ou amodiaquine: 25 mg de base/kg, répartis sur 3 jours (10,10, 5 mg par kg).

Fansidar® (sulfadoxine-pyriméthamine): 1 comprimé/20 kg (3 comprimés pour l'adulte) en dose unique.

Quinine: 25 mg de base/kg/jour, en 3 administrations (toutes les 8 heures), pendant 5 à 7 jours.

Méfloquine: dose unique d'environ 20 mg/kg, donnée en deux prises séparées par 8 heures (2 x 2 comprimés de 250 mg chez l'adulte).

Halofantrine: dose totale de 25 mg/kg per os, répartie sur 18 heures (3 administrations de 8 mg/kg, toutes les 9 heures, soit 3 x 500 mg chez l'adulte).

Artemisia annua : artémisinine, artémether, artésunate.

Remarque générale

L'emploi de l'artémisinine et de ses dérivés ne se justifie que dans les cas de paludisme à *P. falciparum* résistants aux autres médicaments.

- **Artémether** (ampoules de 1 ml contenant 80 mg en solution huileuse pour injections IM):
Premier jour (dose de charge): injection IM de 3,2 mg/kg
Deuxième au septième jour (maximum): une injection de 1,6 mg/kg/jour.
- **Artésunate** (ampoules de 1 ml pour injections IM ou IV contenant 60 mg de poudre anhydre d'acide artésunique à reconstituer immédiatement avant l'emploi dans 0,6 ml de bicarbonate de sodium à 5 p. cent)
premier jour: injection IV de 2 mg/kg (dose de charge), suivie de 1 mg/kg quatre et vingt-quatre heures plus tard
deuxième au septième jours (maximum): une injection de 1 mg/kg/jour

Remarques

Ces deux traitements sont réservés à l'accès pernicieux. Passer à la voie orale dès que possible (artésunate et artémisinine, voir page suivante)

Les associations à base de quinine

Un traitement complet à la quinine est difficilement supporté, voire abandonné par la majorité des patients, à cause des effets secondaires. L'association d'un autre produit permet d'écourter le traitement sans en diminuer l'efficacité.

Quinine + Fansidar®

Premier jour: quinine, 3 administrations de 8 mg de base (10 mg de bichlorhydrate)/kg
et Fansidar®, 1 comprimé/20 kg

Deuxième au quatrième jour : quinine, 3 administrations par jour de 8 mg de base (10 mg de bichlorhydrate)/kg

Quinine + cyclines

Pendant 4 jours : quinine, 3 prises de 8 mg de base/kg

en plus, pendant 7 jours:

tétracycline, 3 prises par jour de 8 mg/kg de poids ou bien doxycycline, 100 mg/jour (adulte)

Les associations à base de dérivés d'Artémisia annua

Artémisinine (capsules ou comprimés de 250 mg)

premier jour: 25 mg/kg

deuxième jour: 12,5 mg/kg plus **méfloquine** (15 à 25 mg/kg)

troisième jour: 12,5 mg/kg

Remarque

L'artémisinine existe aussi en suppositoires

Artésunate (comprimés de 50 mg)

premier jour: 5 mg/kg

deuxième jour: 2,5 mg/kg plus **méfloquine** (15 à 25 mg/kg)

troisième jour: 2,5 mg/kg

Remarque

Ces deux schémas à base d'*Artémisia* doivent être réservés aux cas non compliqués résistants aux autres antipaludiques

L'association Atovaquone - proguanil

Pendant trois jours (doses pour l'adulte):

atovaquone 1 g/jour en dose unique

proguanil 400 mg/jour en dose unique

8.5 Résistance des plasmodiums aux médicaments

Le seul vrai problème est constitué par la résistance de *P. falciparum* aux schizonticides sanguins.

Résistance à la chloroquine

Elle constitue le problème de loin le plus gênant, car ce médicament n'a pas son pareil quant à la sécu-

rité d'emploi, la facilité d'administration et le coût modeste. Elle sévit en Asie, du Vietnam à l'Inde et de la Malaisie à la Nouvelle-Guinée. En Afrique au sud du Sahara, la résistance est apparue partout mais elle est moins marquée à l'ouest. En Amérique du Sud, elle existe par endroits, dans la plupart des pays où le paludisme sévit.

Résistance à la quinine

Elle existe également, surtout en Asie où il est nécessaire d'augmenter les doses (25 à 30 mg/kg/jour pendant 7 à 10 jours) et d'y associer les cyclines pour venir à bout de certains accès cliniques. Dans beaucoup de régions d'Afrique aussi, les doses de quinine habituelles (25 mg/kg/jour pendant 3 à 4 jours) ne suffisent plus.

Résistance aux antifoliques

Elle existe partout par petits foyers et survient très rapidement après l'utilisation sur large échelle de la pyriméthamine ou des biguanides.

Mesure de la résistance

On peut mesurer la sensibilité de *P. falciparum* à n'importe quel antipaludique par des test *in vivo* : un traitement standard est administré au patient et la parasitémie est contrôlée pendant 7 jours. Pour les souches sensibles, la parasitémie disparaît définitivement vers le troisième jour. Le niveau de résistance R I est marqué par une négativation temporaire des prélèvements, suivie de recrudescence avant quatre semaines. Le niveau R II s'observe lorsque la parasitémie baisse jusqu'à environ 25 p.100 de sa valeur initiale, pas plus. La goutte épaisse peut devenir négative pendant un court moment. Le niveau R III est défini par une persistance de la parasitémie à plus de 75 p.100 de son niveau initial.

Les tests *in vitro* demandent plus de matériel et un laboratoire équipé d'électricité. Le sang parasité par *P. falciparum*, généralement prélevé chez des enfants asymptomatiques, est incubé à 37 °C pendant 24 heures au contact de doses croissantes d'un produit (chloroquine, méfloquine ou quinine). Les trophozoïtes de *P. falciparum* grandissent et deviennent des schizontes (reconnaissables à leurs noyaux multiples) dans les tubes (ou godets) témoins, tandis que la croissance des parasites sensibles au produit schizonticide est inhibée. A la fin du test, il faudra compter, pour chaque dose de produit, la proportion de formes asexuées qui ont deux noyaux ou plus et la comparer aux témoins.

Vérification de la prise de médicaments

Le dosage des médicaments dans le plasma ou les urines du patient est rudimentaire ou se fait par des méthodes chromatographiques sophistiquées ("High Pressure Liquid Chromatography") dans les laboratoires de chimie. Sur le terrain, il n'y a guère que le test de Dill et Glasko qui puisse détecter (non quantitatif) la chloroquine dans les urines. Récemment, des techniques immunologiques du type ELISA sur bandelettes, réalisables en périphérie, ont été proposées pour le dosage plasmatique de la quinine, la chloroquine et la pyriméthamine. Les évaluations sont en cours.

Traitements alternatifs

En cas de résistance à la chloroquine, on utilise les associations suivantes: Fansidar[®]; Fansimel[®]; Quinine + cyclines. En monothérapie, le Lariam[®], l'Hal-fan[®] et l'artémisinine sont utilisés.

Remarques

Avant d'évoquer la résistance, il faut éliminer les autres causes de non réponse au traitement:

- le produit administré *per os* n'a pas été entièrement résorbé (vomissements, diarrhée).
- le patient a cessé précocement de prendre les comprimés, par indocilité, négligence ou pour cause de réaction cutanée (prurit) à la prise de chloroquine.
- le médicament manufacturé est sous-dosé.

L'absence de réponse peut aussi avoir pour cause des affections concomitantes, éventuellement anergisantes (rickettsioses, virus). On sait que les médicaments antipaludiques sont considérablement aidés dans leur action par les défenses immunitaires de l'hôte: les doses suppressives de chloroquine sont moins élevées chez les sujets semi-immuns (10 mg/kg) que chez les sujets neufs (25 mg/kg).

gamétocytes ingérés lors du (des) repas infectant(s) (donc de la densité parasitaire) et de leur qualité. Ces deux facteurs sont influencés par l'état immunitaire du sujet.

La **durée de l'infection** est, en l'absence de nouvelles piqûres infectantes, de l'ordre de 1 an pour *P. falciparum*, de 2,5 ans en moyenne pour *P. vivax* et *P. ovale* et peut dépasser les 30 ans chez *P. malariae*.

La **densité parasitaire** est un paramètre important. Vu l'existence d'un seuil de patence et d'un seuil clinique, le clinicien ne perçoit donc, en s'occupant des malades, qu'une partie infime des parasites en circulation dans une communauté. L'épidémiologiste qui recherche une prévalence de l'infection en examinant les gouttes épaisses prélevées en zone d'endémie chez des individus sains, prendra en considération une partie plus importante de la population parasitaire. Le recours à la sérologie permet, quant à lui, de tenir compte des faibles niveaux parasitériques puisque toute stimulation antigénique induit une production d'anticorps.

L'**influence de l'immunité** sur la densité parasitaire est évidente en région endémique où la prémunition s'installe progressivement avec la durée de l'exposition aux piqûres infectantes. Dans les zones à paludisme stable (forte transmission constante), les densités parasitaires décroissent avec l'âge. Puisqu'il y a moins de mérozoïtes à chaque génération, il y a aussi moins de gamétocytes chez les sujets immuns, d'où transmission freinée et intensité du paludisme réduite (le nombre des gamétocytes baisse d'ailleurs de manière plus importante que le nombre de parasites asexués). Enfin, dans ces zones, la densité des gamétocytes sera plus haute chez l'enfant que chez l'adulte.

Remarque

La transmission directe de plasmodiums est possible mais n'a aucun impact épidémiologique. Elle se fera par

- injection de sang infecté: transfusions. Les donneurs ne présentent plus de danger s'ils sont asymptomatiques depuis un an pour *P. falciparum*, depuis trois ans pour *P. vivax*. Le plasma conservé pendant une semaine ou lyophilisé ne présente plus de risque;
- voie transplacentaire: paludisme congénital, rare (il faut un accès aigu chez la mère).

Chez l'anophèle

L'anophèle reçoit de l'homme des gamétocytes et les transforme en sporozoïtes. Ce processus (sporogonie) dure un certain nombre de jours qui dépend essentiellement de la température. Il va de soi que le moustique ne deviendra vecteur (porteur de sporozoïtes) que s'il survit un nombre de jours plus grand que la

9. Epidémiologie

9.1 Paramètres théoriques importants

Chez l'homme (receveur de sporozoïtes et réservoir de gamétocytes)

La fréquence des piqûres infectantes dépend des caractéristiques de la population anophélienne, de l'écologie du milieu et du réservoir de gamétocytes (voir taux d'inoculation au paragraphe suivant).

L'**inoculum de sporozoïtes** est difficilement quantifiable (nombre de sporozoïtes injectés lors d'une piqûre ou nécessaires pour induire une infection chez l'homme). L'intensité de l'infection chez l'anophèle (abondance de sporozoïtes) dépendra du nombre de

durée de la sporogonie. Ci-dessous, on trouvera quelques paramètres qui influencent la transmission du paludisme.

• BIOLOGIE DU VECTEUR

Densité anophélienne

L'anophèle a besoin, pour sa reproduction, de la présence de collections d'eau de surface, calme de préférence, non polluée. Ses larves sont aquatiques et la durée de la vie larvaire est d'une huitaine de jours dans les conditions tropicales, après quoi l'éclosion a lieu. L'abondance de moustiques vecteurs est exprimée en densité anophélienne, nombre d'anophèles femelles par rapport au nombre de personnes vivant dans le même milieu (mesurée par des méthodes standardisées d'échantillonnage par capture).

Agressivité pour l'homme

Après sa fécondation, quarante-huit heures au plus tard après son éclosion, l'anophèle femelle se met à la recherche d'un repas de sang sur l'hôte de son choix. La maturation des oeufs dépend en effet de la présence de sang dans le tube digestif, d'où les habitudes hématophages obligées de la femelle de ces moustiques: un repas de sang est pris tous les 2 à 3 jours.

Ce cycle de reproduction (cycle "gonotrophique") découpe la vie du moustique femelle en périodes de 48 à 72 heures qui se suivent sans interruption et qui, chacune, comprennent un repas sanguin, une période de repos et de maturation des oeufs, la ponte sur la surface de l'eau. Après avoir pondu ses oeufs, la femelle cherche une nouvelle victime pour se nourrir de sang, toujours pendant la nuit.

Le taux de contact homme-vecteur dépend de la longueur du cycle gonotrophique et des habitudes nutritionnelles: repas sanguin pris sur l'homme ou l'animal (anthropophilie ou zoophilie). Le repas sanguin peut être pris dans la maison ou dehors (endophagie ou exophagie); après la prise du repas sanguin, le moustique se repose à l'intérieur des maisons (endophilie) ou à l'extérieur (exophilie). La lutte chimique (insecticides rémanents) contre les moustiques adultes aura d'autant plus d'effet que ceux-ci sont endophages et endophiles.

Rappelons qu'un anophèle doit piquer l'homme au moins deux fois dans sa vie pour transmettre le paludisme.

Longévité

La durée de vie moyenne des anophèles influence grandement la capacité de transmission d'une population anophélienne: seuls les anophèles

qui survivent pendant un temps assez long permettront l'accomplissement du cycle du plasmodium chez le moustique (10 jours à 25°C pour *P. falciparum*) et pourront inoculer les sporozoïtes à une série de personnes (lors de chaque piqûre, au rythme d'une tous les deux à trois jours).

L'espérance de vie d'un anophèle (2 à 3 semaines) dépend en fait beaucoup de la température et de l'humidité, des vents, des précipitations et, évidemment, de la présence d'insecticides.

Si la sporogonie du plasmodium dure 10 jours, le nombre d'anophèles susceptibles de servir de vecteurs (population vectorielle) est la population survivante après 10 jours: notion d' "espérance de vie infectante".

Remarque importante

Les paramètres densité, longévité, habitudes nutritionnelles sont condensés dans la notion de "capacité vectorielle", propriété importante d'une population de moustiques vecteurs.

Réceptivité pour le plasmodium

Anopheles atroparvus est adapté à *P. vivax* et aux souches méditerranéennes de *P. falciparum*. Il transmet plus difficilement ou pas du tout les souches africaines de *P. falciparum*.

On mesure cette réceptivité par la numération des oocystes autour de l'estomac ou par celle des sporozoïtes dans les glandes salivaires après un repas sanguin contenant des gamétocytes en nombres connus.

• TAUX D'INFECTION DU VECTEUR

Il est représenté par le pourcentage d'anophèles porteurs de sporozoïtes dans leurs glandes salivaires (indice sporozoïtique).

• TAUX D'INOCULATION ENTOMOLOGIQUE (H_e)

C'est le nombre de piqûres infectantes distribuées par les anophèles à la population par unité de temps: $h_e = m \text{ a b s}$.

L'enquête entomologique permet de connaître

m : densité anophélienne;

a : nombre de piqûres sur l'homme par nuit pour un moustique;

ma : nombre de piqûres/homme/nuit;

s : index sporozoïtique (pourcentage d'anophèles infectés dans leurs glandes salivaires);

b ne peut pas être mesuré par les observations entomologiques. C'est la proportion de piqûres apparemment infectantes qui réussissent à établir une infection chez l'homme.

- LA CAPACITÉ VECTORIELLE (C)

Le rôle de l'anophèle est de transmettre le paludisme; la capacité vectorielle se définit comme le nombre potentiel de cas secondaires de paludisme issus, par jour, d'un cas primaire.

Cette notion mesure l'efficacité d'une population d'anophèles comme vecteurs du paludisme. Elle influence directement la rapidité de l'acquisition de l'infection par des individus indemnes et la fréquence des surinfections chez les individus déjà porteurs du parasite.

Elle dépend de la densité anophélienne (m), de la fréquence des repas sanguins sur l'homme (a) et de la probabilité (p) pour un anophèle de survivre un nombre de jours (n) égal à la durée du cycle sporogonique.

Si la probabilité de survie d'un anophèle de survivre 1 jour est p (p étant forcément compris entre 0 et 1), alors l'espérance de vie de cet anophèle s'exprime par la formule

$$\frac{1}{-\log_e p}$$

dans laquelle le signe négatif au dénominateur est introduit pour neutraliser le signe négatif du logarithme d'une valeur plus petite que 1.

L'expression mathématique faisant appel à ces trois variables mesurables sur le terrain par des observations entomologiques est:

$$C = \frac{ma^2 p^n}{-\log_e p}$$

Remarque

Une autre mesure utilisée est le "taux de reproduction de base". Il ajoute à la capacité vectorielle, les qualités du réservoir de gamétocytes (durée de l'infection chez l'homme).

C'est le nombre d'infections secondaires causées dans une communauté à partir d'un unique cas primaire, non immun. Si ce taux est inférieur à 1, la situation évolue vers l'extinction de l'endémie (éradication).

9.2 Paramètres mesurés

Le taux de prévalence est la fraction d'une population infectée à un moment donné.

Le taux d'incidence parasitologique est le nombre de nouveaux cas (nouvelles infections) par unité de temps, rapportés à la population totale (synonymes: taux d'inoculation parasitologique, taux de conversion).

Mesure de la prévalence

La mesure de la prévalence donne des indications sur l'importance de la transmission (taux d'inoculation) et de la circulation du parasite dans une communauté. Elle permet aussi de délimiter le problème malarien dans l'espace (délimitation des régions malariennes) et dans le temps (délimitation de la saison de transmission).

Au cours d'enquêtes paludométriques, on recherchera le parasite soit chez l'hôte vertébré en dehors de tout contexte pathologique, par des méthodes directes (lecture de gouttes épaisses) ou indirectes (splénomégalie), soit chez l'hôte invertébré.

- CHEZ L'HOMME

L'**indice plasmodique** est la proportion de sujets (d'un échantillon d'enfants non fébriles âgés de 2 à 9 ans) présentant des plasmodiums dans le sang, quel que soit le stade parasitaire. Les gouttes épaisses doivent être examinées pendant 5 minutes (100 champs microscopiques soit 0,2 µl de sang), les frottis pendant 15 minutes.

Remarque

Un microscopiste ne peut pas utilement examiner plus de 50 à 60 gouttes épaisses par jour.

La **densité parasitaire moyenne** est la moyenne des numérations parasitaires effectuées chez tous les individus d'un échantillon. Elle est exprimée en nombre de parasites par µl de sang.

L'**indice gamétocytaire** représente la proportion de porteurs de gamétocytes dans un groupe d'âge donné.

L'**indice splénique** est le pourcentage de sujets avec rate hypertrophiée.

Généralement, l'échantillon est pris parmi les enfants de 2 à 9 ans. Les palpations se font sur les sujets debout, mais certains auteurs préfèrent palper des abdomens de sujets couchés sur le dos.

L'hypertrophie de la rate est un symptôme tellement caractéristique de la malaria qu'elle est utilisée depuis longtemps comme seule mesure de l'endémie malarienne. L'index splénique est cependant un index non spécifique et tardif comparé à l'index plasmodique.

L'**indice de Hackett** (rate hypertrophiée moyenne) consiste à rechercher dans un échantillon de population l'augmentation moyenne du volume de la rate ("average enlarged spleen", AES). Il faut, pour cela,

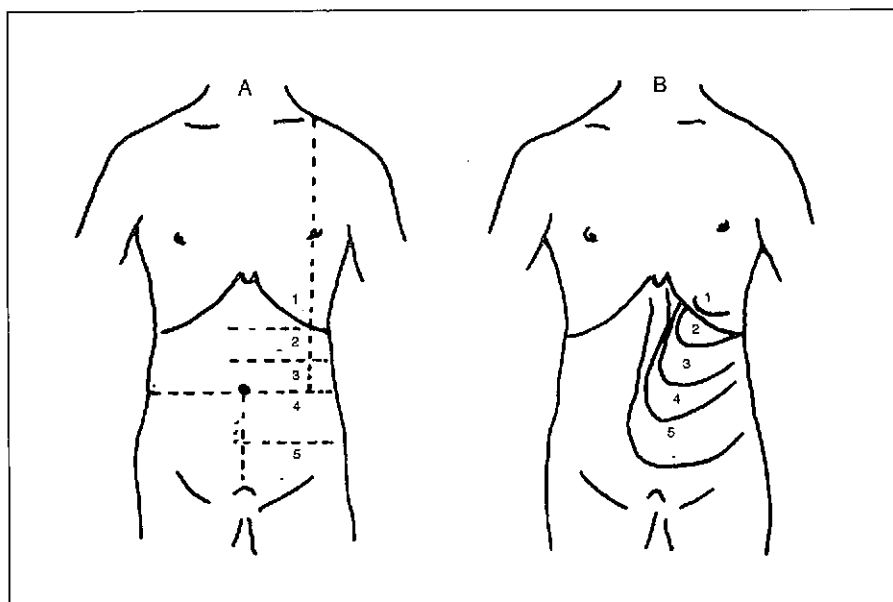


Figure 13-9

Mesure de l'hypertrophie de la rate pour le calcul de l'indice de Hackett

- A Repères topographiques pour les cinq catégories de rates hypertrophiées
 B Projection à la surface de l'abdomen de ces cinq catégories

mesurer l'augmentation de volume et attribuer un coefficient à chaque degré d'hypertrophie (figure 13-9).

coefficient	description
0	rate impalpable;
1	rate palpable à l'inspiration;
2	rate dépassant le rebord costal;
3	rate atteignant l'horizontale de l'ombilic;
4	rate à mi-chemin entre l'ombilic et l'épine iliaque antérieure et supérieure;
5	rate atteignant la fosse iliaque gauche.

$$AES = \frac{\text{nombre d'individus dans chaque classe} \times \text{coefficient splénique correspondant}}{\text{nombre d'individus avec rate hypertrophiée}}$$

L'indice de Hackett donne un renseignement du même ordre que la densité parasitaire.

La **séro-épidémiologie** consiste à mesurer le titre d'anticorps chez tous les individus d'un échantillon de la population (adultes ou par tranches d'âges).

Le titre moyen (moyenne géométrique de l'inverse des titres, MGIT) est une mesure de l'intensité de la transmission. Cette méthode est utilisée lorsque l'index plasmodique est inférieur à 10 p.100 (examens

microscopiques non rentables car trop de négatifs). Elle permet de contrôler l'efficacité d'une mesure anti-paludique (le titre moyen continue à baisser jusqu'à se négativer si la transmission est interrompue) ou de surveiller la réapparition du paludisme d'une région d'où il avait disparu.

Remarque

La moyenne géométrique est obtenue en calculant l'antilogarithme de la moyenne des logarithmes d'une série de nombres.

	Série de quatre titres sérologiques avec leurs inverses et les logarithmes de ces inverses				moyennes	antilog moyenne
titres	1/20	1/80	1/640	1/1280		
inverses	20	80	640	1280	505	
logarithmes	1,30	1,90	2,81	3,11	2,28	190,55

Dans cette série, la moyenne arithmétique est de 505 et la moyenne géométrique de 190,5

Une diminution de la transmission, résultant par exemple d'une action de contrôle (insecticide, drainage) ou d'une variation des conditions climatiques (longue saison sèche) se reflètera, après un délai de 2 ou 3 mois, par une baisse du titre sérologique moyen.

Jusqu'à récemment, c'est généralement le titre d'anticorps anti-formes sanguines qui était mesuré. Depuis la vulgarisation de l'épitope NANP du sporozoïte, les anticorps anti-sporozoïtes peuvent être titrés, donnant une information plus directement interprétable (titre directement influencé par la fréquence des inoculations par l'anophèle).

• CHEZ L'ANOPHÈLE

L'**indice sporozoïtique** est la proportion d'anophèles femelles capturés, montrant à la dissection des sporozoïtes dans les glandes salivaires.

On recherche les sporozoïtes par examen microscopique des glandes salivaires après dissection de l'insecte.

Il est également possible de mettre en évidence des antigènes de sporozoïtes dans des broyats de thorax d'anophèles. Le repérage des épitopes de la circumsporozoïte protéine (pour *P. falciparum* et *P. vivax*, séparément) se fait en utilisant des anticorps monoclonaux dans un test immuno-enzymatique très spécifique. On peut ainsi déterminer rapidement l'inféctivité d'une population de vecteurs, en échappant à la fastidieuse dissection des glandes salivaires.

Il faudra rapporter cet indice à la **densité anophélienne** qui est la quantité d'anophèles femelles adultes capturés par unité de surface (maison, mètre carré de paroi etc.) et par unité de temps (heure, jour) en un endroit donné. De plus, il ne faut tenir compte que des anophèles anthropophiles (se nourrissant de préférence sur l'homme) et négliger les femelles nullipares, forcément trop jeunes pour héberger des sporozoïtes.

Mesure de l'incidence

Le **taux de morbidité** est la proportion de personnes ayant souffert d'accès palustres pour 1.000 personnes par unité de temps.

Le **taux de mortalité** est la proportion de la population dont le paludisme a été la cause directe du décès par unité de temps. Le diagnostic fait par l'entourage manque de précision et comme on l'a vu, le diagnostic clinique est purement présomptif.

Ces indices sont imprécis et difficiles à mesurer. Cependant le taux de mortalité par paludisme est un bon témoin des variations de l'intensité de la transmission en fonction du temps et de l'espace.

9.3 Classification des situations épidémiologiques

L'endémicité se rapporte à un degré de prévalence incluant fréquence et intensité des infections.

Une épidémie consiste en une augmentation soudaine et importante de la morbidité et de la mortalité dues au paludisme.

Le paludisme autochtone est contracté sur place.

Le paludisme importé est une infection contractée en dehors de la zone concernée.

Le paludisme introduit est une infection contractée localement à partir de cas importés.

Le paludisme sporadique est la constatation de quelques cas épars sans que l'on puisse parler d'endémie.

Types de paludisme

Deux paramètres vont les définir: l'intensité de l'infection et sa variation dans le temps (stabilité). Les notions de niveau d'endémicité, image trop statique, a laissé la place à la notion de stabilité qui prend en compte la dynamique de la transmission.

Celle-ci tient compte de la variation d'intensité au cours du temps.

On parle de **paludisme stable** lorsque la saison de transmission est très longue et qu'il y a peu de changement dans l'incidence au cours de l'année et d'une année à l'autre. Les changements climatiques sont trop peu importants pour influencer l'activité de transmission des anophèles et la température assure un cycle sporogonique rapide. Le vecteur est hautement anthropophile et sa durée de vie est longue. Le paludisme stable est le plus souvent un paludisme à *P. falciparum* et il entretient chez la population un degré de protection immunitaire très important. On observe, entre le groupe d'âge de 1 à 4 ans et celui des adultes, une baisse progressive des densités parasitaires moyennes. Dans une région de l'Inde à paludisme stable, on a observé des densités moyennes de 12.000 par μl chez les enfants alors que le groupe des adultes a une densité moyenne d'environ 100 parasites par μl . C'est la prémunition qui est responsable de cet effondrement.

Le **paludisme instable** est une situation dans laquelle un écart climatique minime, des variations dans l'intensité de reproduction des anophèles ou un léger changement de structure de la population humaine causent un arrêt presque complet de la transmission ou au contraire une flambée épidémique chez des sujets sans immunité. L'incidence varie d'un point à un autre, on peut observer l'anophélisme sans paludisme à certains endroits. Ce type instable existe lorsque le vecteur est peu anthropophile ou de longévité courte, lorsque la température est à la limite de tolérance pour le développement de la sporogonie (18°C) et que la densité du vecteur doit obligatoirement être très forte pour assurer une transmission. Paludisme instable ne veut pas dire paludisme saisonnier. Ce type de transmission fluctuante peut très bien être observé dans un milieu dont les caractéristiques climatiques ne changent pas au cours du temps.

A l'intérieur de ces deux types, stable et instable, on peut observer des degrés d'intensité différents.

10. Le contrôle du paludisme

10.1 Objectifs (figure 13-10)

La diminution de la mortalité est obtenue par une chimiothérapie correcte, après un diagnostic posé promptement.

La diminution de la morbidité est obtenue par une chimioprophylaxie chez les groupes à risques, sensibles à l'infection (femmes enceintes, immigrés). Les enfants sont aussi à risque mais pour eux la distribution des doses prophylactiques est difficile à organi-

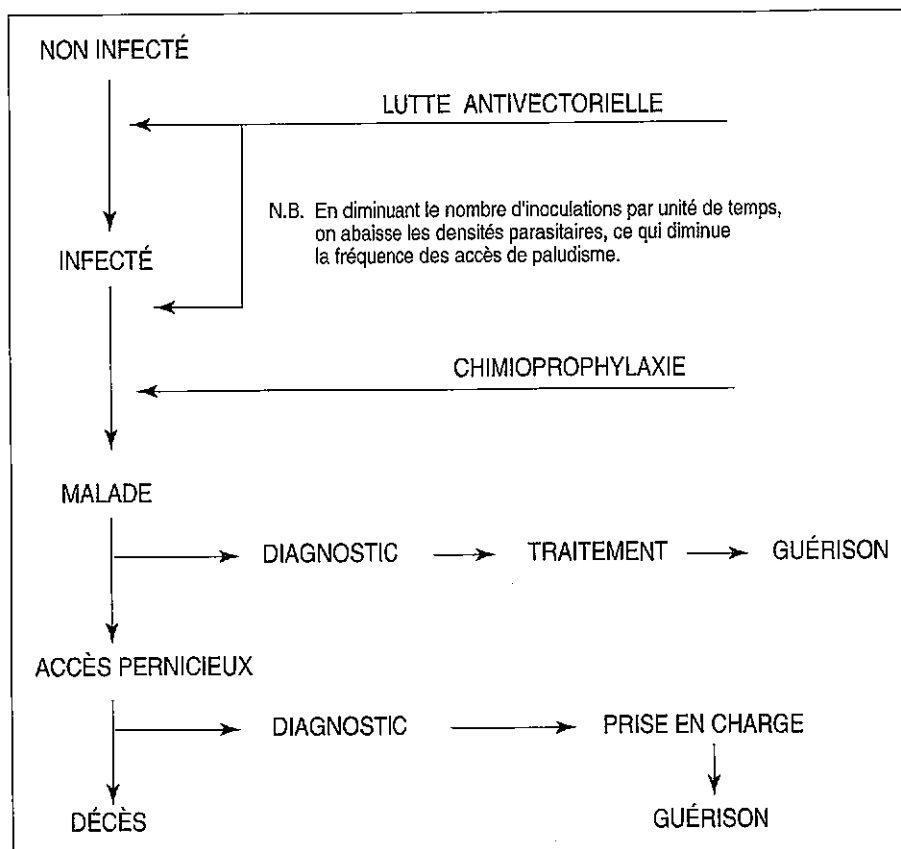


Figure 13-10

Actions possibles en zone endémique

ser et la période pendant laquelle ils devraient recevoir le traitement est trop longue.

La diminution de la transmission ne peut être obtenue que par la lutte contre les anophèles: réduction de la densité, de la longévité, du contact homme-vecteur ou les trois combinés. Les méthodes de contrôle des vecteurs sont détaillées au chapitre 20.

10.2 Stratégies

En fonction des circonstances, du milieu écologique et des possibilités financières, on sera amené à sélectionner des ensembles de méthodes cohérentes.

10.3 Application

La mise en application des mesures choisies sera du ressort des Services de Santé généraux. Certaines actions sont du ressort de services spécialisés. La participation de la population est requise pour la généralisation des moustiquaires imprégnées de deltaméthrine: achat des moustiquaires et leur réimprégnation bisannuelle.

11. Perspectives de vaccination

L'induction d'une protection par l'injection d'antigènes de plasmodium n'est pas encore au point mais fait l'objet de recherches actives. Rappelons que l'immunité de protection s'adresse aux antigènes de surface du parasite qui sont spécifiques de stade. Il faut donc choisir entre les antigènes de sporozoïte, stade hépatique, schizogonie sanguine (mérozoïte) ou gamétocytes.

11.1 Choix de l'antigène et effet attendu

Antigènes de sporozoïtes

Les anticorps dirigés contre l'épitope de 4 acides aminés (NANP) répété un certain nombre de fois, devraient empêcher l'entrée des sporozoïtes dans les hépatocytes et produire une immunité totale (pas d'infection).

Antigènes de formes hépatiques

L'action des anticorps dirigés contre eux devrait prolonger l'action contre les sporozoïtes après leur entrée dans les hépatocytes. Leur inventaire n'est pas terminé et ils sont encore mal connus; on sait cependant que la présence de schizontes hépatiques produit une protection spécifique de ce stade. Puisqu'ils s'adressent à un stade pré-érythrocytaire, leur objectif est une immunité totale.

Antigènes de formes asexuées sanguines (mérozoïte, schizonte)

Les anticorps dirigés contre eux empêcheraient la montée de la parasitémie et imiteraient donc la prémunition en permettant des parasitémies asymptomatiques.

Antigènes de gamétocytes

Les anticorps dirigés contre eux empêcheraient leur transformation en gamètes fonctionnels et donc la production de zygotes chez l'anophèle. Ils stériliseraient le réservoir de parasites et empêcheraient les anophèles de s'infecter. Ils visent à interrompre la transmission.

Remarque

Les différents antigènes pourraient éventuellement être "panachés".

11.2 Obtention des antigènes

Seuls les parasites sanguicoles peuvent être cultivés et uniquement dans le cas de *P. falciparum*. Cette culture est laborieuse. Ces modes de production restent à un niveau théorique. Il semble illusoire de produire des doses de vaccins à partir de parasites entiers tués ou atténués.

Une autre alternative existe: rechercher des fractions antigéniques les plus protectrices, les identifier et les purifier ainsi que leurs épitopes les plus intéressants (avec l'aide des anticorps monoclonaux), ensuite isoler la partie du génome codant pour la séquence d'acides aminés et enfin faire produire ce peptide de plasmidium par une bactérie en utilisant les méthodes de génie génétique ou le synthétiser chimiquement.

11.3 Essais de vaccination

Deux types de vaccins ont été expérimentés sur l'homme jusqu'à présent.

Vaccin anti-sporozoïte

L'immunisation de volontaires a été faite par des molécules NANP synthétiques ou recombinantes. Les résultats décevants sont attribués à la brièveté du contact avec le sporozoïte et la non prise en compte des réponses immunitaires de type cellulaire.

Vaccin anti-mérozoïte

Elaboré par une équipe colombienne, la première phase a consisté en la recherche et la sélection de peptides de surface du mérozoïte les plus protecteurs pour le singe. Il s'agit d'un vaccin de synthèse à base de tels peptides, reliés entre eux par des segments NANP du sporozoïte et polymérisés (SPf 66). Son efficacité est actuellement à l'étude sur le terrain. En Tanzanie, les résultats obtenus semblent montrer que la morbidité a été réduite de 30% chez les sujets vaccinés, mais le pourcentage de sujets parasités est resté inchangé.

BIBLIOGRAPHIE

- FIELD JW, SHUTE PG (1956) The Microscopic Diagnosis of Human Malaria. 11. A morphological study of the erythrocytic parasites, Institute for Medical Research, Malaya.
- RUSSEL PF, WEST LS, MANWELL RD, MACDONALD G. (1963) *Practical Malariology* (2nd edition), London, Oxford University Press
- SHUTE PG, MARYON ME. (1966) Laboratory technique for the study of Malaria, London, Churchill JA.
- GARNHAM PCC. (1966) Malaria parasites and other Haemosporidia, Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- BLACK RH. (1968) Manuel d'épidémiologie appliquée à l'éradication du paludisme, publication OMS.
- MAEGRAITH B, FLETCHER A. (1972) The Pathogenesis of Mammalian Malaria. In: BEN DAWES (Ed), *Advances in Parasitology*, London and New York, Academic Press, **10**, 49-77.
- PASVOL G, WEATHERALL DJ, WILSON RJM *et al.* (1976) Foetal haemoglobin and malaria, *Lancet*, **i**, 1269.
- PASVOL G, WEATHERALL DJ, WILSON RJM. (1978) Cellular mechanism of the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria, *Nature*, **274**, 701.
- BRUCE-CHWATT LJ, DE ZULUETA J. (1980) *The rise and fall of malaria in Europe. A historico-epidemiological study*, Oxford University Press.
- MOLINEAUX L, GRAMICCIA G. (1980) *Le projet Garki. Recherches sur l'épidémiologie du paludisme et la lutte antipaludique dans la savane soudanaise de l'Afrique occidentale*, OMS.
- WÉRY M ET COOSEMANS M. (1980) La résistance médicamenteuse dans le paludisme, *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*, **60**, 137-162.
- BLACK RH, CANFIELD CJ, CLYDE DF, PETERS W, WERNSDORFER WH. (1984) *Chimiothérapie du paludisme*, Ed. Bruce-Chwatt LJ, OMS, série de monographies, n°27.
- HERRINGTON DA, CLYDE DF, LOZONSKI G *et al.* (1987) Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites, *Nature*, **328**, 257-263.
- PATTAROYO ME, AMADOR R, CLAVIJO P *et al.* (1988) A synthetic vaccine probed in humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria, *Nature*, **332**, 158-161.
- STEVENSON MM. (1989) Genetic control of host resistance to malaria, In: MM Stevenson (Ed), *Malaria: Host responses to infection*, CRC Press.
- HAGEL RL, ROTH EF Jr. (1989) Malaria and red cell defects, *Blood*, **74**, 1213-1221.
- PERLMANN P, MILLER L. (Eds) (1990) *Proceedings of the Fogarty/WHO International Conference on Cellular Mechanism in Malaria Immunity*, Bethesda, MD, USA, April 3-6, 1990, Amsterdam, Elsevier, 293 pp., (Immunology letters, **25**, 1-3).
- WHITE NJ, HO M. (1992) The pathophysiology of malaria, In JR BAKER and R. MULLER (Eds), *Advances in Parasitology*, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers **31**, 84-173.
- GILLES HM, WARREL DA. (1993) Bruce-Chwatt's Essential Malariology, London, Edward Arnold (Hodder & Stoughton).
- BEADLE C, LONG GW, WEISS WR *et al.* (1994) Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay, *The Lancet*, **343**, 564-568.
- ALONSO, PL, SMITH T, ARMSTRONG SCHELLENBERG JRM *et al.* (1994) Randomized trial of efficacy of SPf 66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania, *The Lancet*, **344**, 1175-1181.

Coccidies Monoxènes

Les Genres *Eimeria*, *Isospora* *Cryptosporidium* et *Cyclospora* (Eimeriida)

Les Coccidioses

14

1. Généralités

Le cycle évolutif de ces genres se fait entièrement dans un seul hôte et le plus souvent dans un seul organe, l'intestin et ses annexes. La schizogonie et la sporogonie prennent place dans les cellules épithéliales du tube digestif (et glandes annexes) de divers animaux ou, accessoirement, de l'homme.

Les caractères distinctifs importants sont la morphologie de l'oocyste (stade diagnostique), la période prépatente (précédant le début de l'excrétion d'oocystes), la durée de la période de patence (excrétion d'oocystes).

1.1 Cycle évolutif

Le schéma est le même pour les trois genres, *Eimeria*, *Isospora* et *Cryptosporidium*, malgré des variantes parfois importantes (figure 14-1).

La forme infectante est le sporozoïte contenu dans l'oocyste où il survit, dans le milieu extérieur, protégé par une paroi épaisse. L'oocyste est ingéré par l'hôte et, dans l'intestin, les sporozoïtes sont libérés sous l'influence de la trypsine et des sels biliaires et pénètrent dans les cellules de la paroi intestinale par refoulement de la paroi cellulaire et formation d'une vacuole parasitophore. A l'intérieur de la cellule hôte, le sporozoïte s'arrondit et commence à grandir. Pendant la croissance, le noyau se divise et on aboutit à la production d'un schizonte contenant plusieurs noyaux. A la fin de la schizogonie, la division du cytoplasme produit les mérozoïtes, de forme allongée, libres dans la lumière intestinale. Ces mérozoïtes de première génération pénètrent à l'intérieur de nouvelles cellules et donnent des schizontes de deuxième génération qui libèrent à leur tour des mérozoïtes.

Remarques

Chez les espèces du genre *Cryptosporidium*, la maturation du schizonte a lieu à l'extérieur de la cellule épithéliale.

Chez certaines espèces d'*Isospora*, on signale l'existence d'un stade hypnozoïte, retardant de plusieurs jours l'évolution vers le schizonte et la libération de mérozoïtes.

Les schizogonies se suivent, en nombre variable et à localisation variable: ganglions mésentériques, poumons, etc.

Après deux ou plusieurs cycles asexués, les mérozoïtes issus de la dernière génération de schizontes (qui sont toujours localisés dans l'épithélium intestinal) subissent, à l'intérieur des cellules, la différenciation sexuelle. Certains mérozoïtes donnent une cellule multinucléée (microgamétocyte) qui se fragmente en petits parasites flagellés (3 flagelles) très mobiles: ce sont les gamètes mâles ou microgamètes. D'autres mérozoïtes vont donner un grand parasite dont le noyau reste unique à l'intérieur de la cellule hôte: c'est le gamétocyte femelle ou macrogamétocyte.

La fécondation intervient dans la cellule épithéliale qui contient le macrogamétocyte, par fusion de son noyau avec celui d'un microgamète. Le zygote ainsi formé sécrète une paroi épaisse et est alors appelé oocyste.

Celui-ci sort de la cellule hôte dégénérée, se retrouve dans la lumière intestinale, est entraîné par le transit et aboutit dans le milieu extérieur où la maturation se poursuivra jusqu'au stade d'oocyste mûr. Cette maturation comporte la formation de cellules appelées sporoblastes ou sporocystes à l'intérieur desquelles sont formés les sporozoïtes.

L'oocyste est donc un stade capable de survivre en milieu extérieur. Contrairement aux oocystes de *Plasmodium*, les oocystes de coccidies ne changent pas de taille au cours de leur maturation, le nombre de sporozoïtes est peu élevé (huit) et ils sont entourés par une membrane épaisse, apparaissant au microscope comme constituée de deux couches distinctes.

1. Généralités

- 1.1 Cycle évolutif
- 1.2 Caractères distinctifs des genres

2. Coccidies infectant les animaux:

- 2.1 Les genres *Eimeria* et *Isospora*
- 2.2 Le genre *Cryptosporidium*

3. Coccidies infectant l'homme:

- 3.1 *Isospora belli*
- 3.2 *Cryptosporidium* sp.
- 3.3 *Cyclospora cayentanensis*

Bibliographie:

FIGURES

- 14-1 Schéma général du cycle des coccidies
- 14-2 Trophozoïtes de *Cryptosporidium* dans l'intestin
- 14-3 Oocystes de *Isospora* dans les selles
- 14-4 Stades du cycle de *Cryptosporidium*
- 14-5 Oocystes de *Cryptosporidium* dans les selles
- 14-6 Oocystes de *Cyclospora*

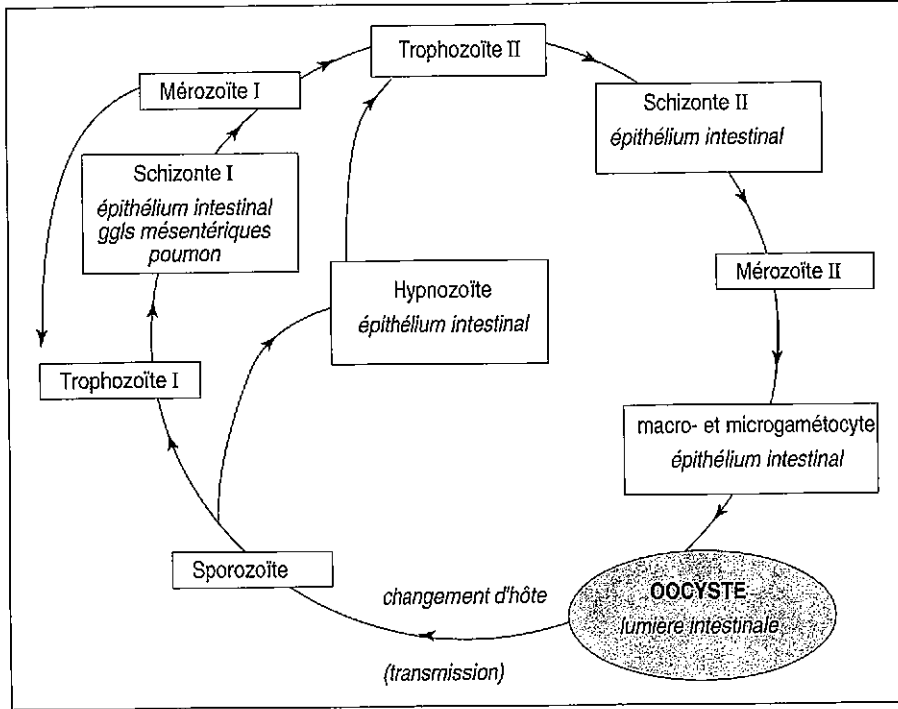


Figure 14-1

Schéma général du cycle des coccidies

1.2 Caractères distinctifs des genres

Le genre *Eimeria*

Les oocystes de plus de 20 µm de diamètre contiennent quatre sporocystes hébergeant chacun deux sporozoïtes.

Les nombreuses espèces infectant tous les animaux (mais pas l'homme) se distinguent les unes des autres par les caractères suivants: la durée du cycle

évolutif complet (période prépatente); le nombre de générations asexuées; le nombre de mérozoïtes formés par chaque génération de schizontes; le site de développement chez l'hôte; le type de cellule parasitée; la position du parasite dans la cellule hôte; la taille et la forme de l'oocyste; la pathogénicité pour l'hôte; la sensibilité aux médicaments. Cette diversité de comportement est typique des coccidies; elle est retrouvée, dans une moindre mesure, dans les autres genres.

Le genre *Isospora*

Ses oocystes mesurant plus de 20 µm de diamètre, éliminés par les selles, contiennent deux sporocystes hébergeant chacun quatre sporozoïtes.

Il est composé de nombreuses espèces infectant des animaux très divers, une seule espèce infectant l'homme (*I. belli*). Son cycle se déroule dans les cellules épithéliales de l'intestin et dans les monocytes (ganglions mésentériques). Les sporozoïtes infectants peuvent séjourner quelque temps dans une cellule épithéliale (comportement d'hypnozoïte) avant leur maturation en schizonte (de première génération) et la libération des mérozoïtes.

Le genre *Cryptosporidium*

Ses oocystes, petits (4 à 5 µm de diamètre), contiennent 4 sporozoïtes mais pas de sporocyste.

Il infecte l'homme et de nombreux animaux et présente les caractéristiques suivantes:

- développement du schizonte en dehors de la cellule épithéliale à laquelle il est attaché par une matrice membranaire ("feeder organelle") (figure 14-2);
- possibilité d'infections persistantes chez certains individus par auto-réinfection à partir de sporozoïtes libérés dans leur intestin;
- manque de spécificité d'hôte (comme chez *Toxoplasma*);
- étonnante résistance à la chimiothérapie habituelle des coccidies;
- infection de l'épithélium intestinal surtout mais aussi pulmonaire.

Le genre *Cyclospora*

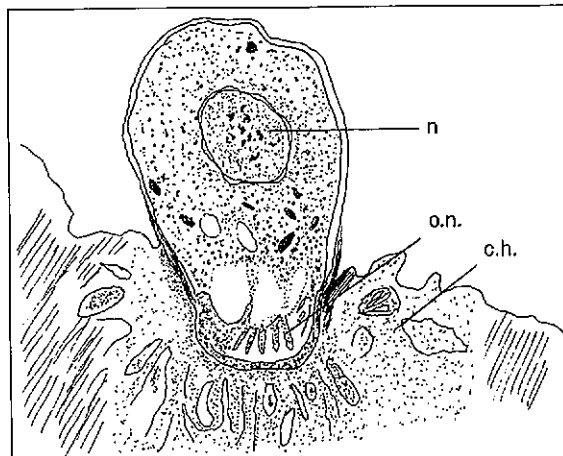
La connaissance de ce genre, récemment décrit, est provisoirement très fragmentaire. On ne sait pas si l'espèce responsable de l'infection humaine est présente chez des animaux. La localisation décrite est purement intestinale (haute).

Figure 14-2

Trophozoïte de *Cryptosporidium* dans l'intestin

Trophozoïte de *Cryptosporidium parvum*, montrant la relation avec la cellule "hôte"

- n noyau
- o.n. organe nourricier ("feeder organelle")
- c.h. cellule hôte



2. Coccidies infectant les animaux

Les espèces décrites chez les animaux domestiques et les animaux sauvages peuvent être regroupées en plusieurs genres d'après l'existence ou non d'hypnozoïtes, la localisation et le nombre de schizogonies, la structure de l'oocyste.

2.1 Les genres *Eimeria* et *Isospora*

Ce sont les plus importants au point de vue nombre d'espèces et importance économique. Ils sont spécifiques de leur hôte habituel: les espèces infectant la dinde ne peuvent être adaptées au poulet ou au canard; les espèces des bovins ne peuvent infecter les moutons ou les porcs.

Ce sont les espèces parasites de la volaille qui ont été le plus étudiées, ces oiseaux étant des animaux de laboratoire faciles à héberger et bon marché. Les caractéristiques des stades du cycle évolutif des parasites de nombreux grands animaux sont incomplètement connues.

Exemples d'*Eimeria* d'animaux domestiques

Remarque

Le micropyle est une ouverture circulaire présente à un pôle de l'oocyste.

Eimeria bovis: intestin grêle; oocystes ovales de 20 x 27 µm avec micropyle à une extrémité, apparaissant après 18 à 21 jours; cosmopolite. Bovins.

Eimeria parva: intestin grêle; oocystes sphériques, sans micropyle, mesurant 12 x 13 µm, apparaissant après 15 jours; Europe, URSS, Amérique du Nord, Tunisie. Mouton et chèvre.

Eimeria leuckarti: intestin grêle; oocystes ovoïdes avec micropyle, mesurant 50 x 80 µm, à paroi épaisse et rugueuse; Europe, Amérique du Nord, Inde. Cheval.

Eimeria debilecti: intestin grêle; oocystes ovoïdes sans micropyle, mesurant 15 x 20 µm et apparaissant après 6 à 7 jours; URSS, Europe, Amérique du Nord et du Sud, Java, Congo. Porc.

Eimeria stiediae: épithélium des canaux biliaires dans le foie; oocystes ovoïdes avec micropyle à un des pôles, à paroi brunâtre et lisse, mesurant 20 x 35 µm et apparaissant après plus de 15 jours; cosmopolite. Lapin.

Eimeria perforans: partie moyenne de l'intestin grêle, oocystes ovoïdes à sphériques, avec micropyle, de taille très variable (20 à 25 µm x 12 à 15 µm en moyenne) et apparaissant après 5 à 6 jours; cosmopolite. Lapin.

Eimeria tenella: épithélium des cryptes des caeca, passage des sporozoïtes par les macrophages; oocystes ovoïdes, incolores sans micropyle, de 19 x 27 µm, apparaissant après 7 jours. Poulet.

Eimeria adenoides, *E. gallopavonis*, *E. meleagridis*... Dinde.

Eimeria anatis, *Tyzzeria perniciosus*, *Wenyonella anatis*... Canard.

E. noceus, *E. stigmosa*... Oie.

	<i>Cyclospora</i>	<i>Isospora</i>	<i>Cryptosporidium</i>
Sporocystes	2	2	absents
Sporozoïtes	4 (2X2)	8 (2X4)	4 (1X4)
Forme	sphérique	ovale allongée	ovale-ronde
Taille	8-10 µm	≥ 20 µm	4-5 µm
Acido-résistance	irrégulière	totale	périphérique
Marquage par monoclonal anti-<i>Cryptosporidium</i>	non	non	oui
Autofluorescence	bleue brillante	non	non
Après concentration formol-éthér	- transparent (aspect en lentille de verre) - non sporulé	- ovale allongé - non sporulé	généralement invisible

Exemples d'*Isospora* d'animaux domestiques

Isospora felis: intestin grêle; oocystes ovoïdes sans micropyle, mesurant 30 x 40 µm et apparaissant après 7 ou 8 jours; URSS, Europe, Amérique du Nord, Japon. Chat, chien.

Isospora bigemina: partie moyenne de l'intestin grêle; oocystes ovoïdes ou sphériques, sans micropyle, de 15 x 18 µm et apparaissant après 15 jours; cosmopolite. Chat, chien.

Isospora suis: intestin grêle; oocystes subsphériques sans micropyle, mesurant 20 µm de diamètre, à paroi épaisse jaune brunâtre et apparaissant après 6 à 8 jours; Amérique du Nord et Europe. Porc.

2.2 Le genre *Cryptosporidium*

Il est présent chez plus de 20 espèces d'animaux (et chez l'homme). Morphologiquement toujours le même, sa composition antigénique ne semble pas varier d'une espèce animale à l'autre. Il manque de spécificité d'hôte et n'est généralement pas très pathogène.

Ce parasite a été observé dans l'intestin de la souris, du lapin, du poulet, du cobaye et du chat (infections inapparentes). Chez le veau, le mouton, la chèvre, la dinde, le singe, le cerf et l'homme, l'infection est symptomatique, à localisation intestinale. Le veau étant très sensible, ce parasite cause des dégâts importants dans les élevages de bovins.

La spécificité d'hôte est large. Une espèce donnée du parasite peut être transmise expérimentalement d'une espèce animale à une autre (du cerf, de l'homme ou de la chèvre à des moutons, des porcelets ou à des

Tableau 14-1

Oocystes des coccidies monoxènes (tableau récapitulatif)

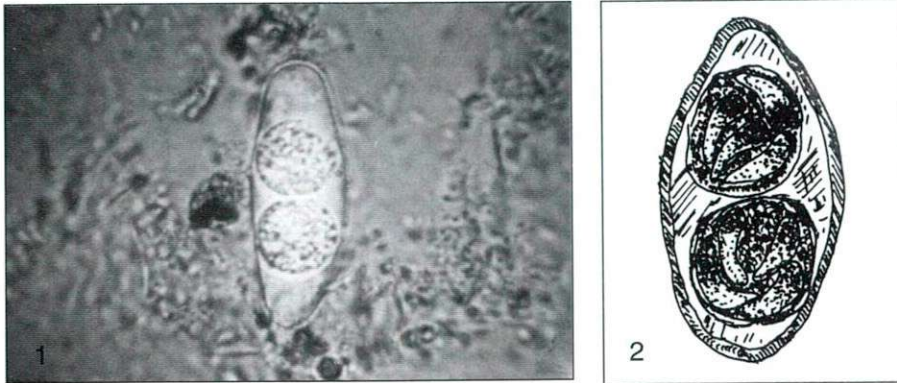


Figure 14-3

Oocystes de *Isospora* dans les selles

1. Microphotographie d'un oocyste montrant deux sporocystes.
2. Dessin d'un oocyste montrant la paroi épaisse, les deux sporocystes et les quatre sporozoïtes qu'ils contiennent chacun.

veaux). De nombreuses espèces sont facilement transmises à la souris blanche de laboratoire, sans changement de pathogénicité pour l'hôte d'origine.

3. Coccidies infectant l'homme

3.1 *Isospora belli*

Parasite de l'homme exclusivement, normalement peu pathogène, il devient plus agressif en cas d'immunodépression.

Caractéristiques du parasite

Il colonise l'intestin grêle, exclusivement. Les oocystes ovoïdes de 25-33 μm / 13-16 μm , avec micropyle, contiennent deux sporocystes avec chacun quatre sporozoïtes (tableau 14-1 et figure 14-3). Il est cosmopolite et donne des symptômes habituellement bénins: diarrhée et douleurs abdominales. Une petite hyperthermie de quelques jours est possible.

Pouvoir pathogène

Il s'explique par la destruction des cellules superficielles de la muqueuse intestinale provoquant localement une chute du pH, des troubles de l'absorption, une fuite de protéines sériques dans la lumière intestinale ainsi qu'une diminution d'activité des enzymes intestinaux et de la bile. Des toxines ne semblent pas exister mais des changements interviennent dans les taux de glucose sanguin et de glycogène musculaire. Cliniquement souvent inapparente, la maladie peut se traduire par une diarrhée avec signes généraux.

Au cours des infections à VIH, le parasite, à caractère opportuniste provoque une diarrhée aqueuse profuse et persistante.

Diagnostic

Essentiellement parasitologique, il se fera par l'examen direct des selles liquides ou après concentration et coloration (voir *Cryptosporidium*). Les oocystes assez grands (environ 20 μm), sporulés ou non, sont facilement reconnaissables.

Remarque

Une éosinophilie sanguine est souvent observée. Des cristaux de Charcot Leyden et d'acides gras sont abondants dans les selles.

Transmission

Les oocystes d'*Isospora* conservent leur viabilité en milieu extérieur (plusieurs mois dans des milieux liquides); ils résistent à des désinfectants utilisés en milieu hospitalier comme le crésyl, l'iodoforme, l'hypochlorite de sodium, la soude caustique et des produits à base d'aldéhyde; ils sont tués assez rapidement par l'ammoniaque, le formol, la lyophilisation ainsi que par l'exposition pendant plus de 30 minutes à des températures supérieures à 65 °C.

On ne connaît pas le nombre d'oocystes nécessaires pour provoquer l'apparition de symptômes.

Traitement

Les cas humains d'infection par *Isospora belli* peuvent, si les symptômes le nécessitent, être traités efficacement par l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (Bactrim®).

Bactrim® forte: (TMP 640 mg/jour; SMZ 3200 mg/jour), soit 4 comprimés par jour pendant 10 à 15 jours

Flagyl®: 2 g par jour pendant 10 jours.

Chez les patients atteints de SIDA, une prophylaxie à base du quart de la dose de Bactrim® du traitement curatif peut être instituée.

3.2 *Cryptosporidium* sp.

Remarque préliminaire

Les espèces distinctes décrites chez divers animaux ne constituent pas une classification définitive: *C. muris* (rongeurs), *C. meleagridis* (oiseaux), *C. crotali* (reptiles), *C. nasorum* (poissons), *C. parvum*. Elles peuvent, chacune, infecter plusieurs espèces animales. La spécificité d'hôte n'est pas rigoureuse. Les infections, tant chez l'homme que chez les animaux domestiques, peuvent être dues à plusieurs de ces espèces actuellement séparées dans la nomenclature mais morphologiquement identiques.

L'existence d'une espèce qui n'infecterait que l'homme et pour laquelle Bird (1981) a proposé le nom de *C. garnhami* est incertaine.

Caractéristiques des stades du cycle

Les schizogonies ont lieu surtout dans l'épithélium digestif des mammifères, causant des entérocolites et des diarrhées; on assiste à deux schizogonies successives au contact des cellules épithéliales, la première produisant huit mérozoïtes, la seconde quatre mérozoïtes. Plus rarement, le parasite peut évoluer dans l'épithélium du système respiratoire (figure 14-4).

Les oocystes sont sphériques, mesurant 4 à 6 µm de diamètre chez l'homme et 5 à 7 µm chez les bovidés (espèces probablement différentes). Ils contiennent à maturité quatre sporozoïtes (sans présence de sporocyste), issus de la fécondation du macrogamétocyte par un microgamète dépourvu de flagelle. On a décrit des oocystes à paroi double (épaisse), résistant dans le milieu extérieur et des oocystes à paroi mince, qui libèrent leurs sporozoïtes dans l'intestin du sujet infecté (auto-infestation), prolongeant ainsi la durée de l'infection.

L'éclosion de l'oocyste à paroi épaisse se fait après 1 heure à 37°C dans un mélange de trypsine et de sels biliaires, après 2 heures dans l'eau à pH 7,6 à 37°C, après plusieurs mois dans l'eau à 5°C. Le contact avec la salive inhiberait l'éclosion.

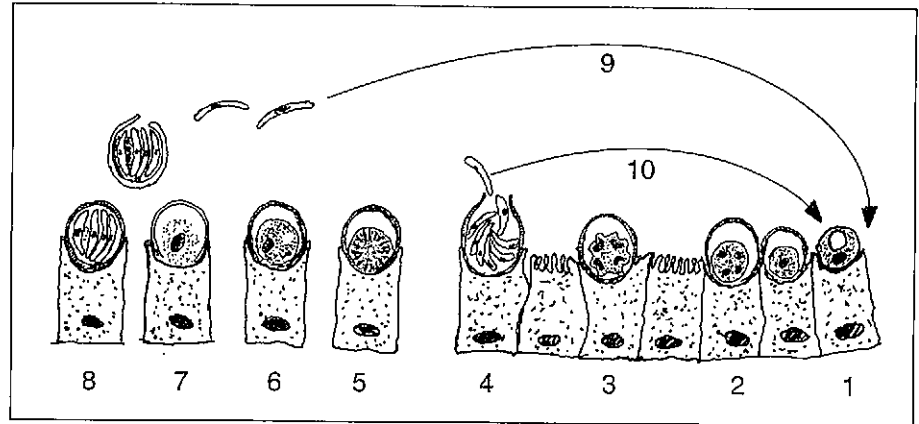
Un important point de divergence avec les autres coccidies monoxènes est la position extracellulaire de tous les stades: les parasites se développent à l'extérieur du cytoplasme de la cellule hôte (épithéliale) et se laissent partiellement encercler par la membrane de cette cellule, tout en faisant saillie dans la lumière intestinale. En fait, ils restent en position extracellulaire et organisent un contact étroit avec la membrane externe profondément modifiée de la cellule hôte, par un organite intracytoplasmique qu'on appelle organite nourricier ("feeder organelle"). La membrane externe de la cellule hôte s'hypertrophie, augmentant ainsi la surface de contact avec le parasite et perd ses villosités.

Hôtes

De nombreuses espèces animales, comme l'homme, hébergent le cycle complet de *Cryptosporidium*.

Physiopathologie

Dans l'intestin, c'est surtout la partie haute de l'intestin grêle qui est touchée. Plus rarement, on note une extension vers le système biliaire, l'estomac, et le côlon. Cette première portion de l'intestin grêle protégée par le pH extrême, l'intense activité protéolytique,



le transit "torrentiel", est pourtant rarement atteinte par les infections. *Cryptosporidium* fait exception à cette règle, provoquant une hypersécrétion d'eau et d'électrolytes du type choléra. Les changements de la muqueuse sont minimes au début (malgré l'infiltration par des cellules inflammatoires) puis survient un approfondissement des cryptes et enfin une atrophie des villosités.

Dans les localisations pulmonaires, le parasite se multiplie au contact des muqueuses du larynx, de la trachée et des bronchioles. Le parasite est rarement seul en cause à ce niveau. Il peut s'associer au cytomégalovirus, à *Pneumocystis carinii* et à des bactéries. Une inflammation aiguë s'installe avec les symptômes habituels: douleur, dyspnée, sécrétions.

Pouvoir pathogène

Les premiers cas de cryptosporidiose ont été décrits en 1976, probablement chez des patients atteints d'immunodépression acquise ou congénitale, avant la reconnaissance du SIDA. Ce n'est qu'en 1982 que le caractère "opportuniste" du parasite est apparu. Il est responsable de la diarrhée rebelle, un des symptômes dominant le tableau clinique chez les patients sidéens.

Cryptosporidium sp. cause essentiellement de la diarrhée, parfois accompagnée de nausées, vomissements et douleurs abdominales. La durée des symptômes est très variable. Des infections peuvent persister pendant des périodes très longues à cause de la possibilité d'auto-réinfestation à partir des sporozoïtes contenus dans les oocystes à paroi mince. Cette réinfestation serait favorisée par l'immunodépression.

L'association à des bactéries entéropathogènes ou à des virus n'est pas rare; elle a été suggérée à plusieurs reprises.

Figure 14-4

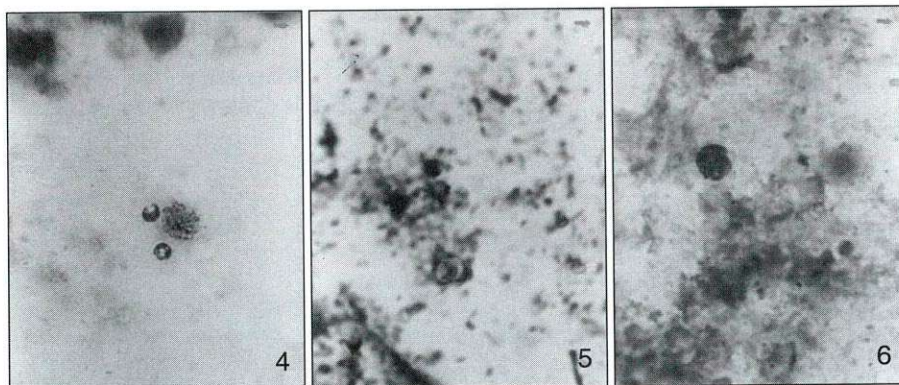
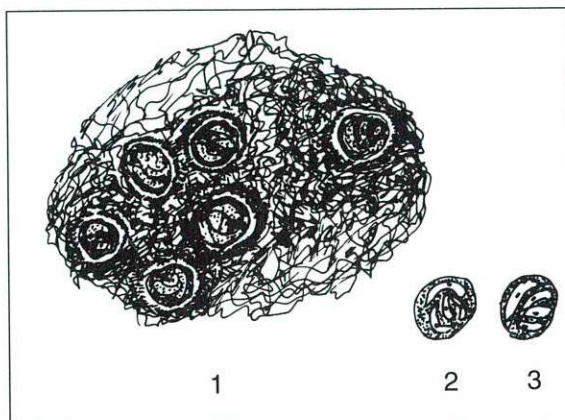
Stades du cycle de *Cryptosporidium*

1. Trophozoïtes
- 2, 3. Schizontes en maturation
4. Schizonte libérant les mérozoïtes
5. Gamétocyte mâle avec 8 noyaux
6. Gamétocyte femelle avec son noyau unique
7. Zygote (noyau diploïde)
8. Oocyste avec ses quatre sporozoïtes
9. Les sporozoïtes libérés par l'oocyste infectent de nouvelles cellules épithéliales, soit dans le même intestin lorsque l'éclosion de l'oocyste a lieu pendant le transit intestinal, soit dans l'intestin d'une autre personne, après passage de l'oocyste dans le milieu extérieur
10. Les mérozoïtes infectent de nouvelles cellules épithéliales et recommencent une schizogonie

Figure 14-5

Oocystes de *Cryptosporidium* dans les selles

1. Dessin d' oocystes, à l'examen de matières fécales
- 2,3. Dessins d'oocystes montrant les quatre sporozoïtes (4 à 5 µm)
- 4 à 6. Microphotographies d'oocystes colorés montrant des structures internes typiques



Chez les animaux, la sévérité des symptômes dépend de l'âge: les agneaux nouveau-nés, les chevreux peuvent mourir des suites de troubles intestinaux.

Le sujet immunocompétent présente une diarrhée aqueuse accompagnée de vomissements, crampes abdominales, fièvre. L'épisode, dont la durée dépasse rarement 10 jours, régresse spontanément.

La durée est raccourcie chez l'enfant (traitement plus précoce?). Au cours d'une épidémie récente, on a observé des symptômes dans 78 p.100 des cas et pas de diarrhée contemporaine de l'excrétion d'oocystes dans 14 p.100 des cas. L'infection peut prendre un caractère de gravité en cas de rougeole ou de malnutrition.

Chez les sujets immunodéprimés (chimiothérapies anticancéreuses, thérapeutiques immunosuppressives et surtout SIDA), la diarrhée aqueuse, profuse (jusqu'à 2 à 6 litres par jour), n'a aucune tendance à la rémission et peut menacer la vie du patient.

Diagnostic

- MISE EN ÉVIDENCE DU PARASITE DANS LES SELLES

Examen parasitologique et coloration des oocystes

L'examen se fera, après concentration par des méthodes de flottation (sulfate de zinc ou saccharose, solutions saturées), sur frottis colorés. Plusieurs techniques sont utilisables (voir chapitre 19). Nous retiendrons la coloration rapide à la safranine et au bleu de méthylène et la coloration de Ziehl Neelsen modifiée, basée sur l'acido alcoolrésistance de la paroi kystique (tableau 14-1 et figure 14-5).

Marquage immunologique

Il peut se faire par immunofluorescence avec anticorps monoclonaux anti-paroi d'oocyste (la réaction manque de spécificité si elle est appliquée directement sur les selles, de nombreuses particules fluorescentes de 3 à 6 µm de nature différente étant difficiles à identifier). Il existe aussi un test immunoenzymatique (ELISA) avec anticorps anti-formes endogènes ou anti-oocystes (plus spécifiques) sur les selles.

- BIOPSIE INTESTINALE

C'est la méthode la plus sensible car les lésions de la bordure en brosse sont très caractéristiques et la présence de schizontes sera notée (autopsie d'animaux ou biopsie chez l'homme).

- L'INOCULATION AUX SOURICEAUX NOUVEAU-NÉS

On pourra confirmer le diagnostic par l'observation des lésions intestinales chez des souris ayant ingéré des oocystes contenus dans les selles, après leur lavage et désinfection dans l'eau distillée et dans l'alcool à 60 p. 100.

- SÉROLOGIE

L'immunofluorescence indirecte avec comme antigène, des coupes d'intestins surinfectés d'animaux élevés dans des conditions stériles ("specific pathogen free"), est très sensible.

Le test ELISA est pratiqué sur des oocystes purifiés, soniqués pour libérer les sporozoïtes. Les IgG persistent moins d'un an.

De nouveaux antigènes sont à l'étude. Ceux des formes endogènes (schizontes), différents des antigènes de parois d'oocystes, donneraient des réactions plus sensibles: des échantillons de population pris au hasard présentent 86 p.100 de positifs avec l'IFI sur Ag de formes endogènes tandis qu'ils ne présentent que

5 p.100 de positifs avec le test ELISA sur Ag de paroi d'oocyste.

Source de matériel pour l'étude du parasite

Le parasite est cultivable *in vitro* sur des lignées cellulaires diverses. Le cycle est reproduit dans sa totalité, du sporozoïte qui constitue l'inoculum jusqu'à l'oocyste sporulé. Il n'y a cependant qu'une seule schizogonie, ce qui limite considérablement le rendement des cultures.

Cependant, la source la plus importante d'oocystes est sans conteste le veau infecté et le patient immunodéprimé au cours de ses épisodes diarrhéiques prolongés.

Transmission et épidémiologie

Il est prouvé que des infections animales peuvent passer à l'homme: les animaux familiers et les veaux font des diarrhées et éliminent de grandes quantités d'oocystes même après la disparition des symptômes.

Mais les contaminations dans les familles, les hôpitaux, les crèches montrent que la transmission directe, d'homme à homme, existe. Des explosions épidémiques sont observées dans les garderies (tout comme avec Rotavirus, *Shigella* sp., *Clostridium difficile*, *Giardia intestinalis* ...). L'âge le plus touché est de 6 à 12 mois tandis qu'il est de 1 à 3 ans pour *G. intestinalis*.

La transmission indirecte par l'eau, les aliments (lait cru) existe également.

Enfin, la transmission par voie respiratoire semble possible (infections expérimentales de porcelets).

Les oocystes sont résistants aux désinfectants; ils éclosent spontanément après un temps variable, dépendant de la température et du milieu dans lequel ils se trouvent. Les saisons ont une influence: l'incidence est plus importante si l'atmosphère est chaude et humide. Les sporozoïtes ne peuvent survivre en dehors de l'oocyste, ils doivent entrer rapidement dans une cellule.

Le parasite est responsable de 1,5 p.100 des gastro-entérites dans les pays développés et de 4,7 p.100 (et même certainement davantage) dans les pays en voie de développement.

C'est une cause supplémentaire de diarrhée du voyageur. Signalons quelques pays à risque spécial: Caraïbes, Mexique, Asie du Sud-Est, URSS, Afrique Centrale.

Traitement et prévention

Purement symptomatique chez les sujets immunocompétents, le traitement est très difficile en cas de diarrhée sévère. On ne connaît pas de drogues efficaces contre *Cryptosporidium*.

Beaucoup de médicaments ont été essayés: antimicrobiens, antiprotozoaires, anthelminthiques, antimalariques, antimycoplasma, antitreponèmes, antiviraux, antituberculeux, antihistaminiques, Ivermectine...

Des résultats douteux ont été obtenus avec la spiramycine.

Le colostrum de vaches immunisées par des injections d'antigènes d'oocystes a été essayé ...

Les selles des malades étant très infectantes, il est important de prendre des précautions drastiques dans les unités de soins où séjournent des patients immunodéprimés (transplantations, chimiothérapie anticancéreuse, services accueillant les malades atteints de SIDA...).

3.3 *Cyclospora cayetanensis*

Historique

La découverte de ce parasite protozoaire est très récente. On avait indentifié comme "granules cyanobactériens" des corpuscules arrondis à reflets bleuâtres dans les selles de sujets diarrhéiques, immunodéprimés ou non. L'examen en microscopie électronique, puis la sporulation provoquée des oocystes ont permis, en 1993, de connaître leur nature coccidienne.

Cycle évolutif

Chez l'homme, on a décrit des stades schizogoniques dans l'épithélium intestinal (intestin grêle) et les oocystes dans les matières fécales aussi bien que dans le liquide duodénal. Les oocystes incubés à 30°C subissent une maturation (sporulation) et placés dans une solution de trypsine, ils libèrent des sporozoïtes pourvus de micronèmes comparables à ceux des coccidies (Apicomplexa). On n'en sait pas plus.

Pathologie

L'infection peut causer des épisodes diarrhéiques successifs entrecoupés de périodes de rémission. Le parasite a été identifié pendant des épisodes diarrhéiques ou en dehors de ceux-ci chez des sujets atteints de SIDA comme de sujets immunologiquement intacts.

Diagnostic

Il repose sur la mise en évidence d'oocystes, sporulés ou non, mesurant de 8 à 10 μ m de diamètre dans les selles ou le produit d'aspirations duodénales.

Les oocystes sporulés contiennent parfois deux sporocystes visibles sans coloration. La paroi est souvent bien colorée par le Ziehl (acido-résistance), comme ceux de *Cryptosporidium*.

A frais, les oocystes apparaissent comme des billes sphériques, transparentes et brillantes, avec des structures internes allant du stade "morula", 6 à 8 petits globules réfringents juxtaposés, jusqu'à deux volumineuses formations granuleuses qui sont les sporocystes. Les sporozoïtes ne sont pas visibles au microscope optique. Après sporulation, ils s'avèrent être au nombre de deux par sporocyste, alors que chez *Isospora*, il y a quatre sporozoïtes par sporocyste (tableau 14-1 et figure 14-6).

Epidémiologie

Le parasite est cosmopolite. Il est clair que l'eau et le lait cru sont des sources de contamination importantes mais la viande crue ne peut pas être exclue.

On n'a pas beaucoup d'information sur un possible réservoir animal, ni sur la présence éventuelle d'un hôte intermédiaire. Jusqu'à présent, le parasite est considéré comme une coccidie monoxène de l'homme, tout comme *Isospora belli*.

Chez des porteurs sains, l'excrétion d'oocystes persiste pendant une vingtaine de jours.

Traitement

Les associations triméthoprim-sulfaméthoxazole ou de tétracycline-acide folique semblent avoir un effet sur l'évolution des symptômes. Le métronidazole, la norfloxacine, la paromomycine et le furoate de diloxanide seraient sans effet.

Figure 14-6

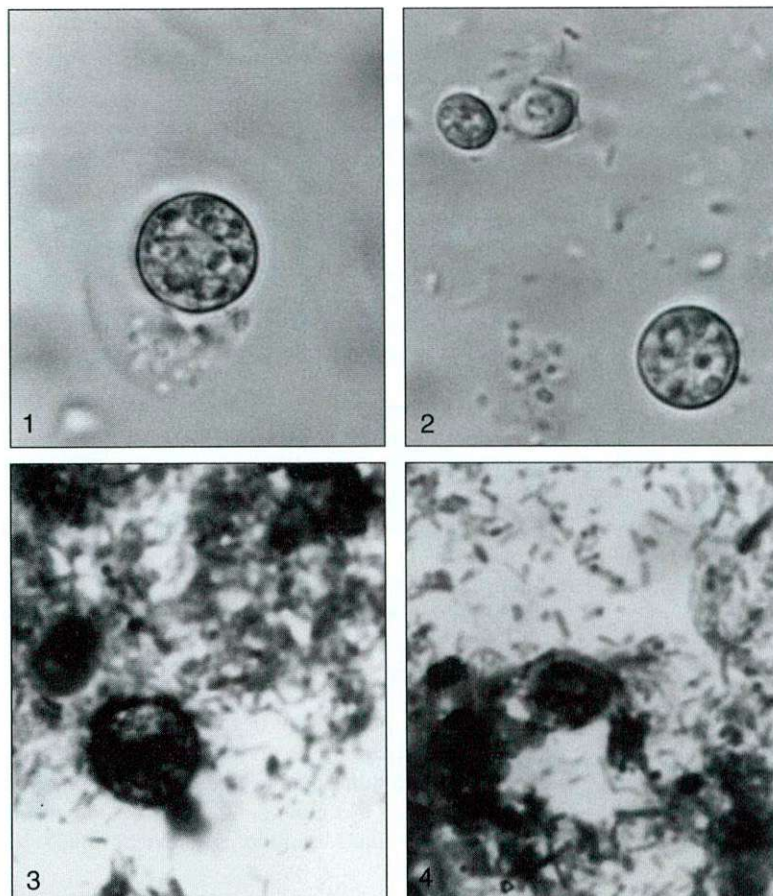
Oocystes de *Cyclospora*

1, 2 A frais

3, 4 Après coloration à la safranine-bleu de méthylène

N.B. Sur la photo 2, remarquer la taille de deux levures, dans le coin supérieur gauche.

Matériel aimablement fourni par E. Mangelschots, IMT Anvers.



BIBLIOGRAPHIE

- KHEYSIN YM. (1972) *Life cycles of Coccidia of Domestic Animals*, Baltimore, University Park Press.
- ASHFORD RW. (1979) Occurrence of an undescribed coccidian in man in Papua New Guinea, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **73**, 497-500.
- BIRD RG. (1981) Protozoa and Viruses. Human Cryptosporidiosis and Concomitant Viral enteritis, In: EU CANNING (Ed.) *Parasitological Topics*, Kansas, USA, Allen Press Inc.
- TZIPORI S. (1983) Cryptosporidiosis in Animals and Humans, *Microbiological Reviews* (American Society for Microbiology), **47**, 84, .
- TZIPORI S. (1988) Cryptosporidiosis in perspective. In JR BAKER and R MULLER (Eds), *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **27**, 63-129.
- BALL SJ, PITTILO RM, LONG PL. (1989) Intestinal and extraintestinal life cycles of Eimeriid Coccidia, In: JR BAKER and R MULLER (Eds), *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **28**, 1-54.
- Montana State University (1991) Second International Workshop on *Pneumocystis*, *Cryptosporidium* and *Microsporidia*, *Journal of Protozoology*, **38**, 2S-245S.
- POLLOCK RCG, BENDALL RP, MOODY AH et al. (1992) Traveller's diarrhoea associated with cyanobacterium-like bodies, *The Lancet*, **340**, 556-557.
- ORTEGA Y, STERLING CR, GILMAN RH et al. (1993) Cyclospora species - a new protozoan pathogen of humans, *New England Journal of Medicine*, **328**, 1308-1312.
- CHIODINI PL. (1994) A "new" parasite: human infection with *Cyclospora cayetanensis*, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**, 369-371.

Coccidies hétéroxènes

Les genres *Toxoplasma* et *Sarcocystis* (Eimeriida)

La toxoplasmose humaine

15

Introduction: famille des Eimeriidae Relations entre les genres

La famille des Eimeriidae comprend (tableau 15-1)

- les genres *Eimeria*, *Isospora* et *Cryptosporidium*, trois groupes de parasites dont la schizogonie et la sporogonie se passent exclusivement dans les cellules épithéliales de l'intestin, chez un seul et même hôte (coccidies monoxènes);
- le genre *Toxoplasma* pour lequel, à côté des schizogonies et sporogonie évoluant dans l'épithélium intestinal d'un hôte (felidés), on reconnaît une reproduction asexuée extrêmement fréquente et abondante dans la plupart des tissus d'un éventail très large d'hôtes vertébrés (hétéroxène facultatif);
- les genres *Sarcocystis*, *Besnoitia* et *Frenkelia* pour lesquels la sporogonie seule évolue dans l'épithélium intestinal d'un hôte, tandis que la schizogonie se passe dans les tissus (muscles, cerveau, etc.) d'un autre hôte vertébré (hétéroxènes obligatoires).

1. *Toxoplasma gondii*

1.1 Historique

Toxoplasma gondii a été décrit pour la première fois en Tunisie en 1908 par Nicolle et Manceaux chez un rongeur sauvage, *Ctenodactylus gundi*. Ce parasite, inoculé à des rongeurs sauvages maintenus en captivité ainsi qu'à des souris blanches de laboratoire, se multiplie dans les cellules lymphoïdes et tue son hôte en quelques jours. Il s'agit donc d'un parasite très virulent. Par la suite, ce parasite a été retrouvé et isolé à partir d'animaux divers: chiens, lièvres, lapins, rats sauvages, cobayes, taupes, pigeons et nombreux autres oiseaux. On peut le retrouver dans toutes les parties du monde. C'est un parasite très répandu et très fréquent dans la nature.

Des études morphologiques et des essais d'inoculation à divers hôtes ont apporté la preuve qu'il n'existe qu'une seule espèce de *Toxoplasma*, capable d'infecter un éventail extrêmement large d'hôtes vertébrés (mammifères, oiseaux).

Introduction:
famille des Eimeriidae

1. *Toxoplasma gondii*
 - 1.1 Historique
 - 1.2 Classification
 - 1.3 Hôtes habituels
 - 1.4 Cycle évolutif de *Toxoplasma gondii*
 - 1.5 Pouvoir pathogène
 - 1.6 Diagnostic
 - 1.7 Traitement curatif
 - 1.8 Épidémiologie
 - 1.9 Mesures prophylactiques

2. *Sarcocystis* spp.
 - 2.1 Introduction
 - 2.2 Cycle évolutif

3. *Besnoitia*
4. *Frenkelia*

Bibliographie

FIGURES

- 15-1 Schéma du cycle de *Toxoplasma gondii*
- 15-2 Ultrastructure d'un trophozoïte de *Toxoplasma*
- 15-3 Zoïtes et kystes de *Toxoplasma*
- 15-4 Circulation des toxoplasmes
- 15-5 Schéma du cycle de *Sarcocystis*
- 15-6 Zoïtes et kystes de *Sarcocystis*
- 15-7 Oocystes de *Sarcocystis*

Tableau 15-1

Tableau comparatif

Caractère	<i>Isospora</i>	<i>Toxoplasma</i>	<i>Sarcocystis</i>
Nombre d'hôtes	1	2	2
Hôte définitif	Nombreux carnivores	Felidés	Divers (sporogonie)
Schizogonie intestinale	Epithélium	Epithélium	Absente
Gamétogenèse intestinale	Epithélium	Epithélium	Sous-épithéliale
Cycle extra-intestinal	Rare ou absent	Abondant	Abondant
Lieu du cycle extra-intestinal	-----	Cerveau et tous les organes	Muscle (kystes), foie, rein, rate (schizontes)
Paroi du kyste extra-intestinal		Fine	Épaisse

N. B. Ces trois genres ont en commun un oocyste présent dans les matières fécales contenant deux sporocystes avec chacun quatre sporozoïtes (Garnham, 1975).

Le parasite est pour la première fois observé chez l'homme en 1916, à Ceylan d'abord, puis en Russie méridionale. La maladie n'est reconnue chez l'homme que vers 1923 par Janku en Europe centrale et le tropisme du parasite pour les tissus nerveux (encéphale, œil) est immédiatement mis en évidence. L'infection congénitale est reconnue en 1937 par Wolf. L'infection généralisée chez l'homme adulte avec prédominance lymphoïde (fièvre ganglionnaire) est décrite en 1940. Depuis le développement de méthodes fiables pour la mise en évidence d'anticorps antitoxoplasmiques (dye-test de Sabin et Feldman, 1948), on s'est rendu compte que l'homme est en contact permanent avec le parasite et que, à côté des cas de toxoplasmose aiguë cliniquement reconnus, il y a de très nombreux porteurs sains chez qui l'affection est chronique ou inapparente.

La transmission par la viande crue est évoquée par Weinman et Chandler en 1954 tandis que la démonstration de l'infection par les fèces du chat date de 1968. C'est entre 1968 et 1973 que la nature véritable du parasite a été reconnue par Hutchinson: il s'agit d'un parasite coccidien qui évolue chez deux hôtes vertébrés (hétéroxène) avec alternance de plusieurs modalités de reproduction asexuée, produisant divers types de trophozoïtes tissulaires ou intestinaux ainsi que des kystes tissulaires et d'une reproduction sexuée localisée dans l'intestin des seuls félinés et produisant des oocystes éliminés dans le milieu extérieur avec les matières fécales.

A partir de 1982, le syndrome de déficience immunitaire acquise amène la toxoplasmose au premier rang des maladies opportunistes avec l'encéphalite aiguë, principale localisation, spectaculaire, de l'infection.

1.2 Classification

Les caractères de l'ordre des Eimeriida sont décrits au chapitre 14. Ces parasites possèdent des oocystes de taille fixe, ne grandissant pas au cours de la maturation et représentant un stade de résistance en milieu extérieur. Des sporocystes sont présents à l'intérieur de l'oocyste. Chaque sporocyste contient un petit nombre de sporozoïtes (stade infectant). Contrairement aux hémosporidies, il n'y a pas de stade sanguin de développement du parasite et il n'y a pas d'hôte invertébré (vecteur); tout le cycle se passe dans la paroi intestinale et dans les tissus des hôtes vertébrés.

La famille des Eimeriidae est caractérisée par un développement intracellulaire de tous les stades du cycle évolutif; les oocystes possèdent de 0 à 4 sporo-

cystes; les sporocystes contiennent un ou plusieurs sporozoïtes; la schizogonie et la sporogonie se passent chez le même hôte (monoxènes) ou chez deux hôtes successivement (hétéroxènes); les oocystes sont éliminés en dehors de l'hôte dans les matières fécales; les microgamètes (mâles) possèdent 2 ou 3 flagelles. Pratiquement tous les hôtes sont des vertébrés.

Dans le genre *Toxoplasma*, les oocystes éliminés dans les matières fécales de l'hôte définitif contiennent deux sporocystes avec 4 sporozoïtes chacun et la sporogonie se termine en dehors de l'hôte.

Chez l'hôte intermédiaire, on note la présence de deux types de trophozoïtes, tachyzoïte (ou endozoïte) et bradyzoïte (ou cystozoïte). Les stades tissulaires (parentéraux) sont prédominants. La division binaire se fait par endodyogénie (formation de pseudokystes et de kystes vrais) et la reproduction asexuée peut durer indéfiniment, sans qu'une sporogonie ne soit intercalée dans le cycle (hétéroxène facultatif).

1.3 Hôtes habituels

Hôtes intermédiaires

Avec l'homme, un éventail très large d'oiseaux, domestiques (pigeons, volaille) ou non, d'animaux domestiques (bétail, porc, chien, lapin, souris, rat, etc.) et d'animaux sauvages (gibier, rongeurs, etc.) peuvent héberger le parasite qui, par ce fait, est cosmopolite.

Hôtes définitifs

Les seuls animaux chez qui les cycles schizogonique et sporogonique ont été décrits sont le chat et autres félinés.

1.4 Cycle évolutif de *Toxoplasma gondii*

La schizogonie et la sporogonie ont lieu dans les cellules intestinales des félinés :

- le développement sexué donne des oocystes, présents dans les matières fécales des chats. De forme ellipsoïde de $12,5 \times 11 \mu\text{m}$, ils contiennent deux sporocystes ovales de $8 \times 6 \mu\text{m}$ et des sporozoïtes de $8 \times 2 \mu\text{m}$, au nombre de quatre par sporocyste.
- les stades asexués se développent dans l'intestin, le cerveau, les muscles, les leucocytes mononucléaires des exsudats péritonéal et autres, chez le chat mais aussi chez de très nombreux mammifères et oiseaux (au moins 200 espèces). La transmission est possible d'un hôte à l'autre sans passage par les félinés, par ingestion de trophozoïtes.

Nomenclature des stades du cycle évolutif

- STADES DANS L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL (FÉLIDÉS)

Trophozoïte: parasite (sporozoïte ou mérozoïte) ayant pénétré dans une cellule de l'épithélium intestinal et commençant l'évolution vers le schizonte.

Schizonte: parasite à plusieurs noyaux produisant les mérozoïtes.

Mérozoïte: parasite issu de la schizogonie.

Gamétocyte: cellule précurseur du gamète mâle ou femelle. Chez le mâle, le noyau se fragmente en plusieurs morceaux; chez la femelle le noyau reste unique.

Zygote: produit de la fécondation du gamète femelle par le gamète mâle.

Oocyste: zygote possédant une paroi protectrice épaisse. Il sera rejeté à l'extérieur avec les matières fécales.

Sporocyste (ou sporoblaste): cellule contenue dans l'oocyste qui va se diviser pour donner les sporozoïtes.

La plupart de ces stades correspondent à un stade évolutif des plasmodiums. Ici, cependant, schizogonie et sporogonie se passent toutes deux chez le même hôte et dans le même organe. Tous ces stades sont également retrouvés chez les coccidies monoxènes (*Isospora* et *Eimeria*): les cycles sont superposables.

- STADES TISSULAIRES (HÔTES INTERMÉDIAIRES)

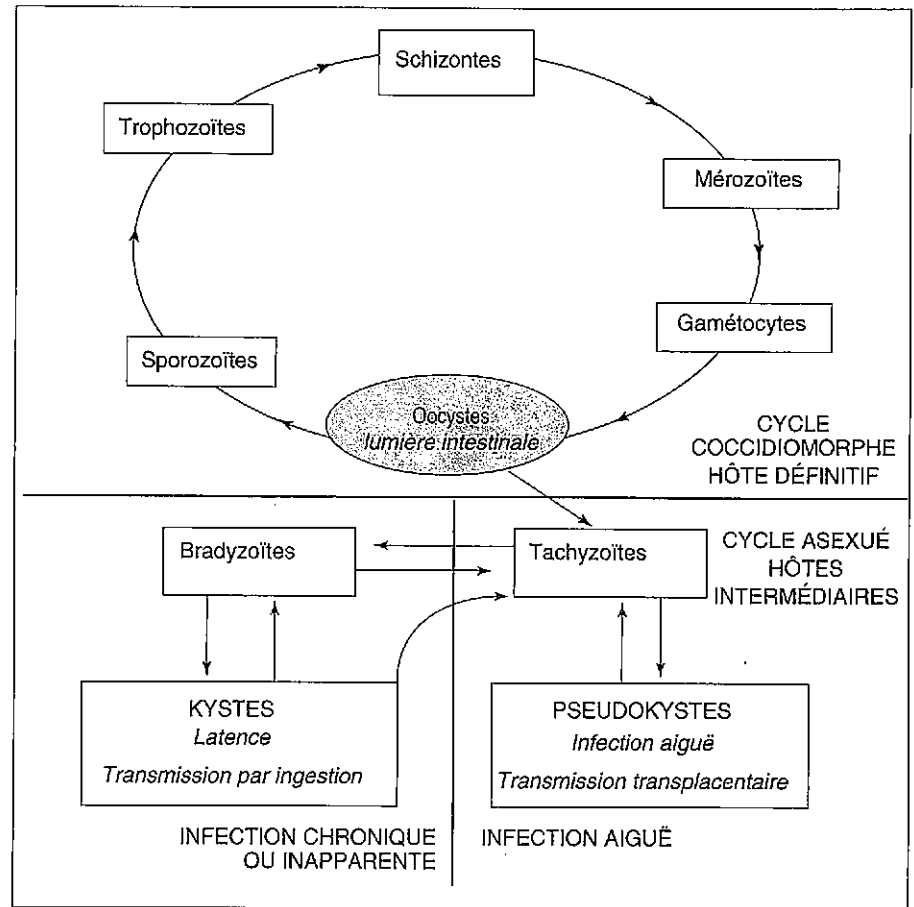
Tachyzoïte (ou **endozoïte**): trophozoïte asexué se multipliant rapidement par endodyogénie à l'intérieur d'une cellule hôte (macrophage) pour former un pseudo-kyste. L'accumulation des parasites entraîne la destruction de la cellule et les libère.

Bradyzoïte (ou **cystozoïte**): parasite se reproduisant lentement par endodyogénie, à l'intérieur d'une paroi kystique qui va persister.

Kyste vrai: amas de bradyzoïtes à l'état quiescent, enfermés à l'intérieur d'une paroi épaisse sécrétée par les parasites au contact de la paroi d'une cellule hôte. Cette paroi de la cellule hôte peut disparaître secondairement, le kyste restera compact.

Cycle coccidiomorphe (intestinal) chez les félidés

Le chat et les autres félidés sont les seuls animaux capables d'héberger le cycle complet (asexué et



sexué) de ce parasite. Ils sont donc appelés les hôtes définitifs (figure 15-1).

Chez le chat qui a ingéré des oocystes (matières fécales) ou des cadavres d'animaux infectés de toxoplasmes (tachyzoïtes, bradyzoïtes) on trouve, dans les cellules de l'épithélium intestinal, des schizontes (donc une pathologie intestinale) et des gamétocytes aboutissant à la formation d'oocystes éliminés dans les matières fécales.

Le cycle peut continuer indéfiniment chez l'hôte définitif par schizogonie et reproduction sexuée concomitantes, suite à des réinfections fréquentes: le chat, par son comportement indépendant, ses activités de chasse, son immixtion dans l'intimité de l'homme est un réservoir important et un disséminateur redoutable du parasite.

D'autre part, le chat ne fait pas exception: il héberge, comme la plupart des autres espèces animales, les stades tissulaires asexués donnant une pathologie générale.

Figure 15-1

Schéma du cycle de *Toxoplasma gondii*

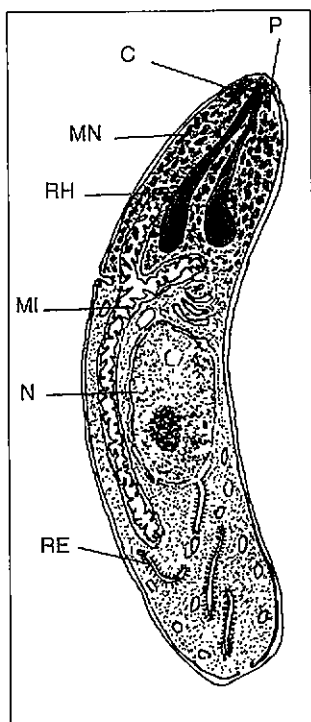


Figure 15-2

Ultrastructure d'un trophozoïte de *Toxoplasma*

P	anneau polaire
C	conoïde
MN	micronèmes
RH	rhoptries
MI	mitochondrie
N	noyau
RE	réticulum endoplasmique

Cycle chez l'hôte intermédiaire

L'hôte intermédiaire peut être n'importe quel mammifère (y compris l'homme) ou un oiseau.

Il peut s'infecter soit à partir des oocystes produits par le chat, soit à partir des kystes ou des formes végétatives (bradyzoïtes et tachyzoïtes) présents dans les muscles (viande) d'un animal infecté, ainsi que dans le sang, le lait, les urines de cet animal.

Le déroulement de cette partie du cycle se fait en deux phases: une phase aiguë et une phase chronique ou latente. Durant la phase aiguë, les trophozoïtes, issus des kystes tissulaires contenus dans la viande de nombreuses espèces animales ou des oocystes provenant du chat, se multiplient activement dans les tissus lymphatiques, musculaires, nerveux et provoquent une maladie aiguë, souvent mortelle chez l'animal infecté expérimentalement (tachyzoïtes, pseudokystes). Cet épisode aigu est dangereux pour le fœtus chez la femme enceinte. Chez la plupart des hôtes, et chez l'homme tout particulièrement, la phase proliférative s'arrête au bout d'un temps assez court grâce aux défenses immunitaires de l'hôte et aussi, sans doute, parce que l'adaptation du parasite à l'homme est plus laborieuse. A ce moment, les parasites ralentissent leur multiplication et s'enkystent dans certains organes (bradyzoïtes, kystes).

Ces kystes vrais sont entourés d'une membrane, propre au parasite, qui enferme et protège un grand nombre de petits trophozoïtes. Ils peuvent rester sur place pendant de très longues périodes sans provoquer de symptômes et sont à l'origine de rechutes, surtout chez l'hôte immunodéprimé.

Si les kystes ou les trophozoïtes sont ingérés par un nouvel hôte intermédiaire (viande mal cuite, cannibalisme chez les rongeurs), les parasites recommencent à se multiplier chez le nouvel hôte où ils sont à l'origine d'un nouveau cycle asexué.

Si les kystes ou les trophozoïtes sont ingérés par un chat (ingestion de cadavres infectés, cannibalisme), les trophozoïtes commencent un cycle schizogonique dans les cellules de l'intestin. Puis la gamétogénèse intervient avec production d'oocystes, seule forme de résistance du parasite en milieu extérieur.

Morphologie et caractères biologiques chez l'hôte intermédiaire

- TROPHOZOÏTES (TACHYZOÏTES ET BRADYZOÏTES)

Parasite intracellulaire de 6 à 12 μm de long sur 3 à 4 μm de large, il présente la forme d'un croissant

ou d'un ovoïde asymétrique avec une extrémité effilée (pôle apical) et l'autre arrondie. Après coloration au Giemsa, le noyau ovoïde rouge occupe une position centrale dans un cytoplasme bleu, homogène et dépourvu de pigment.

Ces trophozoïtes se retrouvent dans les histiocytes, les monocytes et dans toutes les cellules nucléées, parfois même dans les globules rouges (infections expérimentales d'oiseaux et de souris). Ce sont donc en général des parasites adaptés à la vie intracellulaire. On peut cependant les retrouver à l'état libre dans les exsudats (liquide péritonéal de souris). La pénétration des toxoplasmes dans les cellules est active.

Au microscope électronique on retrouve, comme dans un mérozoïte de *Plasmodium*, le complexe apical, constitué surtout de rhoptries, organelles cytoplasmiques en forme de "club" de golf comme la lettre grecque ρ (rho, d'où leur nom). Les parasites de la classe des Apicomplexa (les coccidies, caractérisées par ce "complexe apical", d'où le nom donné par certains systématiciens à ce groupe de parasites sporozoaires) présentent des rhoptries dans tous les stades parasitaires invasifs, chargés de la pénétration dans une cellule hôte (sporozoïte et mérozoïte de *Plasmodium*, *Eimeria*, *Isospora*, etc.) (figure 15-2).

Chez les "zoïtes" de *Toxoplasma*, on compte plus de 8 rhoptries par cellule. Elles sont dérivées de l'appareil de Golgi et ont une fonction sécrétoire. Leur contenu, mélange complexe de plusieurs protéines à fonction enzymatique ou d'intégration dans la membrane externe des cellules cibles, s'écoule par le pôle apical après l'attachement du parasite à la cellule hôte (macrophage ou autre). Il se produit alors une invagination de la membrane externe de la dite cellule, qui permet au parasite d'y pénétrer, entouré d'une paroi protectrice le séparant du cytoplasme et de ses corpuscules acidifiants ou lytiques. En effet, la vacuole qui contient le parasite (vacuole parasitophore) ne fusionne pas avec les lysosomes comme les vacuoles alimentaires et le parasite est donc protégé. Par contre, si le parasite reconnu par le macrophage est recouvert d'anticorps (opsonisé), il est phagocyté et digéré.

- PSEUDOKYSTES

Ce sont des macrophages remplis de parasites qui se sont divisés par bipartition à l'intérieur de la cellule, dans une vacuole parasitophore; on les retrouve dans les infections aiguës, surtout au niveau du système réticuloendothélial (figure 15-3).

La paroi de ces "faux kystes" est donc étrangère au parasite puisqu'elle est constituée par la membrane cellulaire. On les reconnaîtra facilement grâce à la présence du noyau de la cellule hôte.

Lorsque l'espace intérieur est complètement occupé par les parasites, la cellule hôte dégénère et les parasites sont libérés.

- **KYSTES VRAIS**

Ils sont le résultat d'une série de divisions par bipartition sans séparation des cellules filles. La membrane de la cellule mère n'est pas dissoute et sert d'enveloppe au kyste. Ils peuvent atteindre une taille de 30 à 50 µm, ont une forme ronde ou ovale et contiennent de 50 à plusieurs centaines de parasites. A l'intérieur de ces kystes, situés dans les organes abdominaux, les muscles et surtout le cerveau et l'œil, les parasites peuvent survivre pendant de nombreuses années, parfois pendant toute la vie du sujet porteur. Les kystes peuvent également évoluer vers la calcification ou se rompre pour des raisons mal connues. Les parasites sont alors libérés et une infection subaiguë ou aiguë peut se produire (récidives).

Les kystes constituent une forme de résistance tissulaire mais ils dégénèrent rapidement en milieu extérieur. Ils doivent être ingérés par le nouvel hôte en même temps que l'organe dans lequel ils se trouvent (chez l'animal vivant ou à l'état de cadavre).

Remarque

La division du toxoplasme par bipartition possède une caractéristique très particulière: les deux cellules filles se forment complètement à l'intérieur de la membrane externe de la cellule mère. Les parois des cellules filles sont donc totalement distinctes de celle de la cellule mère. Si la paroi de la cellule mère disparaît après la division, on assiste au résultat de la bipartition et on se trouve en présence de deux parasites.

Si au contraire la paroi de la cellule mère persiste, les divisions se poursuivent à l'intérieur de cette paroi et on assiste à la formation d'un kyste vrai.

1.5 Pouvoir pathogène

Toxoplasmose acquise

L'individu qui s'infecte au cours de sa vie fait, le plus souvent, une infection inapparente. Parfois survient une maladie aiguë ou chronique, localisée ou généralisée. Les localisations sont diverses: cerveau (encéphalite), peau (lésions maculo-papuleuses), oculaire (chorio-rétinite), cardiaque (myocardite), hémolympatique ou ganglionnaire (symptômes généraux plus ou moins marqués).

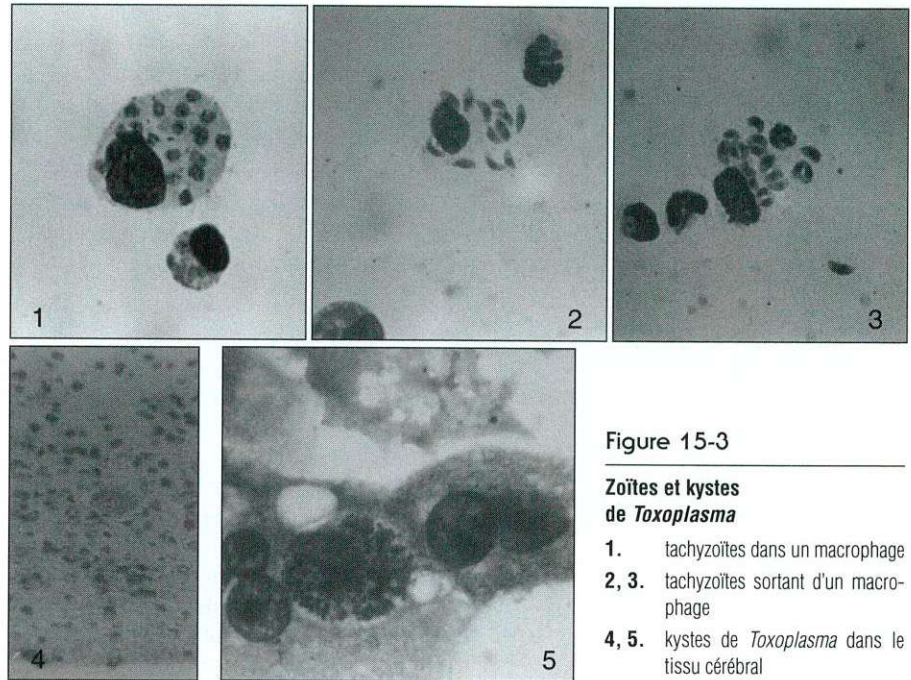


Figure 15-3

Zoïtes et kystes de *Toxoplasma*

1. tachyzoïtes dans un macrophage
- 2, 3. tachyzoïtes sortant d'un macrophage
- 4, 5. kystes de *Toxoplasma* dans le tissu cérébral

En cas d'infection inapparente, le parasite migre dans un organe profond, de préférence tissu nerveux ou muscle, et s'enkyste après une brève période de multiplication dans les ganglions. Le malade pourra faire un épisode fébrile, sans signe de localisation, qui rétrocede rapidement puis son état sera apparemment normal. Le seul signe de la présence des parasites dans son organisme sera alors la persistance d'anticorps antitoxoplasmiques. Outre les kystes, des endozoïtes (tachyzoïtes) peuvent continuer à se multiplier dans les cellules du système réticulo-endothélial pendant la phase de chronicité, d'où le titre d'anticorps non négligeable observé pendant de longues périodes.

Toxoplasmose congénitale

C'est la complication d'une infection acquise par une femme ne possédant pas d'anticorps et qui est enceinte au moment de l'infection. Dans les primo-infections, même en cas d'infection asymptomatique, les parasitémies sont courantes (mais non visibles au microscope). L'époque de la formation du placenta est la plus dangereuse au point de vue transmission au fœtus: les macrophages parasités, restés prisonniers de la circulation placentaire, peuvent provoquer des proliférations parasitaires locales qui aboutissent à une ulcération nécrotique communiquant éventuellement avec la circulation fœtale.

Chez le fœtus, malgré le passage des IgG provenant de la mère, les toxoplasmes ne subissent pas de lyse car les fractions du complément et le magnésium font défaut. Il est donc normal que l'infection cause plus de dégâts chez le fœtus que chez la mère.

La fréquence des infections chez les fœtus dont la mère a fait une infection aiguë pendant sa grossesse est de 10 à 20 p.100 environ. La plupart de ces infections congénitales causent un avortement.

Lorsque la grossesse est menée à terme, il faut redouter

- la méningo-encéphalite datant de la vie intra-utérine avec tendance à la nécrose hémorragique et à l'hydrocéphalie, aboutissant à la destruction complète du tissu cérébral (enfant mort-né). Toutes les formes intermédiaires existent: divers degrés d'hydrocéphalie ou de microcéphalie, plus ou moins compatibles avec la survie de l'enfant et des formes moins graves avec conservation presque intégrale du cerveau, où seule la radiographie peut déceler quelques petites lésions calcifiées chez l'enfant.
- la chorio-rétinite avec lésions caractéristiques visibles à l'ophtalmoscopie dans 90 p.100 des cas de toxoplasmose congénitale.

Réveil de l'infection latente

Les formes latentes peuvent, par éclatement des kystes et réveil de la multiplication des endozoïtes, donner lieu à une rechute aiguë ou subaiguë.

Les infections inapparentes peuvent se réactiver chez des patients dont la réponse immune est supprimée: Sida, affections malignes, Hodgkin, transplantations cardiaques ou autres.... Chez les malades atteints de SIDA, l'encéphalite toxoplasmique est fréquemment observée, conduisant rapidement au décès. Le diagnostic est difficile dans ces cas parce que la sérologie peut rester négative. Après le traitement (laborieux) de l'épisode encéphalitique, la prophylaxie devra être prolongée indéfiniment pour éviter d'autres rechutes.

Virulence des parasites et réceptivité des hôtes

Différentes souches de toxoplasmes peuvent provoquer, chez une espèce donnée d'animal, des infections aiguës, subaiguës ou chroniques.

D'autre part, certaines espèces animales sont extrêmement réceptives (souris, cobaye); d'autres au contraire sont résistantes (rats). Cette différence serait

due à la rapidité de multiplication des tachyzoïtes à l'intérieur des macrophages.

1.6 Diagnostic

Mise en évidence du parasite

• EXAMEN MICROSCOPIQUE

Sa difficulté a, de tout temps, découragé les microscopistes: le parasite (tachyzoïte ou kyste) est rare dans les prélèvements; il se trouve dans des organes difficiles d'accès (ganglions, rate, moelle osseuse, cerveau); enfin, étant immobile et intracellulaire, il n'est reconnaissable que sur des préparations fixées et colorées. Les frottis ou empreintes d'organes sont préférables aux coupes histologiques (comme pour les leishmanies) car un parasite coupé transversalement perd une partie de ses déjà rares caractéristiques morphologiques.

Les frottis et empreintes de tissus peuvent être colorés au Giemsa mais la coloration à l'éosine - bleu de méthylène en solutions aqueuses (RAL 555) procure l'avantage de colorer les toxoplasmes plus intensément que les cellules qui les entourent, ce qui facilite leur repérage.

Dans les coupes histologiques, les tachyzoïtes sont le mieux colorés par le PAS (Periodic Acid - Schiff). Il permet de faire la différence avec des amastigotes de *Leishmania*, qui sont également dans les macrophages. Chez les patients sidéens, dans certains cas, la biopsie du cerveau est justifiée, dirigée par CT Scan ou résonance magnétique nucléaire.

• INOCULATION AUX ANIMAUX ET CULTURE

Il faudra recourir à l'inoculation à la souris blanche mise sous corticothérapie ou à la culture de tissu. L'inoculum proviendra de liquide de ponction ganglionnaire, de tissu cérébral ou de placenta après la naissance d'un enfant mort ou présentant des anomalies neurologiques suspectes. Il est cependant difficile de se procurer des animaux dont on est certain qu'ils ne soient pas spontanément infectés.

• RÉSULTATS DU DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE CLASSIQUE

Il est plus ou moins rentable ($\pm$ à ++++) dans les formes acquises en évolution ou dans les formes congénitales, c'est-à-dire dans toutes les formes où on assiste à une multiplication et dissémination du parasite.

- infection chez les immunodéficients: +++ (inoculation à la souris ou en culture de tissus à partir de biopsie d'abcès cérébral ou du sang)
- infection active lympho-ganglionnaire: ±
- toxoplasmose oculaire chez le jeune enfant: ± (ponction d'humeur aqueuse, en théorie!)
- femme enceinte et nouveau-né: + (à partir de placenta, de sang du cordon, du liquide amniotique)
- APPORTS DE L'IMMUNOLOGIE ET DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

L'IFI peut être appliquée sur des frottis et empreintes d'organes traités par un monoclonal spécifique et faciliter le repérage des parasites au microscope.

La mise en évidence d'antigènes circulants a été proposée en utilisant le principe de l'ELISA capture. On utilise des plaques à godets sensibilisés par des anticorps spécifiques antitoxoplasmiques, éventuellement un mélange d'anticorps monoclonaux, chargés de reconnaître les antigènes ou les complexes antigéniques circulants, dissous dans le sérum ou dans le surnageat d'un homogénéisat de biopsie. Il y a cependant des difficultés du fait de la complexité des antigènes circulants de toxoplasmes et de protozoaires en général: antigènes membranaires, cytoplasmiques, sécrétés. De plus, le toxoplasme étant la cause de nombreuses infections inapparentes, l'antigène peut être présent dans le sérum en dehors des poussées aiguës, ce qui diminue la valeur diagnostique de la méthode.

Les sondes nucléiques ou la PCR pour détecter la présence de matériel nucléaire toxoplasmique dans les prélèvements sont à l'étude.

Diagnostic sérologique

Il est, de loin, le plus fréquemment utilisé actuellement.

- CINÉTIQUE DES ANTICORPS AU COURS DE L'INFECTION

Pendant la phase d'invasion, qui dure jusqu'à 4 semaines, les IgM seules sont sécrétées. Pendant la phase aiguë (du 2ème mois au début du 4ème mois), les IgM restent élevées tandis que les IgG et IgA sont également retrouvées en quantités appréciables. Pendant cette période, on observe une chute des fractions C3 et C4 du complément. Pendant la phase chronique, l'infection est stabilisée, les IgM baissent rapidement et disparaissent tandis que les IgG et IgA restent détectables très longtemps. Les fractions C3 et C4 sont reve-

nues à des concentrations normales dans le plasma. C'est à ce stade, en général, que sont enregistrées les données sur la prévalence.

- ANTIGÈNE

Il est produit à partir de liquide péritonéal de souris atteinte d'infection aiguë (souche virulente, entretenue au laboratoire); ce liquide contient des tachyzoïtes et des pseudokystes en voie de maturation. Il faudra obtenir une suspension purifiée de trophozoïtes que l'on pourra utiliser telle quelle (Ag figuré) ou après destruction par les ultrasons ou par une série de congélations-décongélations.

Remarque

On peut aussi utiliser des toxoplasmes entretenus sur culture de cellules carcinomateuses en lignées continues.

- RÉACTIONS UTILISÉES POUR LA TITRATION DES IgG

Le dye-test de Sabin et Feldman

Le principe de ce test met à profit la destruction *in vitro* de toxoplasmes vivants par des sérums contenant des anticorps spécifiques IgG, en présence de complément (utilisation de la voie classique C1 à C9) et de magnésium. Dans le dye-test de Sabin-Feldman, on visualise la lyse parasitaire par une perte de la colorabilité du cytoplasme par le bleu de méthylène alcalin (pH 11). Dans la variante de Desmond, la réaction est lue en observant le pourcentage de lyse au microscope à contraste de phase. Ce test met en évidence les IgG. Il est très fiable et a servi de réaction de référence pendant plus de trente ans. Sa mise en pratique est limitée car il nécessite l'emploi de sérum frais humain dépourvu d'anticorps antitoxoplasmiques comme source de complément et d'une suspension de parasites vivants (risques particuliers de contamination chez les manipulateurs). La souche de parasites doit être entretenue au laboratoire sur souris blanches.

Ce test reste reconnu comme un des plus fiables et garde une valeur historique. Vu sa complexité, il n'est plus pratiqué que par quelques laboratoires spécialisés.

L'immunofluorescence (Ag figuré)

Avec un conjugué anti-Ig total, elle donne un taux d'immunoglobulines sériques global.

L'agglutination directe

Le test de Fulton modifié, réalisé avec le sérum du patient avant et après traitement par le dimercapto-éthanol (qui détruit les IgM) et un antigène particulaire (toxoplasmes fixés au formol), permet de titrer séparé-

TEST	TITRE D'ANTICORPS	
	Contact avec le parasite Maladie inapparente	Maladie évolutive
Dye Test (Sabin-Feldman)	1 /32-1 /256	> 1 /256
Immunofluorescence (IFI-IgG)	1/10-1/1000	>1/1000
Immunofluorescence (IFI-IgM)	Négatif	Positif
Agglutination (IgG+IgM) (sérum avant 2-ME)*	1/4 à 1/64	> 1/64
Agglutination (IgG) (sérum après 2-ME)*	1/4 à 1/64	1/4 à 1/256

* 2-ME : dimercapto-éthanol

Tableau 15-2

ment les IgG et les IgM par déduction, après comparaison des deux titres obtenus.

Le test ELISA

Il utilise des godets sensibilisés par l'antigène (soluble) de *T. gondii*.

- RÉACTIONS UTILISÉES POUR LA RECHERCHE DES IGM

L'immunofluorescence

Elle est faite avec un conjugué spécifique anti-IgM humaines (ou anti-chaînes μ); ce test est pris en défaut lorsque les IgM sont occultées par des IgG (chez le nouveau-né par exemple).

Les tests immuno-enzymatiques

L'ELISA simple utilise un conjugué monospécifique anti-IgM

L'IgM capture fait intervenir les IgM seules, en utilisant des godets ou des tubes dont la paroi est recouverte d'anticorps anti-IgM (chaînes μ).

Le test d'agglutination de toxoplasmes

Après captage sur la paroi d'un godet des IgM du sérum du patient, ce test met en oeuvre des toxoplasmes formolés qui vont s'agglutiner en présence de ces anticorps. Il a été décrit sous le nom de "Immunosorbent Agglutination Assay" (ISAGA).

- TITRES SIGNIFICATIFS

Vu la grande fréquence des contacts entretenus avec le parasite, un pourcentage important de sujets possèdent des anticorps antitoxoplasmiques. Un diagnostic de toxoplasmose aiguë suppose donc la mise en évidence d'une montée du titre.

Deux éléments peuvent faire suspecter une maladie évolutive:

- un titre croissant au cours du temps (il faut donc au moins 2 prélèvements);
- la présence d'IgM antitoxoplasmiques dans le sérum du patient; celles-ci sont produites rapidement lors du contact avec le parasite en multiplication et ont une demi-vie courte. Leur présence indique donc une infection aiguë récente ou contemporaine (tableau 15-2).

Diagnostique sérologiques de toxoplasmose active

- FORME LYMPHOGANGLIONNAIRE

Augmentation du titre d'IgG de 16 fois ou plus;

Présence d'IgM par IFI-IgM ou ELISA-IgM ou ISAGA-IgM.

Remarques

Attention à la suppression des IgM par des IgG concomitantes; il est possible d'éliminer les IgG dans un sérum par adsorption sur la protéine A (*Staphylococcus aureus*).

Il est aussi possible d'utiliser le test d'agglutination modifié (avant et après traitement du sérum par le dimercapto-éthanol).

- TOXOPLASMOSE OCULAIRE

La sérologie est peu sensible, la recherche des anticorps dans l'humeur aqueuse peut être indicative mais est peu utilisée en routine.

- PATIENTS IMMUNODÉPRIMÉS

La sérologie est souvent peu sensible, la meilleure réaction restant l'agglutination.

- FEMME ENCEINTE

La logique de l'interprétation des résultats est exposée au tableau 15-3.

1.7 Traitement curatif

Antibiotiques

Spiramycine (Rovamycine®): 40 à 50 mg/kg/jour en 2 doses pendant 30 à 45 jours.

La Rovamycine® ne pénétrant pas dans le LCR n'est pas active contre l'encéphalite chez le patient atteint de SIDA.

Sulfamides en association avec les antifoliques

Il s'agit essentiellement de la double association

- sulfadiazine (Adiazine®): 100 mg/kg/jour (max. 4 g/jour)
- pyriméthamine (Daraprim®, Malocide®): 1 mg/kg/jour (max. 50 mg/jour)

à laquelle, on ajoute

- acide folinique: 2 à 10 mg deux fois par jour pendant le traitement à la pyriméthamine.

La cure est 4 à 6 semaines en cas de toxoplasmose aiguë. Chez la femme enceinte, éviter l'utilisation de la pyriméthamine. Chez les patients immunodéprimés, le traitement doit être continué sans interruption. En cas d'intolérance aux sulfamidés, l'association clindamycine-pyriméthamine peut être intéressante.

1.8 Épidémiologie

Les sources de contamination (pour l'homme et l'animal)

Les oocystes contenus dans les matières fécales des chats résistent pendant des mois sur ou dans le sol humide à température ordinaire. Ils peuvent être transportés par des mouches, des cancrelats, des vers de terre dans les pâturages, etc. Ils sont tués par une température de 70°C pendant 1 heure, mais résistent à la plupart des désinfectants.

Les kystes vrais sont situés dans les tissus (cerveau, intestin, muscles) des animaux où ils survivent plus de 2 mois dans la viande ou les abats conservés à +4°C. Ils sont tués par la chaleur (cuisson), la salaison, la fumure et par la congélation à -10°C.

Les pseudokystes ou trophozoïtes se trouvent dans le lait, la salive ou les urines des animaux domestiques (chien, chat).

Les voies de pénétration

Elles sont multiples:

- digestive, sans doute la plus courante;
- placentaire (transmission congénitale). Chez la femme enceinte qui fait un épisode aigu avec tachyzoïtes circulants localisés au niveau du placenta, l'enfant est infecté dans environ 50 p.100 des cas. Dans 10 ou 20 p.100 des cas, il fait une infection aiguë pendant la vie foetale ou à la naissance. Jouent un rôle: la période de la grossesse où survient la maladie, la virulence du parasite, l'état immunitaire de la mère...
- respiratoire et conjonctivale;

Les contaminations les plus fréquentes pour l'homme sont causées par l'ingestion de kystes tissulaires présents dans la viande mal cuite ou crue (steak tartare) ou d'oocystes souillant les aliments crus ayant été en contact avec des fèces de chat.

Test précoce, réalisé au début de la grossesse pour recherche des IgG et IgM;			
si	IgG + IgM nég.	Infection avant la grossesse	
si	IgG + IgM +	Répéter après 3 semaines	
		- si idem	Pas de risque
		- si IgG augmentées	Infection possible au moment de la conception
		traitement de la mère	
si	IgG nég IgM nég	Pour dépister un début d'infection en cours de grossesse, répéter tous les mois	
		- si positivation	traitement de la mère
si	Développement d'une lymphadénopathie pendant la grossesse		
si	IgG	>1/1000	
	IgM	positive	
ou si	IgG	<1/1000	
	Répéter après 3 semaines: IgG en augmentation		
	Traitement de la mère		
si	la mère s'est infectée pendant la grossesse		
	en plus de son traitement, surveiller le fœtus:		
	- Echographie		
	- Isolement de <i>T. gondii</i> à partir du sang fœtal ou liquide amniotique.		
	- Anticorps dans le sang du nouveau-né		
si	l'enfant s'avère infecté, il sera traité dès la naissance.		

Circulation du parasite

Le toxoplasme possède un choix de destinations impressionnant, à partir de ses réservoirs habituels (figure 15-4):

- Du chat à l'homme, aux bovidés, aux autres animaux domestiques, aux oiseaux, par contact avec des oocystes répandus dans la maison ou dans la nature.
- Du chat au chat, en se léchant le pelage ou en avalant des matières contaminées par des oocystes.
- Du chat au chien (coprophagie, léchage d'objets contaminés).

Tableau 15-3

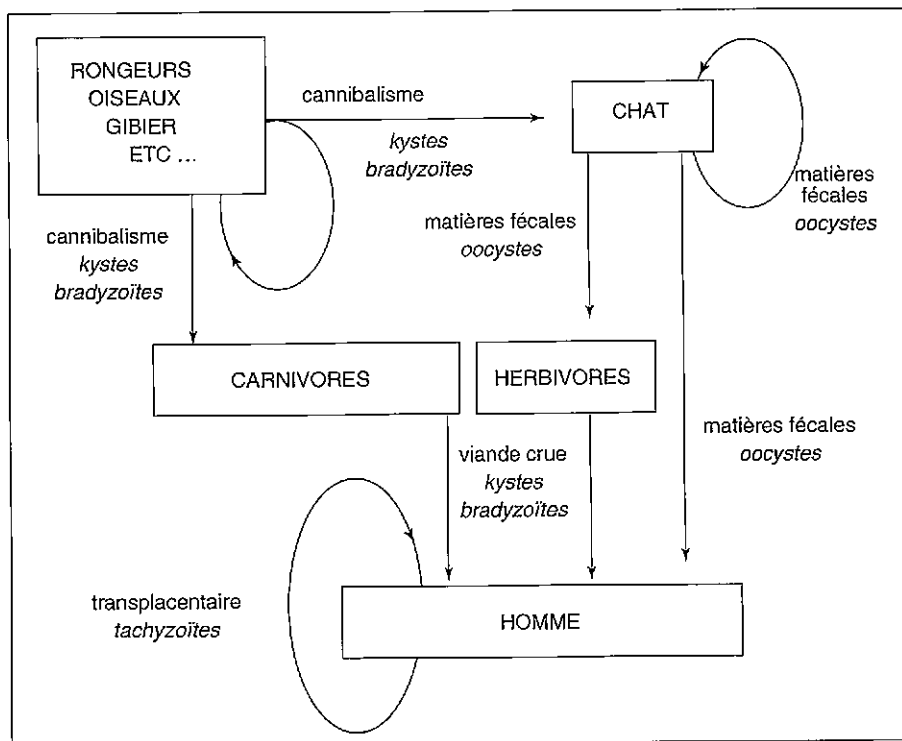


Figure 15-4

Circulation des toxoplasmes

- Du bétail et des oiseaux au chien, au chat et à l'homme, par ingestion de viande crue (tous les carnivores).
- Des mammifères aux oiseaux de proie (animaux vivants ou cadavres, par ingestion).
- Des petits mammifères aux gros animaux sauvages carnivores (animaux chasseurs).
- Des animaux sauvages à l'homme (ingestion de gibier).
- Cannibalisme chez beaucoup d'animaux.
- Coprophagie chez le porc.
- Des rongeurs domestiques au chat (ingestion).
- De la mère à sa nichée (voie transplacentaire) et ceci est valable pour tous les mammifères.

Cette liste n'est pas limitative, elle met en évidence l'intense circulation du parasite dans la nature. Les oiseaux, migrants ou non, se chargent du transport à distance.

Prévalence de l'infection toxoplasmique

La fréquence du contact avec le parasite ne peut être appréciée que par des enquêtes séro-épidémiologiques qui recherchent les sujets porteurs d'anticorps

IgG spécifiques antitoxoplasmiques. Les enquêtes de prévalence sont effectuées au moyen de tests tels que l'immunofluorescence indirecte et les tests immunoenzymatiques.

Dans la population adulte, le pourcentage de porteurs d'anticorps dans la population générale varie, d'après les pays, entre 10 et 90 p.100. En France, Desmonts a trouvé chez les enfants de 5 ans une fréquence de positivité de 7 p.100, tandis qu'en examinant les adultes à partir de 30 ans, il trouve 70 à 80 p.100 de sujets porteurs d'anticorps. Aux Etats-Unis, la prévalence sérologique dans des échantillons de plus de 10.000 femmes enceintes était de 8 p.100 dans l'état d'Oregon, tandis que dans l'Est, elle était de 38 p.100.

Il faut cependant insister sur le fait que cette infection est généralement inapparente et que les individus porteurs de kystes tissulaires peuvent vivre pendant des années, ou même toute leur vie, sans que ces kystes ne donnent lieu à des rechutes aiguës.

Par examen systématique des femmes enceintes et des donneurs de sang, on a pu déterminer l'influence de la consommation régulière de viande peu cuite ou de lait non bouilli, du travail dans les abattoirs et du contact avec les chats.

Fréquence de la maladie toxoplasmique

L'infection humaine par toxoplasme est cosmopolite et sa fréquence est beaucoup plus grande que ne le laisse supposer la fréquence des diagnostics cliniques. L'incidence des cas cliniques (fièvre ganglionnaire, uvéite) varie avec l'âge de 1 (moins de 4 ans) à 7 (entre 15 et 35 ans) pour 1000 habitants (Grande Bretagne).

1.9 Mesures prophylactiques

Elles concernent surtout la femme enceinte non immune: relations surveillées avec les chats; éviter les viandes insuffisamment cuites et les crudités mal lavées.

La surveillance sérologique mensuelle permettra le traitement curatif d'un épisode aigu pour prévenir les lésions chez le fœtus.

L'administration de l'association sulfadiazine-pyriméthamine est recommandée pendant toute la durée d'un traitement immunosuppresseif, de même que chez les patients sidéens ayant fait une atteinte de toxoplasmose.

2. *Sarcocystis* spp.

2.1 Introduction

Toxoplasma et *Sarcocystis* se distinguent l'un de l'autre par leur spécificité vis-à-vis de l'hôte intermédiaire où évolue la multiplication asexuée: trophozoïtes et schizontes, pseudokystes, kystes.

Nous avons vu que l'espèce *Toxoplasma gondii* pouvait infecter un éventail considérable d'hôtes et que l'infection pouvait se transmettre d'un hôte à l'autre sans passage obligatoire par la sporogonie chez les félinés.

Les espèces du genre *Sarcocystis*, au contraire, montrent une spécificité assez stricte pour un couple d'hôtes vertébrés déterminé: leur schizogonie évolue chez un hôte déterminé pour chaque espèce tandis que la gamétogénèse suivie de toute la sporogonie (et à l'exclusion de toute schizogonie, ce qui élimine pratiquement la possibilité d'une action pathogène), évolue chez un autre mammifère, lui aussi bien déterminé pour chaque espèce. Il s'agit donc d'un parasite hétéroxène obligatoire.

Cette combinaison spécifique de deux hôtes a même été proposée pour définir chaque espèce. C'est ainsi qu'on a proposé la dénomination *Sarcocystis bovi-hominis* pour le parasite évoluant par schizogonie chez le bœuf et dont la sporogonie se passe dans l'intestin de l'homme; de même, on peut citer *S. suis-hominis* (couple porc-homme), *S. ovis-canis* (couple mouton-chien), etc ...

2.2 Cycle évolutif

Le cycle asexué, aboutissant à la formation de kystes par endodyogénèse, se développe chez les bovins, etc...

Le cycle sexué (sporogonie) aboutissant à la formation d'oocystes contenant deux sporocystes et 2x4 sporozoïtes, se déroule chez l'hôte "définitif" (carnivores: nombreux animaux et l'homme) (figure 15-5).

Chez le bétail

Sarcocystis sont des parasites très fréquents des herbivores, des porcs et de la volaille.

Chez l'herbivore, l'infection est acquise par ingestion d'oocystes. Les sporozoïtes qui en sortent développent une schizogonie dans les cellules endothéliales des vaisseaux de divers organes (viscères, muscles ...) et dans les macrophages et produisent des mérozoïtes. Deux générations de schizontes sont sou-

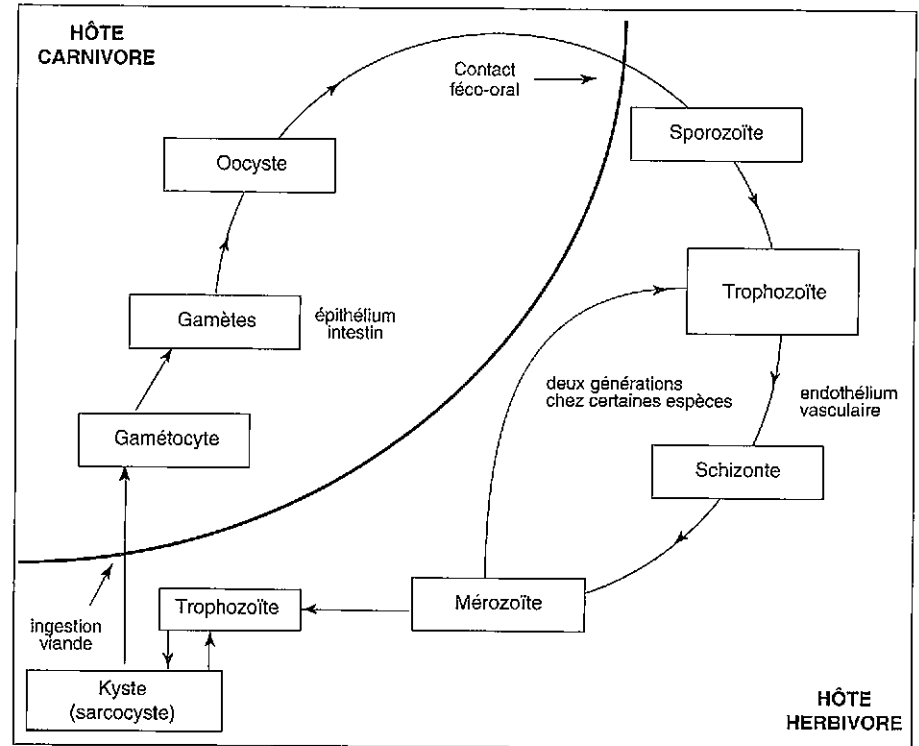


Figure 15-5

Schéma du cycle de *Sarcocystis*

vent observées; les mérozoïtes issus de la dernière génération se développent par endodyogénèse en sarcocystes dans les muscles. Ceux-ci contiennent des cystozoïtes.

L'infection chez l'animal est recherchée par la mise en évidence des kystes (sarcocystes ou tubes de Miesscher) qui se développent dans les muscles striés, les muscles lisses, le muscle cardiaque, le diaphragme et qui peuvent atteindre une taille de 1 à 2 millimètres. Ces grands kystes sont visibles à l'œil nu et apparaissent comme des grains blanchâtres à la surface des muscles. La paroi de ces kystes est épaisse et se compose de deux couches dont l'externe a une structure spongieuse et l'interne est constituée par une zone cytoplasmique étendue comportant de nombreux noyaux (syncytium), et émettant des prolongements vers l'intérieur du kyste en le divisant en compartiments. La cavité du kyste est remplie de trophozoïtes en forme de banane, de 12 µm sur 3 µm (figure 15-6).

Le carnivore (hôte définitif qui héberge le cycle sexué) se contamine en mangeant de la viande contenant des kystes (sarcocystes). Les zoïtes qui sortent du kyste se cantonnent dans l'intestin où le développement des gamétocytes dans l'épithélium aboutit à la formation d'oocystes dans le bol fécal, ce qui amène le

Figure 15-6

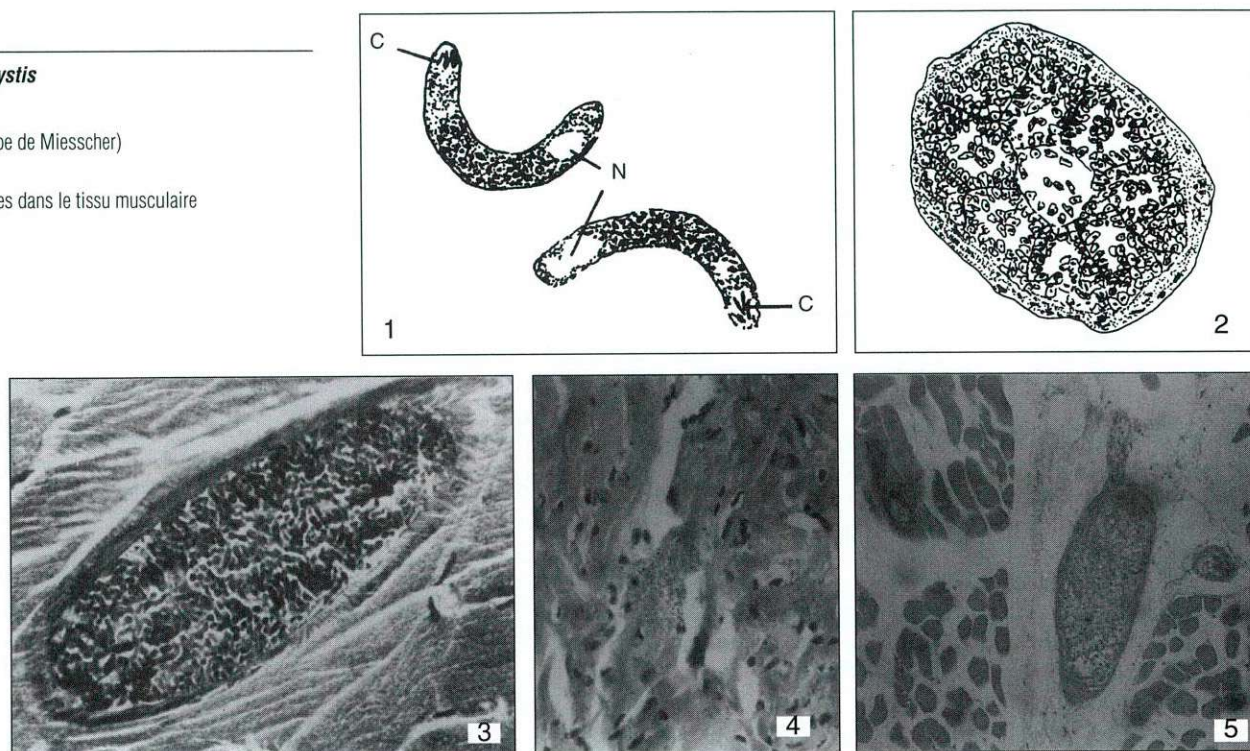
Zoïtes et kystes de *Sarcocystis*

1. Dessin d'un trophozoïte

2. Dessin d'un sarcocyste (tube de Miesscher)

3, 4, 5.

Photographie de sarcocystes dans le tissu musculaire



parasite à quitter l'hôte. Cette partie sexuée du cycle n'entraîne aucune pathologie chez le carnivore (figure 15-6).

**Chez l'homme (*S. suihominis*
et *S. bovis*)**

L'homme se contamine en consommant de la viande mal cuite de porc (dans le premier cas) ou de boeuf (dans le second cas), à partir des parasites asexués se trouvant, le plus souvent, sous forme de kystes. Les zoïtes issus des kystes ingérés entrent dans les cellules épithéliales de l'intestin et se développent en gamétocytes. Les cellules hôtes libèrent les formes sexuées arrivées à leur maturité et la fécondation a lieu dans la lumière intestinale, aboutissant à la formation d'oocystes.

Entre 10 et 30 jours après l'ingestion de viande, de nombreux oocystes apparaissent dans les selles. Ils ont une forme ovale, une paroi épaisse apparaissant double et contiennent deux sporocystes avec chacun quatre sporozoïtes (figure 15-7). Il faut signaler que, comme la maturation des oocystes de *Sarcocystis* est souvent achevée dans l'intestin avant l'émission dans les selles, on retrouve fréquemment, à l'examen microscopique, les sporocystes déjà libérés de

l'oocyste. Dans ce cas, ils se présentent comme des corpuscules arrondis et contiennent quatre sporozoïtes.

Remarque importante

Le cycle évolutif de *Sarcocystis* cause un doute lors du diagnostic d'*Isospora belli* par la recherche dans les selles humaines d'oocystes à 2 x 4 sporozoïtes.

Des chiens et des chats qui reçoivent de la viande des mêmes porcs n'excrètent pas d'oocystes (spécificité d'hôte!).

D'autre part, à partir d'oocystes d'origine humaine, on peut infecter (par ingestion) des porcelets. Entre le 10ème et le 13ème jour après l'ingestion, les animaux deviennent malades: fièvre, dyspnée, inappétence et hémorragies disséminées. Certains animaux meurent au cours de la phase aiguë. Des examens histopathologiques, pratiqués à différents moments de l'infection, permettent de reconnaître des schizontes de deux générations successives dans les cellules endothéliales des veines de différents organes.

Après la phase aiguë de l'infection, les parasites quittent l'endothélium vasculaire et les cystozoïtes apparaissent dans les muscles striés, où leur multiplication aboutit à la formation de sarcocystes à paroi épaisse et striée.

3. *Besnoitia*

C'est un parasite cosmopolite de différents animaux (mais n'atteignant pas l'homme), dont la schizogonie (tachyzoïtes) a lieu dans les monocytes circulants. Les kystes (bradyzoïtes) présents dans les histiocytes de la peau atteignent jusqu'à 500 µm de diamètre. Le kyste mûr est rempli de trophozoïtes en forme de banane, entourés d'une mince bande de cytoplasme de la cellule hôte contenant plusieurs grands noyaux. Le tout est enveloppé d'une couche dense de collagène.

La transmission mécanique des stades du cycle schizogonique peut se faire chez le bétail par les grandes mouches piqueuses et les tiques. Le cycle sporogonique évolue chez les félinés.

A ce genre appartiennent *Besnoitia besnoiti* (parasite du bétail) et *Besnoitia jellisoni* (parasite des rongeurs).

L'espèce africaine infectant le bétail aurait perdu la faculté de produire une sporogonie et serait transmise mécaniquement par des insectes piqueurs. Chez cette espèce, les kystes sont présents en majeure partie dans la peau des animaux. Par contre, une espèce de l'antilope qui présente des kystes surtout dans le système cardiovasculaire (paroi des vaisseaux) ne pourrait être transmise que par l'intermédiaire d'un carnivore, vu la situation plus profonde des kystes.

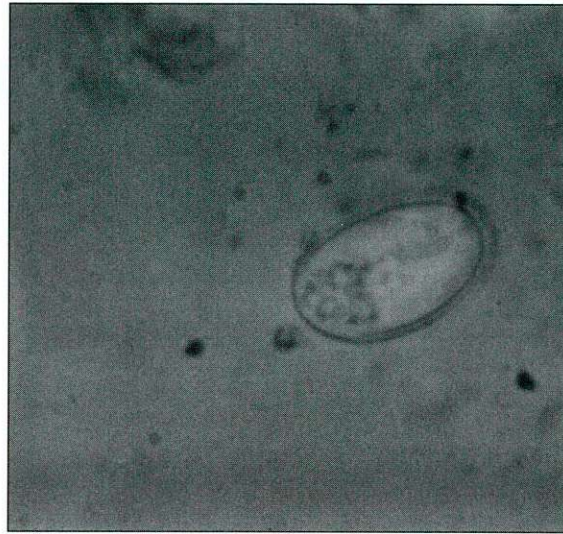


Figure 15-7

Oocyste de *Sarcocystis*

Kyste à paroi double en voie de maturation (on aperçoit quatre cellules avec chacune un noyau). A maturité, il présentera deux sporoblastes contenant chacun quatre sporozoïtes.

4. *Frenkelia*

Les hôtes intermédiaires (schizogonie et kystes, entre autres dans le cerveau) en sont des campagnols et divers rats. Les hôtes définitifs (sporogonie) en sont les oiseaux de proie (buses).

BIBLIOGRAPHIE

- SABIN AB, FELDMAN AH. (1948) Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*), *Science*, **108**, 660-663.
- HUTCHINSON WM, DUNACHIE JF, SIIM JCH, WORK K. (1969) Life cycle of *Toxoplasma gondii*, *British Medical Journal*, **iv**, 806.
- HUTCHINSON WM, DUNACHIE JF, SIIM JCH, WORK K. (1970) Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*, *British Medical Journal*, **i**, 142-144.
- HUTCHINSON WM, DUNACHIE JF, WORK K, SIIM JCH. (1971) The life-cycle of the coccidian parasite *Toxoplasma gondii* in the domestic cat, *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*, **65**, 380-399.
- JACOBS L. (1973) New knowledge of *Toxoplasma* and Toxoplasmosis. In: BEN DAWES (Ed.), *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **11**, 631-670.
- (1982) Colloque International sur l'immunologie dans la toxoplasmose, *Lyon Médical*, **248**, supplément au n° 17.
- TADROS W, LAARMAN JJ. (1982) Current concepts on the biology, evolution and taxonomy of tissue cyst-forming eimeriid Coccidia. In: WHR LUMSDEN, R MULLER and JR BAKER (Eds), *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **20**, 293-468.
- JACKSON MH, HUTCHINSON WM. (1989) The prevalence and source of toxoplasma infection in the environment. In: JR BAKER and R MULLER (Eds), *Advances in Parasitology*, London, Academic Press; **28**, 55-105.
- PERKINS ME. (1992) Rhoptry organelles of Apicomplexan parasites, *Parasitology Today*, **8**, 28-32.

Les genres *Babesia* et *Theileria* (Piroplasmida) Les Piroplasmoses

16

L'ordre des Piroplasmida n'a pas encore reçu de position définitive dans la classification des protozoaires. Ses structures morphologiques au microscope électronique le font ranger de manière péremptoire dans le groupe des Sporozoaires mais les particularités de la reproduction sexuée restent une difficulté. La classification proposée ci-dessous n'est pas universellement admise: groupe des Sporozoaires (Apicomplexa); classe des Piroplasmidea; ordre des Piroplasmida, celui-ci comprenant deux familles: les Babesiidae (genre *Babesia*) et les Theileriidae (genres *Theileria* et *Haematoxenus*).

Les piroplasmes sont des parasites intracellulaires des globules rouges et des globules blancs mononucléaires des mammifères. Ils sont transmis par la piqûre d'une tique. Chez l'hôte invertébré, le cycle commence dans les cellules de la paroi du tube digestif et se termine dans les glandes salivaires où se trouve le stade infectant.

Une caractéristique essentielle de certains de ces parasites est que l'infection acquise par la tique est transmise à sa descendance par l'intermédiaire des œufs. L'hôte invertébré semblerait donc être le réservoir principal de ces protozoaires qui n'ont pas besoin de l'hôte vertébré pour se perpétuer.

1. Le genre *Babesia*

1.1 Hôtes, espèces et distribution géographique

Animaux domestiques

Vache: *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens*, *B. argentina*, *B. berbera*; cheval: *B. caballi*, *B. equi*; mouton: *B. foliata*, *B. motasi*, *B. ovis*; chèvre: *B. motasi*, *B. ovis*, *B. taylori*; Porc: *B. peronticita*, *B. trautmanni*; chien: *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. vogeli*; chat: *B. felis*...

Animaux sauvages

Toutes sortes de mammifères (primates, antilopes, buffles, zèbres, chacals, loups, renards, léopards, lions, panthères, jaguars, éléphants, chauve-souris, écureuils, gerbilles, mulots, hamsters, souris et rats et de nombreux autres rongeurs sauvages) sont infectés. Par exemple, cerf, daim: *Babesia bigemina*; lion, léopard, puma: *B. felis*; *Hylomyscus*, *Microtus* et nombreux autres petits rongeurs: *B. hylomysci*, *B. microti*...

Hôtes invertébrés et distribution géographique

Ce sont les tiques (*Ixodes*, *Ornithodoros*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Boophilus*, *Dermacentor*).

Les babesia ont, comme les tiques qui les transmettent, une distribution cosmopolite. Le grand éventail des hôtes vertébrés réceptifs favorise également la présence universelle de ce parasite.

1.2 Spécificité d'hôte

On a cru longtemps que chaque espèce de *Babesia* était spécifique d'un groupe d'hôtes vertébrés. De là, le nombre très important d'espèces décrites, dont la morphologie et le cycle évolutif sont pratiquement superposables (78 espèces identifiées chez des mammifères autres que les ruminants!).

Les essais récemment entrepris au laboratoire pour entretenir des lignées de *Babesia* sur des animaux expérimentaux ont montré que cette spécificité est moins étroite qu'on ne le pensait: on peut citer, entre autres, la découverte de cas humains de babésiose à *B. microti*, les infections de souris de laboratoire avec *B. canis*, et de rats et hamsters avec *B. galagolata* du singe galago.

Si l'adaptation à un hôte vertébré particulier ne peut plus servir de critère pour la séparation d'une espèce, il faudra revoir la liste des espèces et bon nombre d'entre elles tomberont en synonymie. Les critères morphologiques, biochimiques et génétiques resteront

1. Le genre *Babesia*

- 1.1 Hôtes, espèces et distribution géographique
- 1.2 Spécificité d'hôte
- 1.3 Cycle évolutif, morphologie et caractères biologiques
- 1.4 Pathologie
- 1.5 Diagnostic
- 1.6 Traitement
- 1.7 Données épidémiologiques
- 1.8 Prévention et lutte

1. Le genre *Theileria*

- 1.1 Hôtes, espèces et distribution géographique
- 1.2 Morphologie et cycle évolutif
- 1.3 Pouvoir pathogène
- 1.4 Diagnostic

Bibliographie

FIGURES

- 16-1 Formes érythrocytaires de *Babesia* sp.
- 16-2 Schéma du cycle de *Babesia*

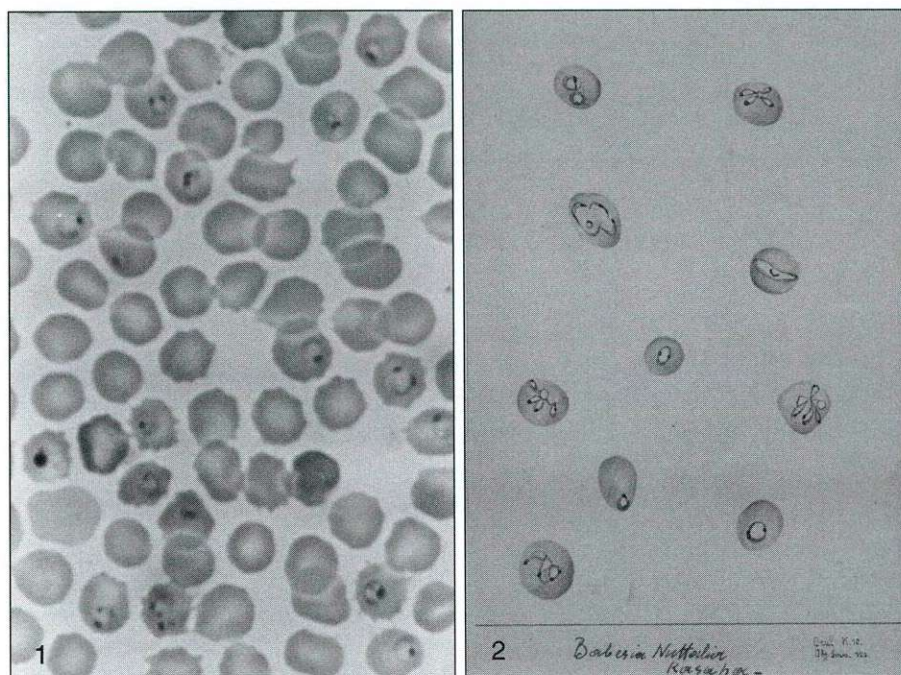


Figure 16-1

Formes érythrocytaires de *Babesia* sp

1. *Babesia hylomisci* (*Hylomyscus*, rongeur africain)
2. Dessin de *Babesia*, schématisant les formes intra-érythrocytaires

alors les seuls valables pour établir une nouvelle liste d'espèces pouvant infecter chacune, une série plus importante d'hôtes vertébrés.

1.3 Cycle évolutif, morphologie et caractères biologiques

Chez l'hôte vertébré

Après l'injection de sporozoïtes à un animal par une tique infectée, on a observé chez *B. equi* (mais uniquement chez cette espèce), une phase de développement pré-érythrocytaire (mérogonie ou schizogonie) dans les lymphocytes. Les mérozoïtes qui en sortent vont dans les érythrocytes. Chez *B. microti* et d'autres espèces, il semble que les sporozoïtes pénètrent directement dans les globules rouges. Cette phase du cycle est encore mal définie. Il faut rappeler ici que chez les plasmodiums, la phase préérythrocytaire n'a été décrite que plus de 60 ans après la découverte du parasite dans les globules rouges et que Schaudinn avait prétendu au début de ce siècle, avoir observé la pénétration du sporozoïte dans un érythrocyte.

Dans le globule rouge, les parasites sont contenus provisoirement dans une vacuole parasitophore mais celle-ci est rapidement détruite et les parasites se retrouvent libres dans le cytoplasme. Les parasites intraglobulaires apparaissent ronds, ovales ou piri-

formes, comportant un petit noyau central entouré de cytoplasme (figure 16-1). Certains (les formes asexuées) se multiplient par bourgeonnement et restent accolés par leur extrémité pointue ce qui donne des images en trèfle à deux ou à quatre feuilles, en croix de Malte. On y observe la formation de rhoptries et des segments membranaires doubles, précurseurs du bourgeonnement. Il n'y a ni pigment parasite ni altérations du globule rouge parasité. Sans que le microscope optique ne puisse en faire la distinction, on sait que l'érythrocyte héberge un autre type de parasite, les formes sexuées (gamétocytes) décrites "en accordéon" au microscope électronique à cause de leur paroi plissée, qui ne bourgeonnent pas, ne forment pas de rhoptries et ne disposent pas de segments de membrane dédoublée.

Le mécanisme de l'entrée dans le globule est semblable à celui adopté par les plasmodiums: les rhoptries du parasite causent une invagination de la membrane plasmique de la cellule hôte. Par contre, la sortie reste énigmatique: on ne sait pas par quel mécanisme le globule hôte est détruit par ce parasite de taille très modeste lors de sa maturité, alors que la destruction globulaire est la principale caractéristique des babésioses.

On distingue des espèces à petites formes de 1 à 2,5 μ de long (*B. bovis*, *B. divergens*, *B. berbera*, *B. equi*, *B. ovis*, *B. felis*) et des espèces à formes plus grandes de 2,5 à 5 μ de long (*B. bigemina*, *B. major*, *B. caballi*, *B. canis*).

Chez la tique

Dans l'estomac, sans modification morphologique, on croit observer la fusion de gamètes. Les zygotes résultants, pourvus d'un pôle pointu, traversent la membrane péritrophique puis pénètrent dans les cellules épithéliales de la paroi du tube digestif où ils s'arrondissent. Le zygote sphérique est rejeté par la cellule hôte vers l'hémolymphe. Les parasites se présentent, à la sortie des cellules, sous forme de vermicules renflés à une extrémité, les ookinètes, stade pivot du développement chez la tique. En effet, les ookinètes de première génération peuvent, soit gagner les glandes salivaires, soit entrer dans des cellules de la cavité générale de la tique et s'y multiplier. Leur migration à travers tous les tissus de la tique (muscles, ovaires, hémocytes, tissu pérित्रachéal) et leur prolifération leur permettent l'atteinte des ovaires. L'organe cible reste cependant les glandes salivaires où l'ookinète se transforme en sporoblaste. Une dernière multiplication, très généreuse, survient au moment où la tique s'est fixée à un hôte (l'augmentation de la température

est déterminante). Elle produit des milliers de petits parasites piriformes, les sporozoïtes, qui constituent la forme infectante pour l'hôte vertébré.

L'infection des œufs pondus et le passage des parasites à la génération suivante causent, chez certaines espèces de *Babesia*, l'envahissement des tissus de la larve, de la nymphe, et de l'adulte. Chez chaque stade de maturation de la tique (larve, nymphe, adulte), il y a accumulation de parasites dans les glandes salivaires. La tique, qui prend un repas sanguin à chacun de ses stades, peut donc chaque fois transmettre l'infection à partir de ses glandes salivaires. Il est remarquable que l'hôte vertébré ne soit pas indispensable au maintien de la lignée de parasites. On a pu observer *Babesia bovis* chez *Rhipicephalus* pendant 32 générations, sans réinfection à partir d'un hôte vertébré, les tiques étant nourries sur des lapins non infectés. Ceci implique un mécanisme de prolifération des ookinètes chez l'hôte invertébré et ne semblerait pas possible si la sporogonie seule y avait lieu (figure 16-2).

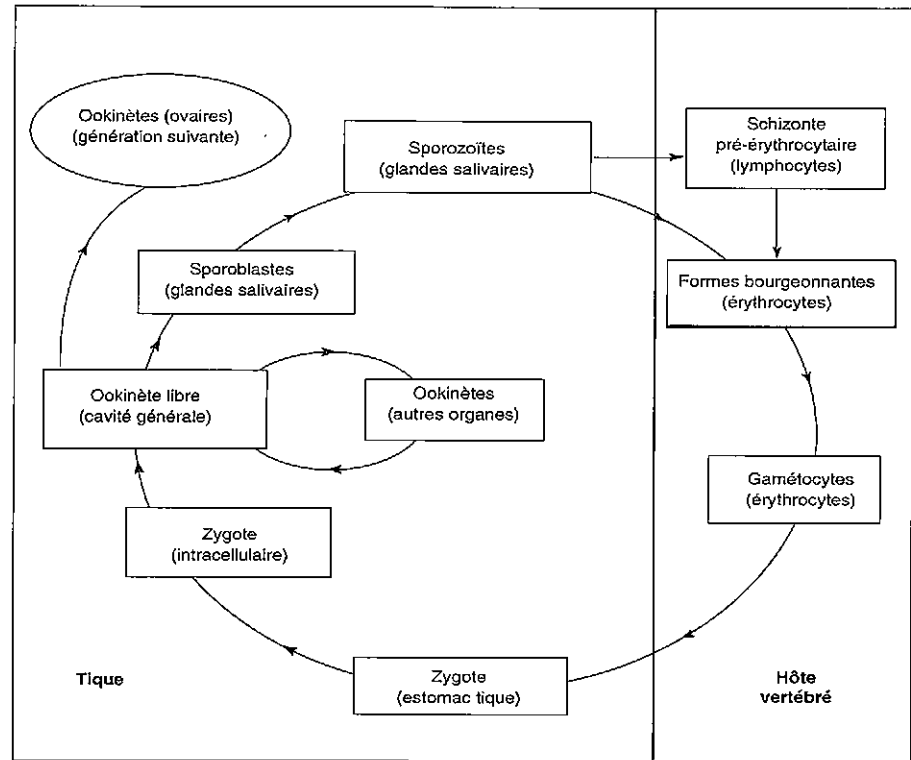
1.4 Pathologie

Chez le bétail et les animaux domestiques

Le tableau est dominé par l'hémolyse: c'est une fièvre hémoglobinurique. Il existe des formes aiguës et des formes chroniques, d'après l'espèce de *Babesia* en cause. Dans la forme aiguë, la période d'incubation dure deux semaines.

La sévérité de la primo-infection dépend de l'espèce de parasite et de son degré d'adaptation à l'hôte envisagé, de la race du bétail, certains bovidés étant plus résistants que d'autres, et de l'âge (les animaux arrivant à l'âge adulte sans contact préalable avec le parasite font plus facilement une infection mortelle). Les jeunes chats sont très sensibles à l'infection tandis que les jeunes ruminants bénéficient d'une protection immunitaire naturelle dont on ignore la nature.

La mort peut survenir après 8 à 10 jours d'évolution mais l'animal peut aussi en réchapper, gardant alors une immunité protectrice. A l'autopsie, on est frappé par la couleur jaune des tissus sous-cutanés (produits de dégradation de l'hémoglobine), la pâleur des muscles (anémie), l'hypertrophie importante de la rate et du foie avec coloration rouge-brun. La moelle osseuse est congestionnée et les reins œdématisés.



Babésiose humaine

La maladie chez l'homme est superposable à celle observée chez les animaux. On y observe aussi des cas aigus et une maladie chronique.

Aucune espèce de *Babesia* n'est spécialisée dans le parasitisme humain mais c'est *B. microti* qui a causé le plus de cas, à l'occasion de l'épidémie observée aux USA. Deux facteurs interviennent pour expliquer l'observation d'infections aiguës chez l'homme.

- Certaines professions sont particulièrement exposées aux piqûres de tiques (fermiers, cultivateurs, éleveurs).

- La déficience immunitaire particulière provoquée par la splénectomie confère à l'homme une sensibilité particulière. L'infection dans ce cas pourra être fulminante comme chez les animaux.

1.5 Diagnostic

Il s'agit d'une fièvre hémoglobinurique.

Parasitologie

L'examen de prélèvements de sang colorés au Giemsa (frottis, goutte épaisse) montre les parasites intra-globulaires, en forme de goutte d'eau, avec un

Figure 16-2

Schéma du cycle de *Babesia*

noyau entouré de cytoplasme homogène. Les érythrocytes contiennent un, deux ou quatre parasites. Les différences avec les plasmodiums concernent deux points: il n'y a pas de gamétocytes à morphologie reconnaissable et il n'y a pas de pigment au cours du développement intra-globulaire. Toutefois, le diagnostic différentiel d'avec des anneaux de *P. falciparum* reste difficile.

Des anticorps monoclonaux et polyclonaux sont actuellement proposés pour la capture d'antigènes solubles circulants.

Sérologie

La recherche des anticorps est utile pour distinguer les uns des autres, les infections par différentes espèces de *Babesia*. Les réactions croisées d'une espèce à l'autre sont faibles et le titre obtenu avec l'antigène homologué est nettement plus élevé. L'immunofluorescence reste la réaction la plus fiable, utilisant un antigène de formes sanguines en frottis ou goutte épaisse provenant d'animaux infectés ou de parasites cultivés. Elle est utile pour le diagnostic des cas humains de même que chez les chiens. Pour les troupeaux de bovidés, on préfère les agglutinations au latex et l'ELISA, plus rapides d'exécution.

Les tests immuno-enzymatiques qui font appel à des mélanges antigéniques complexes (lysats de parasites) sont difficilement interprétables. Les antigènes purifiés sont nombreux, provenant le plus souvent du mérozoïte, de la surface du globule parasité, du plasma où ils sont déversés au cours du développement du parasite. Les antigènes récupérés dans les surnageats de culture sont séduisants: facilement obtenus, ils ont de bonnes performances. Toutefois, aucun antigène ne donne entière satisfaction jusqu'à présent, quant à la spécificité d'espèce et la précocité du diagnostic.

1.6 Traitement

L'association quinine-clindamycine ou la pentamidine sont des médicaments actifs.

1.7 Données épidémiologiques

Le premier cas humain mortel a été décrit en Yougoslavie en 1957, chez un fermier qui avait subi, 11 ans auparavant, une splénectomie. Vingt-cinq cas de maladie aiguë avec fièvre, anémie, hémoglobinurie ont été décrits depuis lors, chez des sujets splénectomisés.

Dans les années septante, on a vu apparaître une bouffée de cas causés par *Babesia microti* dans l'Est

des Etats-Unis, chez des sujets non splénectomisés: 143 diagnostics ont été posés dans deux états (Massachusetts et New York). On a parlé d'épidémie dans l'île de Nantucket (N.Y.).

Des souches de *Babesia bovis*, *B. divergens*, *B. microti* et *B. canis* ont été isolées à partir de cas humains.

Les cas subaigus ou chroniques (individus sains porteurs de parasites) peuvent être recherchés par les méthodes sérologiques, suivies de l'examen du sang des individus possédant un taux d'anticorps significatif. On essaiera chez les positifs à l'examen du sang, d'isoler des souches par inoculation à des animaux de laboratoire.

A Mexico, 38 personnes sur 101 examinées provenant d'une région où la babésiose animale est endémique, avaient un taux d'anticorps significatif. Aux Etats-Unis, une enquête parasitologique et sérologique de prévalence de l'infection organisée en 1981 a recensé, dans les deux états sus-nommés, 250 sujets parasités.

On a accusé la prolifération des cerfs, animaux protégés, sortis de leur biotope pour s'approcher des endroits habités dans des zones forestières résidentielles. La transmission est assurée par *Ixodes dammini*. Depuis 1986, les rapports de cas semblent avoir diminué, suite aux mises en garde lancées par les pouvoirs publics.

Il faut rappeler la ressemblance morphologique des trophozoïtes de *Babesia* dans les globules rouges d'un homme avec de jeunes trophozoïtes (anneaux) de *Plasmodium*, ce qui peut être à l'origine de l'attribution erronée à *Plasmodium*, d'autres infections parasitaires intraglobulaires.

1.8 Prévention et lutte

Les essais de vaccination contre les babésioses ont utilisé des souches atténuées (sang d'animaux infectés), des plasmas d'animaux infectés (contenant les exo-antigènes), des extraits de parasites lysés et des antigènes purifiés.

Un vaccin est actuellement commercialisé (Pirodog®) pour les chiens (chiens de chasse surtout): il est produit à base d'exo-antigènes relargués par le parasite *B. canis* dans les surnageats de culture. Il donne de bons résultats puisque depuis 1982, date de la première vaccination, le pourcentage de chiens ayant contracté une babésiose clinique est tombé de 12 p.100 en moyenne par an à 0 p.100 à partir de 1985.

2. Le genre *Theileria*

2.1 Hôtes, espèces et distribution géographique

La maladie est inexistante chez l'homme. Plusieurs espèces infectent les bovins d'élevage (*Theileria parva*, *Theileria annulata*...), le mouton et la chèvre (*Theileria herci*, *Theileria ovis*...). C'est un pathogène important des animaux d'élevage.

Les infections ont une aire géographique très large, suivant la distribution des tiques qui les transmettent: *Rhipicephalus*, *Boophilus*, *Hyalomma*...

2.2 Morphologie et cycle évolutif

Cinq jours environ après la piqure de la tique infectée, des jeunes schizontes apparaissent dans le cytoplasme des lymphocytes.

On observe, chez l'hôte vertébré, trois formes intracellulaires:

- dans les lymphocytes, les macroschizontes (ou "Koch's Blue Bodies") contenant environ huit noyaux irréguliers, qui libèrent à leur maturité les macromérozoïtes qui vont parasiter d'autres lymphocytes;
- dans les macrophages ou les cellules réticulaires, les microschizontes, qui ont de 50 à 120 minuscules noyaux;
- dans les globules rouges, les gamétocytes, très petits parasites (1,2 à 2,5 µm), dont la forme diffère d'une espèce à l'autre.

Chez la tique, la fécondation des gamétocytes femelles se fait dans l'estomac. Un ookinète est produit, qui sort de l'estomac mais on perd sa trace

jusqu'à l'arrivée des parasites dans les glandes salivaires. Les sporoblastes se trouvent alors dans les cellules des acini des glandes sous forme de petits parasites arrondis qui grandissent. A leur maturité, ils distendent très fort la cellule parasitée et libèrent les sporozoïtes, stade infectant. L'infection acquise par la larve sera transmise à l'hôte vertébré au stade de nymphe. Si la nymphe s'est infectée, c'est l'adulte qui transmettra. Les tiques mâles aussi bien que les femelles peuvent héberger ce cycle et devenir infectantes. Il n'existe, dans aucun cas, de transmission transovarienne.

2.3 Pouvoir pathogène

Fièvre, engorgement ganglionnaire, hypertrophie de la rate, œdème pulmonaire avec oppression caractérisent le tableau clinique.

Le pouvoir pathogène varie d'une espèce à l'autre. C'est *Theileria parva*, agent de l'"East Coast Fever" qui, chez le bétail, est l'espèce la plus virulente.

2.4 Diagnostic

Engorgement ganglionnaire et splénomégalie évoquent l'infection à *Theileria*.

La recherche des schizontes sur des frottis de tissu lymphoïde colorés au Giemsa ne permet pas de distinguer les espèces. Par contre, l'examen du sang le permettra, par la découverte des "piroplasmes" (gamétocytes) dans les globules rouges: ils sont annulaires chez *T. annulata*, en forme de virgule chez *T. parva* et pleiomorphes chez *T. mutans*.

La sérologie par immunofluorescence sur l'antigène gamétocyte (sang parasité) ou, moins bien, sur l'antigène schizonte, permet de faire la distinction entre les infections à *T. parva*, *T. annulata*, *T. mutans*.

BIBLIOGRAPHIE

Royal Society of tropical Medicine and Hygiene (1980) Symposium on Human Babesiosis, *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*, **74**, 143-158.

HEALY GR. (1989) The impact of cultural and environmental changes on the epidemiology and control of human babesiosis, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **83**, (supplement) 35-38.

REITER I, WEILAND G. (1989) Recently developed methods for the detection of babesial infections, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **83**, (supplement) 21-23.

TIMMS P. (1989) Development of babesial vaccines, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **83**, (supplement) 73-79.

TELFORD SR, GORENFLOT A, BRASSEUR PH, SPIELMAN A. (1993) Babesial infections in Man and wild Life, In: JP KREIER and JR BAKER, *Parasitic Protozoa*, **5**, 1-22.

Le groupe des microsporidies (Microsporida)

17

Introduction : Taxinomie

La pathologie causée par les microsporidies chez l'homme immunodéprimé ayant significativement augmenté, il est nécessaire de passer en revue l'ordre des Microsporida.

GROUPE DES MICROSPORIDIES

ORDRE : MICROSPORIDA

Infecte les insectes, poissons et mammifères.

FAMILLE DES MICROSPORIDAE

Genre Pleistophora

Spores de 2 à 3 μ , sporonte produisant de nombreuses spores, noyaux simples.

Genre Encephalitozoon

Spores de 1 à 2 μ , sporonte produisant 2 spores, noyaux simples.

FAMILLE DES NOSEMATIDAE

Genre Nosema

Spores de 2 à 4 μ , sporonte produisant 2 spores, noyaux de type diplocaryotique (deux noyaux accolés).

FAMILLE DES ENTEROCYTOZONIDAE

Genre Enterocytozoon

Plasmodes multinucléés au stade prolifératif (méronte) avec noyaux allongés simples et apparition précoce de structures du tube polaire; plasmodes multinucléés également au stade sporogonique (sporonte) avec noyaux en division; spores petites, de 1,5 x 1 μ m.

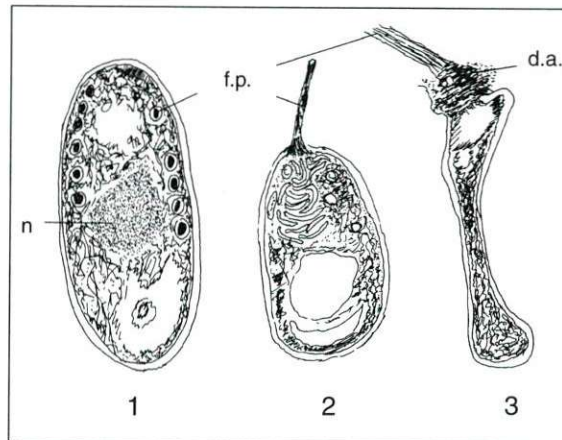
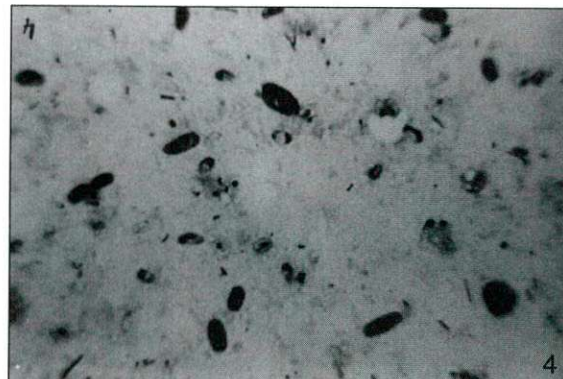


Figure 17-1

Spores de microsporidies (ultrastructure)

- Dessin d'une spore montrant le filament polaire spirale (coupé transversalement) et le noyau
n noyau
f.p. filament polaire
- Dessin d'une spore en phase d'éjection du filament polaire
f.p. filament polaire
- Dessin d'une spore vidée après éjection du sporoplasme
d.a. disque d'ancrage
f.p. filament polaire
- Microphotographie de spores (1 à 2 μ m de diamètre)



Introduction : Taxinomie

Famille des Microsporidae
Famille des Nosematidae
Famille des Enterocytozoonidae

- Inventaire des genres d'intérêt médical: généralités
 - Avant l'ère de l'immunodépression VIH
 - A l'époque du SIDA
 - Cycle évolutif, caractères biologiques
 - Caractères distinctifs importants des genres
 - Description des genres infectant l'homme345
 - Le genre *Encephalitozoon*
 - Le genre *Enterocytozoon*
 - Le genre *Nosema*
 - Diagnostic
 - Mise en évidence du parasite
 - Sérologie
 - Traitement
- Bibliographie

FIGURES

- 17-1 Spores de microsporidies (ultrastructure)
17-2 Schéma du cycle des microsporidies
17-3 Stades intracellulaires de microsporidies

1. Inventaire des genres d'intérêt médical: généralités

1.1 Avant l'ère de l'immunodépression VIH

Quelques cas d'infection avaient été décrits chez des patients dont le système immunitaire était incomplet pour des raisons diverses:

- un cas de localisation musculaire causé par *Pleistophora* sp.;
- cinq cas d'infection généralisée ou oculaire par *Nosema conori* et *N. corneum*;
- deux cas d'infections respectivement cérébrale et rénale par *Encephalitozoon cuniculi*.

1.2 A l'époque du SIDA

Les patients sidéens présentent le plus souvent des infections digestives causées par le genre *Enterocytozoon*, plus rarement des infections de l'oeil provoquées par *Encephalitozoon hellem*, exceptionnellement des localisations hépatiques ou péritonéales de *Encephalitozoon cuniculi*. Les genres *Pleistophora* et *Nosema* sont exceptionnels chez l'homme.

1.3 Cycle évolutif, caractères biologiques

On distingue trois phases dans les activités du parasite: phases infective, proliférative, sporogonique.

Phase infective

Les spores, présentes dans le milieu ambiant, entrent en contact avec un hôte. Elles contiennent, dans une coque rigide et épaisse, un filament (filament polaire) attaché, d'une part, au disque d'ancrage situé à un pôle de la spore et d'autre part, au sporoplasme (ensemble cytoplasme-noyau) (figure 17-1). Grâce à ce filament enroulé en spirale à l'intérieur de la coque et qui agit comme un ressort, l'extrusion se produit sous l'influence d'un stimulus *ad hoc*, entr'ouvrant la coque et projetant le sporoplasme dans la cellule hôte (opération "missile"). La pénétration a lieu par effraction de la membrane plasmique de cette cellule sous la violence du choc ou par endocytose grâce à la présence sur la surface externe du sporoplasme de clathrine, une protéine de reconnaissance cellulaire. Le développement intracellulaire peut commencer.

Phase proliférative

La cellule hôte va héberger deux phases successives de multiplication. Le sporoplasme (éjecté de la spore) devient un trophozoïte à son entrée dans la cellule. Son noyau se divise pour former un schizonte (méronte). Les mérozoïtes résultant de cette schizogonie (mérogonie) restent à l'intérieur de la cellule et entament un deuxième cycle de divisions nucléaires aboutissant à la production d'un deuxième schizonte (sporonte).

Phase sporogonique

Le sporonte donne des sporoblastes puis des spores qui sont libérées, entraînant la mort de la cellule hôte, et qui vont coloniser d'autres cellules.

D'autre part, les spores, entourées d'une paroi épaisse, résistent dans le milieu extérieur pendant plusieurs mois et sont d'emblée infectantes. Elles proviennent des très nombreux animaux infectés naturellement. La contamination survient généralement par ingestion (formes digestives), à moins que ce ne soit par un contact direct avec des produits contaminés (oeil, peau) (figures 17-2 et 17-3).

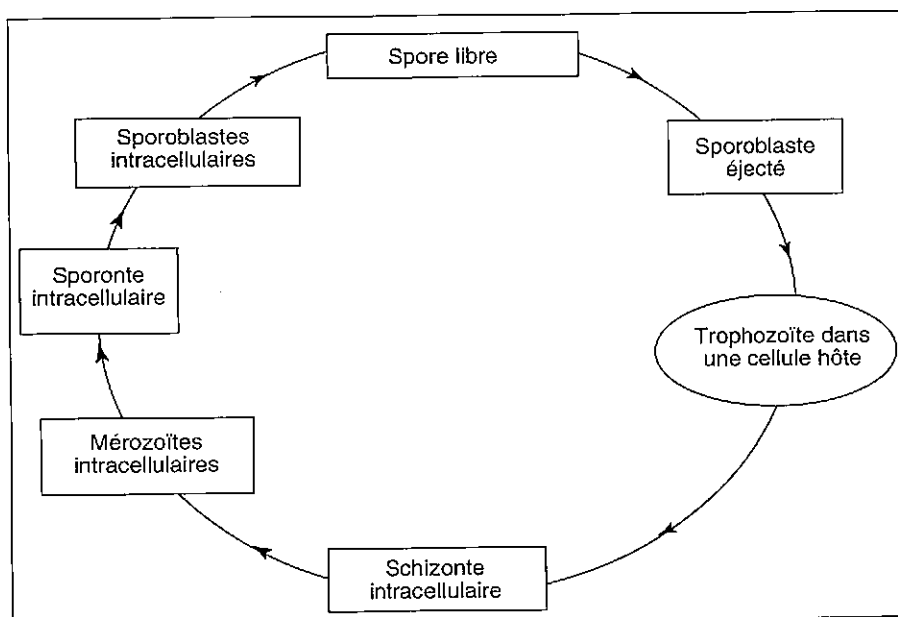
1.4 Caractères distinctifs importants des genres

Le sporoplasme a un noyau diplocaryotique (deux noyaux accolés) ou non.

Le sporonte donne de nombreuses spores (pansporoblastique) ou seulement deux spores (disporoblastique).

Figure 17-2

Schéma du cycle des microsporodites



Il y a présence, ou non, d'une paroi épaisse sécrétée par le parasite autour du sporonte dans la cellule hôte.

La taille des spores et le nombre de tours de spire du tube polaire, la présence et la taille de la vacuole postérieure doivent aussi être pris en considération.

2. Description des genres infectant l'homme

2.1 Le genre *Encephalitozoon*

Deux espèces ont été reconnues chez l'homme: *Encephalitozoon cuniculi* (du lapin), à localisations hépatique et péritonéale et *E. hellem*, à localisation oculaire (épithélium cornéen). On ne peut pas les distinguer morphologiquement mais l'analyse de leurs protéines par électrophorèse en gel de polyacrilamide (SDS-PAGE) permet de les reconnaître.

Morphologie et cycle

La mérogonie et la sporogonie se situent dans les cellules du rein, du foie, du système nerveux central. Le parasite y est contenu dans une vacuole parasitophore.

Les sporoblastes produisent deux spores, pas plus: c'est le type "disporoblastique".

Les spores sont petites (1 à 2 μ de diamètre); le tube polaire y décrit 6 tours de spire.

Distribution et hôtes

Le réservoir de parasites est constitué par les rongeurs, lapins et animaux domestiques.

Culture in vitro

E. cuniculi et *E. hellem* se cultivent facilement sur des cellules de rein, dans le milieu essentiel minimal additionné de 10 p.100 de sérum de veau foetal (MEM-S). Les spores sont récoltées dans le milieu de culture et peuvent servir à l'ensemencement de cultures secondaires. C'est une source d'antigène pour les réactions sérologiques.

2.2 Le genre *Enterocytozoon*

Enterocytozoon bieneusi est le parasite que l'on trouve chez les patients sidéens. Il se situe habituellement dans l'intestin.

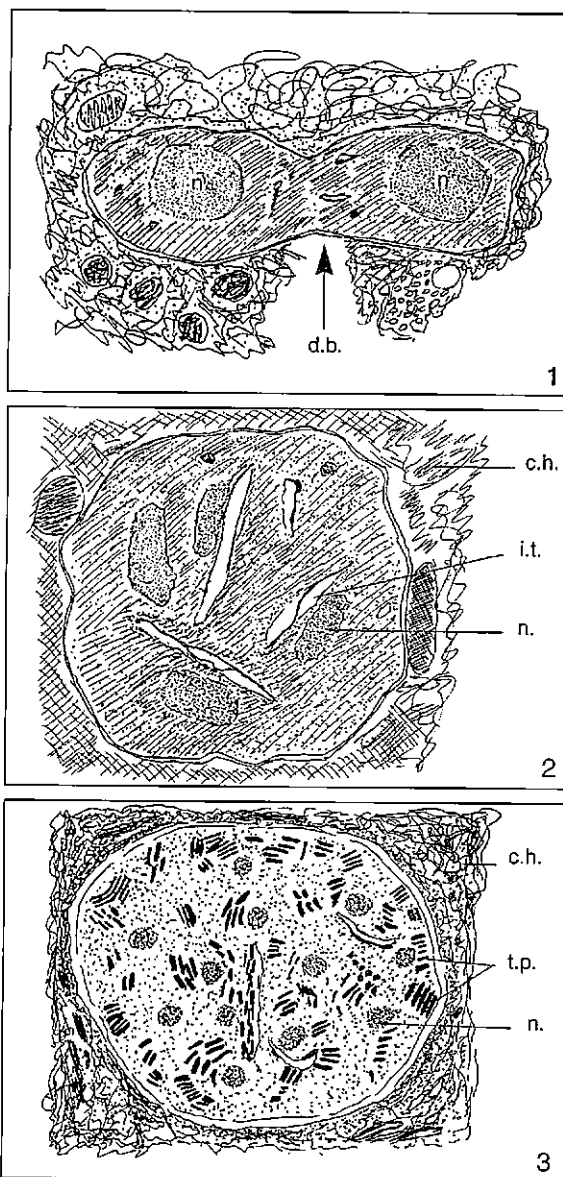


Figure 17-3

Stades intracellulaires de microsporidies (dessins)

1. Trophozoïte en division (les noyaux se sont séparés, le cytoplasme suit)
n noyau
d.b. division binaire
2. Schizonte (plasmode avec quatre noyaux)
n noyau
i.t. inclusions translucides
c.h. cellule hôte
3. Sporonte (plasmode avec douze noyaux et synthèse de tubes polaires)
n noyau
t.p. tube polaire
c.h. cellule hôte

Morphologie et cycle

Les mérontes multinucléés sont situés dans les cellules épithéliales de l'intestin, entre le noyau et la bordure en brosse, au contact direct du cytoplasme, sans vacuole parasitophore.

Les sporontes également se développent en cellules à plusieurs noyaux. Les filaments spirales sont formés avant que les sporoblastes (plus de dix) ne s'individualisent (microsporodies pansporoblastiques).

Les sporoblastes renferment le sporoplasme, le disque d'ancrage au pôle antérieur, le tube polaire en développement (déjà 4 à 5 tours de spire) et une vacuole postérieure.

Les spores sont très petites, de 1 à 2 μ de diamètre, avec noyau simple et tube polaire faisant 8 à 12 tours de spire.

Distribution et hôtes

L'homme héberge le parasite fréquemment sans symptômes. Plusieurs animaux (poissons, entre autres le saumon) sont infectés par *Enterocytozoon* sp., dont la morphologie et le cycle sont superposables à ceux d'*E. bienewisi*. On ne sait toutefois pas si ces espèces sont infectantes pour l'homme.

Pathologie

Le développement du stade prolifératif dans les cellules épithéliales de l'intestin cause des diarrhées de longue durée par nécrose de ces cellules, infiltration lymphocytaire, atrophie des villosités et de la bordure en brosse, élongation des cryptes...

Culture in vitro

Elle est difficile pour le genre *Enterocytozoon*.

Transmission

L'infection se transmet le plus souvent par ingestion. Les spores sont répandues dans la nature avec les selles. D'autre part, les spores formées dans un intestin et libérées peuvent infecter, par projection du tube polaire et injection du sporoplasme, une cellule épithéliale du même intestin et ainsi prolonger l'infection.

2.3 Le genre *Nosema*

Les espèces de ce genre sont surtout des parasites d'insectes. Les plus connues sont *N. bombicis*, première espèce décrite, parasite du ver à soie (Naegeli 1857) et *N. apis*, parasite des abeilles. De nouvelles espèces sont encore décrites comme, par exemple, *N. scripta* chez un coléoptère parasite de la feuille du peuplier dont la première description date de 1993. Une espèce a été décrite dans une lésion de la cornée (*N. corneum*).

Morphologie et cycle

Les mérozoites donnent deux ou plusieurs cellules filles, ayant chacune des noyaux doubles, diplocaryotiques.

Les sporozoites sont en contact direct avec le cytoplasme de la cellule hôte (pas de vacuole parasitophore). Les sporozoites produisent chacun deux spores (disporozoites).

3. Diagnostic des infections à microsporidies

Mise en évidence du parasite

Dans les selles, la recherche par microscopie optique des spores, seul stade extra-cellulaire est difficile. La description des formes parasitaires et la compréhension du cycle a été tributaire du microscope électronique. Celui-ci reste indispensable pour l'identification des spores. D'où l'importance de la sérologie pour obtenir des informations sur la prévalence de l'infection.

Sérologie

On est actuellement assez démunie, au laboratoire, pour interpréter utilement les réactions sérologiques. Sensibilité et spécificité sont nettement insuffisantes avec les antigènes disponibles.

En immunofluorescence indirecte (IFI), l'antigène *Encephalitozoon cuniculi* donne une réaction positive chez les animaux de laboratoire infectés expérimentalement. Le diagnostic a pu aussi être posé chez un enfant ayant éliminé des spores dans ses urines. L'IFI et le test ELISA sont tous deux utilisés pour les enquêtes épidémiologiques. Les prévalences trouvées sont hautes.

Pour *Enterocytozoon bienewisi*, on ne dispose pas encore de l'antigène spécifique et les réactions croisées avec *Encephalitozoon* sp. ne sont pas interprétables.

4. Traitement des infections à microsporidies

Le métronidazole et l'albendazole ont donné des rémissions cliniques chez les patients sidéens avec diarrhée (*Enterocytozoon bienewisi*) mais pas de guérison parasitologique (rechutes).

L'itraconazole a été utilisé avec succès chez un patient dont la cornée était infectée par *Encephalitozoon hellem*.

La sinéfungine a débarrassé des ruches d'abeilles de *Nosema apis*.

BIBLIOGRAPHIE

CANNING EU AND HOLLISTER WS. (1987) Microsporidia of mammals - Widespread pathogens or opportunistic curiosities? *Parasitology Today*, **3**, 267-272.

CHILMONCZYK S, COXWT, HEDRIK RP. (1991) *Enterocytozoon salmoni* N. Sp.: an intranuclear microsporidium from salmonid fish, *Journal of Protozoology*, **38**, 264-269.

CALI A. (1991) General microsporidian features and recent findings on AIDS isolates, *Journal of Protozoology*, **38**, 625-630.

CANNING EU, HOLLISTER WS. (1991) *In vitro* and *in vivo* investigations of human microsporidia, *Journal of Protozoology*, **8**, 631-635.

DIDIER ES, SHADDUCK JA *et al.* (1991) Studies on ocular microsporidia, *Journal of Protozoology*, **38**, 635-638.

BAUER LS, PANKRATZ S. (1993) *Nosema scripta* N. Sp. (Microsporida: Nosematidae), a microsporidian parasite of the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Journal of Eukaryotic microbiology*, **40**, 135-141.

Protozoaires de classification incertaine

Pneumocystis carinii – *Blastocystis hominis*

18

1. *Pneumocystis carinii*

1.1 Introduction

Parfois considéré comme un champignon, rangé par certains parmi les protozoaires, le statut taxinomique de *Pneumocystis carinii* est toujours discuté, faute d'arguments définitifs. Il ne possède en effet aucune des structures qui caractérisent les sporozoaires (rhoptries, anneau polaire), les flagellates (kinétoplaste, flagelle, microtubules) ou les rhizopodes.

Son rôle pathogène est parfois rapproché de celui des toxoplasmes, avec une focalisation au poumon. Les formes latentes sont les plus fréquentes, surtout chez l'adulte, tandis que l'infection aiguë existe chez l'enfant, le vieillard, le débilite et l'immunodéprimé. Il a été observé en République Démocratique du Congo (Zaïre) pour la première fois en 1962 chez des nouveaux-nés prématurés ou débilites entre la 7ème semaine et le 5ème mois d'âge.

L'infection par *Pneumocystis carinii* survient avec une fréquence importante et une pathogénicité considérable chez les patients atteints de SIDA.

1.2 Cycle évolutif, morphologie et caractères biologiques

Morphologie

Au cours de son développement chez l'hôte, le parasite se présente sous quatre formes différentes (figure 18-1).

Les **trophozoïtes** existent sous deux formes: les petites formes (haploïdes), arrondies, de 2 à 4 μ de diamètre, à cytoplasme dense et noyau central et les grandes formes (diploïdes), d'un diamètre de 4 à 10 μ , de forme irrégulière avec cytoplasme peu dense et noyau unique. La membrane externe du parasite est très fine; la division se fait par bipartition ou par endodyogénie

(plusieurs cellules filles à paroi mince dans une cellule mère à paroi mince) (figure 18-2).

La **forme prékystique** se présente sous forme ovale (3,5 à 5,5 μ), avec paroi externe nettement épaissie, généralement lisse et régulière. Le noyau du grand trophozoïte s'est morcelé et on se trouve devant un parasite multinucléé (deux à huit noyaux haploïdes). La première division du noyau présente un complexe synaptonémal au cours de la prophase, ce qui est caractéristique d'une méiose (division réductionnelle) et indique un stade sexué.

La **forme kystique** (4 à 8 μ) dont la paroi s'est encore épaissie, renferme à ce moment huit parasites complets, avec chacun leur noyau et leur aire cytoplasmique propre entourée d'une fine membrane. Les corps intrakystiques sont arrondis, en forme de banane ou amiboïdes. Le kyste est arrondi et contient, en dehors des parasites intrakystiques, un résidu de cytoplasme dégénéré de la cellule mère. Ces formes vont être libérées par une craquelure de la paroi du kyste pour revenir au stade initial (trophozoïte). La paroi du kyste s'affaisse alors comme une baudruche dégonflée et reste *in situ* pendant des périodes très longues (figure 18-2).

Caractères biologiques

Le cycle complet est hébergé par le même hôte, il se situe dans les alvéoles pulmonaires. Les petits trophozoïtes haploïdes s'y trouvent par paquets (aspect "en nid d'abeille"), souvent adhérents à la paroi de l'alvéole. Leur taille s'accroît et les formes deviennent amiboïdes, une copulation (fusion de deux petits trophozoïtes) interviendrait à ce moment pour les rendre diploïdes; ces formes peuvent, avant copulation ou après celle-ci, se diviser par simple division binaire ou par endodyogénie, en se nourrissant uniquement des sécrétions de la muqueuse alvéolaire. On se trouve bientôt en présence de formes prékystiques plurinucléées puis de kystes contenant 8 corps intrakystiques

1. *Pneumocystis carinii*
 - 1.1 Introduction
 - 1.2 Cycle évolutif, morphologie et caractères biologiques
 - 1.3 Hôtes
 - 1.4 Pouvoir pathogène
 - 1.5 Diagnostic
 - 1.6 Traitement
 - 1.7 Épidémiologie
2. *Blastocystis*
 - 2.1 Localisation
 - 2.2 Morphologie et cycle
 - 2.3 Pouvoir pathogène
 - 2.4 Diagnostic
 - 2.5 Culture
 - 2.6 Traitement
 - 2.7 Épidémiologie et transmission

Bibliographie

FIGURES

- 18-1 Schéma du cycle hypothétique de *P. carinii*
- 18-2 Stades de *Pneumocystis*
- 18-3 Formes de *Pneumocystis* dans les sécrétions bronchiques
- 18-4 Stades de *Blastocystis* présents dans les selles

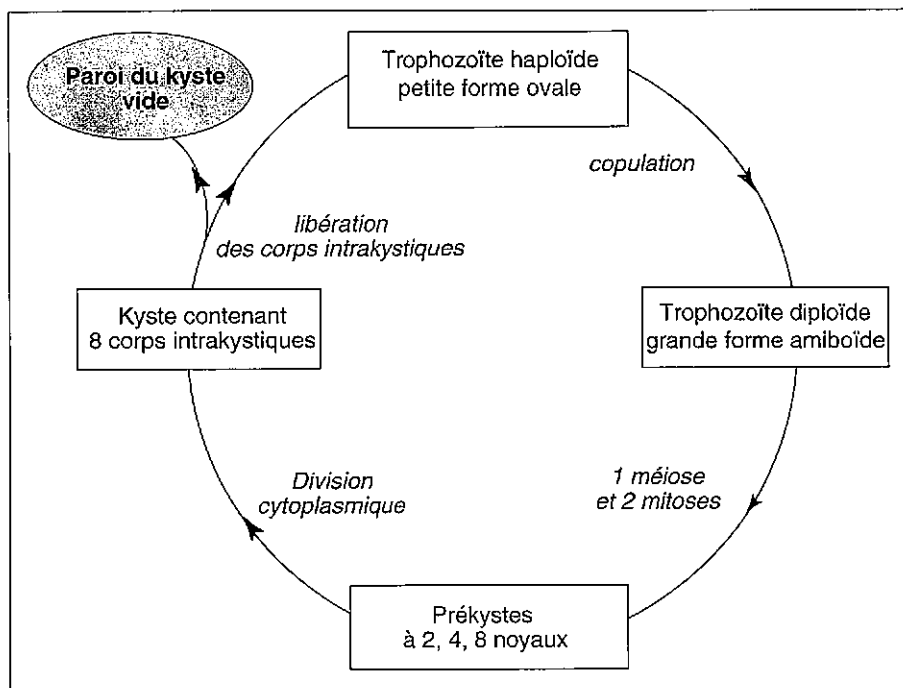


Figure 18-1

Schéma du cycle hypothétique de *P. carinii*

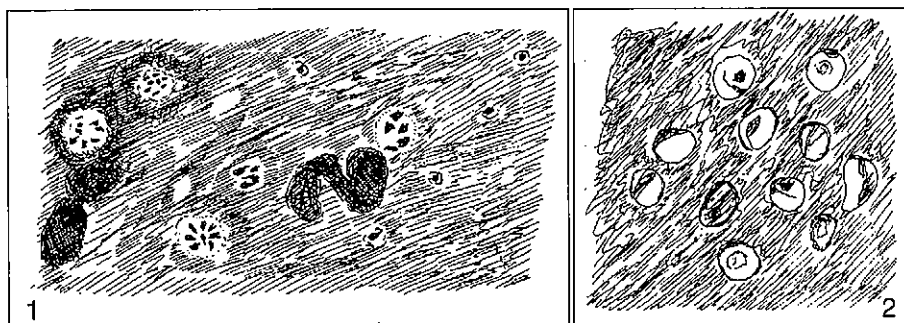
qui ensuite seront libérés, toujours dans l'alvéole pulmonaire.

On remarque l'absence de microtubules cytoplasmiques, de microfilaments et de lysosomes dans les différents stades et la présence d'une enveloppe nucléaire garnie de pores et de mitochondries, visibles dans les corps intrakystiques. D'où le doute taxinomique: est-ce bien un protozoaire?

Figure 18-2

Stades de *Pneumocystis*

1. Dessin de petits trophozoïtes et kystes multinucléés dans les sécrétions alvéolaires et bronchiques
2. Dessin de parois de kystes vides restés visibles dans les sécrétions après coloration au bleu de toluidine



La nutrition se fait par sécrétion d'enzymes dans le micro-environnement puis pénétration de petites molécules nutritives par diffusion à travers la membrane externe. L'endocytose est absente (ni phago- ni pinocytose). On n'a pas observé de motilité. Les formes trophiques ont tendance à adhérer les unes aux autres et aux parois kystiques ainsi qu'aux pneumocytes dans les alvéoles. C'est cette adhérence, provoquée par les polysaccharides de surface, qui donne l'aspect "en nid d'abeille" déjà signalé.

Dans les alvéoles pulmonaires des immunodéprimés ou en culture (sur du tissu ganglionnaire de rat), on observe une prédominance de la reproduction par bipartition.

1.3 Hôtes

P. carinii est un parasite monoxène de l'homme ainsi que de nombreux animaux (singe, chien, chat, mouton, chèvre, cobaye, rat, souris). Il a une distribution large, cosmopolite.

La morphologie des parasites est identique d'un hôte à l'autre mais la composition antigénique est différente. Les antigènes majeurs sont, chez le rat, deux protéines de respectivement 116 kD et 45 à 50 kD, tandis que chez l'homme, les protéines majeures (glycoprotéines) ont respectivement 116 et 40 kD. Il n'y a donc pas d'identité antigénique complète entre *Pneumocystis* du rat et celui de l'homme mais ces deux parasites partagent un nombre de déterminants antigéniques communs.

Les études faites à l'aide d'anticorps monoclonaux ont permis de constater des variations antigéniques entre souches isolées à partir d'espèces différentes d'animaux ainsi que d'un stade à l'autre du cycle de développement, de mettre en évidence la localisation des principaux antigènes sur le parasite et d'isoler des antigènes spécifiques de *P. carinii*.

1.4 Pouvoir pathogène

Chez toutes les espèces animales ainsi que chez l'homme, le parasite produit généralement des infections latentes.

L'homme fait la maladie à l'occasion de baisse de l'état général: leucémie, lymphome malin, maladie de Hodgkin, myélome multiple, agammaglobulinémies, anémies aplastiques, patients traités par corticostéroïdes, agents cytotoxiques, antibiotiques ou irradiations, traitements immunodépresseurs mais surtout actuellement le SIDA. Dans les infections à VIH, *P. carinii* est un germe opportuniste fréquent aux USA

et en Europe mais beaucoup moins en Afrique. La cause de cette répartition différente est inconnue.

On trouve aussi la pneumocystose chez les prématurés, les enfants débilités ou en état de malnutrition. Les greffes d'organes, par les traitements immunodépresseurs associés, favorisent aussi l'infection aiguë.

Histologiquement, il s'agit d'une infiltration massive à mononucléaires (plasmocytes, histiocytes et lymphocytes). Les cavités alvéolaires élargies sont remplies de débris cellulaires et bactériens. Les kystes de *Pneumocystis* sont enrobés dans un substrat mousseux et situés le long de la paroi de l'alvéole.

Cliniquement, le patient présente toux, dyspnée, tachycardie, douleur abdominale ou thoracique, température peu élevée. S'il n'est pas traité, la maladie peut évoluer vers la mort après deux ou trois semaines d'aggravation constante.

1.5 Diagnostic

Le diagnostic chez le malade est basé sur la clinique (pneumonie), l'anamnèse (sérologie VIH positive, corticothérapie, etc.) et la mise en évidence du microorganisme responsable (figure 18-3).

Examen microscopique direct

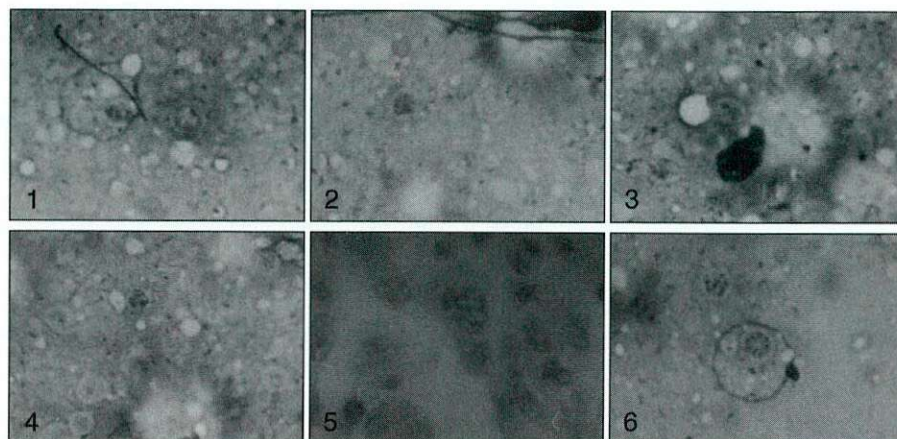
Il mettra en évidence les trophozoïtes et les formes kystiques dans des sécrétions bronchiques obtenues par expectoration induite ou par lavage broncho-alvéolaire (90 p.100 de sensibilité). L'examen de coupes histologiques de biopsie pulmonaire (transbronchique), plus invasive, permet également le diagnostic.

Les méthodes de coloration proposées pour les coupes histologiques et les étalements (frottis) sont nombreuses: hématoxyline-éosine, Giemsa (bonne mise en évidence des corps intrakystiques), bleu de toluidine et imprégnation argentique de Gomori pour les parois. La méthode de Gram (*P. carinii* est Gram+) permet une bonne différenciation avec les autres microorganismes dans le liquide de lavage bronchique.

D'autre part, les anticorps monoclonaux permettent, par immunofluorescence ou coloration à la peroxydase, de repérer de manière très spécifique les parasites. Ils sont commercialisés par plusieurs laboratoires.

Remarque

Les crachats sont peu abondants et ne contiennent pas de parasites.



En fait, c'est souvent à l'autopsie que l'on découvre le parasite dans des coupes de tissus pulmonaire colorées à l'hématoxyline - éosine.

Sérologie

La recherche d'anticorps anti-*Pneumocystis* dans le sérum d'individus aurait plus une valeur épidémiologique (résultats contradictoires!) qu'une valeur diagnostique, étant donné la rapidité de l'évolution de la pneumonie. Les méthodes utilisées actuellement sont l'immuno-fluorescence indirecte (IFI) et l'ELISA.

L'antigène est préparé à partir de poumons d'animaux infectés expérimentalement ou naturellement. Les tissus subissent une homogénéisation, filtration et centrifugation différentielle sur gradient de sucrose. L'antigène d'origine animale réagit de façon comparable à l'antigène d'origine humaine.

En immunofluorescence, une suspension de kystes est très peu sensible: les individus sains sont habituellement négatifs. Des coupes de tissus infectés donnent une plus grande sensibilité.

Dans des réactions ELISA, ce sont des extraits de *P. carinii* (à l'urée) ou solubilisés à l'HCl qui sont utilisés comme antigènes.

Des infections subcliniques (porteurs sains) stimulent la réponse immune de l'hôte (production d'anticorps spécifiques). La réponse vis-à-vis d'un antigène donné varie d'un sujet (ou d'un rat) à l'autre.

A titre d'exemple, une étude faite il y a une dizaine d'années en immunofluorescence a montré que dans un groupe de 119 patients morts de pneumocystose, 90 p.100 avaient des anticorps décelables contre 3 p.100 dans un groupe témoin d'individus bien

Figure 18-3

Formes de *Pneumocystis* dans les sécrétions bronchiques

1 à 5. prékystes

6. kyste

Patients avec pneumonie	Sujets sains hétérosexuels
réaction IFI +: 44 à 70 p.100; ELISA +: 47 à 84 p.100;	réaction IFI +: 2 à 57 p.100 ELISA +: 50 à 100 p.100

Tableau 18-1

portants. D'autre part, une enquête récente faite aux Etats Unis donnait, elle, les résultats ci-dessus (tableau 18-1)

Culture et inoculation aux animaux de laboratoire

Remarque

Ni l'une ni l'autre ne constituent des méthodes de diagnostic mais les deux sont utiles pour produire au laboratoire, à la demande, des quantités importantes de parasites. L'infection expérimentale permet aussi l'étude des relations hôte-parasite.

La culture *in vitro* est possible en présence de cellules en couche monocellulaire ("feeder cells"). L'avantage des cultures est de pouvoir récolter les parasites à l'état pur, sans cellules contaminantes ni matériaux collants.

Les principaux problèmes posés par les cultures sont la stérilité, l'asynchronisme de développement, la difficulté de numération des organismes et le nombre limité de passages.

L'inoculation à des animaux de laboratoire n'est pas un apport intéressant pour le diagnostic. La plupart d'entre eux hébergent, en effet, le parasite à l'état latent et il suffit de leur administrer une cure intensive d'immunosuppresseurs pour faire apparaître spontanément une infection aiguë à *P. carinii*.

Par contre, ces modèles animaux ont permis l'étude de l'efficacité de différents traitements médicamenteux (administrés conjointement à la cortisone qui favorise l'infection) visant à protéger les animaux de l'apparition de la pathologie.

1.6 Traitement

Association triméthoprime-sulfaméthoxazole (Bactrim®): TMP 16 mg/kg/jour et SMZ 80 mg/kg/jour (soit, pour un adulte, 6 comprimés de Bactrim® forte/jour).

Pentamidine (Pentacarinat®): 4 mg/kg/jour en IV lente ou en aérosols pulmonaires.

La durée du traitement est de 3 semaines.

Une prophylaxie a été recommandée à base de triméthoprime et sulfaméthoxazole (1 comprimé de

Bactrim® par jour) ou d'aérosols à la pentamidine (mensuels) pour les patients en immunodépression (traitement immunosuppresseur et patients SIDA ayant déjà fait un épisode ou qui ont moins 200 lymphocytes T CD4⁺/µl).

1.7 Epidémiologie

Le parasite se trouve chez 1 à 10 p.100 de la population humaine, à l'état latent, ainsi que chez divers animaux domestiques et sauvages. La transmission se fait de manière directe d'individu infecté à individu indemne (contact direct, transmission pflugienne).

Avant l'époque de l'infection à VIH, la maladie était le plus souvent décrite chez des patients immunodéprimés où elle prenait parfois des allures d'épidémie (services de prématurés); 17 cas ont été diagnostiqués dans un service pédiatrique hébergeant des enfants en immunosuppression pour affection maligne; 40 diagnostics rétrospectifs ont été portés par examen de matériel d'autopsie de 301 enfants du même hôpital, décédés d'autre affections.

Avec l'infection à VIH, le problème a changé de dimension: aux Etats-Unis, 60 à 90 p.100 des patients atteints de SIDA développent une pneumocystose. La réponse aux médicaments est lente et les rechutes fréquentes.

L'individu normal héberge le parasite sans symptômes (infection inapparente). Le parasite a donc une virulence peu élevée.

2. Blastocystis hominis

Ce parasite reste, à bien des égards, énigmatique. C'est bien un protozoaire, avec mitochondries, réticulum endoplasmique et ribosomes mais il n'est pas encore classé de manière définitive: on pense aux amoebo-flagellates.

2.1 Localisation

Cosmopolite, les formes parasitaires se cantonnent dans le côlon.

2.2 Morphologie et cycle

Le parasite se caractérise par la présence, à côté du ou des noyau(x), d'un corpuscule central qui est, en fait, une vacuole remplie de granules de différentes tailles.

Il se présente au cours de son cycle sous plusieurs formes: vacuolée, granuleuse, kystique et ami-

boïde (figure 18-4). La forme vacuolée se transformerait en forme granuleuse par accumulation de granules dans la vacuole, dans certaines circonstances mal définies.

La forme vacuolée, la plus fréquemment observée en culture, mesure de 8 à 10 μ . Dans les formes à vacuole unique, les noyaux (souvent multiples) et le cytoplasme sont comprimés contre la membrane externe par une grande vacuole centrale. Le cytoplasme contient peu de mitochondries et d'endosymbiontes (bactéries en forme de granules). La membrane plasmotique peut avoir une épaisseur considérable. Les formes multivacuolées, d'un diamètre variant de 5 à 15 μ en moyenne, sont les plus fréquentes dans les selles.

La forme granuleuse, de taille très variable, est sphérique et remplie de granules situés dans le cytoplasme et dans la ou les vacuole(s). Ces petits granules sont des bactéries endosymbiontes de forme circulaire ou en bâtonnets. Les noyaux, multiples, possèdent des nucléoles. Cette forme dérive apparemment de la forme vacuolée lorsque les conditions de survie deviennent défavorables pour le parasite.

Dans les selles fraîches (ou conservées dans le formol), le parasite peut prendre une forme kystique, arrondie, de 3 à 10 μ , avec un cytoplasme condensé, plusieurs vacuoles, une paroi épaisse à structure fibreuse multilamellaire et un enduit de surface de densité irrégulière au microscope électronique.

Enfin, la forme amiboïde présente un noyau à chromatine condensée en périphérie, une vacuole centrale et de grandes mitochondries. Sa surface est hérissée de longs filaments. Elle est peu mobile et se divise activement. Il est possible que cette forme soit un état particulier, passager, d'une des formes décrites ci-dessus ou représente un artefact.

2.3 Pouvoir pathogène

Il ne se manifeste qu'en cas de parasitisme intense. Les lésions ne sont pas clairement identifiées. Les formes parasitaires sont retrouvées dans la muqueuse du côlon, à l'intérieur de l'épithélium, entre les cellules, mais il n'y aurait pas de réaction inflammatoire.

On ne remarque aucune différence entre les souches.

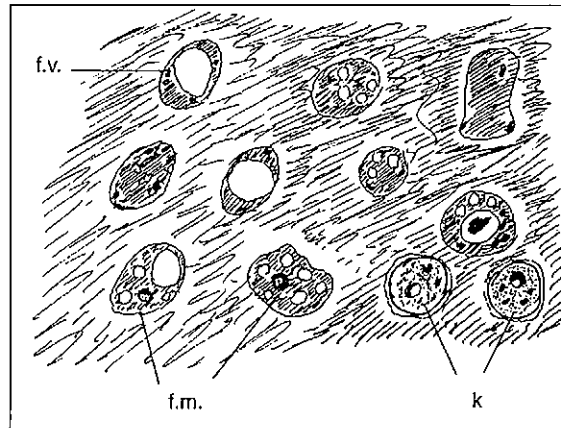


Figure 18-4

Sades de *Blastocystis* présents dans les selles

Dessin des formes le plus souvent retrouvées à l'examen de selles

f.v. forme vacuolaire

f.m. forme multivacuolaire

k kyste

2.4 Diagnostic

L'examen microscopique des selles montrera des parasites. Les méthodes de concentration les plus efficaces sont celles utilisant le formol - acétate d'éthyl (Ritchie). Le lugol peut être utile, de même que le bleu de toluidine, car le parasite non coloré est difficilement reconnaissable. La coloration au trichrome est très démonstrative.

Il n'existe pas de test sérologique.

2.5 Culture

Les cultures polyxéniques sont possibles sur le milieu de Boeck - Dbrolav, sans addition d'amidon de riz. La culture axénique est possible en anaérobiose stricte, sur milieux convenant aux amibes: le milieu MEM additionné de sérum de cheval (MEM-S) est le meilleur (voir chapitre 19). On y observera surtout des formes géantes contenant beaucoup d'endosymbiontes.

2.6 Traitement

Les traitements anti-amibiens sont efficaces.

2.7 Epidémiologie et transmission

Dans une étude récente faite aux USA portant sur les selles de 2360 patients, 480 présentaient le parasite parmi lesquels 289 polyparasitismes comprenant *B. hominis* et 191 avec monoparasitisme à *B. hominis*.

Les prévalences médianes d'une série d'enquêtes (dont l'échantillon dépasse 1000 personnes) sont de 5 à 15 p.100.

La transmission se fait vraisemblablement par contact féco-oral.

BIBLIOGRAPHIE

- BRUMPT E. (1912) *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines, *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*, **5**, 725-730.
- THIJS A, JANSSENS PG. (1962) Pneumocystosis in Congolese infants, *Tropical and geographical Medicine*, **15**, 158-172.
- ZIERDT CH, WILLIAM RL. (1973) *Blastocystis hominis*: axenic cultivation, *Experimental Parasitology*, **36**, 316-325.
- PHILLIPS BP, ZIERDT CH. (1976) *Blastocystis hominis*: pathogenic potential in human patient and in gnotobiotics, *Experimental Parasitology*, **39**, 358-364.
- MARTY P, DELLAMONICA P, LE FICHOUX Y et al. (1981) *Pneumocystis carinii* Delanoe et Delanoe, 1912 en microscopie optique, *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, **56**, 363-374.
- GARCIA LS, BRUCKER DA, CLANCY MN. (1984) Clinical relevance of *Blastocystis hominis*, *Lancet*, **i**, 1233-1234.
- MATSUMOTO Y, YOSHIDA Y. (1986) Advances in *Pneumocystis* biology, *Parasitology Today*, **2**, 137-142.
- Society of Protozoology (1989) Symposium: Historical perspectives on *Pneumocystis carinii*, *Journal of Protozoology*, **36**, 39-74.
- Society of Protozoology, National Institute of allergy and infectious diseases (1989) Workshop on *Pneumocystis carinii*, (Bristol, UK) *Journal of Protozoology*, **36**, suppl. 1S-80S.
- Society of Protozoology, National Institute of allergy and infectious diseases (1991) Second International Workshop on *Pneumocystis*, *Cryptosporidium* and *Microsporidia*, (Montana, USA), *Journal of Protozoology*, **38**, 2S-245S.
- SAIMOT AG, GIRARD PM. (1991) Pneumopathie à *Pneumocystis carinii* au cours de l'infection à VIH: diagnostic, facteurs pronostiques et traitement curatif, *Presse Médicale*, **20**, 258-264.
- BOREHAM PFL, STENZEL DJ. (1993) *Blastocystis* in humans and animals: Morphology, Biology and Epizootiology, In: JR BAKER and R MULLER, *Advances in Parasitology*, London, Academic Press, **32**, 2-70.

Techniques utilisées pour le diagnostic et la recherche

19

1. Protozoaires des matières fécales

1.1 Examen direct des selles pour recherche de protozoaires

Recherche de trophozoïtes (sur selles diarrhéiques)

• EXAMEN MICROSCOPIQUE À FRAIS

Il est important de réaliser une préparation bien lisible. On mélange à cet effet, sur un porte-objet, une petite quantité de la selle à examiner avec une goutte d'eau physiologique. Si la selle est liquide, on l'examine sans addition d'aucune sorte. On recouvrira la préparation d'une lamelle couvre-objet. La préparation doit être très mince.

Pour l'examen au microscope, on utilise l'objectif X10 ou X20 puis X40 avec un oculaire X6 ou X10 et on abaisse le condensateur de manière à ne pas trop éclairer la préparation.

Remarque

On examine les selles le plus tôt possible après leur émission car les trophozoïtes sont fragiles; un léger chauffage de la préparation augmente leur mobilité, ce qui facilite le repérage au microscope.

Recherche de kystes

On procèdera de la même façon. Les quantités de selles et d'eau physiologique doivent être calculées de manière à ce que la préparation finale ne soit pas trop épaisse et que la lamelle ne flotte pas sur une quantité trop importante de liquide débordant de partout.

L'examen au microscope permet de repérer trophozoïtes mobiles et kystes. Cependant pour ces derniers, la reconnaissance des caractères morphologiques nécessitera souvent un examen à l'immersion et une coloration.

Colorations extemporanées pour les kystes

• ÉOSINE (solution aqueuse à 1 p.100)

Elle a pour but de colorer uniformément en rose le fond de la préparation (matières alimentaires non digérées, bactéries, cellules végétales). Sur ce fond coloré, les kystes de protozoaires apparaissent comme des éléments non colorés: leur paroi épaisse ne laisse pas pénétrer le colorant.

Au faible grossissement (objectif X10), on repère facilement dans une telle préparation la présence de kystes que l'on devra ensuite identifier à un plus fort grossissement. Cette méthode n'est efficace que si la préparation est très mince (épaisseur d'une cellule): en effet, l'éosine ne doit pas recouvrir les éléments parasitaires, le contraste s'en trouverait diminué.

• LUGOL

Il colore en jaune-brun les membranes des kystes ainsi que leurs structures cytoplasmiques et nucléaires, soulignant les caractéristiques morphologiques. L'examen se fait à l'objectif X40 ou X100.

Solution de Lugol

Eau distillée	100,0 ml
Iode	1,0 g
Iodure de potassium	2,0 g

Laisser reposer pendant 4 jours et conserver à +4°C.

Pour l'emploi, on filtre (sur papier) une petite quantité que l'on met dans un flacon compte-gouttes en verre brun. Il faudra renouveler cette solution filtrée chaque semaine.

• RÉACTIF DE BAILINGER

Il colore, chez les protozoaires intestinaux (kystes et trophozoïtes), le cytoplasme et les bâtonnets cristalloïdes en rouge, les structures nucléaires en noir.

Colorant de Bailenger

Cristal violet	2,0 g
Fuchsine basique	0,05 g
Alcool 95°	20,0 ml
Phénol cristallisé fondu	10,0 ml

1. Protozoaires des matières fécales
2. Protozoaires du sang et des tissus
3. Examen du liquide céphalo-rachidien (LCR)
4. Autres techniques de mise en évidence de parasites
5. Diagnostic indirect par recherche d'anticorps
6. Cryoconservation

FIGURES

- 19-1. Goutte épaisse correctement effectuée.
- 19-2. Quadrillage des cellules à numération des éléments cellulaires dans le LCR.
- 19-3. Immunodiffusion radiale
- 19-4. Prélèvements de sang séché, découpage de "confettis"
- 19-5. Test d'agglutination directe sur carte (CATT)
- 19-6. Réaction d'agglutination: promastigotes de *Leishmania* en plaque à microtitration
- 19-7. Immunodiffusion (Ouchterlony) et immunoelectrophorèse
- 19-8. Lames multispot
- 19-9. Exemple de tests d'immunofluorescence positifs
- 19-10. "Immunoblotting" ou "Western blot"

Après contact pendant une nuit, on ajoute

Eau distillée 100,0 ml

Filtrer et conserver en flacon bouché hermétiquement et à l'abri de la lumière.

Coloration de Sargeant

- PRINCIPE

Extemporannée, elle se fait après un enrichissement selon Ritchie.

- COLORANT

Vert de malachite	0,2 g
Acide acétique glacial	3,0 ml
Alcool 95°	3,0 ml
Eau distillée pour faire	100,0 ml

Dissoudre le vert de malachite dans l'alcool, ajouter l'acide acétique et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée. Le colorant se conserve bien sur la table du laboratoire.

- PROCÉDURE

- Concentration des kystes par la méthode formol-éther;
- coloration du culot: mélanger sur une lame porte-objet, une goutte de la concentration de selles avec une goutte de colorant. Examiner entre lame et lamelle.

- RÉSULTAT

Membrane externe du kyste, membrane nucléaire et chromatine colorées en vert pâle. Les corps chromatoides se présentent sous la forme de solides bâtonnets verts.

Coloration MIF

(voir sous "conservation des kystes")

1.2 Méthodes de concentration

Méthode diphasique de sédimentation (RITCHIE)

- PRINCIPE

Différents constituants des matières fécales gênant l'examen sont éliminés en cours de préparation: les éléments protéiques sont coagulés par le formol, les graisses sont solubilisées par l'acétate d'éthyle. Les éléments figurés subsistent, la centrifugation les concentre dans le culot.

- RÉACTIFS NÉCESSAIRES

Solution isotonique de formol à 10 p. 100 dans NaCl 8,5 p.1000

Acétate d'éthyle (Merck) ou éther diéthylique.

- PROCÉDURE

- Délayer une partie de matières fécales dans dix parties de solution isotonique de formol à 10 p.100;
- filtrer à travers une double couche de gaze chirurgicale et laisser sédimenter 1 minute;
- reprendre le surnageant et le centrifuger à 1.500 tours/min. pendant 2 minutes;
- éliminer le surnageant, resuspendre le culot dans 10 ml de formol à 10 p.100, centrifuger à nouveau; recommencer cette opération 3 ou 4 fois jusqu'à ce que le liquide surnageant soit clair;
- mettre le dernier culot en suspension dans 5 ml de formol à 10 p.100, ajouter 3 ml d'acétate d'éthyle, bien boucher le tube et agiter vigoureusement en maintenant le pouce sur le bouchon, pour émulsionner le tout;
- centrifuger à 1.500 tours/min. pendant 2 minutes;
- éliminer le liquide surnageant (couche supérieure d'acétate d'éthyle, couche inférieure de formol et anneau gras à l'interphase);
- reprendre le culot et l'examiner pour la recherche des parasites.

Méthode de flottation (FAUST)

- PRINCIPE ET RÉACTIF

Nécessite l'emploi d'une solution aqueuse saturée de sulfate de zinc (33 p. 100 environ) qui a une densité de 1,180 et est plus lourde que les protozoaires (et les œufs d'helminthes).

- PROCÉDURE

- Triturer soigneusement une partie de selles avec dix parties d'eau tiède;
- tamiser 10 ml de la solution fécale à travers une couche de gaze humide disposée dans un entonnoir; recueillir le filtrat dans un tube à centrifuger;
- centrifuger une minute à 2.000 tours/min.;
- éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans l'eau;
- recommencer la centrifugation jusqu'à obtention d'un surnageant clair, l'éliminer;

- remettre le culot en suspension dans la solution de sulfate de zinc; remplir le tube presque jusqu'au bord;
- centrifuger pendant 1 minute à 2.500 tours/min.;
- prélever à l'aide d'une anse métallique la couche superficielle du liquide dans laquelle se trouvent les parasites, faire plusieurs prélèvements et les examiner à frais, entre lame et lamelle.

Remarques

Prélever les parasites immédiatement après la centrifugation.

Si on remplit le tube de sulfate de zinc jusqu'à ras-bord, on pourra placer une lamelle à plat sur l'orifice du tube, au contact de la couche superficielle, puis la transférer sur une lame porte-objet pour l'examiner.

1.3 Coloration des protozoaires fécaux sur frottis

Technique de Kohn

• PRODUITS NÉCESSAIRES

Colorant de Chlorazol Black E (G.T. GURR, London)

Autres produits: catalogue Merck.

Colorant

Chlorazol Black E (G.T. GURR, London) 5 g

Solution de base

Alcool éthylique 90°	170 ml
Alcool méthylique	160 ml
Acide acétique glacial	20 ml
Phénol liquéfié	20 ml
Acide phosphotungstique à 1 p.100	12 ml
Eau distillée pour faire	1000 ml

Préparation

Le chlorazol est broyé dans un mortier en ajoutant la solution de base au fur et à mesure, par petites quantités. Le tout est placé dans un flacon de verre blanc et laissé au repos, à la lumière pendant 4 à 6 semaines (mûrissement); formation d'un dépôt et éclaircissement (obligatoire) de la partie surnageante qui prend une couleur rouge cerise et qui servira de solution colorante. La technique convient pour les frottis et pour les coupes.

• PROCÉDURE

- Faire des frottis de matières fécales sur une lame porte-objet à l'aide d'un bâtonnet;
- les frottis encore humides seront trempés dans la solution colorante que l'on peut utiliser telle quelle ou diluée avec 1 fois ou 2 fois son volume de solution de base;

- le temps de traitement est de 2 à 4 heures; dans certains cas, il faudra colorer jusqu'à 12 à 18 heures (vérifier les progrès de la coloration en examinant un des frottis au microscope après 2 à 3 heures de contact avec le colorant).

Fixation, coloration et différenciation sont combinées en un seul et même bain.

• RÉSULTAT

Les noyaux et caryosomes prennent une teinte gris-vert foncé.

Le tissu musculaire et la kératine sont colorés en rouge.

Hématoxyline ferrique

• PRINCIPE

C'est une coloration régressive. Le mordantage et la surcoloration (imprégnation excessive des structures par le colorant) sont suivis d'une décoloration (enlèvement du colorant des structures qui le retiennent le moins).

• PRODUITS NÉCESSAIRES

Solution A

Hématoxyline	1,0 g
Alcool absolu	10,0 ml
Eau distillée	90,0 ml
Thymol	1 cristal

Remarque

Dissoudre l'hématoxyline dans l'alcool absolu puis ajouter l'eau distillée.

Solution B

Alun de fer	2,0 g
Eau distillée	100,0 ml

Solution C (Fixateur de Schaudinn)

HgCl ₂ , sol. aqueuse saturée	2 parties
Alcool absolu	1 partie
Acide acétique glacial	4 gouttes par 100 ml

Remarque

Ajouter l'alcool et l'acide acétique au moment de l'emploi.

• PROCÉDURE

Elle est longue (48 heures) et laborieuse, la différenciation étant un point crucial et délicat.

Confectionner un frottis de selles

Sur lame ou sur lamelle à l'aide d'un bâtonnet de bois (frottis très mince).

Fixer le frottis encore humide

Schaudinn (20 minutes).

Lavages nécessaires pour éliminer le sel de mercure

10 minutes successivement dans chacun des bains suivants:

Alcool à 70 p.100;

alcool à 70 p.100 contenant quelques gouttes de lugol (donnent une teinte jaunâtre au bain d'alcool);

alcool à 70 p.100 contenant quelques gouttes d'une solution saturée d'hyposulfite de sodium;

alcool à 70 p.100.

Mordançage

Solution B, 1 partie

alcool à 70 p.100, 15 parties

durée: 12 à 24 heures.

Lavage

Alcool à 70 p.100 pendant 30 minutes;

Coloration

Solution A, 1 partie

alcool à 70 p.100, 10 parties

durée: 24 heures.

Différenciation

Solution B, 1 partie

alcool à 70 p.100, 15 parties

durée: environ 5 minutes; contrôler au microscope les progrès de la différenciation.

Lavage

Alcool à 70 p.100: 2 heures; changer plusieurs fois le bain.

Déshydratation

Alcool absolu: deux bains successifs de 5 minutes;

bain d'éclaircissement: huile de clou de girofle, 10 minutes;

xylo: deux bains successifs de 5 minutes.

Montage

Au baume de Canada, en recouvrant d'une lamelle.

• RÉSULTAT

Les structures des trophozoïtes et des kystes (membranes, corps chromatoides, bactéries et hématies phagocytées, chromatine nucléaire) sont colorées en noir.

Remarque

La différenciation est le point délicat. Elle a pour but d'enlever électivement l'excès de colorant de certaines structures (cytoplasme, vacuoles). Il est nécessaire d'en contrôler le progrès toutes les 5 minutes au microscope.

1.4 Coloration des oocystes de *Cryptosporidium* et de *Cyclospora*

Coloration rapide à la safranine et au bleu de méthylène

• RÉACTIFS

Méthanol absolu additionné de 3 p.100 d' HCl

Solution de safranine (Paramount ou Merck) à 1 p.100 dans l'eau distillée

Solution de bleu de méthylène (Paramount ou Merck) à 1 p.100 dans l'eau distillée

• PROCÉDURE

Peut se faire sur des frottis de selles fraîches ou après concentration de Ritchie ou par flottation.

- Faire sur une lame un frottis à partir de selles diluées en eau physiologique et laisser sécher à l'air; fixer par passage sur la flamme (bec Bunsen);
- fixation au méthanol - acide chlorhydrique pendant 3 à 5 minutes;
- rincer à l'eau;
- recouvrir la préparation de safranine à 1 p.100; laisser agir pendant 60 secondes en chauffant jusqu'à ébullition (si nécessaire, rajouter du colorant en continuant à chauffer);
- recouvrir de bleu de méthylène à 1 p.100 et laisser agir pendant 30 secondes;
- rincer à l'eau et sécher;
- monter entre lame et lamelle au moyen d'un lut approprié (DPX de la firme BDH);
- examiner à l'objectif X20 et X100.

• RÉSULTAT

La paroi des oocystes de *Cryptosporidium* (4 à 6 μ m) est colorée en orange. Les sporozoïtes contenus sont plus sombres et situés contre la paroi.

Chez *Cyclospora*, certains kystes (10 μ m) ont une paroi colorée, d'autres les structures internes.

Les kystes d'*Entamoeba* et de *Giardia*, les levures et diverses particules contenues dans les selles sont colorés en bleu. Quelques bactéries sporulées peuvent être colorées en orange.

Coloration de Ziehl-Neelsen (modifiée)

• PROCÉDURE

- Faire un étalement mince de matières fécales sur un porte-objet (délayer les selles si elles sont trop solides);
- sécher à l'air;
- fixer au méthanol pendant 5 minutes;

- sécher à l'air;
- colorer pendant 1 heure à la fuchsine phéniquée (fuchsine de Ziehl);
- rincer à l'eau;
- différencier 20 secondes en agitant la lame dans une solution d'acide sulfurique à 2 p.100;
- rincer à l'eau;
- colorer au vert de malachite à 5 p.100;
- rincer à l'eau et sécher à l'air;
- observer à l'objectif X40 puis X100 à l'immersion.

Remarque

Le culot après enrichissement selon Ritchie peut servir de point de départ.

• RÉSULTAT

Les oocystes de *Cryptosporidium* et de *Cyclospora* sont ronds ou ovoïdes de couleur rouge vif sur fond vert. Les autres éléments des selles sont colorés en vert, sauf certains bacilles et autres coccidies qui sont rouges aussi. On les reconnaît aisément à leur forme et leur taille (4 à 6 µm).

1.5 Conservation des kystes dans les selles

Formol (formaldéhyde)

• PRODUITS

Solution aqueuse de formol (5 p.100)

Formol du commerce (40 p.100)	5,0 ml
Eau distillée	95,0 ml

ou

eau physiologique formolée et glycinée

Eau physiologique (NaCl 8,5 p.1000)	95,0 ml
Formol du commerce (40 p.100)	5,0 ml
Glycérine	1,5 ml

• PROCÉDURE

Mélanger 1 volume de matières fécales avec 3 volumes de la solution de formol: l'échantillon peut se conserver pendant plusieurs années.

Mélange MIF

Il est composé de teinture de merthiolate (M), de lugol (Iode) et de formol (F).

• PRODUITS

Solution MF (stable)

Eau distillée	50,0 ml
Formaldéhyde	5,0 ml
Teinture de merthiolate* (1/1.000)	4,0 ml
Glycérine	1,0 ml

*Utiliser la teinture de merthiolate contenant de l'éosine (Lilly).

Remarque

La solution MF se conserve plusieurs semaines en flacon brun.

Solution iodo-iodurée (lugol)

Cristaux d'iode (pulvérisés)	5,0 g
Iodure de potassium	10,0 g
Eau distillée	100,0 ml

Filtrer.

Conservation en flacon brun pendant 3 à 4 semaines.

• PROCÉDURE

Juste avant l'emploi, on mélange 0,15 ml de lugol à 2,35 ml de MF. Une partie de matières fécales est triturée dans trois parties de mélange MIF.

Remarque

La solution MIF complète ne se conserve pas. L'iode précipite après quelques minutes et les protozoaires ne sont plus bien colorés.

Ce mélange conserve les protozoaires, kystes et trophozoïtes colorés par l'iode, tandis que les autres constituants des matières fécales sont colorés par l'éosine contenue dans la teinture de merthiolate.

Les échantillons de selles ainsi traités peuvent plus tard subir des concentrations et l'examen microscopique se fait dans d'excellentes conditions.

L' alcool polyvinylique

• COMPOSITION DU MÉLANGE FIXATEUR

Fixateur de Schaudinn modifié

Cristaux de chlorure de mercure	4,5 g
Alcool éthylique 95°	31,0 ml
Acide acétique glacial	5,0 ml

L' alcool polyvinylique (PVA)

Glycérol	1,5 ml
Poudre PVA	5,0 g
Eau distillée	62,5 ml

Mélanger jusqu'à dissolution en chauffant (en évitant l'ébullition).

• PRÉPARATION

Chauffer au bain-marie, à 70-75 °C, la solution PVA et y ajouter le fixateur. Mélanger jusqu'à ce que le mélange soit limpide. Laisser refroidir.

Remarque

Un léger trouble peut apparaître sans nuire aux qualités conservatrices.

• PROCÉDURE

Mélanger 1 partie de matières fécales et 3 parties de fixateur.

- RÉSULTAT

Les mélanges à base de PVA conservent la morphologie des kystes et des trophozoïtes de manière indéfinie. Les échantillons conservés de cette manière peuvent ensuite être colorés en frottis, à l'hématoxyline.

1.6 Culture polyxénique de *Entamoeba histolytica*

Principe

La croissance de l'amibe dysentérique nécessite la présence de germes microbiens associés et de grains d'amidon.

Milieu de Dobell

- COMPOSITION

Phase solide

Sérum de cheval stérilisé par filtration; 1 ml par tube; coaguler au four Pasteur pendant 1 heure à 80 °C, les tubes étant couchés pour obtenir une pente de sérum d'environ 3 à 4 cm de longueur.

Phase liquide

Solution de Ringer-Locke

NaCl	9,0 g
KCl	0,42 g
CaCl ₂	0,24 g
NaHCO ₃	0,2 g
Glucose	1,0 g
Eau distillée	1000,0 ml

Ajouter l'albumine d'oeuf (voir sous "préparation")

- PRÉPARATION

Ajouter stérilement 1 blanc d'oeuf par 250 ml de Ringer (après désinfection d'un pôle de la coquille, découper une petite fenêtre à l'aide de ciseaux pointus stérilisés et laisser s'écouler le blanc). Homogénéiser dans un ballon contenant des billes de verre. Stériliser par filtration sur Seitz.

La phase liquide est ajoutée au sérum coagulé de manière à couvrir entièrement la pente (environ 5 cm de hauteur). Tester la stérilité des tubes ainsi complétés, à l'étuve pendant 24 heures, puis conserver à + 4 °C.

L'amidon de riz (stérilisé à l'autoclave) est ajouté au moment de l'ensemencement (une anse de platine ou une pointe de couteau).

Milieu de Jones

- SOLUTIONS STOCK POUR PRÉPARER
UN TAMPON PHOSPHATE M/15.

Sel alcalin (phosphate disodique)

soit	Na ₂ HPO ₄	9,48 g
soit	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	11,88 g
soit	Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	23,9 g
	Eau distillée	1.000 ml

Sel acide (phosphate monopotassique)

KH ₂ PO ₄	9,1g
Eau distillée	1000 ml

- PRÉPARATION DU MILIEU (pH 7,2 pour *E. histolytica*)

Mélange tampon

Eau bidistillée	1125,0 ml
NaCl (9 p.1000)	0,13 g
Sol. Na ₂ HPO ₄ M/15	187,5 ml
Sol. KH ₂ PO ₄ M/15	62,5 ml

Milieu complet

Mélange tampon	950,0 ml
Extrait de levure (Difco)	1,0 g
Sérum de cheval	50,0 ml

Vérifier le pH, filtrer sur Seitz (stérilisation), stocker à + 4 °C. Pour l'emploi, répartir en tubes sur une hauteur de 5 cm au moins et ajouter de l'amidon de riz (autoclavé) pour la culture d'amibes.

Entretien des cultures

L'isolement à partir des selles est fait en mettant un gramme environ de selles dans deux tubes de milieu. Contrôler la croissance tous les jours. Dès que des amibes sont observées, repiquer dans un tube de milieu neuf. Pour l'entretien, le rythme des repiquages de *E. histolytica* est de 2 fois par semaine.

1.7 Culture axénique de *Entamoeba histolytica*

Principe et utilité

Le but est de multiplier les trophozoïtes en l'absence de tout germe associé et de composant particulaire (amidon) qui gênent la récolte et l'étude des amibes. La récolte des amibes à l'état pur est nécessaire pour la préparation des antigènes solubles et figurés, pour l'analyse des isoenzymes, pour l'étude du pouvoir pathogène intrinsèque des amibes, etc.

Au moment de l'isolement d'une souche, la difficulté est de se débarrasser de la flore intestinale forcément associée. On suivra les indications données par Diamond (1968).

Remarque importante

On trouvera, à la fin du paragraphe traitant de la culture des protozoaires intestinaux, la liste des ingrédients utilisés pour les milieux avec le nom de leur fournisseur, leurs numéros de code et les conditionnements proposés.

Milieu TYI-S-33 complet (Diamond)

(I) Bouillon TYI	87 ml
(II) Mélange vitamines-tween 80	3 ml
(III) Sérum bovin	16 ml
(IV) Antibiotiques	

- (I) BOUILLON TYI
 - Dissoudre les ingrédients suivants dans 50 ml d'eau bidistillée puis ajuster à un volume final de 87 ml:
 - Digeste de caséine 2000 mg
 - Extrait de levure 1000 mg
 - glucose 1000 mg
 - NaCl 200 mg
 - K₂HPO₄ 100 mg
 - KH₂PO₄ 60 mg
 - Chlorhydrate de L-cystéine 100 mg
 - Acide L-ascorbique 20 mg
 - Citrate ferrique d'ammonium 2,28 mg
- ajuster à un pH de 6,8 avec NaOH 1N;
 - clarifier par passage à travers un filtre WHATMAN N°1;
 - autoclaver puis laisser refroidir jusqu'à température ambiante.
 - (II) MÉLANGE VITAMINES-TWEEN 80
 - Solution A: mélange vitamines "107"
 - Composition (tableau 19-1)

Tableau 19-1

1. Vitamines hydrosolubles					
solution a		solution b		solution c	
acide nicotinique	62,5 mg	niacinamide	62,5 mg	riboflavine	25 mg
acide para-aminobenzoïque	125 mg	chlorhydrate de pyridoxine	62,5 mg		
		chlorhydrate de pyridoxal	62,5 mg		
		chlorhydrate de thiamine (aneurine B1)	25 mg		
		pantothénate de calcium	25 mg		
		l-inositol	125 mg		
		chlorure de choline	1.250 mg		
dissoudre dans l'eau distillée bouillante et ajuster à un volume de 150 ml		Dissoudre dans l'eau distillée et ajuster à un volume de 150 ml		Dissoudre dans 75 ml eau dist. en ajoutant NaOH 0,1 N goutte à goutte. Porter à 150 ml	
Mélanger les solutions a, b et c et ajuster à un volume total de 500 ml					
2. Solution de biotine					
D- biotine		30 mg			
Dissoudre dans 200 ml d'eau distillée à l'aide de NaOH 0,1N puis ajuster à un volume de 300 ml					
3. Solution d'acide folique					
Acide folique		30 mg			
Dissoudre dans 200 ml d'eau distillée à l'aide de NaOH 0,1N puis ajuster à un volume de 300 ml					
4. Vitamines lipo-solubles					
Solution a		solution b			
vitamine D2 (ergo-calciférol)	300 mg	vitamine K3 (bisulfite sodique de menadione)	60 mg		
vitamine A (rétinol)	300 mg				
Dissoudre les deux composants dans 63 ml d'alcool éthylique à 95 p.100 (V/V).		Dissoudre dans 300 ml de Tween 80/eau à 5 p.100 (V/V); mélanger avec sol (a), et porter à un vol. tot. de 3000 ml			
5. Solution de vitamine E					
Vitamine E (acétate de tocophérol alpha)		25 mg			
Dissoudre dans 250 ml d'eau distillée					

La solution A, ou mélange de vitamines "107" est obtenue en mélangeant:

Solution 1	500 ml
Solution 2	250 ml
Solution 3	250 ml
Solution 4	2500 ml
Solution 5	250 ml

Stériliser par filtration. Le mélange complet doit être limpide et conservé à -22°C. S'il apparaît un trouble après réchauffement à la température ambiante, il doit être jeté. Ce trouble est dû à l'utilisation de NaOH en excès lors de la préparation des solutions stock 1c, 2 ou 3.

Solution B

Vitamine B 12 40 mg
Dissoudre dans l'eau distillée et ajuster à un volume total de 100 ml.

Solution C

Acide DL-6,8-thioctique 100 mg
Dissoudre dans l'éthanol absolu et ajuster à un volume total de 100 ml.

Solution D

Tween 80 50 g
Dissoudre dans l'éthanol absolu et ajuster à un volume total de 100 ml.

Mélange final Vitamines-Tween 80

Solution A	1000 ml
Solution B	12 ml
Solution C	4 ml
Solution D	4 ml
Eau distillée	180 ml

Le volume final est de 1200 ml. Stériliser par filtration. Le mélange II (vitamines-tween 80) est conservé à -20°C.

• (III) SÉRUM BOVIN

Inactiver pendant 30 minutes à 56°C.

• (IV) ANTIBIOTIQUES

Un mélange de 0,25 mg/ml de streptomycine et de 250 U/ml de pénicilline;

ou

un mélange de 500 µg/ml de pipéracilline et de 125 U/ml d'amikacine.

Entretien des cultures

Le repiquage est nécessaire tous les trois ou quatre jours.

RÉFÉRENCES

DIAMOND LS. (1968) Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoebae, *Journal of Parasitology*, 54,1047-1056.

DIAMOND LS, HARLOW DR AND CUNNICK C. (1978) A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other amoebae, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 431-432.

MARINKELLE CJ et al. (1991) A modification of Diamond's medium for axenic culture of *Entamoeba histolytica*, *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*, 85, 746-747.

1.8 Milieux de culture pour flagellates intestinaux et assimilés

Culture de *Giardia* (Keister)

Remarque

Ce milieu est le TYI-33 de Diamond supplémenté en bile et sans vitamines, inutiles pour la croissance de *Giardia*.

• MILIEU

K ₂ HPO ₄ (Merck)	100 mg
KH ₂ PO ₄ (Merck)	60 mg
Trypticase peptone	2 g
Extrait de levures	1 g
Glucose	1 g
NaCl	200 mg
Chlorhydrate de cystéine monohydraté (Sigma C-1276)	1 g
Acide ascorbique (Merck)	20 mg
Citrate d'ammonium ferrique	2,28 mg
Bile de boeuf déshydratée (Sigma B3883)	75 mg
Eau distillée	90 ml
Ajuster le pH à 7,0 - 7,2 avec NaOH 1N	

• ADDITIONS

Sérum de boeuf inactivé 10 ml

- Stériliser par filtration (Minisart 0,45µm);
- répartir en tubes (± 15 ml par tube), flacons ou bouteilles jusqu'à au moins 80 p.100 de leur capacité;
- conserver en azote liquide.

• ENTRETIEN DES CULTURES

Les tubes semi-cylindriques, possédant une surface plane, sont inclinés dans l'étuve à 37°C. Le repiquage est nécessaire tous les trois ou quatre jours.

RÉFÉRENCE

KEISTER DB. (1983) Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-33 medium supplemented with bile, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77, 487-488.

Culture de *Trichomonas vaginalis* (I)

• PRODUITS

Extrait de foie [‡]	25,0 g
Glucose	5,0 g
Na Cl	6,5 g
Agar	1,0 g
Eau distillée	1.000 ml
pH 6,4 ± 0,2	

[‡]Extrait de foie: "Oxoid Liver Infusion" donne de bons résultats.

• PRÉPARATION

- Mettre les ingrédients dans un litre d'eau, porter à ébullition jusqu'à dissolution complète;
- stériliser par autoclavage (121°C) pendant 15 minutes;
- laisser refroidir jusqu'à 50°C;
- ajouter 80 ml de sérum de cheval* inactivé et acidifié à pH 6,0.

Pour l'utilisation en diagnostic, la croissance bactérienne peut être inhibée par addition d'antibiotiques**

Le pH de ce milieu est de 6,4 ± 0,2.

• ADDITIONS

*Sérum de cheval

Inactiver par chauffage à 56°C pendant 30 minutes; acidifier à pH 6,0 par addition d'HCl 1N.

**Antibiotiques

Pénicilline 1000 unités et streptomycine 500 µg par ml de milieu

ou

Chloramphénicol 100 µg par ml de milieu.

• CONSERVATION DU MILIEU PRÉPARÉ

A l'abri de la lumière et au réfrigérateur, entre 2 et 8°C.

• ENTRETIEN DES CULTURES

- Inoculer le milieu et incubé à 35°C pendant 3 à 5 jours;
- examiner périodiquement en prélevant au fond du tube.

Remarque

Les *Candida* poussent aussi dans ce milieu. Leur croissance éventuelle ne gêne pas celle des *Trichomonas*.

Culture de *Trichomonas vaginalis* (II)

Son isolement et sa croissance sont aussi possibles dans le milieu TYI S33 décrit pour *E. histolytica*.

RÉFÉRENCES

FEINBERG JG AND WITTINGTON MJ. (1957) A culture medium for *Trichomonas vaginalis* Donné and species of *Candida*, *Journal of clinical Pathology*, 10, 327-329.

LOWE GH. (1965) A comparison of current laboratory methods and a new semi-solid culture medium for the detection of *Trichomonas vaginalis*, *Journal of clinical Pathology*, 18, 432-434.

Minimal Essential Medium (MEM)

• COMPOSITION

Trypticase (BBL 11921)	20,0 g
Extrait de levure	10,0 g
Maltose	5,0 g
L-cystéine-HCl	1,0 g
Acide L-ascorbique	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,8 g
KH ₂ PO ₄	0,8 g
Agar noble (Difco 0142)	0,5 g
Eau distillée	900 ml

• FABRICATION

- Dissoudre les produits, sauf l'agar, dans l'eau distillée; ajuster à pH 6,5; ajouter l'agar; autoclaver.
- Ajouter avant l'emploi:

Na ₂ HCO ₃	2,0 g par litre
Sérum de veau foetal stérilisé	10 p.100
Solution pénicilline - streptomycine	1 p.100
- Ajuster à un pH de 7,2 par barbotage d'air humidifié et enrichi à 10 p.100 de CO₂.

• UTILISATION

Culture de *Blastocystis hominis*, de microsporidies ...

Produits nécessaires pour la confection des milieux ci-dessus (tableau 19-2).

Tableau 19-2

Compilation
Chantal VAN OVERMEIRE
Laboratoire de Protozoologie, IMT,
Anvers

Ingrédients	source	code	conditionnement
Nicotinic acid (niacin)	Sigma	N0765	25 g
Para-aminobenzoïc acid	Sigma	A9879	1 g
Niacinamide	Sigma	N3768	100 g
Pyridoxine hydrochloride	Sigma	P6280	5 g
Pyridoxal hydrochloride	Sigma	P6155	500 mg
Thiamine hydrichloride (aneurine, vit. B1)	Sigma	T4625	5 g
Calcium panthotenic acid	Sigma	P6045	5 g
i-inositol	Sigma	I7508	50 g
Choline chloride	Sigma	C7527	100 g
Riboflavin (vit. B2)	Sigma	R4500	5 g
D-biotin (vit. H)	Sigma	B4639	500 mg
Folic acid	Sigma	F8758	5 g
Ergocalciferol (vit. D2)	Sigma	E9007	1 g
Retinol (vit. A)	Sigma	R7632	500 mg
Menadione sodium bisulfite (vit. K)	Sigma	M5750	25 g
Alpha tocopherol acetate (vit. E)	Sigma	T3376	5 g
Cyanocobalamin (vit. B12)	Sigma	V2876	100 mg
DL-6,8-thioctic acid	Sigma	T5625	500 mg
Piperacilline	Sigma	P8396	1 g
Amikacine	Sigma	A3650	250 mg
Tween 80	Merck	822187	500 ml
Ethanol absolute	Merck	983	1 l
Enzymatic digest of casein	LED-Techno	BBL 97023	500 g
Trypticase peptone	Becton-Dickinson	11921	500 g
Yeast extract	Difco	0127-02-6	100 g
D-glucose	Sigma	G7021	100 g
NaCl	Vel	1723	1000 g
K ₂ HPO ₄	Merck	5101	1000 g
KH ₂ PO ₄	Merck	4873	250 g
NaOH	Merck	6498	500 g
L-cysteine HCl	Sigma	C1276	10 g
Ascorbic acid	Sigma	A4544	25 g
Ferric ammonium citrate (brown!)	Sigma	F5879	100 g
Bovine serum (adult)	Biofluids, inc.	203	500 ml
Dehydrated bovine bile	Sigma	B3883	25 g
Foetal calf serum	EuroBiochem		500 ml

2. Protozoaires du sang et des tissus

2.1 Préparations pour la microscopie

Examen à frais

- PROCÉDURE

Une petite goutte de sang est déposée au centre d'une lame porte-objet et immédiatement recouverte d'une lamelle. Le sang s'étale par capillarité en couche mince. Si la goutte n'est pas trop grosse, le sang ne débordera pas.

Examiner sans attendre à l'objectif X40 (avant le séchage du sang).

- PARASITES RECHERCHÉS

Les protozoaires sanguicoles mobiles: trypanosomes.

Goutte épaisse (GE) et sa coloration

- PRINCIPE

Une goutte de sang est placée sur une lame porte-objet et immédiatement défibrinée par un mouvement en spirale fait à l'aide du coin d'une autre lame. Ce mouvement aura aussi pour effet d'étaler le sang sur une surface d'1 à 2 cm de diamètre (figure 19-1).

Séchage sans exposition à une chaleur excessive (soleil !) puis coloration, sans fixation préalable, avec une solution aqueuse de Giemsa qui aura une double action: hémolyse (dés-hémoglobination) et coloration. Laver à l'eau, laisser sécher en position verticale avant d'examiner. Seuls seront restés sur la lame les leucocytes et les parasites éventuels. La recherche des protozoaires se fait à l'immersion (obj. X100).

- DÉTAILS IMPORTANTS POUR RÉSULTAT OPTIMAL

- Défibrination plutôt qu'utilisation d'anticoagulants (l'EDTA étant le moins mauvais).
- Séchage à fond, toutefois sans chauffage, pour éviter la fixation des hématies qui empêcherait leur destruction. Éviter l'exposition des lames au soleil, même en boîtes fermées.
- Coloration pendant 20 à 40 minutes au Giemsa dilué (5 à 10 p.100) dans de l'eau tamponnée (tampon phosphate) ou neutralisée à pH 7,2 (voir colorant de Giemsa). La neutralisation (alcalinisation) de l'eau, souvent trop acide, peut aussi s'effectuer par l'addition de quelques gouttes d'une solution saturée de carbonate de lithium; l'évolution du pH sera suivie par le virage d'un

indicateur ajouté à l'eau à neutraliser (bleu de bromothymol).

- Lors du rinçage à l'eau du robinet, éviter le jet brutal qui peut décoller le prélèvement.

Frottis et sa coloration

Une (petite) goutte de sang prélevée au doigt est placée à l'extrémité d'une lame porte objet. Sans attendre, placer le petit côté d'une autre lame (rodée de préférence) au contact de la goutte. Les deux lames forment un angle de 45°. Attendre que le sang se répande le long de l'angle dièdre ainsi formé.

Pousser la lame inclinée vers l'autre extrémité du porte-objet en entraînant derrière elle le sang qui s'étale en une couche d'épaisseur minime. Le mouvement doit être régulier, ininterrompu, jusqu'à épuisement de la goutte de sang.

Dans un frottis correctement fait, les globules rouges ne sont pas superposés, ils sont les uns à côté des autres. Le frottis s'arrête avant l'extrémité du porte-objet (queue du frottis) si la goutte de sang déposée sur la lame n'était pas trop grosse.

On laisse sécher et on pratique, comme pour la GE, une coloration au Giemsa mais qui sera précédée d'une fixation de trois minutes par le méthanol absolu. Dans ce cas, les érythrocytes seront conservés avec les parasites qu'ils contiennent éventuellement. La coloration panoptique de Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa), qui sert à colorer les frottis pour formule leucocytaire, peut aussi être employée mais elle n'ajoute rien à la qualité de la coloration des parasites.

Frottis et goutte épaisse sur la même lame

Lors d'enquêtes épidémiologiques, lorsque des séries importantes doivent être faites, il est possible de faire coexister les deux prélèvements: le frottis sera plus court (encore moins de sang!), n'occupant que la moitié de la lame, l'autre moitié étant réservée à la goutte épaisse. La principale difficulté est de procéder à la fixation du frottis en laissant la goutte épaisse non fixée (attention aux vapeurs de méthanol!).

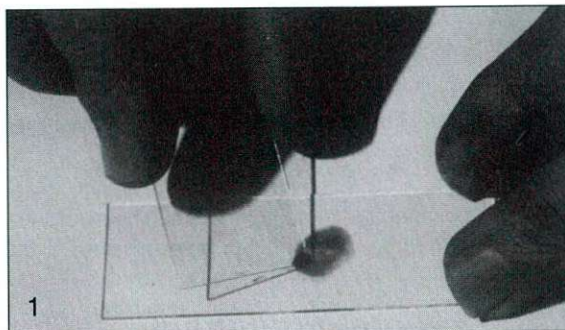
2.2 Préparation du colorant de Giemsa

La solution mère de Giemsa doit être traitée avec beaucoup de soins: bouteille de verre brun hermétiquement fermée, pas d'agitation, armoire fermée. A partir de cette bouteille de solution mère, prélever la quantité nécessaire dans un flacon compte-gouttes ou dans un cylindre gradué. Ne jamais verser un surplus éventuel dans la bouteille de solution mère.

Figure 19-1

Goutte épaisse correctement effectuée

1. Défibrination et étalement se font d'un mouvement en spirale.
2. La préparation doit être suffisamment mince pour ne pas être opaque.



La dilution (entre 5 et 10 p.100) doit être faite extemporanément, dans une eau limpide (sinon filtrer sur filtre de papier) dont le pH est compris entre 7,0 et 7,2. Ce pH peut être obtenu par l'utilisation d'une solution tamponnée ou par neutralisation de l'eau, généralement trop acide à cause du CO_2 dissous.

Préparation d'un tampon phosphate (selon Sørensen)

- SOLUTIONS STOCK

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11,87 g/l	(1)
KH_2PO_4	9,07 g/l	(2)

- QUANTITÉS POUR OBTENIR

un pH de 7,0		un pH de 7,2	
(1)	61 ml	(1)	72 ml
(2)	39 ml	(2)	28 ml
Eau distill.	900 ml	Eau distill.	900 ml

Remarque

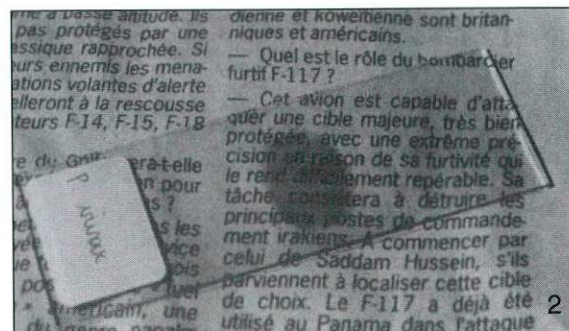
Il existe dans le commerce, sous forme d'ampoules ou de comprimés, des mélanges tampons préparés, de pH connu, que l'on peut diluer dans une quantité donnée d'eau distillée pour assurer la stabilité du pH (Titrisol® Merck pH 7).

Neutralisation

L'eau distillée ou du robinet sont généralement acides. Pour ramener le pH à 7, on peut ajouter à l'eau d'un ballon, quelques gouttes d'une solution saturée de carbonate de lithium. Cette alcalinisation se fera sous le contrôle d'un indicateur dont le virage (changement de couleur) permet de s'arrêter au pH désiré.

Utilisation des indicateurs

Les indicateurs sont des colorants qui changent de couleur en fonction du pH et qui permettent donc d'apprécier celui-ci. Le bleu de bromothymol est particulièrement adapté pour la détermination du pH neutre.



Bleu de bromothymol (solution à 0,02 p.100 de bleu de bromothymol prête à l'emploi)

poudre de bleu de bromothymol	0,1 g
eau distillée	15 ml
solution de NaOH N/20	3,2 ml

Chauffer au bain marie pour assurer la dissolution; porter à 500 ml avec de l'eau distillée. Placer dans un flacon compte-gouttes.

Pour l'emploi, ajouter quelques gouttes d'indicateur dans un demi-litre d'eau (suffisamment pour que la couleur devienne visible).

La couleur est jaune en solution acide et bleue en solution alcaline. Le pH neutre donne une couleur gris-verdâtre.

2.3 Colorations utiles en histologie des parasitoses

Coloration à l'hématoxyline d'Ehrlich

- COLORANT

Produits

Hématoxyline	2 g
Alcool absolu	100 ml
Glycérol	100 ml
Eau distillée	100 ml
Acide acétique glacial	10 ml
Alun de potasse en excès ($\text{K}_2\text{SO}_4 \text{ Al}_2[\text{SO}_4]_3 \cdot 24 \text{ H}_2\text{O}$)	

Préparation

- Dissoudre l'hématoxyline dans l'alcool avant d'ajouter les autres constituants;
- ajouter ensuite le glycérol et l'eau distillée;
- faire une solution saturée de potasse dans un récipient séparé en chauffant; laisser tiédir;
- ajouter la solution d'alun à l'hématoxyline;
- ajouter l'acide acétique glacial en dernier lieu.

En faire une grande quantité et placer dans des bouteilles en verre clair, bouchées à l'ouate et laisser mûrir 3 mois à la lumière du jour ("gentle sunlight").

- **PROCÉDURE (POUR COUPES DE TISSUS FIXÉS ET ENROBÉS DANS LA PARAFFINE)**
 - Déparaffiner par chauffage et traitement au xylol ;
 - enlever le xylol par l'alcool méthylique (répéter trois fois);
 - laver à l'eau courante dans un bac à coloration;
 - sans laisser sécher à aucun moment, recouvrir d'hématoxyline les préparations qui seront placées d'abord sur une plaque chauffante pendant 5 minutes puis à température ambiante pendant 15 minutes;
 - laver en eau courante (du robinet, légèrement alcaline) dans les bacs à coloration jusqu'à bleuissement des tissus (pas moins de deux minutes);
 - rincer brièvement à l'alcool acide (0,5 p.100 HCl);
 - laver en eau courante (comme précédemment) jusqu'à bleuissement;
 - colorer à l'éosine à 1 p.100 pendant 2 minutes;
 - laver en bac pendant 2 minutes;
 - déshydrater en alcool méthylique;
 - traiter à l'huile de clou de girofle;
 - traiter au xylol à trois reprises;
 - monter au baume de Canada sous une lamelle.

Remarque

Pour les frottis ou empreintes d'organes, la fixation se fera au méthanol avant l'application de l'hématoxyline; la déshydratation en fin de traitement est inutile.

• RÉSULTAT

Noyaux (bleus) et cytoplasme (rouge) sont bien colorés, le contraste est excellent, la précision fournie par cette coloration est remarquable.

Coloration PAS (Periodic acid - Schiff)

• PRODUITS NÉCESSAIRES

Acide périodique 0,5 p.100 dans l'eau distillée

Réactif de Schiff (peut être obtenu dans le commerce) fuchsine basique, métabisulfite de Na, HCl, mélange décoloré par le charbon

Eau sulfureuse de rinçage

bisulfite de Na à 10 p.100	10 ml
HCl 1N	10 ml
Eau distillée	180 ml

Hématoxyline

hématoxyline d'Ehrlich ou hémalun

Vert lumière

Solution stock

Vert lumière en cristaux	0,2 g
Eau distillée	100 ml
Acide acétique glacial	0,2 ml

Solution prête à l'emploi

Solution stock	10 ml
Eau distillée	50 ml

• PROCÉDURE

- Déparaffiner par chauffage et xylol et amener à l'eau (voir hématoxyline);
- traiter à l'acide périodique 0,5 p.100 pendant 10 minutes;
- laver en eau courante pendant 5 minutes;
- passer dans le réactif de Schiff pendant 10 minutes;
- rincer dans trois bains d'eau sulfureuse pendant deux minutes chaque fois;
- laver à l'eau pendant 3 à 5 minutes;
- colorer les noyaux par l'hématoxyline;
- coloration cytoplasmique éventuelle par le vert lumière.

• RÉSULTAT

Les structures polysaccharidiques sont colorées en rouge.

Coloration nucléaire de Feulgen

• PRODUITS NÉCESSAIRES

HCl 1N

Réactif de Schiff

Solution de métabisulfite de Na acidifié

Métabisulfite de Na à 1 p.100 dans l'eau	50 ml
HCl 0,1 N	50 ml

Vert lumière

• PROCÉDURE

- Les coupes seront déparaffinées et amenées à l'eau (voir hématoxyline);
- hydrolyser dans HCl 1N à 60°C pendant 8 à 15 minutes (dépend du fixateur utilisé);
- laver à l'eau;
- traiter au réactif de Schiff pendant 10 minutes;
- enlever le réactif de Schiff par un jet de métabisulfite de Na acidifié;

- immerger dans le métabisulfite acidifié 3 fois deux minutes;
- laver à l'eau du robinet pendant 5 minutes;
- colorer le cytoplasme au vert lumière.

- RÉSULTAT

Les sites contenant de l'ADN sont colorés en pourpre.

2.4 Techniques de concentration par centrifugation

Technique du "buffy coat" appliquée aux trypanosomes

- PRINCIPE

Le poids spécifique (densité) des trypanosomes est le même que celui des leucocytes et inférieur à celui des hématies. La centrifugation d'un tube capillaire hépariné rempli de sang parasité causera la sédimentation des éléments: au fond les hématies, plus lourdes, puis les leucocytes et les parasites, enfin le plasma.

- MÉTHODE

Remplir un capillaire hépariné de 70 µl de sang pris au doigt, fermer une extrémité à la plasticine et centrifuger à plus de 12.000 tours/min. pendant 5 minutes. Le résultat est une séparation des globules rouges et du plasma. A l'interface entre les deux phases, une couche blanchâtre est visible où sont concentrés les leucocytes et les trypanosomes éventuels.

Découper, à l'aide de deux traits de lime, une section allant de 1 mm sous la couche de leucocytes (globules rouges supérieurs) à 2 cm au dessus (plasma). Faire sortir, à l'aide d'une poire microcapillaire, le contenu de cette section: plasma, couche laiteuse ("buffy coat") et quelques érythrocytes. Porter des gants pour effectuer cette manipulation.

L'examen de cette goutte à frais entre lame et lamelle, éventuellement au contraste de phase ou au fond noir, permet aisément de repérer les parasites mobiles.

- VARIANTE DE WOO

Il est possible d'examiner au microscope l'interface érythrocytes-plasma à l'intérieur du capillaire, sans le casser.

Le tube est placé dans une rigole creusée sur un support transparent qui prend place sur la platine du microscope. A l'aide d'un objectif X10, on peut repé-

rer les trypanosomes mobiles à proximité de la couche de leucocytes.

La centrifugation et l'examen du sang de 12 patients peuvent être effectués en 20 à 30 minutes.

- APPLICATIONS

Recherche de *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma cruzi*

Variante: le "quantitative buffy coat" (QBC)

- PRINCIPE

Centrifugation différentielle avec visualisation des noyaux des plasmodiums colorés par l'acridine orange, à l'intérieur d'un tube capillaire.

- PROCÉDURE

Il s'agit d'un tube capillaire tapissé d'acridine orange et d'un anticoagulant. Un flotteur cylindrique en plastique massif, possédant une densité intermédiaire entre celle du plasma et celle des érythrocytes, est introduit "à frottement doux" dans le capillaire, après le prélèvement de sang d'un volume de 60 µl. La centrifugation fait migrer le flotteur au niveau du "buffy coat" et provoque un étalement de celui-ci.

Le matériel spécialisé est commercialisé par la firme Becton-Dickinson.

C'est une technique relativement simple mais elle requiert une centrifugation (une centrifugeuse portative "parafuge" sur batterie est fournie) et un microscope équipé d'un éclairage ultraviolet. Un objectif spécial (paralens), filtrant les rayons ultra-violets et relié par fibres optiques à une source lumineuse halogène, peut être vissé sur n'importe quel microscope.

On a prétendu que cette méthode était plus sensible que la microscopie conventionnelle. Elle est surtout plus rapide mais demande une bonne expérience du microscope.

- APPLICATIONS

Le QBC a été décrit pour la recherche des plasmodiums dans le sang mais il pourrait s'avérer utile pour d'autres parasites sanguicoles dont les condensations d'ADN sont importantes: trypanosomes, microfilaries...

Remarque

On a proposé d'examiner en fluorescence une goutte de sang du patient suspect, simplement additionnée d'acridine orange ou d'un autre colorant fluorescent, la benzothiocarboxypurine. Après mélange avec le colorant, le sang

est étalé sous un couvre-objet. L'examen peut être fait après deux minutes. La lecture est rapide à l'objectif spécial X60 appelé "Makler fluorescence objective", dont le principe est semblable à celui de Becton-Dickinson.

RÉFÉRENCES

LEVINE M, WARDLAW SC AND PATTON CL. (1989) Detection of haemoparasites using quantitative buffy coat analysis tubes, *Parasitology Today*, 5, 132-134.

PARZY D, RAPHENON G, MARTET G *et al.* (1990) Quantitative Buffy Coat test (QBC), Test Monofluokit *falciparum*. Intérêt comparé dans le diagnostic rapide du paludisme, *Médecine Tropicale*, 50, 99-102.

MAKLER MT, RIES J, HORTON RJ AND HINRICHS DJ. (1991) Detection of *Plasmodium falciparum* infection with the fluorescent dye, benzothiocarboxypurine, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44, 11-16.

2.5 Techniques de concentration par filtration

Elution du sang sur résines échangeuses d'ions (méthode de Lanham)

• PRINCIPE

Les éléments figurés du sang possèdent une charge électrique de surface différente de celle des parasites. Les résines échangeuses d'ions, réseau cellulosique en suspension dans une solution tamponnée, ont la capacité de retenir des cellules ayant une charge électrique bien précise. Les cellules retenues varieront suivant le pH et la force ionique (concentration) du tampon utilisé pour leur équilibrage. Pour chaque sang (homme, animal) à traiter, un équilibre spécifique doit être respecté (Lanham, 1970).

• MÉLANGES TAMPONS

Les tampons PSG contiennent du phosphate de sodium, du sel (NaCl) et du glucose.

Pour le sang d'homme ou de souris (PSG 5:5)

pH à 20°C: 7,95 à 8,05 (acidifier si nécessaire avec quelques gouttes d'HCl 1N);

force ionique 0,18.

Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	8,45 g
NaH ₂ PO ₄ .1H ₂ O	0,34 g
NaCl	2,13 g
Glucose	15,00 g
Eau distillée pour faire	1,00 l

Steriliser sur filtre Sartorius 0,22 µm après préfiltration sur filtre épais.

Pour le sang de rat (PSG 6:4)

pH à 20°C: 7,95 à 8,05 (acidifier si nécessaire avec quelques gouttes d'HCl 1N);

force ionique: 0,22

Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	10,14 g
NaH ₂ PO ₄ .1H ₂ O	0,41 g
NaCl	2,55 g
Glucose	15,00 g
Eau distillée pour faire	1,00 l

• MÉTHODE

Une suspension de "diéthylamino-éthyl cellulose" (cellulose DEAE) dans un tampon de pH et de force ionique déterminés avec précision, est versée dans un cylindre (ou simplement le corps d'une seringue en plastique) dont l'extrémité inférieure est fermée par un filtre (verre fritté ou simple papier filtre) qui retient la cellulose mais laisse passer les liquides. Le flux de tampon peut être réglé grâce à un robinet ou une pince située à la sortie de la colonne.

La cellulose sédimente sur le filtre et forme une colonne de densité régulière tandis que le tampon passe au travers de cette colonne de quelques centimètres de hauteur.

Le sang citraté ou hépariné est versé avec précaution à la pipette sur la face supérieure de la colonne, à l'interface colonne-tampon. Le flux créé par l'addition régulière de tampon par le dessus du cylindre entraîne le sang et ses constituants à travers la cellulose et est recueilli dans des tubes au bas de la colonne.

Tous les éléments du sang sont retenus dans la cellulose tandis que les trypanosomes passent au travers et sont récoltés avec le tampon à la sortie. Ils peuvent être ensuite concentrés soit par centrifugation et examen du culot, soit par filtration sur une membrane millipore de 1 à 2 µm de porosité et examen du résidu retenu à la face supérieure de la membrane.

Toutes ces manipulations doivent être faites en milieu stérile pour éviter les erreurs dues à la présence d'autres microorganismes mobiles.

• APPLICATIONS

Trypanosomes africains humains mais aussi animaux (*T. evansi*, *T. equinum* et *T. equiperdum*).

RÉFÉRENCE

LANHAM SM AND GODFREY DG. (1970) Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose, *Experimental Parasitology*, 28, 512-534.

Variante Lumsden **("mini Anion Exchange Centrifugation** **Technique", m-AECT)**

Nécessaires à usage unique, prêts à l'emploi, contenant la colonne et le mélange tampon stérilisés. Il faut disposer, en plus, d'une centrifugeuse. Placer la colonne contenant la cellulose DEAE en position verticale sur un portoir, laisser se tasser la cellulose, remplacer le tampon qu'elle contient et rincer la colonne à l'aide de la réserve de tampon.

Ajouter aux 10 ml de tampon m-AECT, le glucose (fourni dans le "kit"). Après dissolution, faire s'écouler un peu de ce tampon à travers la colonne pour ajuster son pH et sa force ionique.

Prélever au doigt $\pm 200 \mu\text{l}$ de sang dans un tube hépariné, puis verser ce prélèvement sur le filtre supérieur de la colonne et le laisser pénétrer dans le filtre. Placer le réservoir et son joint en caoutchouc sur l'extrémité supérieure de la colonne. Il est ainsi fixé en position verticale. Verser le tampon fraîchement préparé dans le réservoir. Il va s'écouler lentement à travers le filtre supérieur et la colonne, entraînant le sang et ses constituants à travers la cellulose.

Placer le tube prévu à cet usage en dessous de la colonne pour recueillir l'éluat (tampon et trypanosomes éventuels). Les cellules sanguines sont retenues dans la colonne. Centrifuger ce tube à 1500 t/m pendant 5 minutes et recueillir le culot pour examen à frais.

Remarque

Ce matériel peut être obtenu au Projet de Recherche Clinique sur les Trypanosomiasés (PRCT) Daloa, Côte d'Ivoire.

2.6 Techniques de concentration **par hémolyse**

Examen à frais après hémolyse (Test de **clarification de Van Meirvenne et Bücher)**

• MÉTHODE

Placer une goutte de sang (10-20 μl) sur une lame. Ajouter, à l'aide d'une anse de platine, 10 μl du réactif hémolytique concentré (sodium dodécyl sulfate à 1 p.100 dans du tampon glucosé), puis mélanger. Placer un couvre-objet de 24 X 32 mm et examiner au microscope (ocul. X10, obj. X10 ou X25).

Les érythrocytes sont hémolysés, les parasites sont intacts et mobiles dans un champ ne contenant plus que des leucocytes.

Cette méthode raccourcit significativement la durée de la lecture au microscope.

La "clarification" peut être suivie par une centrifugation du sang hémolysé avec examen du sédiment au microscope. La méthode est à l'étude pour l'utilisation sur le terrain.

• APPLICATIONS

Tous les trypanosomes

2.7 Milieux de culture **pour flagellates sanguicoles**

L'hémoculture est utile pour le diagnostic ou la production d'antigènes de certains parasites. Elle peut aussi fournir au laboratoire le matériel dont il a besoin pour la détermination des souches par iso-enzymes. On choisira de préférence un anticoagulant anti-complémentaire. L'héparine ne convient pas.

La culture des trypanosomes du LCR améliore la sensibilité de leur recherche: elle a donné de meilleurs résultats que la double centrifugation.

Bouillon au sang **pour culture de flagellates sanguicoles**

Préparation

Brain Heart Infusion (Difco 0037)	37,0 g
Eau distillée	1,0 l
- Stériliser à l'autoclave;	
- répartir en tubes par 5 ml;	
- ajouter du sang de lapin défibriné: 0,5 ml par tube.	

Milieux diphasiques **pour flagellates sanguicoles**

• AGAR AU SANG DE LOCKE OU TOBIE MODIFIÉ

Phase solide

H ₂ O distillée	1000 ml
Bacto-Tryptose (Difco)	15,0 g
NaCl	4,0 g
Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O	5,0 g
KCl	0,4 g
Gélose (Bacto Agar, Difco)	15,0 g
pH 7,6	

Solution de Locke

H ₂ O distillée	1000,0 ml
KCl	0,20 g
CaCl ₂	0,20 g
KH ₂ PO ₄	0,30 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10 g
NaHCO ₃	1,00 g
Glucose	2,50 g
Pénicilline	200 U/ml
Streptomycine	200 $\mu\text{g/ml}$
pH 7,4	

Préparation

- Dissoudre les composants de la phase solide dans l'eau distillée par agitation magnétique sur plaque chauffante jusqu'à ébullition;
- répartir à raison de 80 ml par flacon de 100 ml à bouchon à vis;
- autoclaver 30 minutes à 120 °C et conserver à 4 °C;
- au moment de l'emploi, faire fondre les 80 ml de gélose au bain-marie à ébullition; ensuite stabiliser la température à 56°C pendant une demi-heure, en ajoutant 20 ml de sang de lapin prélevé stérilement sur héparine;
- mélanger le sang et la gélose; répartir 1 ml par tube; boucher au caoutchouc et laisser gélifier (par refroidissement) en position inclinée;
- incubé 48 heures à 37 °C pour contrôle de stérilité;
- ajouter 3 ml de solution de Locke par tube au moment de l'usage.

Applications

Culture des Trypanosomatidae.

- MILIEU DIPHASIQUE "NNN"
(NOVY-NICOLLE-MAC NEAL)

Phase solide

Gélose au NaCl et au sang, solidifiée en pente:

Agar	14,0 g
NaCl	6,0 g
Eau distillée	900,0 ml

- Autoclaver, répartir en tubes (5 ml par tube);
- avant solidification (autour de 50 °C) ajouter à chaque tube 1 ml de sang de lapin défibriné;
- laisser solidifier en pente.

Phase liquide

Ajouter à chaque tube 2 ml de solution de Locke ou de solution saline glucosée (ce dernier ajout n'est pas prévu dans la recette originale).

Applications

Diagnostic par culture des leishmanies

- BHI BLOOD AGAR

Phase solide

Brain Heart Infusion (Difco 0037)	37,0 g
Agar noble	18,0 g
Eau distillée	1,0 l

- Dissoudre par ébullition; stériliser à l'autoclave; répartir en tubes par 5 ml;
- refroidir à 48°C;
- ajouter le sang de lapin défibriné: 0,5 ml par tube;
- laisser solidifier en position inclinée.

Phase liquide

Brain Heart Infusion (Difco 0037)	37,0 g
Eau distillée	1,0 l

Stériliser et ajouter aux tubes de manière à recouvrir les pentes d'agar.

Applications

Diagnostic par culture des leishmanies.

Le milieu GLSH

C'est un milieu monophasique qui contient glucose, lactalbumine, sérum de veau foetal, hémoglobine de boeuf ou mieux, d'homme. Il permet la croissance de la plupart des espèces de la famille des Trypanosomatidae.

- MILIEU (pour 1 litre)

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	3,35 g
KH ₂ PO ₄	0,70 g
NaHCO ₃	0,35
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,15 g
Glucose	1,00 g
Lactalbumine	3,00 g

- ADDITIONS

Sérum de veau foetal	100,00 ml
Hémoglobine (sol. 2 p.100)*	150,00 ml
Rouge phénol	0,005 g
Pénicilline	200 U/ml
Streptomycine	200 µg/ml
Eau distillée	750 ml

Ajuster le pH à 6,9 - 7,0 avec HCl 1N;
stériliser par filtration sous pression, sur filtres de cellulose (après une préfiltration).

*Préparation de l'hémoglobine

Sang humain frais, hépariné (pas d'autres additifs!), provenant d'un centre de transfusion ou d'une banque de sang et certifié séronégatif pour HIV et hépatites.

Hémolyse: ajouter 1 volume de sang à quatre volumes d'eau bidistillée; mélanger à l'agitateur magnétique pendant 10 minutes à 4°C;

autoclaver à 121°C pendant 20 minutes;

conservation à +4°C en attendant la congélation ou la lyophilisation.

Lyophilisation: homogénéiser dans un mixer de cuisine, répartir par flacons de 500 ml ou de 1 l et lyophiliser. Conservation dans des ampoules scellées, à t° ambiante.

Solubilisation: 2 p.100 de sang lyophilisé dans l'eau bidistillée, agitateur magnétique pendant une nuit à 4°C (attention à la contamination bactérienne!). Centrifuger à 10.000 tours/min. pendant 30 minutes à +4°C, filtrer le surnageat sur papier filtre (par exemple S&S folded filters 5951/2).

- APPLICATIONS

Culture massive des Trypanosomatidae.

**La trousse KIVI ("kit for in vitro isolation")
pour la culture des Trypanosomatidae**

Ce "kit" est fabriqué au laboratoire de Protozoologie de l'Institut de Médecine tropicale, Nationales-straat 155, B-2000 Antwerpen, Belgique.

- MILIEU

15 ml de milieu GLSH-DCA* additionnés du mélange d'antibiotiques**.

GLSH (voir culture trypanosomes);

Additifs

*DCA ou "diluted cis aconitate" à la concentration finale de 3 mMol (cet élément aiderait à la transformation des trypanosomes sanguicoles trypomastigotes en formes procycliques de culture);

**Antibiotiques: pénicilline 5000 UI/ml, gentamycine 200 µg/ml, 5-fluorocytosine 50 µg/ml (concentrations finales).

- ANTICOAGULANT

Solution à 5 p.100 de polyanéthol sulfonate de sodium (PAS, Sigma).

- MATÉRIEL

- Flacons scellés de type pénicilline de 50 ml. Ils contiennent 15 ml de GLSH-DCA stérilisé;
- seringues à usage unique et aiguilles G 20;
- flacons scellés de type pénicilline de 10 ml contenant l'anticoagulant;
- la trousse comprend les seringues et aiguilles pour la prise de sang, du parafilm et les deux types de flacons à pénicilline scellés contenant, les uns, le milieu de culture prêt à l'ensemencement et les autres, l'anticoagulant.

- PROCÉDURE

- Prélever environ 9,5 ml de sang de façon aseptique avec une seringue contenant 0,5 ml de la solution d'anticoagulant;
- le mélange sang-anticoagulant est introduit à raison de 2 à 5 ml dans 1 ou 2 flacons contenant le GLSH-DCA*, en injectant à travers le bouchon de caoutchouc. N'ouvrir les flacons en aucun cas!
- protéger les flacons ensemencés par du parafilm;
- mélanger par agitation manuelle douce.

- Conserver à t° ambiante (de préférence entre 15 et 20°C) et en position verticale pour éviter la contamination bactérienne suite à un contact prolongé du milieu avec le bouchon.

- Expédition au laboratoire

Délai autorisé de 2 à 4 semaines après inoculation sur le terrain.

Examen pour recherche de trypanosomes et subinoculation sur Tobie (agar-sang).

- Applications

Diagnostic et isolement sur le terrain des trypanosomes africains (humains et animaux)

Variantes du KIVI

pour isolement des leishmanies et de *T. cruzi*

RÉFÉRENCE

AERTS D, TRUC P, PENCHENIER L, CLAES Y AND LE RAY D. (1992) A kit for *in vitro* isolation of trypanosomes in the field: first trial with sleeping sickness patients in the Congo Republic, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86, 394-395.

2.8 Culture de *Plasmodium falciparum*

Principe

L'isolement *in vitro* de *P. falciparum* à partir d'un sujet parasité et sa culture continue reposent jusqu'à présent sur la présence, dans le milieu de culture, de globules rouges humains dans lesquels a lieu la schizogonie. Cette culture comporte plusieurs exigences qui en rendent l'entretien laborieux: nécessité de renouveler le milieu tous les jours, ajout régulier de globules rouges compatibles, nécessité d'une atmosphère enrichie en CO₂ et teneur obligatoire de 10 p.100 de sérum humain.

Milieux, solutions, suspensions

- MILIEU STOCK (CONSERVATION - RPMI STOCK)

Milieu RPMI 1640	10,42 g
Tampon HEPES	5,94 g
Hypoxanthine	50 mg
Glucose	2 g
Eau bidistillée	1.130 ml

- Ajuster le pH à 7,2 avec NaOH 1N;
- stériliser par filtration sur Sartorius 0,22 µm;
- conservation: ± 1 mois au réfrigérateur (+4°C).

- MILIEU DE LAVAGE

RPMI stock tel quel

• MILIEU DE CULTURE

RPMI stock	100 ml
Solution de NaHCO ₃ à 5 p.100	4 ml
Solution de Gentamycine*	1 ml
Sérum humain	10 ml

Stériliser la solution de NaHCO₃ par filtration sur Sartorius 0,22 µm.

*Solution de Gentamycine

Gentamycine	0,2 ml
RPMI stock	9,8 ml

• PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION D'ÉRYTHROCYTES

20 ml de sang prélevé chez des donneurs des groupes A ou O dans une seringue contenant 3 ml de solution ACD** comme anticoagulant;

centrifuger, éliminer le plasma et resuspendre le culot dans 5 fois son volume de RPMI stock;

recommencer trois fois ce lavage des globules;

diluer le dernier culot de manière à obtenir un hématocrite de 50 p.100; conditionner en tubes de 2 ml;

conserver à +4°C jusqu'au jour de l'utilisation (maximum 3 semaines).

** ACD (Acide-Citrate-Dextrose)

Citrate trisodique	22,0 g
Acide citrique	8,0 g
Dextrose	24,5 g
Eau distillée	1,0 l

• PRÉPARATION DE LA SUSPENSION GLOBULAIRE LAVÉE (AU MOMENT DE L'EMPLOI)

Aspirer le plasma et placer le culot dans un tube à centrifuger conique;

ajouter le milieu de lavage (5 fois le volume du culot globulaire);

centrifuger à 2.000 tours/min. pendant 5 minutes;

recommencer trois fois le lavage;

après la troisième centrifugation, ramener l'hématocrite à 50 p.100 (un vol. culot globules + un vol. milieu de culture).

Procédure

• DÉMARRAGE DE LA CULTURE

La culture peut se faire à partir de sang parasité ou de produits provenant de la cryoconservation (ampoule de sang ou de culture).

Le sang du patient est prélevé sur anticoagulant (l'ACD est le meilleur mais l'EDTA convient aussi); l'ampoule de cryoconservation est décongelée.

- Placer dans un tube stérile à fond conique;
- centrifuger à 2000 tours/min. pendant 5 minutes, éliminer le surnageant et le remplacer par du RPMI de lavage; répéter trois fois ce lavage s'il s'agit de sang de patient; si on part de cultures ou

de sang congelé, se référer à la technique de décongélation des ampoules décrite plus loin;

- ajouter le milieu de culture contenant les cellules péritonéales de souris* et des globules rouges neufs (éventuellement, pour ajuster la parasitémie) de manière à obtenir un hématocrite de 5 p.100 et si possible une parasitémie initiale d'environ 1 p.100;
- ajouter le mélange de gaz**.
- Les repiquages se font au rythme de deux par semaine dans des boîtes de Falcon; les cellules péritonéales de souris ne sont ajoutées que lors de la première mise en culture.

*Cellules péritonéales de souris

La cavité péritonéale de la souris est ouverte stérilement et rincée avec du milieu stock;

le liquide retiré est centrifugé à 2000 tours/min. pendant 5 minutes; le lavage des cellules du culot est répété trois fois;

le dernier culot est remis en suspension dans 10 ml de milieu de culture; cela suffit à faire deux boîtes Falcon (5 ml de milieu de culture par boîte).

**Mélange de gaz

N ₂	96 p.100
O ₂	1 p.100
CO ₂	3 p.100

Ce mélange est introduit dans les boîtes de culture à l'aide d'une pipette pasteur stérile; le gaz provenant de la bonbonne est humidifié par barbotage dans l'eau et passe par un filtre stérilisant.

• ENTRETIEN DE LA CULTURE

On distingue repiquage (dilution des globules parasités avec des globules neufs pour partir d'une parasitémie de 1 p.100) et simple renouvellement du milieu.

Repiquage

- Sortir les boîtes de culture de l'étuve et transférer, à l'aide d'une pipette en verre stérile, la suspension de culture dans un tube à centrifuger conique;
- centrifuger à 2000 tours/min. pendant 5 minutes;
- éliminer le liquide surnageant, prélever une goutte du culot pour en faire un frottis; coloration au Giemsa et numération parasitaire;
- ajouter 2,5 ml de milieu de culture et placer à l'étuve en attendant le résultat de l'examen du frottis (détermination de la parasitémie). Cette suspension servira à inoculer les nouveaux flacons (inoculum).

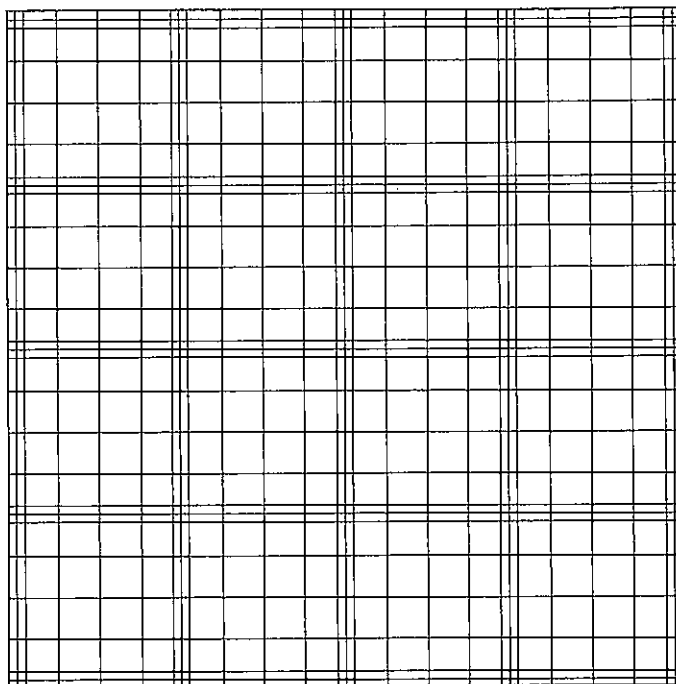
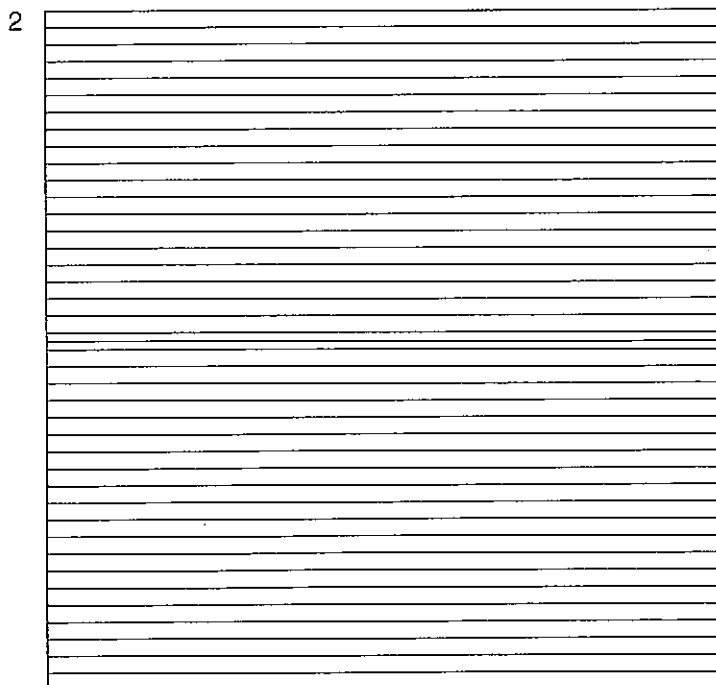


Figure 19-2

Quadrillage des cellules à numération des éléments cellulaires dans le LCR

1. Cellule de Fuchs-Rosenthal
2. Cellule de Nageotte



- Préparer les nouveaux flacons de culture:

milieu de culture	5 ml
Suspension globulaire lavée	0,5 ml

 (hématocrite: 5 p.100)

Pour calculer le volume de l'inoculum (en ml), on divisera le volume préparé plus haut (ici: 2,5) par le pourcentage de parasitémie dans l'ancienne culture.

- Inoculer les flacons, y ajouter du mélange de gaz et les mettre à l'étuve.

Renouvellement du milieu

Le renouvellement du milieu de culture se fait en même temps que le repiquage (deux fois par semaine) si la concentration des globules dans le milieu (hématocrite) est de 1 p.100.

Pour les cultures ayant une concentration globulaire de 5 p.100 dans le milieu, il faudra, outre les deux repiquages hebdomadaires, impérativement changer le milieu de culture tous les jours.

Remarque

Des modifications de la méthode sont utilisées pour la production de gamétocytes ou pour réaliser des clonages; ces techniques spécialisées sont décrites dans des publications.

3. Examen du liquide céphalo-rachidien (LCR)

3.1 Numération des cellules (éléments)

La numération doit se faire sur un liquide fraîchement prélevé et évidemment, avant toute centrifugation. On trouvera, au cours de la numération, des lymphocytes et des polynucléaires. La numération des cellules par unité de volume (nombre d'éléments par μ l) se fait sur le liquide non dilué, en cellule de Nageotte ou de Fuchs-Rosenthal.

Le LCR normal ne contient pas de cellules. On peut en tolérer 3 à 5 par μ l. En cas d'inflammation des méninges, des leucocytes apparaissent. Dans les trypanosomiasis africaines, leur nombre est proportionnel à la gravité de l'atteinte.

Cellule de Fuchs-Rosenthal

La cellule de Fuchs-Rosenthal comporte 9 ou 16 grands carrés de 1 mm de côté, chacun divisé en 16 petits carrés. L'épaisseur de la cellule est de 0,2 mm. Il suffira donc de compter les éléments présents dans 5 grands carrés pour obtenir le nombre d'éléments par μ l ($5 \text{ mm}^2 \times 0,2 \text{ mm} = 1 \mu\text{l}$) (figure 19-2).

Cellule de Nageotte

Elle a une surface carrée de 10 mm de côté. L'épaisseur de la cellule est de 0,5 mm. Le volume de liquide qu'elle peut contenir sera donc de $10 \times 10 \times 0,5 = 50 \mu\text{l}$. La cellule est divisée en 40 bandes horizontales limitées par deux traits verticaux, correspondant chacune à $50/40 = 1,25 \mu\text{l}$. On comptera le nombre de cellules présentes dans 8 bandes et on divisera le nombre obtenu par 10 pour obtenir le nombre de cellules par μl .

3.2 Examen parasitologique

Examen direct

Rarement des parasites mobiles peuvent être trouvés à frais, lors de la numération en cellules de Nageotte ou de Fuchs-Rosenthal: trypanosomes (ils ne restent mobiles que pendant environ 20 minutes), trophozoïtes amiboïdes de *Naegleria* (qu'il ne faudra pas confondre avec des leucocytes, mobiles également par leurs pseudopodes).

Ces parasites seront généralement recherchés dans les culots de centrifugation.

Centrifugation simple

Examiner le culot entre lame et lamelle, à l'objectif X40, après 10 minutes de centrifugation à 2000 tours/min.

Centrifugation double

Le culot de la première centrifugation est remis en suspension dans ce qui reste de liquide et aspiré dans un tube capillaire à microhématocrite. Boucher (sceller à la flamme) une extrémité et centrifuger pendant une minute à grande vitesse. L'extrémité inférieure (bouchée) du capillaire est examinée au faible grossissement et les trypanosomes sont recherchés à l'intérieur du tube.

3.3 Dosage des protéines

Les valeurs normales de la protéinorachie chez l'adulte sont comprises entre 0,15 et 0,30 g par litre. Dans la trypanosomiase, l'augmentation est modérée, dépassant rarement 1 g par litre.

Méthode de Sicard et Cantaloube

• PRINCIPE

C'est un test de floculation. Les protéines coagulent sous l'effet combiné de la chaleur et du milieu

acide en flocons blanchâtres qui sédimentent au fond du tube. La hauteur du sédiment est proportionnelle à la quantité d'albumine (protéines).

• RÉACTIF

Solution à 30 p. 100 d'acide trichloracétique

• MÉTHODE

Le dosage est pratiqué à l'aide d'un albuminomètre de Sicard et Cantaloube (fin tube gradué et évasé à son extrémité supérieure).

- Verser dans l'albuminomètre 4 ml de LCR à examiner (jusqu'au trait 4);
- chauffer le tube au bain-marie, jusqu'à une température voisine de l'ébullition : 80 à 90°C;
- ajouter immédiatement 12 gouttes d'une solution à 30 p. 100 d'acide trichloracétique;
- placer le tube au repos pendant 5 minutes puis le boucher et le retourner 2 ou 3 fois;
- laisser reposer le tube en position rigoureusement verticale pendant 5 heures.

On peut différer la lecture jusqu'à 24 heures sans grande modification du résultat.

• RÉSULTAT

La lecture de la graduation correspondant à la limite supérieure du sédiment donne les quantités de protéines en gramme par litre: le 1er trait correspond à 0,22 g/l; le 2ème trait à 0,40 g/l. Attention aux variantes de fabrication: il existe des tubes à graduations décimales.

Tube original de Sicard et Cantaloube

Les graduations de la partie inférieure du tube sont irrégulièrement espacées. La hauteur du précipité correspondra aux valeurs suivantes (à partir du fond du tube):

1e division	0,22 g par litre
2e division	0,40 g par litre
3e division	0,56 g par litre
4e division	0,71 g par litre
5e division	0,85 g par litre

Remarque

Pour un liquide normal, le précipité ne doit pas dépasser la deuxième graduation.

Albuminomètre décimal

Le tube d'une contenance de 1 ml porte des graduations régulièrement espacées avec deux variantes :

division en 10 graduations (un trait = 0,10 g par litre)	division en 5 graduations (un trait = 0,20 g par litre)
1er trait = 0,10 g par litre	1er trait = 0,20 g par litre
10e trait = 1,00 g par litre	5e trait = 1,00 g par litre

Dosage colorimétrique
("Dye Binding Protein Assay")

- PRINCIPE

Le colorant (bleu de Comassie brillant) se lie aux protéines. L'intensité de la coloration du LCR additionné de colorant sera donc proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon

- PRODUITS NÉCESSAIRES

Bleu de Comassie brillant G 250 (Bio Rad Lab.)
 Solution standard contenant 32 mg de protéines par 100 ml (Sigma Chem. Comp.)
 Eau distillée

- MATÉRIEL

Tubes à essai de 6 ml et portoir *ad hoc*
 Pipettes de 50 µl, 5 ml et 10 ml
 Verrerie graduée

- MÉTHODE

- Si le LCR est trouble, d'abord le centrifuger et utiliser le surnageat;
- dans trois tubes identiques placés côte à côte sur le portoir, verser 50 µl du LCR à analyser;
- préparer extemporanément la dilution du colorant: 1 vol. dans 4 vol. d'eau distillée;

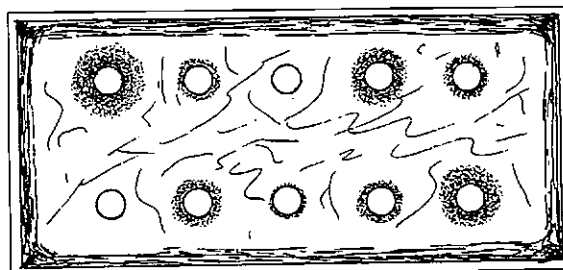


Figure 19-3

Immunodiffusion radiale

Lame porte-objet recouverte de gel d'agarose contenant du sérum anti-IgM. Godets contenant les échantillons à analyser.

- verser 2,5 ml de ce réactif par tube et lire le test dans l'heure qui suit, en comparant par transparence la couleur du LCR au standard et au témoin négatif.

- RÉSULTAT

Test négatif (taux de protéines normal dans le LCR): la couleur du tube LCR est comprise entre celle du témoin négatif et celle du standard ou identique à celle du standard;

test positif: couleur du tube LCR plus bleu que le standard;

Remarque

Si la couleur du témoin négatif et celle du standard sont les mêmes, recommencer le test (tubes souillés, réactif ou standard détériorés).

3.4 Dosage des IgM non spécifiques

Cette recherche sera faite sur du LCR non dilué.

Test de précipitation en gel

- TECHNIQUE D'OUCHTERLONY (PARAGRAPHE 5.6)

Sur une lame couverte d'agarose, on creuse des puits périphériques entourant un puits central. Dans le puits central est placé le sérum anti-IgM humain préparé à partir d'une espèce animale (porc, lapin...). Dans les puits périphériques sont disposés les différents LCR à examiner.

Après diffusion et en cas de formation d'un complexe antigène-anticorps, il y a apparition dans la gélose d'un trait blanc laiteux perpendiculaire à la ligne passant par le centre des deux puits.

- TECHNIQUE D'IMMUNODIFFUSION RADIALE

La gélose est imprégnée du sérum anti-IgM. Les échantillons à étudier sont à placer dans des puits alignés, creusés dans la gélose. La précipitation aura lieu autour des puits où l'IgM est présent. Le diamètre du cercle de précipitation sera proportionnel à la quantité d'IgM dans l'échantillon concerné (figure 19-3).

Technique d'immunoprécipitation en milieu liquide (néphélométrie)

Les complexes antigènes-anticorps insolubles provoquent l'apparition d'un trouble dans le mélange sérum anti-IgM - LCR. L'importance du trouble est mesurée par la diffraction d'un rayon lumineux passant à travers le tube contenant le mélange.

Test d'agglutination de particules de latex (voir dosages d'anticorps sériques)

L'antigène consiste en une suspension aqueuse de particules de polystyrène sensibilisées par des Ig anti-IgM humaines.

Sur une carte plastifiée noire, une goutte de cet antigène est mise en présence d'une goutte de LCR. Après mélange pendant 2 minutes (mouvement rotatif), il apparaît une agglutination si la réaction est positive. Ce test est commercialisé sous le nom de Rapi Tex IgM® par Behringwerke.

Interprétation

Dans le LCR normal, il n'y a pas d'IgM. Sa présence y est pathologique.

Remarque

Dosage des IgM non spécifiques du sérum.

Les techniques sont les mêmes mais le sérum est analysé en dilutions. Pour les techniques de précipitation en gélose, c'est la dernière dilution produisant un arc qui donnera le titre d'IgM. Chez le trypanosé, le taux d'IgM sériques est très élevé et la valeur normale peut être multipliée par quatre ou plus.

4. Autres techniques de mise en évidence de parasites

4.1 Recherche d'antigènes parasitaires par méthodes immunologiques

Principe

Les réactions immunologiques ont pour but de provoquer *in vitro* la formation de complexes antigènes-anticorps et de les révéler. Dans les tests sérologiques classiques, l'antigène produit au laboratoire est mis au contact de sérums de patients pour détecter chez eux la présence d'anticorps.

Mais si on dispose d'anticorps de spécificité connue (immuns sérums connus ou anticorps monoclonaux*), ceux-ci pourront à leur tour servir à détecter des antigènes dans les organes *in situ* ou circulant dans le plasma et contre lesquels ils sont dirigés.

*Les anticorps monoclonaux

Principe

La fabrication des anticorps dirigés contre un microorganisme est assurée par des lymphocytes B contenus dans les organes lymphoïdes, dont la rate. Ces cellules proviennent de cellules souches, les lymphoblastes. Une fois parvenues au terme de leur différenciation, au cours de laquelle elles reçoivent les

instructions liées à leur fonction de reconnaissance de l'antigène et de production de l'anticorps spécifique, elles ne peuvent plus se multiplier. Parmi les innombrables lignées de ce type de lymphocytes, chacune sécrète une immunoglobuline spécifique (monoclonale) dirigée contre un seul site antigénique (épitope).

La fusion d'un lymphocyte avec une cellule tumorale produit une cellule hybride dont la multiplication en culture devient possible.

Étapes de la production

- Prélèvement de la rate d'un animal immunisé contre le parasite ou les épitopes cibles;
- fusion des cellules de myélome (cellules tumorales de la moelle osseuse: gène de prolifération) avec des lymphocytes (gène de synthèse d'une immunoglobuline utile) en présence de polyéthylèneglycol;
- clonage de cellules hybrides pour obtenir des "hybridomes"; chaque clone qui se multiplie est analysé et on regarde quelle est l'immunoglobuline fabriquée;
- sélection des clones intéressants, fabriquant les anticorps monoclonaux recherchés;
- prolifération de ces clones en culture cellulaire ou dans le péritoine de souris et récupération de l'immunoglobuline recherchée dans le milieu ou le liquide péritonéal.

Recherche d'antigènes parasitaires figurés

La recherche de parasites au microscope peut se faire par une réaction d'immunofluorescence. Un frottis de sang, de selles ou d'organe (ou une coupe de tissu) dans lequel on recherche les parasites est recouvert dans un premier temps, d'un anticorps monoclonal spécifique de l'antigène parasitaire recherché et dans un deuxième temps, d'un conjugué fluorescent spécifique de l'Ig du monoclonal.

La lecture du frottis se fait au microscope, en lumière ultraviolette. Les parasites sont brillants sur un fond sombre.

• APPLICATIONS

Plasmodium: mise en évidence de trophozoïtes de *P. falciparum* dans les gouttes épaisses.

Pneumocystis carinii: mise en évidence des formes du cycle dans le produit de lavage alvéolaire ou crachats induits.

Cryptosporidium: mise en évidence des oocystes dans les selles.

Microsporidies

Remarque

Dans les quatre cas, il existe des anticorps monoclonaux commercialisés.

Recherche d'antigènes parasitaires solubles: ELISA "capture"

Remarque

Le test ELISA est exposé au paragraphe des techniques de recherche d'anticorps.

• PRINCIPE

Le support solide est sensibilisé par un antiserum poly- ou monoclonal dirigé contre l'antigène recherché (Ag). L'incubation avec le plasma ou le sérum du patient permettra à l'antigène soluble de venir se coller sur le support (paroi de la cupule, par exemple). Un sérum de lapin ou de chèvre spécifique de l'antigène permettra de recouvrir celui-ci d'immunoglobulines de l'animal en question. L'étape suivante sera de marquer ces immunoglobulines par un conjugué enzymatique anti Ig de lapin ou de chèvre puis d'ajouter le substrat correspondant. En cas de présence de l'antigène, il se produira un changement de couleur du support par action de l'enzyme sur son substrat.

• PROCÉDURE

Elle comporte schématiquement les étapes suivantes:

- sensibilisation du support par un anticorps spécifique de l'Ag;
- incubation avec le sérum ou plasma à tester: l'Ag soluble se lie au support s'il est présent; lavage;
- incubation avec le sérum de chèvre ou de lapin anti-Ag: l'antigène est recouvert d'Ig de l'animal choisi; lavage;
- incubation avec un conjugué enzymatique anti-Ig de chèvre ou de lapin: marquage des Ig de l'animal choisi;
- incubation avec le substrat; lavage;
- examen au photomètre pour quantification; en cas de lecture à l'oeil nu, le résultat sera seulement qualitatif (positif ou négatif).

• APPLICATIONS

Plasmodium:

mise en évidence de la protéine P 50 dans le plasma des sujets parasités (pas encore passée en routine).

détection des sporozoïtes chez le moustique à l'aide d'un anticorps monospécifique de l'épitope NANP.

N.B. des monoclonaux anti-NANP peuvent être obtenus chez le Dr WIRTZ, Department of Entomology,

Walter Reed Army Institute of Research, Washington, DC 20307-5100, USA) Tél. 782.3049.

Toxoplasma:

mise en évidence d'antigènes de tachyzoïtes.

"Dip-stick capture" pour *P. falciparum* :

Para Sight F®

• RÉACTIFS

Agent hémolytique

Bâtonnet de fibres de cellulose, imprégné d'un IgG monoclonal dirigé contre un épitope synthétique de la protéine "riche en histidine" de schizontes de *P. falciparum*

Sérum polyclonal dirigé contre cette même protéine "riche en histidine" et conjugué à des liposomes contenant un colorant rose

Solution de lavage

• PROCÉDURE

- 50 µl de sang à examiner sont placés dans un tube en polypropylène; on y ajoute 3 gouttes de réactif lytique (environ 100 µl) pour réaliser l'hémolyse;
- placer une goutte du lysat de sang dans un godet, y tremper l'extrémité du bâtonnet réactif maintenu verticalement et laisser imprégner 10 minutes;
- placer une goutte du conjugué dans le godet et laisser imprégner le bâtonnet;
- ajouter la solution de lavage et la laisser imprégner le bâtonnet;
- lire le résultat en constatant la présence d'un trait coloré en rose apparu sur le bâtonnet.

RÉFÉRENCES

BEADLE C, LONG GW, WEISS WR, MCELROY PD, MARET SM, OLOO AJ AND HOFFMAN SL. (1994) Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay, *The Lancet*, **343**, 564-568.

SHIFF CJ, MINJAS J AND PREMJI Z. (1994) The Para-Sight®-F test: A simple rapid manual dipstick test to detect *Plasmodium falciparum* infection, *Parasitology Today*, **10**, 494-495.

4.2 Sondes ADN

Principe

Les caractères génétiques reposent sur l'originalité de la séquence des bases dans la molécule d'ADN. Certaines séquences de nucléotides sont répétées un grand nombre de fois. Ces séquences répétitives vont être choisies et servir de cible pour la reconnaissance dans un prélèvement.

Identification de la séquence intéressante

La sonde est constituée d'un fragment d'ADN parasite dénaturé (coupé en deux dans le sens de la longueur) de manière à offrir dans la réaction une chaîne simple (ADN monocaténaire, séquence de nucléotides). Celle-ci sera capable de reconnaître son "brin" complémentaire, composé de nucléotides disposés dans le même ordre dans l'ADN, également dénaturé, des parasites du prélèvement. La re-naturation de l'ADN a donc lieu par appariement des bases qui le composent. C'est l'"hybridation moléculaire".

Une fois déterminée la séquence de nucléotides intéressante (et donc les paires de bases qui en font partie), deux séries de manipulations sont nécessaires pour en arriver à l'hybridation moléculaire: dénaturer l'ADN parasite dans le prélèvement et permettre l'hybridation moléculaire entre séquences de bases complémentaires.

Procédure

- Fabrication de la sonde: choix de la séquence; son isolement à partir du génome; sa dénaturation de manière à produire deux demi-séquences; son marquage par un isotope radioactif ou un enzyme;
- dénaturation de l'ADN parasite dans le prélèvement où l'on recherche le parasite, afin de pouvoir fournir à la sonde le complément dont elle a besoin pour l'hybridation;
- contact sonde-prélèvement et révélation du marquage.

Exemple: recherche de Plasmodium

- Hémolyse du culot globulaire dans les cupules d'une plaque à microtitration;
- absorption de l'hémolysat sur une membrane de nitrocellulose;
- extraction et dénaturation de l'ADN par incubation dans NaOH à température ambiante, neutralisation puis chauffage dans une étuve à 50°C pendant une heure;

- contact de 6 heures avec la sonde à 42°C;
- autoradiographie (en cas de sonde isotopique, les plus sensibles actuellement).

Remarques

La sensibilité des sondes dépend de deux facteurs essentiels: la fréquence de la répétition de la séquence cible dans l'ADN recherché et l'intensité du marquage par l'isotope ou l'enzyme.

Des sondes existent dans le commerce pour de nombreux microorganismes mais pour les protozoaires, cette technologie reste jusqu'à présent du domaine de la recherche.

4.3 Amplification de séquence ("polymerase chain reaction", PCR)

Principe

Il s'agit de la synthèse *in vitro* de multiples copies d'une courte séquence choisie d'acides nucléiques appartenant au génome connu du parasite recherché.

Les séquences des nucléotides (A,T,C,G) des deux brins d'ADN sont complémentaires. Un A sur un brin correspond toujours à T sur l'autre, un C correspond à G. Cette complémentarité stricte est capitale. Lorsque les deux brins sont séparés (chaleur), ils peuvent se réassocier, chacun de leur côté, avec de nouveaux brins ou de nouvelles molécules (nucléotides) mais l'appariement doit être respecté.

D'autre part, une enzyme, l'ADN polymérase, permet la copie de nouveaux brins complémentaires de ceux préexistants (ADN matrice) à partir d'amorces ("primers"). Les amorces sont de petits fragments complémentaires de chaque brin de la séquence à amplifier et correspondant à une de ses extrémités, chacune sur son brin. Chaque amorce bloquera le processus de copie à sa hauteur, fixant ainsi la longueur du fragment à amplifier.

La réaction de base se déroule en trois étapes:

- séparation des deux brins de l'ADN à mettre en évidence par augmentation de la température (94°C);
- abaissement de la température pour permettre aux amorces ajoutées dans le milieu de s'apparier chacune à une extrémité d'un des deux brins séparés du fragment à amplifier ("annealing"); cette température varie, en fonction des amorces utilisées, entre 40°C et 60°C et est un facteur particulièrement important de la réaction;
- augmentation de la température (72°C) pour que la polymérase puisse synthétiser les brins complémentaires à partir des amorces fixées, en utilisant les nucléotides triphosphates du milieu.

A la fin de ce cycle, on obtient deux copies du fragment initial (s'il existe!). Le deuxième cycle, commençant par la séparation des deux brins de chacun des deux copies fabriquera quatre brins complémentaires, d'où présence, à la fin de ce cycle, de quatre copies du fragment initial. C'est donc une progression géométrique de raison 2.

Procédure

Au début, seront introduits dans un microtube placé dans un bloc chauffant tous les éléments nécessaires à la réaction, en milieu tamponné: l'ADN dont il faudrait amplifier une séquence, un "stock" d'amorces des deux types, la polymérase (thermostable, provenant de bactéries vivant dans les eaux chaudes et pouvant donc agir à des températures élevées) et les composants nécessaires à l'élaboration des nucléotides triphosphates.

Les variations de température se succèdent, contrôlées par ordinateur.

Les cycles s'enchaînent de manière automatique, aboutissant à une énorme multiplication des molécules caractéristiques du parasite recherché.

Le produit d'amplification est alors analysé par électrophorèse et la séquence amplifiée apparaît sous forme d'une bande après coloration au bromure d'éthidium ou après hybridation avec une sonde correspondant à cette séquence. Cette dernière méthode garantit que l'amplification a bien été spécifique.

Le gain en sensibilité est spectaculaire.

Applications

Des séquences d'ADN non codant, spécifiques de *Trypanosoma brucei* se sont avérées être d'excellentes cibles pour cette réaction.

5. Diagnostic indirect par recherche d'anticorps

5.1 Prélèvements et dilutions

Sérum

Le sérum est obtenu par décantation, après coagulation du sang et rétraction du caillot. Les dilutions pour une titration des anticorps s'effectuent en eau physiologique tamponnée ("phosphate buffered saline", PBS).

Les échantillons de sérum sont conservés au congélateur, la température dépendant des molécules

considérées. Les anticorps se conservent bien à -20°C. La conservation peut également être assurée par la simple réfrigération à +4°C si les surinfections microbiennes sont évitées par l'addition de 1 p.100 d'azide de sodium.

Remarque

La recherche d'anticorps peut aussi se faire dans le LCR.

Sang séché

• PAPIER FILTRE

La quantité de sang prélevée au doigt ou au lobule de l'oreille sera mesurée par remplissage d'un capillaire de contenance connue (entre 25 et 75 µl). Ce capillaire sera immédiatement vidé par absorption dans l'épaisseur d'un papier filtre (Whatman N°1). Le séchage sera complet.

Plusieurs prélèvements peuvent prendre place sur un disque de 9 ou de 11 cm de diamètre. Les disques chargés de sang seront, même après séchage, séparés les uns des autres par une feuille de papier quelconque (coupon de papier hygiénique, par exemple) pour éviter le contact direct entre échantillons sur les disques empilés (figure 19-4).

La dessiccation sera complétée et maintenue par la présence de cristaux de silicagel bleu dans des sachets en polyéthylène scellés (fermés par un noeud) où seront enfermés les échantillons. A l'état sec, la conservation à +4°C ou même à température ambiante est assurée pour plusieurs semaines. Il faut cependant éviter l'exposition des échantillons à une chaleur forte (soleil direct, effet de serre dans une voiture) car le sang cuit ne peut plus être élué.

Au laboratoire, les taches de sang seront découpées et placées pendant 12 à 24 h dans un tube contenant une quantité mesurée de PBS. L'éluion du sang est contrôlée par la décoloration complète de la tache et par la coloration rosée du tampon. La dilution ainsi obtenue est calculée en divisant le volume de sang prélevé (dont la moitié environ est du plasma) par le volume de solution tampon placée dans le tube. Par exemple, une tache contenant 50 µl de sang (dont 25 µl de plasma) mise à éluer dans 250 µl de PBS correspond à une dilution de 1/10 du sérum.

• SUPPORTS ALTERNATIFS

Recommandé par le CDC Atlanta: papier filtre "ROPACO" n° 1023-038", chez James River Rochester, 340 Mill Street, Rochester, Michigan 48063 USA.

Découper des bandelettes de 7,5 x 2,5 cm sur lesquelles on dessine deux cercles de 12 mm de dia-

mètre. Une extrémité reste libre pour l'identification. Saturer l'intérieur des cercles de sang. Séparer les prélèvements par du parafilm (papier paraffiné). Les confettis de 12 mm de diamètre découpés et élués dans 0,2 ml de PBS fournissent une dilution de 1/8 du sérum.

Les pastilles de fibres de verre pour antibiogramme conviennent également pour recueillir le sang des prélèvements.

Prélèvement en tube capillaire

Le remplissage d'un tube capillaire de sang pris au doigt permet aussi la conservation du plasma congelé si le capillaire hépariné, une fois rempli, est centrifugé. La partie contenant le plasma peut être séparée et bouchée par de la plasticine. L'échantillon de plasma, dûment étiqueté, pourra être conservé à +4°C pour examen immédiat ou au congélateur pour examen différé.

Formule habituelle du PBS (sauf indication contraire)

Un mélange tampon est une solution dans l'eau distillée, d'un sel acide et d'un sel alcalin (habituellement phosphate monosodique NaH_2PO_4 , sel acide et phosphate disodique Na_2HPO_4 , sel alcalin). La présence de ces deux sels a pour effet d'assurer à l'eau un pH stable au cours du temps, déterminé par la quantité relative des deux sels. L'addition de NaCl, à raison de 8,5 g/l, assure l'isotonie (eau physiologique).

Solution concentrée

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	60,0 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	13,6 g
Na_3N	0,8 g
Eau distillée	1.000 ml

Avant l'emploi, diluer 1 volume de cette solution dans 25 volumes d'eau distillée et ajouter le sel:

Solution concentrée	40,0 ml
Eau distillée	1.000 ml
NaCl	8,5 g

5.2 Réactions d'agglutination directe

Test CATT ("Card Agglutination Trypanosomiasis Test") pour les trypanosomiasis africaines

• PRINCIPE

En présence d'anticorps, les trypanosomes fixés et colorés au bleu de Comassie sont agglutinés et for-



Figure 19-4

Prélèvements de sang séché, découpage de "confettis"

Les taches de sang proviennent de la piqûre au doigt. Les échantillons sont découpés en confettis à l'aide d'un emporte-pièce. Les prélèvements ainsi obtenus sont comparables entre-eux pourvu que le support soit saturé de sang.

ment des grumeaux bleus visibles à l'oeil nu. La réaction a lieu à l'intérieur de cercles dessinés sur une carte plastifiée blanche.

• RÉACTIFS ET MATÉRIEL

Antigène

Trypanosomes de sérotypes définis, fixés, colorés, lyophilisés et conditionnés en flacons scellés. Chaque flacon doit être reconstitué avec 2,5 ml de tampon CATT. La suspension ainsi obtenue doit être parfaitement homogène et doit être utilisée extemporanément ou être conservée à +4°C. Un flacon suffit pour 50 tests.

Tampon de reconstitution

La solution tampon (pH 7,2) contient de l'azide de sodium (0,1 p.100) comme agent conservateur. Au moment de l'emploi, verser l'antigène dans le flacon compte-gouttes. Il faut l'agiter avant l'emploi et le garder à l'abri du soleil et de la poussière.

La même solution tampon est utilisée pour la reconstitution des sérums de contrôle (lyophilisés) et la dilution des échantillons à tester.

Cartes plastifiées

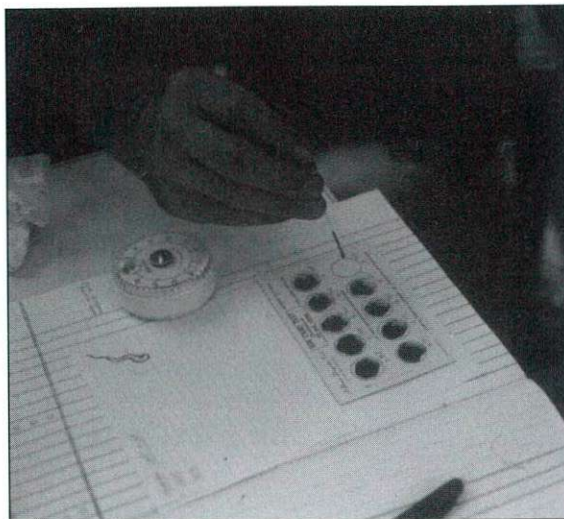
Les cartes rigides sont lisses et de couleur blanche. Sur la surface sont dessinés 10 cercles ("spots") qui identifient dix zones de réaction à l'intérieur desquelles seront déposées les gouttes d'antigène et de sang ou de sérum.

Le matériel et les réactifs peuvent être obtenus au laboratoire de Sérologie de l'Institut de Médecine tropicale, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen, Belgique.

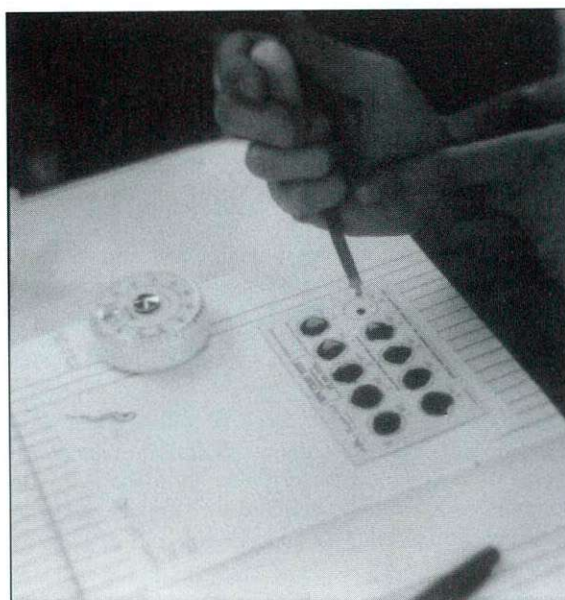
Figure 19-5

Test d'agglutination directe sur carte (CATT)

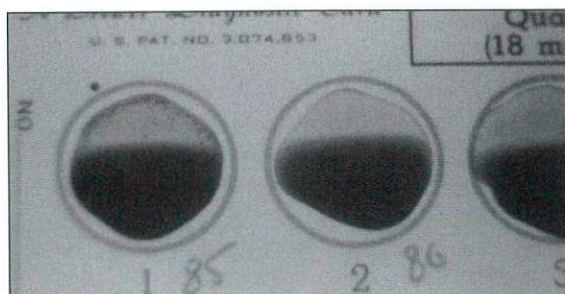
1. Dépôt d'une goutte de sang complet sur la carte plastifiée
2. Mise d'une goutte d'antigène (suspension de trypanosomes colorés) et mélange
3. Lecture après deux minutes d'agitation circulaire: les agglutinats bleus sont visibles en périphérie du spot n°1 (85), indiquant une réaction positive



1



2



3

• PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Sang total

Remplir un capillaire hépariné au 3/4 de sa longueur (éviter les bulles d'air) de sang pris au doigt et le conserver horizontalement dans un portoir approprié. La mini-poire permet de déposer 1 goutte de sang (environ 30 μ l) sur la carte pour la réaction d'agglutination.

Lors d'un dépistage sur le terrain, prélever par séries de 10 personnes et faire la réaction sans tarder.

Eviter

- la sédimentation des globules rouges (rouler les capillaires);
- la dessiccation (chambre humide);
- la coagulation (recommencer le prélèvement).

Sérum

Chacune des dilutions (de 1/2 à 1/64) sera examinée dans un "spot" de la carte.

• PROCÉDURE

- Déposer 1 goutte (environ 45 μ l) du réactif CATT (antigène reconstitué dans du tampon) dans chaque cercle de la carte (figure 19-5);
- ajouter ensuite, soit une goutte de sang, soit 5 μ l de sérum ou de plasma non dilué, soit 25 μ l des dilutions successives, soit une goutte des sérums de contrôle;
- à l'aide d'une tige d'agitation étaler le mélange jusqu'à environ 1 mm du bord du cercle;
- agiter la carte pendant 5 minutes sur un agitateur rotatif; pour éviter un séchage des "spots", placer un couvercle sur l'agitateur et mettre un tampon d'ouate humide sous ce couvercle.

Remarque

En absence d'agitateur, agiter la carte manuellement de façon à donner au liquide un mouvement rotatoire continu mais lent et toujours dans le même sens.

• LECTURE ET INTERPRÉTATION

Après les 5 minutes d'agitation, lire les résultats sur la carte avant de l'enlever de l'agitateur. Si on travaille manuellement, lire les résultats en inclinant la carte doucement dans les quatre sens.

La présence de grumeaux bleus en périphérie de la goutte signe une réaction positive. Elle est négative si la suspension est restée homogène.

Remarque

Il existe aussi un test d'agglutination directe de promastigotes de *Leishmania*, réalisé en plaque à microtitration (figure 19-6).

5.3 Agglutination de particules inertes ("Latex agglutination test", LAT)

Principe

Des particules de latex (généralement polystyrène carboxylé), de taille microscopique (diamètre inférieur à 1 µm), ont leur surface recouverte d'une couche de protéines antigéniques purifiées appartenant au parasite considéré. Ces particules sensibilisées sont mises en contact, sur une carte plastifiée sombre, avec le sérum dans lequel on recherche des anticorps. Les liaisons antigène-anticorps provoquent une agglutination des particules. La suspension d'aspect laiteux homogène devient particulière. On voit les agglutinats à l'oeil nu.

Réactifs et matériel

Suspension de particules de latex sensibilisées avec un antigène soluble (ou une mixture d'antigènes) de parasite

Solutions tampons pour la dilution de la suspension d'antigène et pour la dilution des sérums

Carte plastifiée avec cercles dessinés, de couleur sombre.

Réaction

Une goutte d'antigène est mélangée à une goutte de la dilution choisie de sérum. Après mélange à l'aide d'une spatule en plastique, la carte est agitée par rotation pendant 5 minutes à la température ambiante. Le critère de positivité est l'apparition de grumeaux visibles à l'oeil nu.

Applications

Trypanosomiasis africaines (glycoprotéines variables de surface de parasites d'animaux expérimentalement infectés); amibiase (trophozoïtes de cultures axéniques détruits par ultrasons), toxoplasmose (Ag toxoplasmique total permettant de détecter globalement les Ac de type IgG et IgM).

RÉFÉRENCE

BÜSSCHER P, DRAELANTS E, MAGNUS E, VERVOORT T AND VAN MEIRVENNE N. (1991) An experimental latex agglutination test for antibody detection in human african trypanosomes, *Annales de la Société belge de Médecine tropicale*, **71**, 267-273.

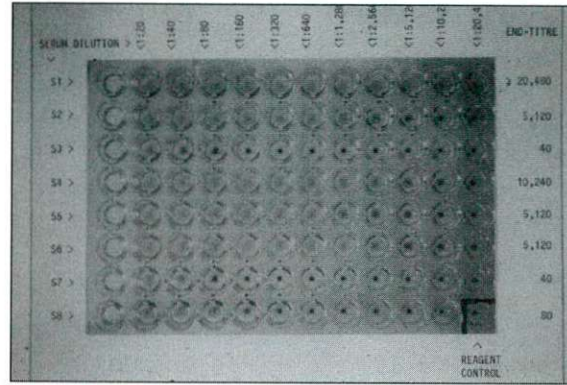


Figure 19-6

Réaction d'agglutination: promastigotes de *Leishmania* en plaque à microtitration

Les huit sérums examinés (S1 à S8) sont dilués, dans les rangées horizontales, de 1/20 à 1/20480. Les titres obtenus sont indiqués à droite de la plaque. Le "bouton" arrondi apparaissant au fond du godet indique une réaction négative.

(D. Le Ray, D. Jacquet, laboratoire de Protozoologie, Anvers)

5.4 Hémagglutination passive

Aussi appelée hémagglutination indirecte (HAI).

Principe

Dans ce cas, ce sont des globules rouges de mouton qui servent de support à un antigène. Ils subissent "passivement" l'agglutination.

Ce phénomène n'a aucun rapport avec l'agglutination directe des globules rouges humains (groupes sanguins A B O) par des anticorps complets, bivalents, spécifiques ni avec l'hémagglutination indirecte (réaction de Coombs pour la recherche d'anticorps incomplets).

Réactifs et matériel

- PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE
 - Suspension en eau physiologique de globules rouges de mouton lavés et fixés par l'acide tannique ou le glutaraldéhyde pour les rendre résistants;
 - mise en présence de la suspension de globules rouges fixés et de l'antigène soluble;
 - lavage pour éliminer l'antigène en excès, non fixé sur les globules;
 - lyophilisation des globules rouges sensibilisés pour une conservation longue.
- PLAQUES À MICROTITRATION

Les cupules de ces plaques doivent avoir dans ce cas-ci un fond arrondi, pour favoriser la sédimentation des globules rouges non agglutinés sous forme de "bouton".

Remarque

Il existe de nombreux "kits" dans le commerce.

Réaction (en tube ou en cupules)

On place dans les cupules, successivement, une quantité d'antigène (suspension de globules rouges sensibilisés) et une quantité de la dilution du sérum du patient;

incubation à 37°C pendant 30 minutes à une heure.

Lecture

Si les globules rouges ne sont pas agglutinés, ils sédimentent au fond du godet sous forme d'un culot arrondi et compact (le "bouton"). En cas d'agglutination, la sédimentation se fait par paquets, sous forme d'un précipité granuleux à bords irréguliers, ayant l'aspect d'une membrane friable.

Applications

Trypanosomiasis africaines et américaine (Cello-gnost®, Behringwerke); infections par plasmodiums; amibiase.

5.5 Variante de réaction d'agglutination: "immunosorbent agglutination assay" (ISAGA)

Test utilisé pour la recherche des IgM spécifiques dans la toxoplasmose.

Principe

Cette méthode permet à une suspension de toxoplasmes formolés de sédimenter dans une cupule à fond arrondi et de former un "bouton". Si la paroi de la cupule expose des IgM anti-toxoplasmiques, les parasites de la suspension sont captés et ne sédimentent pas.

Les IgM éventuellement exposées sur la paroi proviennent du sérum du patient et ont été captées par les anti-IgM de la paroi sensibilisée de la cupule.

Procédure

La séquence des manipulations est la suivante:

- sensibilisation du support (paroi de la cupule) par des anti-IgM humaines (lapin, chèvre...);
- incubation en présence du sérum du patient: les IgM éventuelles adhèrent sur la paroi;
- addition de la suspension de toxoplasmes entiers formolés.

Ils adhèrent à la paroi si les IgM spécifiques sont présents; ils sédimentent sous forme de bouton au fond de la cupule si les toxoplasmes sont restés libres dans la suspension.

Remarque

Les toxoplasmes formolés de la suspension peuvent être remplacés par des globules rouges de mouton sensibilisés par l'antigène toxoplasmique. Ces globules rouges sédimentent en cas de non fixation sur la paroi.

5.6 Précipitation en gel (PEG)

Immuno-diffusion (méthode d'Ouchterlony)

- PRINCIPE

Dans une couche de gélose (agar noble ou agarose) recouvrant une lame porte-objet, deux godets sont creusés à l'emporte-pièce à quelque distance l'un de l'autre. Dans l'un de ces godets, on placera la solution de protéines antigéniques, dans l'autre le sérum où l'on recherche les anticorps.

Les deux liquides diffusent, à partir de leur origine respective, dans le support inerte que constitue la gélose concentriquement par rapport aux godets. Les cercles de diffusion vont finir par se toucher. Au point de rencontre, si le sérum contient des anticorps spécifiques de l'antigène, se forment des immuns-complexes insolubles dans la gélose et qui précipitent sur place. Ce phénomène est visible sous la forme d'un trait blanc laiteux, appelé "arc de précipitation", contrastant avec le fond transparent de la gélose. Cet arc est perpendiculaire à la ligne qui passe par le centre des deux godets et révèle la présence des anticorps spécifiques: la réaction est positive. L'absence d'arc constitue une réaction négative (figure 19-7).

La rencontre de la solution ("soupe") antigénique, souvent constituée chez les protozoaires d'un mélange de protéines antigéniques (épitopes), et d'un sérum contenant plusieurs anticorps reconnaissant ces antigènes produira plusieurs arcs (systèmes précipitants) situés parallèlement les uns aux autres.

- PRÉPARATION DES LAMES

Des lames recouvertes de gel d'agarose à 1,5 p.100 (poids/volume) dans du tampon TRIS à pH 8,0 sont préparées en vue de la réaction:

Tampon pour agarose

NaCl	0,15 M
Tris*	0,01 M
EDTA	0,005 M
NaN ₃	0,02 p.100
* Tampon Tris(hydroxyméthyl) amino-méthane 0,05 M (pH 7,2 à 9,0)	
Tris	12,11 g
Eau distillée	1,0 l
HCl 0,1 N ajuster la quantité en fonction du pH désiré	

Gel d'agarose

Faire bouillir l'agarose dans le tampon pour le dissoudre puis le conserver au bain-marie entre 50 et 60°C en attendant de le couler sur les lames.

- PROCÉDURE

Découpage des puits à l'aide d'un perce bouchon (emporte-pièce) de 2 mm de diamètre; la disposition la plus souvent adoptée est celle d'un puits central contenant l'antigène et de 6 puits périphériques où sont placés les sérums à examiner;

- mise en place des réactifs (Ag et sérum) à raison de 3 µl par puits;
- placer en atmosphère humide et recouvrir d'un couvercle pour éviter la dessiccation;
- diffusion (24 à 36 heures) à 4 °C pour les lames de taille ordinaire (porte-objet).
- lavage en solution citratée (citrate trisodique à 5 p. 100 dans l'eau distillée) pendant 3 à 15 heures dans le but de redissoudre les floculations aspécifiques provoquées par le contact éventuel de substance C (cellules parasitaires détruites) avec la protéine C réactive du sérum (protéine de l'inflammation aiguë);
- lavage en eau physiologique tamponnée dont la formule est la suivante:

NaCl	9,0 g
NaN ₃	1,0 g
H ₂ O distillée	900,0 ml
Tampon barbital pH 8,2*	100,0 ml

ajuster à pH 7,5-8,0 à l'aide d'une solution de KH₂PO₄ à 8,08 g par litre d'eau distillée;

*Formule du tampon barbital à pH 8,2:

Tampon barbital 0,1 M**	76,9 ml
HCl 0,1 N	23,1 ml
Eau distillée	1000 ml

** Tampon barbital (véronal) 0,1 M (pH 6,8 à 9,4):

Diéthyl barbiturate Na	20,6 g
Eau distillée	1000 ml

- séchage (recouvrir le gel d'une feuille de papier filtre Whatman n° 1, pour déminéraliser le gel pendant sa dessiccation);
- coloration au noir amido:

Sol. A	
acide acétique	60,0 ml
eau distillée	1000,0 ml
Sol. B	
acétate de Na	13,61 ml
eau distillée	1000,0 ml

Le colorant se compose de:

Sol. A	425,0 ml
Sol. B	425,0 ml
Noir amido 10 B (Merck)	2,0 g
eau distillée q.s. pour	1000,0 ml

- différenciation en acide acétique (2 p.100).

- APPLICATIONS

E. histolytica (antigène HK9), *T. cruzi*, *Leishmania* sp. (formes de culture broyées et solubilisées en milieu aqueux).

Immuno-électrophorèse (IEP)

- TECHNIQUE

On pourra, pour une analyse plus fine, utiliser l'immuno-électrophorèse dans laquelle le temps de diffusion dans le gel est précédé d'une dissociation du mélange d'antigènes par électrophorèse. Dans ce but, la lame garnie d'agarose est reliée par des bandelettes de papier filtre mouillé de tampon avec les cuvettes de tampon où se trouvent les électrodes. Sous l'effet d'un champ électrique, les protéines constitutives migrent dans le gel suivant l'axe du courant électrique. Le sens et la vitesse de déplacement sera fonction de la charge électrique et de la taille des molécules.

Les fractions antigéniques séparées diffusent alors vers le sérum étudié (antisérum), placé secondairement dans une rainure longitudinale découpée dans le gel. La réaction des différentes fractions antigéniques avec les anticorps correspondants entraînera la formation d'une succession d'arcs de précipitation spécifiques (figure 19-7).

Après l'électrophorèse, les étapes de la réaction sont superposables à celles de la réaction de précipitation. Les gels pour IEP contiennent 1,5 à 2 p.100 d'agarose pour résister à l'échauffement produit par l'électrophorèse.

- APPLICATIONS

T. cruzi, *Leishmania*; cette technique permet l'identification d'arcs spécifiques.

RÉFÉRENCES

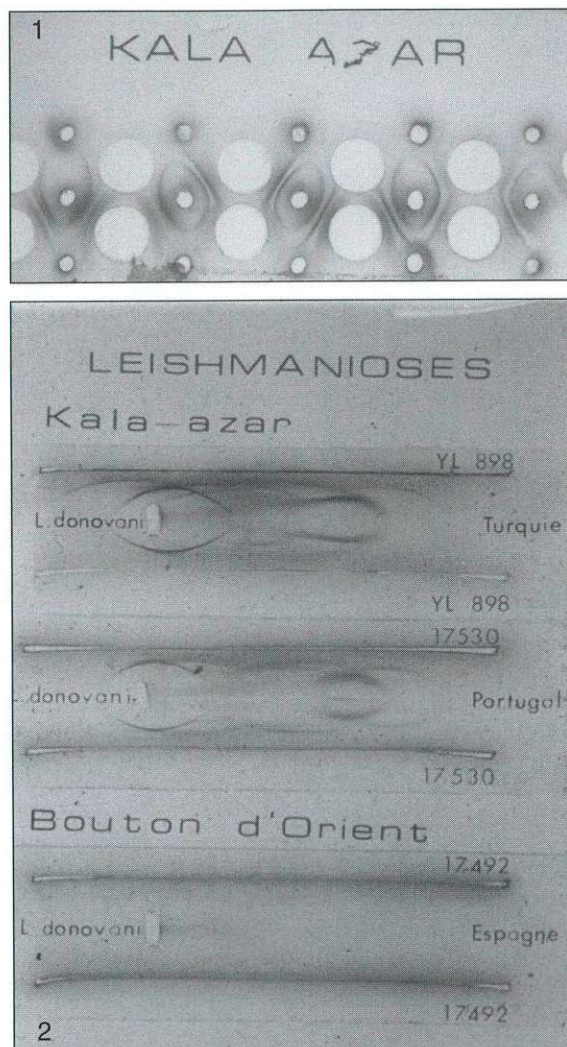
GRABAR P et WILLIAMS CA. (1953) Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines, Application au sérum humain, *Biochimie, Biophysique Acta*, 10,193-194.

Figure 19-7

Immunodiffusion (Ouchterlony) et immunoélectrophorèse

1. Réaction de précipitation en gel (PEG) pour la leishmaniose
2. Immuno-électrophorèses avec des sérums de cas de leishmanioses

Matériel aimablement communiqué par D. Le Ray

**5.7 Immunofluorescence indirecte (IFI)****Principe**

Les complexes antigènes-anticorps (Ig du sérum du patient) produits au contact des parasites sont révélés par un sérum de Coombs (sérum d'animal, souvent porc, chèvre ou lapin, immunisé contre les Ig du sérum humain), chimiquement combiné avec un colorant, la fluorescéine.

Réactifs et matériel

- ANTIGÈNES UTILISÉS

L'antigène (parasites entiers) est fabriqué à partir d'une des sources suivantes:

- sang parasité d'animaux infectés au laboratoire (frottis ou gouttes épaisses);
- parasites élués (filtration sur colonne) à partir du sang de ces animaux (lyophilisés, en ampoule);
- parasites cultivés (lyophilisés, en ampoule).

Une goutte de sang parasité, ou de l'antigène lyophilisé reconstitué dans du tampon, est déposée dans chacun des cercles ("spots") de lames siliconées. L'antigène, une fois séché et bien emballé, se conserve plusieurs mois au congélateur (-25°C).

- RÉACTIFS

Conjugué fluorescent; bleu Evans (utilisé comme contre-colorant); PBS (solution tamponnée); glycérine tamponnée (glycérine 60 p.100, PBS 40 p.100).

- MATÉRIEL

Microscope équipé d'éclairage ultraviolet; lames siliconées "multispots" (figure 19-8).

Prélèvements à examiner

Il peut s'agir d'échantillons de sang séché, de sérum (en dilutions) ou de LCR (non dilué)

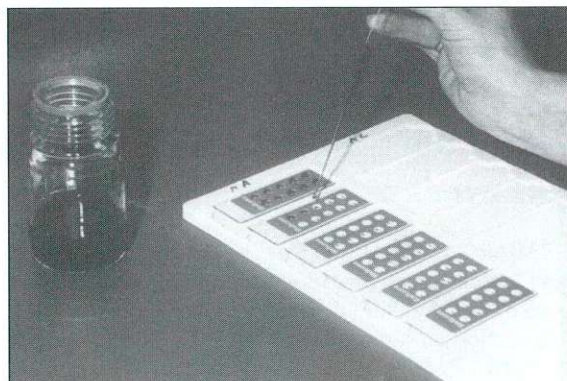
Procédure

- Mettre une goutte de chaque dilution du sérum du patient (ou de l'éluat de sang séché) sur les spots de la lame d'antigène pendant 30 minutes, à température du laboratoire et en chambre humide pour éviter la dessiccation des gouttes;
- laver 10 minutes en PBS pour évacuer les immunoglobulines non fixées;
- diluer le conjugué fluorescent à la dose prescrite, dans du PBS additionné de bleu Evans à la concentration de 1/10.000 et le placer, à raison d'une goutte par spot, sur l'antigène pendant 30 minutes;
- laver 10 minutes en PBS;

Figure 19-8

Lames "multispot"

Les lames sont recouvertes d'une couche de silicone qui ménage deux rangées de cinq cercles (spots) où aura lieu la réaction, soit avec des sérums de différents sujets, soit avec des dilutions progressives d'un même sérum.



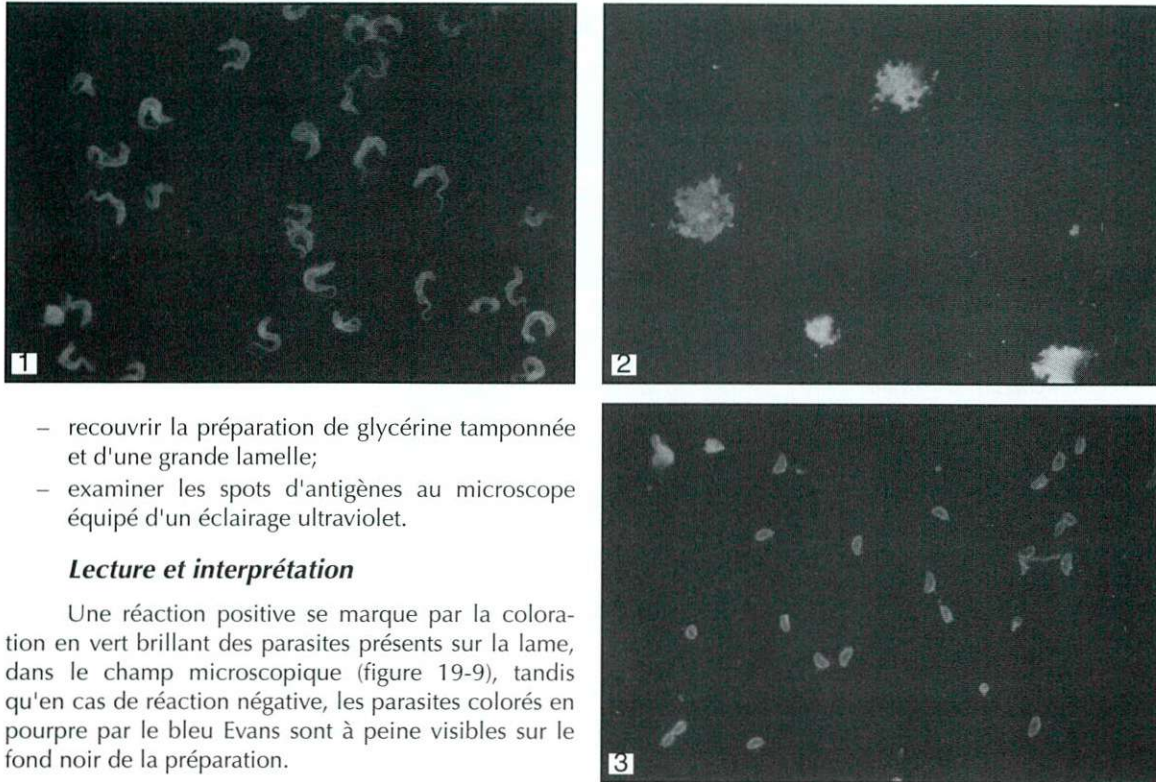


Figure 19-9

Exemple de tests d'immunofluorescence positifs

1. trypanosomes
2. amibes
3. toxoplasmes

- recouvrir la préparation de glycérine tamponnée et d'une grande lamelle;
- examiner les spots d'antigènes au microscope équipé d'un éclairage ultraviolet.

Lecture et interprétation

Une réaction positive se marque par la coloration en vert brillant des parasites présents sur la lame, dans le champ microscopique (figure 19-9), tandis qu'en cas de réaction négative, les parasites colorés en pourpre par le bleu Evans sont à peine visibles sur le fond noir de la préparation.

Ce test permet la visualisation au microscope des complexes antigène-anticorps localisés sur les parasites. C'est une garantie de spécificité.

Le manque de standardisation des réactifs et des manipulations intervenant dans la réalisation du test empêche souvent l'uniformisation des renseignements fournis par différents laboratoires (les titres considérés comme spécifiques peuvent être différents).

Applications

Amibiase; trypanosomiasis humaines*; toxoplasmose; infections par *Plasmodium*.

* Réactif antigénique gratuitement disponible sur demande au laboratoire de Sérologie de l'Institut de Médecine tropicale, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen, Belgique.

5.8 Test ELISA ("Enzyme-linked Immunosorbent Assay")

Principe

L'antigène soluble est fixé sur un support solide (paroi de cupules); les anticorps du patient viendront s'y attacher en cas de réaction spécifique. Dans le second temps de la réaction, le conjugué (sérum de

Coombs lié à un enzyme) reconnaîtra les Ig du patient si elles sont présentes sur la paroi.

La quantité d'enzyme qui sera retenue sur la paroi est donc proportionnelle à la quantité d'anticorps (Ig spécifiques de l'antigène) dans le sérum.

Un substrat incolore, spécifique de l'enzyme, est ajouté dans chaque cupule. La réaction enzymatique produit un changement de couleur du substrat, proportionnel à la quantité d'enzyme présente dans la cupule et donc à celle d'anticorps présente dans le sérum. La lecture peut se faire au spectrophotomètre et est donc quantitative (malgré l'emploi d'une dilution unique) et objective.

L'absorption de la lumière par la paroi colorée de la cupule est mesurée par comparaison avec une cupule témoin et exprimée en valeur d'absorbance.

La réaction comprend donc, schématiquement, les étapes suivantes:

- sensibilisation d'un support par un antigène;
- mise en incubation du sérum;
- mise en incubation d'un conjugué enzymatique anti-globulines humaines;
- ajout du substrat.

Réactifs et matériel

• ANTIGÈNES UTILISÉS

Le test ELISA utilise des antigènes solubles, obtenus par destruction des parasites (ultrasons ou broyeur de cellules) et qui peuvent être conservés à l'état congelé ou lyophilisé. Ils seront fixés sur un support rigide (surface de plastique) qui peut être la paroi interne d'un tube à essai ou d'une cupule de plaque à microtitration.

• RÉACTIFS

Conjugué enzymatique

De nombreux conjugués anti-globulines humaines liés à une enzyme (peroxydase le plus souvent) sont disponibles dans le commerce. Ils peuvent être monospécifiques (anti-IgG, anti-IgM) ou polyvalents (anti-IgG+M+A).

Substrat

Chromogène spécifique de l'enzyme, il réagit avec lui et provoque un changement de couleur.

Couples enzyme-substrat fréquemment utilisés

peroxydase avec ortho-phénylène diamine;

phosphatase alcaline avec p-nitrophényl phosphate;

β galactosidase avec o-nitrophényl-D galactoside.

Solution d'arrêt

Solution d'acide sulfurique.

Liquide de dilution (PBS tween 0,01 M)

Solution stock (concentrée) 0,25 M

Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	34,35 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	7,875 g
H ₂ O distillée	1,0 l

Pour l'emploi:

PBS stock	40,0 ml
NaCl	8,5 g
Tween 20	0,5 ml
H ₂ O distillée	1,0 l

• MATÉRIEL

Plaques à microtitration; pissette ou arrosoir pour les lavages intermédiaires; spectrophotomètre: pour la lecture automatisée, il est nécessaire d'utiliser des cupules à fond plat car le rayon lumineux du photomètre est vertical et la cellule de mesure se trouve sous la plaque.

Procédure

- Placer 200 µl de la dilution choisie du sérum par cupule; un contact de 30 minutes permet aux anticorps du patient (Ig) de se fixer directement à l'antigène collé sur la paroi;
- laver 10 minutes dans du PBS pour éliminer le sérum non fixé;
- introduire un conjugué enzymatique antiglobulines humaines et laisser en contact pendant 30 minutes;
- laver encore 10 minutes pour éliminer le conjugué non fixé;
- introduire le substrat spécifique de l'enzyme dans la cupule;
- arrêter la réaction substrat-enzyme par un acide fort (H₂SO₄);
- lecture au photomètre ou visuelle (appréciation du changement de couleur du substrat dans les cupules tests par rapport aux témoins).

Précautions

Cette réaction doit être réalisée en présence de témoins assurant la spécificité de la réaction: contrôle de la qualité de l'antigène, des liquides de dilution et éventuellement du conjugué.

Applications

Trypanosomiasis, toxoplasmose (intérêt des conjugués monospécifiques).

5.9 Variante: ELISA IgM "capture"

Cette réaction permet le dosage des IgM spécifiques.

Principe

La paroi d'une cupule est sensibilisée par un anticorps anti IgM humaines préparé chez la chèvre ou le lapin. L'incubation, dans cette cupule, du sérum à examiner produira la fixation sur la paroi des IgM éventuellement présents. L'antigène toxoplasmique ajouté ensuite se fixera à son tour sur la paroi si des IgM du sérum du patient le reconnaissent. Il faudra alors révéler ces "captures" successives par un conjugué enzymatique anti-toxoplasme.

Procédure

La séquence des manipulations sera schématiquement la suivante, les différentes étapes étant séparées par des lavages en PBS:

- support sensibilisé par un anti-IgM (lapin, chèvre);
- sérum du patient: s'il y a des IgM, fixation sur le support;
- antigène de toxoplasme;
- conjugué enzymatique anti-toxoplasme.

L'antigène toxoplasmique ajouté peut être lui-même marqué par un enzyme, la dernière étape devient alors superflue. Le substrat changera de couleur pourvu que l'enzyme soit présent sur la paroi de la cupule.

Utilisation

Diagnostic de la toxoplasmose aiguë où le dosage des IgM est précieux.

5.10 Immuno-transfert

"Western blot" (WB)

• PRINCIPE

Une électrophorèse des protéines parasites est pratiquée sur gel de polyacrilamide pour séparer les constituants antigéniques. Une fois la séparation obtenue, le transfert par contact sur une feuille de nitrocellulose peut avoir lieu.

Le sérum à examiner devra être déposé sur la feuille de nitrocellulose pour fixation des anticorps sur les antigènes reconnus. Un conjugué enzymatique anti-Ig humaines et le substrat de l'enzyme révéleront les fixations (figure 19-10).

• PROCÉDURE

- Séparation des antigènes parasites par électrophorèse des protéines sur gel de polyacrilamide;
- transfert ("blotting") sur membrane de nitrocellulose et découpage de cette feuille en bandelettes étroites;
- incubation des bandes avec les sérums à tester dilués en PBS tween (sans azide de sodium) pour permettre les réactions antigène-anticorps;
- lavage par trempage à 6 reprises dans du PBS tween (voir ELISA);
- incubation avec un conjugué enzymatique anti-Ig humaines pour permettre le marquage à l'enzyme;
- lavage dans les mêmes conditions que précédemment;
- trempage des bandelettes dans le substrat pour coloration.

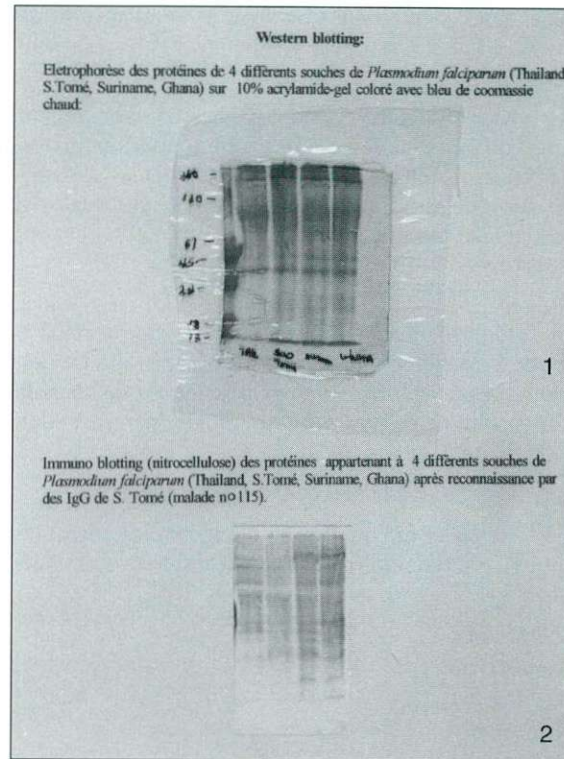


Figure 19-10

"Immunoblotting" ou "Western blot"

1. migration de protéines de plasmodium
2. protéines (antigènes) transférées sur nitrocellulose où certaines ont réagi avec des immuns-sérums de patients

(Cliché Chantal VAN OVERMEIRE, Laboratoire de Protozoologie, IMT, Anvers)

Remarque

Un dispositif amélioré permet le contact avec les antisérums sans découpage préalable de la feuille de nitrocellulose.

• APPLICATIONS

En parasitologie, c'est essentiellement une technique de recherche pour analyse antigénique fine des parasites: plasmodiums, toxoplasmes, trypanosomes...

6. Cryoconservation

6.1 Plasmodium falciparum du sang de patients ou de cultures

Congélation

On peut congeler du sang parasité prélevé chez un patient ou des plasmodiums de culture.

Le sang parasité du patient sera prélevé sur anti-coagulant (ACD ou EDTA) et centrifugé pour éliminer le plasma; le culot sera remis en suspension dans 5 fois son volume de RPMI stock*; le lavage des globules en

RPML stock sera répété trois fois; le dernier culot de globules lavés sera mélangé au mélange cryoprotecteur**.

Pour les cultures, on les choisira d'environ 5 p.100 de parasitémie avec une forte proportion de formes en anneau. Les grands trophozoïtes et les schizontes sont détruits par la congélation; centrifuger la culture à 2.000 tours/min. pendant 5 minutes, éliminer le surnageant.

Dans les deux cas, ajouter au culot de globules un volume équivalent du mélange cryoprotecteur**, goutte à goutte et à température ambiante afin de permettre la pénétration du glycérol dans les cellules; la suspension finale de globules rouges parasités doit avoir un hématoците de 50 p.100.

Distribuer à raison de 0,5 ml par ampoule.

Congeler rapidement en plongeant les ampoules dans l'azote liquide ou en les plaçant dans un congélateur à -70°C.

*RPML stock

voir paragraphe 2.8.

**Mélange cryoprotecteur

glycérol	28 p.100
sorbitol (ou mannitol)	3 p.100
NaCl	0,65 p.100

Ce mélange est fabriqué en ajoutant 28 ml de glycérol à 72 ml d'une solution aqueuse contenant 4,2 p.100 de sorbitol ou de mannitol et 0,9 p.100 de NaCl. Stériliser par passage sur un filtre de 0,22 µm.

Décongélation

Préparer les solutions suivantes:

Sol. A. NaCl à 12 p.100 dans l'eau distillée

Sol. B. NaCl 1,6 p.100 dans l'eau distillée

Sol. C. Dextrose 0,2 p.100 et NaCl 0,9 p.100 dans l'eau distillée

Stériliser les solutions par filtration.

- Retirer une ampoule de l'azote et la placer dans un bain-marie à 37°C jusqu'à décongélation totale;
- transférer dans un tube stérile, mesurer le volume de sang et ajouter goutte à goutte, en mélangeant soigneusement, 0,2 ml de la solution A par ml de sang décongelé;
- laisser reposer 3 minutes à température ambiante;
- ajouter goutte à goutte, en mélangeant soigneusement, 10 ml de solution B par ml de sang décongelé;

- centrifuger à 2.000 tours/min. pendant 5 minutes;
- enlever le surnageant et ajouter goutte à goutte, en mélangeant soigneusement, 10 ml de solution C par ml de sang décongelé;
- centrifuger à 2.000 t/m pendant 5 minutes;
- enlever le surnageant, resuspendre le culot de globules rouges dans du milieu RPML complet (voir culture de plasmodiums, paragraphe 2.8).

Démarrer la culture dans les conditions prescrites (première culture avec des cellules péritonéales de souris); ajouter des globules rouges frais si la valeur hématoците est trop basse (il faut obtenir un hématoците de 5 p.100).

6.2 Trypanosomes sanguicoles

Les trypanosomes africains tout comme *T. cruzi* peuvent être conservés en congélation à partir du sang d'un patient (trypomastigotes) ou à partir de cultures (formes procycliques). Les stabilats de trypanosomes africains ont l'avantage de conserver indéfiniment le type antigénique qu'ils expriment.

Mélange cryoprotecteur

DMSO (diméthyl sulfoxyde)	20 ml
PSG 5:5 *	80 ml

*Le PSG est décrit plus haut (concentration des parasites sanguicoles par filtration).

Procédure

Sang prélevé sur héparine 3 volumes

DMSO 20 p.100 1 volume

pour obtenir un mélange à 5 p.100 de DMSO en concentration finale.

Vitesse de refroidissement dans un appareillage automatique: 1°C par minute jusqu'à -35°C, puis 5°C par minute jusqu'à -79°C, enfin plonger dans l'azote liquide.

Pour obtenir approximativement ces vitesses de refroidissement, procéder comme suit:

- refroidir les ampoules vides à +4°C et la suspension de parasites dans la glace;
- répartir le mélange sang ou culture avec le cryoprotecteur à raison de 0,8 ml par ampoule;
- placer les ampoules, maintenues verticalement sur un portoir, au fond d'un congélateur à -35°C pendant 30 minutes;

- placer les ampoules dans un congélateur à -75/80°C ou sur la neige carbonique pendant 30 minutes;
- les transférer sans tarder dans l'azote liquide.

Le contrôle de viabilité peut être fait le lendemain de la congélation, en observant le pourcentage de formes mobiles après décongélation.

La décongélation se fait en plaçant les ampoules dans un bain-marie à 37°C au sortir de l'azote liquide.

6.3 Parasites intestinaux en culture (amibes, *Giardia*)

Mélange cryoprotecteur

Diméthyl sulfoxyde (DMSO)	20 ml
PSG 5:5*	100 ml

*Le PSG est décrit plus haut (concentration des parasites sanguicoles par filtration).

Procédure

- Mélanger la suspension de parasites avec le mélange cryoprotecteur à température ambiante:

Culture de protozoaires (3 jours)	1 ml
Mélange cryoprotecteur	0,5 ml

- répartir en ampoules de 1 ml;
- procéder ensuite au refroidissement progressif jusqu'à -70° (la technique décrite pour les trypanosomes au paragraphe précédent peut être utilisée);
- transférer immédiatement dans l'azote liquide.

Lutte contre les arthropodes vecteurs de protozoaires parasites

20

1. Concepts généraux du contrôle des vecteurs

1.1 Lutte chimique

Inventaire

Les substances insecticides peuvent être produites par synthèse chimique ou extraites de végétaux ou de bactéries.

Elles peuvent agir sur les arthropodes adultes (adulticides) ou sur les stades larvaires (larvicides).

Le choix d'un insecticide est guidé, outre son activité sur l'insecte cible, par sa toxicité pour les vertébrés (y compris l'homme), la durée de son efficacité (rémanence), son effet polluant, son coût, son mode d'utilisation (par contact, étalés sur une paroi; effet spatial, répandus dans l'atmosphère).

• HUILES MINÉRALES

Étalées en nappe fine à la surface de l'eau, elles empêchent les larves de *Culicidae* qui se développent en milieu aquatique, de venir respirer à la surface du gîte. L'effet polluant est un inconvénient sérieux.

• PYRÉTHRINES

Ce sont des molécules d'origine végétale contenues dans le pyrèthre, extrait de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Leur effet adulticide immédiat ("knock down") et sans action prolongée (pas de rémanence) est mis à profit pour les captures résiduelles, dont le but est de récupérer, le matin dans les maisons, les moustiques qui se sont nourris la nuit sur les habitants (épidémiologie du paludisme). Elles sont utilisées en pulvérisations spatiales dans des espaces confinés (bombe insecticide ou pompe à main du type "flytox"), en association avec le butoxyde de piperonyle avec lequel elles entrent en synergie.

Les extraits de pyrèthre, mis en solution à 0,04 p. 100 dans un solvant organique (huile, kérosène), sont peu toxiques pour l'homme et sont rapidement détruits

au contact de l'air. Leur prix et leur rareté ont encouragé la recherche de succédanés: les pyrèthroïdes.

• PYRÉTHRINOÏDES SYNTHÉTIQUES

Ces produits sont analogues au pyrèthre mais produits par synthèse chimique. La grande différence avec le pyrèthre réside dans la stabilité de ces molécules qui restent actives sur un support pendant des périodes prolongées.

La perméthrine (Permas[®]) est utilisée en pulvérisation rémanente.

La deltaméthrine (K-Othrine[®], Decis[®]) est trois fois plus active que le pyrèthre et plus stable à la lumière (effet prolongé). Plus toxique pour les animaux et l'homme que la perméthrine, elle est cependant utilisée au dixième de la dose de cette dernière. Elle est utilisée pour l'imprégnation des moustiquaires ou pour des pulvérisations intra-domiciliaires.

La resmethrine (Pinosect[®]) est rapidement décomposée au contact de l'air. Elle est utilisée en pulvérisations spatiales contre les phlébotomes.

La lambdacyalothrine est active contre les moustiques adultes et est utilisée pour l'imprégnation des moustiquaires.

La cyfluthrine, la cyperméthrine, l'étofenprox (Trebon[®]) et l'alphaméthrine sont en cours d'évaluation contre les moustiques adultes.

L'esbiothrine existe en bombes insecticides, plaquettes et spirales pour fumigation.

• ORGANOCHLORÉS

Le dichlorodiphényl-trichloro-éthane ou DDT a été le premier insecticide découvert (1940). Il est caractérisé par sa stabilité qui lui permet de rester actif sur les supports pendant plus de 6 mois (rémanence prolongée), sa faible toxicité et son prix modique. Très peu soluble dans l'eau, il est critiqué en écologie pour sa très lente dégradation qui lui permet de s'accumuler dans les chaînes alimentaires (légumes, viande). Il possède un léger effet répulsif sur les moustiques.

1. Concepts généraux du contrôle des vecteurs
 - 1.1 Lutte chimique
 - 1.2 Lutte biologique
 - 1.3 Méthodes génétiques
 - 1.4 Lutte mécanique et écologique
 - 1.5 Répulsifs
2. Lutte contre les anophèles
 - 2.1 Pulvérisations intra-domiciliaires
 - 2.2 Traitement spatial intra-domiciliaire
 - 2.3 Traitement spatial extérieur
 - 2.4 Mesures antilarvaires
 - 2.5 Diminution du contact homme-insecte
 - 2.6 Moustiquaires imprégnées d'insecticides
3. Lutte contre les glossines
 - 3.1 Insecticides
 - 3.2 Lâcher de mâles stériles
 - 3.3 Établissement de barrières chimiques et mécaniques
 - 3.4 Utilisation de pièges
 - 3.5 Régulateurs de croissance
 - 3.6 Phéromones sexuelles
 - 3.7 Groupe de l'ivermectine
4. Lutte contre les phlébotomes
 - 4.1 Utilisation des insecticides
 - 4.2 Modifications de l'environnement
 - 4.3 Mise en place de barrières naturelles
 - 4.4 Protection individuelle
5. Lutte contre les réduviés
 - 5.1 Utilisation des insecticides
 - 5.2 Réduction du contact homme-vecteur
 - 5.3 Réduction des populations de réduves

Bibliographie

Le méthoxychlore est analogue au DDT; il est toutefois partiellement biodégradable et sa rémanence ne dépasse pas 4 mois.

L'hexachlorocyclohexane ou HCH (Lindane[®], Gammexane[®]) a un bon effet rémanent (3-4 mois). Il est actif par contact (sur support) ou en pulvérisation spatiale (véhiculé par l'air). Son odeur désagréable rend délicat son usage dans les habitations. Une apparition rapide de résistance chez les anophèles a été observée.

La dieldrine possède une toxicité aiguë élevée pour l'homme et elle est bien résorbée par voie cutanée. Sa fabrication est coûteuse et de plus, l'apparition rapide d'anophèles résistants rend son utilisation problématique.

L'endosulfan possède la même toxicité que la dieldrine. Il a été utilisé en pulvérisation spatiale (par avion) contre les glossines (surtout *G. morsitans*).

• ORGANO-PHOSPHORÉS

Le malathion, découvert en 1950, reste un excellent adulticide contre les anophèles. Son action rémanente d'environ 3 mois et sa faible toxicité pour les vertébrés contrebalancent son coût élevé et son odeur désagréable après pulvérisation. En poudre, il est efficace également contre les ectoparasites (poux, puces).

Le fénitrothion (Sumithion[®]) est utilisé comme larvicide ou comme adulticide. Peu toxique, il peut remplacer le DDT dans les campagnes antipaludiques.

Le fenthion (Baytex[®]) est comparable au malathion. Il est utilisé avec succès comme larvicide ou adulticide.

Le chlorpyrifos (Dursban[®]) est un larvicide à large spectre, utilisé contre les larves qui se développent dans les eaux polluées (*Culex*). Le méthyl-chlorpyrifos, un analogue chimique, est en cours d'évaluation comme adulticide contre les moustiques.

Le téméphos (Abate[®]) est un larvicide pour eaux claires; très peu toxique, il est utilisé contre les larves de *Simulium* et d'anophèles.

L'iodofenphos (Elocril[®], Nuvanol N' [®]) est un insecticide de contact pour insectes péridomiliaires (fermes, dépendances).

Le dichlorvos (DDVP) est très volatil et agit à l'état gazeux (effet spatial) contre les insectes adultes. Dans les plaquettes Vapona[®], il est incorporé dans une résine de polychlorovinyl.

Le diazinon est utilisé contre les mouches et les phlébotomes.

Le trichlorfon (Dipterex[®]) est utilisé contre les mouches.

• CARBAMATES

Le propoxur (Baygon[®]) est très efficace contre les insectes domestiques; il a remplacé le DDT contre les anophèles en Amérique centrale.

Le carbaryl (Sevin[®]) peut remplacer le DDT là où ce dernier est interdit.

Le bendiocarb est utilisé contre les moustiques.

• HORMONES

Certaines hormones entravent le développement larvaire des insectes. Elles se caractérisent par une absence totale de toxicité sur les vertébrés.

Le méthoprène (Altosid[®]) pose des problèmes de périodicité d'application, vu son efficacité de courte durée et son action restreinte au stade prénymphal (larvaire) de l'insecte.

Le diflubenzuron (Dimilin[®]) provoque la mort des larves en inhibant la sclérification (solidification de la cuticule) après les mues.

Le Précocène[®] permet le développement larvaire mais, à l'éclosion, on ne retrouve que des adultes nains, malformés et inviables.

Formulation des insecticides

Dans les **poudres à poudrer**, la matière active, pulvérulente, est présentée à l'état pur ou mélangée à des particules inertes (pyrophillite, acide borique, terre de diatomées). Elles servent au déparasitage de la peau, des locaux.

Les **poudres mouillables** sont utilisées en suspension dans l'eau. Une suspension homogène est rendue possible grâce à l'addition à la poudre insecticide, d'agents tensio-actifs (détergents ou analogues). Les emballages portent souvent l'abréviation "WVP" ("Wettable Powder").

Exemple de formule de DDT (poudre dispersable ou mouillable)

DDT technique	76,5 p.cent
Poudre inerte (dioxyde de silicone hydraté)	21,0 p.cent
Agent mouillant (Igepon T 77)	1,5 p.cent
Agent dispersant (Marasperse N)	1,0 p.cent

Dans les **concentrés émulsionnables**, l'insecticide est en solution dans un solvant organique additionné d'un agent tensio-actif. Dilué dans l'eau, il produit une émulsion (aspect laiteux) qui doit rester

homogène pendant une période prolongée. Les emballages portent souvent l'abréviation "EC" ("Emulsifiable Concentrate").

ULV est l'abréviation de "Ultra Low Volume" (volume ultra-faible). La solution concentrée en solvant organique est utilisée comme telle, en spray très fin. Leur utilisation est réservée aux pulvérisations par avion ou hélicoptère, à raison de 0,6 à 4,7 l/ha. Le malathion ULV par exemple a une concentration de 98 p.100 de matière active.

Les **granulés** et **briquettes** sont des supports inertes (argile, ciment, plâtre) qui permettent le relargage progressif du produit actif lors de l'immersion dans l'eau (surtout utilisés comme larvicides). Ils contiennent de 2 à 25 p. 100 de produit actif.

Les **résines** servent de support à un insecticide volatil comme le dichlorvos (plaquettes Vapona®).

Les **bombes insecticides** (aérosols) contiennent un gaz liquéfié sous pression comme le très contesté dichlorodifluorométhane (fréon) ou autre, qui entraîne l'insecticide lors de la vaporisation.

La toxicité des insecticides

La toxicité pour les vertébrés est exprimée en DL50 orale pour le rat femelle (dose qui, administrée oralement, tue 50 p.100 des animaux). Le tableau ci-dessous indique la DL50 en mg/kg de quelques insecticides couramment utilisés. On remarquera que plus cette dose est élevée, moins l'insecticide est toxique (tableau 20-1).

La résistance aux insecticides

La résistance biochimique ou physiologique peut être mesurée par des tests standardisés dans lesquels une sélection d'insectes capturés sont mis pendant un certain temps en contact avec une dose du produit analysé. Des voies métaboliques alternatives trouvées par l'organisme de l'insecte pour neutraliser l'effet toxique du produit rendent l'insecticide inactif.

La fréquente résistance comportementale n'est cependant pas mesurée par ces tests. Il s'agit de "comportements d'évitement", quand l'insecticide a une action répulsive qui fait fuir le moustique.

1.2 Lutte biologique

Certains parasites pathogènes pour les invertébrés (protozoaires, nématodes ou champignons) peuvent raccourcir considérablement la vie des insectes adultes. Leur utilisation est difficile: il faut créer une

Produit	DL50 orale chez le rat	Produit	DL50 orale chez le rat
bendiocarb	40	gamma HCH	88
carbaryl	500	iodofenphos	2100
chlorpyrifos	82	lambda-cyhalothrine	1444
DDT	113	malathion	2800
deltaméthrine	135	méthoxychlore	6000
diazinon	250	perméthrine	430
dichlorvos	56	propoxur	90
dieldrine	46	pyréthre	200
endosulfan	46	resméthrine	2500
esbiothrine	670	téméphos	8600
fénitrothion	800	trichlorfon	560
fenthion	245		

épidémie due au germe choisi dans une population anophélienne, par exemple.

Tableau 20-1

Les prédateurs sont surtout constitués par des poissons larvivores (*Gambusia affinis*) dont on peuple les gîtes larvaires. Il existe aussi des insectes prédateurs attaquant les moustiques mais leur intervention dans la lutte est problématique.

Bacillus thuringiensis et *Bacillus sphaericus* produisent des toxines possédant un effet larvicide très puissant. Chez *B. thuringiensis*, on a sélectionné le sérotype 14 qui est particulièrement actif, commercialisé sous le nom de Teknar®. Il est utilisé surtout contre les larves d'anophèles. Les bactéries sont incorporées dans des boues qui leur permettent de rester en suspension dans l'eau des gîtes. La toxine en poudre peut aussi être placée dans des particules (granulés) dont la densité est calculée pour qu'elles flottent dans l'eau du gîte. La toxine de *B. sphaericus* est un peu moins active.

1.3 Méthodes génétiques

La modification, au laboratoire, de la réceptivité d'une espèce d'anophèle vis-à-vis des plasmodiums pourrait considérablement gêner la transmission du paludisme. C'est actuellement une voie de recherche très active (moustiques transgéniques).

La stérilisation au laboratoire d'insectes mâles (anophèles, glossines) par irradiation est suivie du lâcher des mâles stériles dans un biotope naturel. La copulation ne se faisant qu'une seule fois dans la vie d'une

femelle, celle-ci n'aura donc pas de descendance si le mâle choisi pour cette unique occasion est stérile!

Ces méthodes nécessitent cependant l'élevage en insectarium de grandes quantités d'insectes. Les lâchers dans les biotopes doivent être précédés d'une étude quantitative des populations d'insectes dans les biotopes à traiter car la proportion de mâles stériles par rapport à la population totale de mouches doit être significative et leur compétitivité intacte.

1.4 Lutte mécanique et écologique

Elle poursuit deux objectifs: la réduction de la densité des vecteurs et la réduction du nombre de piqûres infligées à l'homme.

Pour agir sur la densité, on procède à la destruction des gîtes larvaires ou des lieux de repos des adultes (voir cas particuliers ci-dessous) ou encore au piégeage qui capture les insectes au stade adulte ou larvaire.

Pour agir sur le contact homme-vecteur, la déviation des vecteurs sur des animaux "pièges" (zoo-prophylaxie) est parfois couronnée de succès. L'exclusion des vecteurs des locaux où vit l'homme (treillis moustiquaires aux portes, fenêtres et autres ouvertures) et l'utilisation de moustiquaires de lit (dimension des mailles inférieure à 1,5 mm de côté) peut être souveraine pour les insectes à activité nocturne mais reste à l'échelle de la protection de l'individu..

1.5 Répulsifs

Le badigeonnage de la peau ou imprégnation de vêtements avec des produits qui éloignent les insectes permet de diminuer temporairement (maximum 4 à 6 heures), le nombre de piqûres. Ces produits sont actifs contre les moustiques et les phlébotomes.

Les produits utilisés pour leur action répulsive sont, par ordre d'ancienneté décroissante, le sulfate de calcium hydraté, la citronnelle, le pyrèthre, le diméthylphthalate et analogues, le diéthyltoluamide ou DEET, la perméthrine. Le plus actif est le DEET, utilisé à des concentrations de 20 à 50 p. 100 dans des bombes, crèmes, lotions, savons, etc.

2. Lutte contre les anophèles

On utilise principalement, seuls ou en combinaisons, les pulvérisations rémanentes intra-domiciliaires, les moustiquaires imprégnées et les larvicides.

2.1 Pulvérisations intra-domiciliaires

Ce principe est basé sur l'observation que la plupart des anophèles entrent dans les habitations pour piquer et vont ensuite se poser sur les parois intérieures des murs.

Les pulvérisations couvrent toutes les surfaces intérieures. Le dosage est exprimé en grammes de matière active par mètre carré: DDT 1 à 2 g/m²; lindane 0,5 g/m²; malathion 2 g/m²; propoxur 2 g/m²; fenitrothion 2 g/m², deltaméthrine 0,025 g/m².

La durée d'action (rémanence) est de 3 à 12 mois selon le produit.

Remarque

Ce genre d'application des insecticides (même le DDT) est sans danger pour l'environnement. Le produit est appliqué sur les surfaces et y reste fixé.

2.2 Traitement spatial intra-domiciliaire

On utilise des aérosols sous pression (en bombe) au fréon ou au propane ou des pulvérisateurs à main; du pyrèthre destiné à étourdir le moustique y est souvent ajouté.

Les insecticides le plus souvent utilisés sont le DDT à 3 %, le méthoxychlore à 3 % et le malathion à 2 %.

2.3 Traitement spatial extérieur

L'émission, dans le milieu extérieur, de brouillards, de brumes ou de poudres sèches à l'aide d'appareils à moteur portés à la main, placés sur un véhicule ou dans un avion, ont des effets indésirables sur les animaux et entraîne la pollution des pâturages, potagers et eaux de surface. Le dosage est exprimé en grammes par hectare: DDT 224 g/ha; dichlorvos 56 à 280 g/ha; fenthion 112 g/ha; lindane 112 à 224 g/ha; malathion 112 à 560 g/ha.

2.4 Mesures antilarvaires

Elles réduisent la densité anophélienne par l'élimination des collections d'eau de surface: remblayage, drainage, curage des canaux, assèchement des marais, etc. L'utilisation de larvicides comme le déversement d'huile de pétrole additionnée de substances tensioactives, les épandages terrestres ou aériens d'Abate®, de fenthion, de Dursban®, d'extraits de *Bacillus thuringiensis* ou l'alevinage des collections d'eau par *Gambusia affinis*, entravent le développement larvaire.

Concentré émulsionnable	Dilution pour l'emploi	Dose par m ² d'après la capacité d'absorption
perméthrine: Permas® (concentré à 10 p.100 soit 100 mg/ml)	diluer à 10 p.100 dans l'eau. Concentration finale: 10 mg/ml	absorption: 50 ml/m ² Dose: 500 mg/m ²
deltaméthrine (K-Othrine®) (concentré à 2,5 p.100 soit 25 mg/ml)	diluer à 2 p.100 dans l'eau. Concentration finale: 0,5 mg/ml	absorption: 50 ml/m ² Dose: 25 mg/m ²
lambdacyalothrine (concentré à 2,5 p.100 soit 25 mg/ml)	diluer à 2 p.100 dans l'eau. Concentration finale: 0,5 mg/ml	absorption: 50 ml/m ² Dose: 25 mg/m ²

Tableau 20-1

Compilation Marc Coosemans.

2.5 Diminution du contact homme-insecte

Elle est obtenue par utilisation de treillis moustiquaires aux fenêtres ou autour des lits ou l'usage de répulsifs sur la peau (diéthyltoluamide ou DEET) dont la durée d'action ne dépasse pas quelques heures. Dans certains cas, une diminution importante du nombre de piqûres sur l'homme a été obtenue par l'interposition d'un troupeau d'animaux d'élevage, entre les gîtes larvaires et les habitations.

2.6 Moustiquaires imprégnées d'insecticides

Le tissu peut être du coton, du nylon, du polyester ou un mélange de ces fibres. Les insecticides recommandés sont les pyréthriinoïdes: perméthrine (Permas®), deltaméthrine (K-Othrine®, Decis®) lambdacyalothrine. La surface moyenne d'une moustiquaire de lit d'une personne est d'environ 10 m². Les concentrés émulsionnables sont dilués dans le volume d'eau que peut absorber la moustiquaire. La capacité d'absorption d'eau est de 40 à 100 ml par m² suivant le tissu utilisé (nylon ou polyester mélangés à du coton). Le coton pur doit être évité (plus fragile et insecticide enfermé à l'intérieur des fibres) (tableau 20-2).

Les moustiquaires seront immergées dans le bain d'insecticide puis essorées à la main et mises à sécher horizontalement sur le matelas, la paille ou une claie. Le séchage au soleil doit être proscrit. Le manipulateur portera obligatoirement des gants pour éviter le contact avec l'insecticide.

La concentration finale est de 500 mg/m² pour la perméthrine et de 25 mg/m² pour les deux autres produits.

3. Lutte contre les glossines

3.1 Insecticides

En région de savane, les épandages aériens d'endosulfan (10 g/ha dans les villages; 250 g/ha sur la végétation entourant les villages) ou de dieldrine à 3 % sont utilisés. Le DDT reste actif mais son utilisation dans la nature fait l'objet de réticences.

Sur les forêts galeries, la deltaméthrine (12,5 g/ha) peut être répandue à partir d'hélicoptère.

Dans la forêt, il faut tracer des routes pour pulvériser à partir de véhicules ou bien se servir de pulvérisateurs portés par des équipes de désinsectisation; on utilise la dieldrine à 3 p. 100.

La plupart des insecticides restent actifs contre les glossines: DDT, HCH, dieldrine, endosulfan, fenitron, dichlorvos, propoxur, pyréthriinoïdes.

Ils ont souvent été abandonnés. Leur application relevait, en forêt, de la performance sportive et en savane, où les applications par avion sont possibles, de la prouesse financière.

3.2 Lâcher de mâles stériles

Il est essayé depuis une dizaine d'année en Afrique de l'Ouest. Les résultats sont inégaux d'après les espèces et la méthode est laborieuse et très coûteuse.

Il a donné lieu à des essais bien contrôlés. Cependant, il ne se plie à aucune recette standard et reste un défi car la production commerciale relève de la science fiction et le lâcher de mâles stérilisés par irradiation dans un biotope exige des études entomologiques longitudinales et augmente transitoirement la population vectrice. En effet, les mâles aussi bien que

les femelles piquent et sont aptes à transmettre les trypanosomes.

3.3 Etablissement de barrières chimiques et mécaniques

Pour isoler une région où une action de réduction de la population de glossines a été entreprise, on peut supprimer la végétation ou mettre en place des écrans avec application d'insecticides rémanents tous les mois (deltaméthrine).

3.4 Utilisation de pièges

Un bon piège doit exercer un pouvoir d'attraction sur la mouche (couleur, forme, odeur, emplacement); ensuite, il doit la retenir captive (pièges biconiques de Challier-Laveissière) ou bien la tuer (écrans de tissu bleu imprégnés de deltaméthrine à raison de 75 mg/m²) ou encore la stériliser (écrans imprégnés de chimio-stérilisants).

Le piégeage pourrait être confié aux habitants eux-mêmes à condition qu'ils sachent à quoi il sert.

Le piège biconique blanc-bleu de Challier et le pyramidal bleu-noir de Gouteux et Lancien ont été reconnus les plus efficaces et les plus faciles à fabriquer, avec leur armature simple habillée de tissu. Leur prix et la difficulté de leur entretien sont deux obstacles à leur généralisation.

Les écrans, simples morceaux de tissu coloré, imprégnés de produits capables de tuer les mouches, constituent peut être l'ultime simplification. Des études récentes très fouillées font appel à la chimie des fibres textiles, des colorants et des insecticides pour réunir les quatre qualités recherchées: attractivité, résistance aux intempéries, bonne imprégnation et rémanence.

Les mélanges polyester-coton ont la préférence, pour leur résistance à l'usure, la stabilité de leur coloration et leur capacité de retenir une quantité efficace d'insecticide.

Pour la couleur, on hésite encore: le bleu électrique attire le mieux les mouches mais elles préfèrent se poser sur du noir. On hésite aussi sur la nécessité de combiner deux couleurs plus ou moins contrastées et sur la manière de les juxtaposer.

Les insecticides en concentrés émulsionnables sont les meilleurs. Plutôt que les organochlorés trop vite inactivés et trop lents à tuer les mouches, on préfère les pyréthrinoides, l'alphaméthrine (200 mg de concentré émulsifiable par m²) étant jugée supérieure à la deltaméthrine. Les mouches qui viennent se poser

sur les écrans doivent être intoxiquées en moins de 10 secondes.

Un écran imprégné résiste pendant 3 à 4 mois mais, en saison des pluies, la rémanence tombe à 45 jours au maximum. Les réimprégnations constituent une manipulation coûteuse et encombrante vu le nombre de pièges nécessaires pour une bonne couverture de la surface à protéger.

En conclusion, le piégeage, qui a pu réduire de plus de 95 p.100 la population initiale de mouches dans certaines plantations entretenues, reste une méthode coûteuse vu son extension prohibitive dans le temps et l'espace. Quant à la motivation des villageois, elle est généralement de courte durée si elle a pu être suscitée à un moment. Les écrans ou les pièges sont alors abandonnés à l'agressivité du milieu écologique qui les détruit: soleil, pluie, poussière ... C'est pourtant une méthode qui pourrait résoudre le problème des zones éternellement endémiques.

3.5 Régulateurs de croissance

Le diflubenzuron (Dimilin®) est une hormone qui est très peu toxique pour les vertébrés et biodégradable (elle ne s'accumule pas dans les chaînes alimentaires). Elle peut donc être utilisée sur grande échelle dans la nature. Elle n'a pas d'effet sur la glossine adulte, mais les larves pondues n'atteignent pas le stade de pupa (stade nymphal).

3.6 Phéromones sexuelles

Des supports (corde avec des nœuds par exemple) imprégnés de ces substances attirent fortement le mâle et l'invitent à copuler avec ces femelles factices.

Si on a ajouté une substance chimiostérilisante (groupe des Aziridines), la copulation stérilise le mâle par la même occasion.

3.7 Groupe de l'ivermectine

Ce groupe de médicaments anthelminthiques administré aux animaux (bétail) est dépourvu de toxicité pour les vertébrés, mais les glossines qui viennent se gorger sur les animaux traités meurent dans un délai assez bref.

4. Lutte contre les phlébotomes

L'abandon, dans nombre de pays tropicaux, de la lutte contre le paludisme a provoqué une recrudescence des cas de leishmanioses. Les phlébotomes sont très sensibles aux insecticides. Cependant, on signale

en Inde quelques cas de résistance au DDT, à la diel-drine et au diazinon.

4.1 Utilisation des insecticides

Il faut pulvériser à intervalles étudiés et à des endroits choisis en fonction des habitudes du vecteur. Là où l'infection est purement humaine ou périodestique (Asie, régions méditerranéennes), on appliquera les insecticides (DDT, malathion) dans et autour des maisons, sur les murets de pierre, dans les étables, les caves. Si on a affaire à une zoonose où les rongeurs sont un réservoir important, outre ces pulvérisations périodestiques (lieux de repos diurnes), on évitera le contact entre les phlébotomes et les rongeurs (morceaux de tissus imprégnés de DDT à l'entrée des terriers que les rongeurs emportent dans leur gîte et qui éloignera les phlébotomes, ou bien poudre de DDT à l'entrée des terriers).

On pourra utiliser les pulvérisations aériennes à l'occasion de rassemblements importants de population. Les aérosols et nébulisations à l'iodofenphos ou à la resmethrine sont pratiqués dans les agglomérations.

4.2 Modifications de l'environnement

Il faudra éliminer les décombres et les ordures, détruire les terriers des rongeurs, défricher la forêt aux alentours sur un rayon de 300 mètres autour des villages, urbaniser les quartiers périphériques des villes...

4.3 Mise en place de barrières naturelles

Lutzomyia et *Psychodopygus* sont des insectes forestiers d'Amérique latine. Les insecticides ne peuvent être employés sur des surfaces aussi étendues. On évitera le contact homme-vecteur en déboisant un couloir planté d'herbe où des élevages de bétail peuvent être réalisés. Ce couloir isolera les agglomérations de la forêt. Seuls seront piqués les individus qui se rendent dans la forêt pendant la journée.

4.4 Protection individuelle

Elle consistera dans la pose de toiles moustiquaires à mailles très fines aux fenêtres et autour des lits, dans l'utilisation de répulsifs et dans l'élimination des déchets de toutes sortes aux abords des maisons. L'emploi de moustiquaires imprégnées d'insecticide, de serpentins au pyréthre, de plaquettes fumigantes ou de répulsifs (DEET), protège l'individu ou la maisonnée contre les piqûres du vecteur.

5. Lutte contre les réduvidés

5.1 Utilisation des insecticides

La pulvérisation intra-domiciliaire avec la diel-drine, la perméthrine (1 à 2 g/m²) procure une rémanence d'au moins 2 mois, considérée comme importante car les réduves se cachent dans de profondes crevasses. L'utilisation de peintures additionnées d'insecticides constitue une promotion non négligeable de cette désinsectisation.

5.2 Réduction du contact homme - vecteur

Afin de réduire les lieux de refuge des réduves, on peut supprimer les crevasses des murs par l'emploi de ciment, de plâtre ou de boue séchée. Les toitures de paille ou de tôles seront doublées d'un plafond ne laissant pas passer les insectes. Bref, l'amélioration de l'habitat est primordial.

En outre, les moustiquaires de lit protègent efficacement les personnes qui y dorment.

5.3 Réduction des populations de réduves

Sélection des "habitants" de la maison

La diminution des sources de repas sanguins possibles pour les insectes à l'intérieur de la maison passe par l'élimination de tous les animaux (cobayes, lapins, volaille) qui y trouvent refuge la nuit.

Capture d'insectes

Elle sert à faire une estimation du nombre d'insectes présents dans une maison aussi bien qu'à en obtenir une diminution par captures répétées. Faite à la pince, pendant un temps déterminé (15 minutes), elle dépend de l'expérience du captureur. Après pulvérisation spatiale de pyréthre dans la pièce, son rendement augmente de 3 à 4 fois mais la méthode n'est pas quantitative.

Pour la quantification, on a imaginé plusieurs méthodes. Le marquage d'insectes capturés (couleur) qu'on relâche et recapture dans une même maison manque de précision vu le petit nombre d'insectes marqués recapturés. On a essayé d'apprécier la diminution du rendement de captures de 15 minutes, répétées consécutivement dans la même habitation. Les boîtes de Gomez-Núñez sont des boîtes de carton de 31 x 25 x 5 cm dont une face est perforée de 30 trous

de 2 cm de diamètre. Elles sont collées contre une paroi, face trouée contre le mur. Le contrôle de leur contenu se fait, à intervalles réguliers, pendant 1 à 6 mois.

La maladie de Chagas est typiquement une maladie du sous-développement et de la pauvreté. En effet, une amélioration des habitations supprimerait les rédues domestiques.

BIBLIOGRAPHIE

DAVIDSON G. (1982) Developments in malaria vector control, *British Medical Bulletin*, **38**, 201-206.

LAVEISSIÈRE C, COURET D, MANNO A. (1987) Importance de la nature des tissus dans la lutte par piégeage contre les glossines, *Cahiers de l'ORSTOM, Série Entomologie médicale et Parasitologie*, **25**, 133-144.

LAVEISSIÈRE C, COURET D, GRÉBAUT P. (1987) Recherche sur les écrans pour la lutte contre les glossines en région forestière de Côte d'Ivoire. Mise au point d'un nouvel écran, *Cahiers de l'ORSTOM, Série Entomologie médicale et Parasitologie*, **25**, 145-164.

Organisation Mondiale de la santé (1990) *Lutte contre les leishmanioses*, Série de Rapports techniques, **793**, 67-72.

Organisation Mondiale de la santé (1991) *Lutte contre la maladie de Chagas*, Série de Rapports techniques, **811**, 51-58.

MOUCHET J, ROBERT V, CARNEVALE P *et al.* (1991) Le défi de la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale: place et limite de la lutte antivectorielle, *Cahiers Santé*, **1**, 277-288.

GWADZ RW. (1994) Genetic approach to malaria control: how long the road? *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **50**, 6 (suppl.), 116-125.

SEXTON JD. (1994) Impregnated bednets for malaria control: biological success and social responsibility, *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **50**, 6 (suppl.):72-81.

LACEY AL, BRUCE KO. (1994) The role of biological control of mosquitoes in integrated vector control, *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **50**, 6 (suppl.), 97-115.

GRATZ N, JANY W. (1994) What role for insecticides in vector control programs? *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, **50**, 6 (suppl.), 11-20.

Index

A

Abate® 260
Abcès amibien
 diagnostic 52, 53, 54
 fréquence 45
 lésions 49
Acanthamoeba 64
Acanthopodida (ordre des-) 37, 59
Accès pernicieux 159, 162
Acide désoxyribonucléique, voir ADN
Acide folinique 197
Acide para-aminobenzoïque
 (et *Plasmodium*) 143, 152
Acide ribonucléique, voir ARN
Actine 25
Adaptation
 des parasites à un hôte 31
 des trypanosomes en culture 98, 115
Adénopathies 111
ADN 23, 24
 hybridation d'–, voir Sondes nucléiques
Agglutination
 capture, voir ISAGA
 directe
 dans la maladie de Chagas 98
 dans la toxoplasmose, 195
 dans la trypanosomiase africaine
 voir CATT
 dans les leishmanioses 128
 techniques 247
 passive 249
 voir aussi Latex et Hémagglutination
Albendazole 212
Alcool polyvinylique (conservation des selles) 225
Allopurinol 129, 131
Altosid® 260
Amastigote 86, 87, 94, 95, 123, 125, 126, 130
Amibes (classification du roupe "Amiboïdes") 37, 59
Amibes libres 62–65
Amibes non pathogènes 46, 59–62, 79
Amibiase
 diagnostic
 recherche du parasite 50–53
 titration d'anticorps 53–54
 effet de l'immunité 49

extra-intestinale, voir Abcès amibien
intestinale
 fréquence 45, 56
 lésions 48–49
 traitement 55
 transmission 55–56
Amodiaquine 168, 169
Amphotéricine B® 64, 129, 131
Amplification de séquence, voir PCR
Anémie (dans le paludisme) 161
Animaux de laboratoire 35
Anophèles
 capacité vectorielle 173
 densité 172
 espèces transmettrices 155, 156, 157, 159
 indice sporozoïtique 174
 longévité 172
 lutte contre les– 262–263
Anticorps
 détection des– 246–255
 –monoclonaux 243
Antifoliques 168
 résistance aux– 170
Antigènes
 détection des– 115, 243–244
 de surface 22, 86, 88
 variables 22, 87, 88, 112
 voir aussi Épitope 244
Antimoniote de méglumine 129, 131
Antimoniés 129, 131, 132, 133, 134
Apicomplexa 137
 embranchement des– 37
Aralen® 168
ARN 24
Arsobal® 116
Artemisia annua (molécules dérivées de–) 168, 169, 170
Atébrine® 75, 168
Axostyle 25, 76, 77
Azolés (dérivés–) 55

B

Babesia
 infectant l'homme 205
 infectant les animaux 203

Babésiose

 diagnostic 205, 206
 fréquence chez l'homme 206
Bacillus thuringiensis 261
Bactrim® 169, 182, 218
Bailenger (coloration de–) 51, 221
Balantidium coli 67
Baygon® 260
Baytex® 260
Benznidazole 99
Bérénil® 116
Besnoitia sp. 201
Biopsie
 bronchique 217
 cutanée 127, 131
 hépatique
Bipartition (reproduction par –) 26
Blackwater Fever,
 voir Fièvre bilieuse hémoglobinurique
Blastocystis 218
 prévalence 219
Blépharoplaste 25, 71, 76
Blood incubation infectivity test 108, 119
Bouton d'Alep 132
Bouton d'Orient 132
Bradyzoïte 190, 191
Buffy-coat 98, 114, 234

C

Capacité vectorielle (de l'anophèle) 173
Carbamates (insecticides–) 260
Carbaryl 260
Caryosome 24, 43, 61, 62
CATT (dans la maladie du sommeil) 112, 247
Cellognost® (dans la maladie du sommeil) 112
Chagas, voir Maladie de–
Chagome 97
Chancre d'inoculation 109
Chilomastix mesnili 71
Chloroquine 168, 169, 170
 résistance à la– dans le paludisme 170
Chlorpyrifos 260
Chorio-rétinite 193, 194
Chromatine 24
 chez les amibes 43, 60, 61, 62

- Ciliophora (embranchement des-) 38
 Cils 26
 Cinétosome 25
 Circumsporozoïtique (protéine-) 160, 166, 174
 Cladistique (méthode- et taxinomie) 34
 Clarification par hémolyse (test de -) 113, 236
 Classe (nomenclature) 36
 Classification
 critères 33
 méthodes 34
 Clonalité 34
 Clone 35
 Clou de Biskra 132
 Coccidies
 caractères distinctifs des genres 180
 de l'homme 182-185
 des animaux 181-182
 schéma du cycle évolutif 179, 180
 Collections de souches 35
 Coloration (techniques de-)
 histologie 232-234
 matières fécales (*Cryptosporidium*) 224
 matières fécales (extemporanées) 51, 221-222
 matières fécales (permanentes) 51, 52, 223-224
 ponction-biopsie 127
 sang 231-232
 Commensal 29
 Concentration (techniques de-)
 LCR 114, 241
 matières fécales 51, 75, 184, 222
 sang 98, 114-115, 164, 234-236
 Congénitale (transmission- des protozoaires)
 Babesia (tique) 205
 maladie de Chagas 100
 maladie du sommeil 116
 paludisme 171
 toxoplasmose 193
 Conjugaison (reproduction par -) 26
 Conservation
 des matières fécales 51, 225
 du sérum 246
 Copro-anticorps 54
 Corpuscule basal 25
Crithidia 85
 Cryoconservation 35, 255-257
 Cryptosporidiose
 chez l'homme 182
 diagnostic 184-185
 pathologie 183
 transmission 185
 Culture de
 Balantidium coli 68
 Entamoeba histolytica 54-55
 Giardia 75
 Leishmania 128, 130
 Plasmodium falciparum 238
 protozoaires (généralités) 35
 Trichomonas vaginalis 78
 Trypanosoma cruzi 98
 Trypanosoma gambiense 115
 Cyclines 68, 170, 171
Cyclospora 185
 Cytochromes 88
 Cytokines 127, 160, 161
 Cytoplasme 22, 23, 24, 33, 43
 Cytosol 23
 Cytosquelette 25, 87
 Cytostome 22, 67
- D**
 Dapsone 168
 Daraprim® 168
 Decis® 259, 263
 DDT 259
 Déhydroémétine 55
 Deltaméthrine 259, 263
 Densité parasitaire (dans le paludisme) 163-164
 DFMO 116, 119
 Diamond (milieu de-) 55, 226-228
 Diarrhée 41, 46, 50, 67, 71, 74, 77, 79, 97, 182, 183, 185, 212
 Diazinon 260
 Dichlorvos 260
 Dieldrine 260
Dientamoeba fragilis 79
 Diflubenzuron 260
 Difluorométhyl-ornithine, voir DFMO
 Dimilin® 260
 Diminazène (acéturate de-) 116
 Diplomonadida (Ordre des-) 36, 71
 Dip-stick "capture"
 dans le paludisme 165
 technique 244
 Diptex® 260
 Direxiole® 55
 Disporobastique 210, 211, 212
 Dobell (milieu de-) 55, 68, 79, 226
 Dot blot immuno-assay
 dans la maladie de Chagas 99
 voir aussi Western blot
 Doxycycline 168, 169, 170
 Drépanocytose 143
 Duffy (groupes sanguins- et *Plasmodium*) 142
 Duodénum (protozoaires du-) 74
 Dursban® 260
Duttonella (sous-genre-) 89, 104
 Dye-test 195
 Dysenterie 41, 48, 67
- E**
 East Coast Fever 207
 Eflornithine 116
 Eimeriida (ordre des-) 37, 137
 Eimeriidae (famille des-) distinction des genres, synthèse 189
 ELISA
 dans l'amibiase 53
 dans la cryptosporidiose 184
 dans la maladie de Chagas 99
 dans la maladie du sommeil 112
 dans la pneumocystose 217
 dans la toxoplasmose 196
 dans le paludisme 166
 dans les leishmanioses 128
 technique 253
 ELISA "capture"
 dans l'amibiase 53
 dans la giardiose 75
 dans la toxoplasmose 195
 dans la trypanosomiase 115
 technique 244
 titration d'IgM (technique) 254
 titration d'IgM dans la toxoplasmose 196
 Embranchement (phylum) (nomenclature) 36
 Émétine 41, 55
Encephalitozoon 209
 cuniculi 211
 hellem 211
 Endocytose 22
 Endodyogenèse (reproduction par -) 26, 191
Endolimax nana 62
 Endosulfan 260
Endotrypanum (sous-genre-) 101
Entamoeba
 coli 41, 60-61
 dispar 46, 59-60
 non pathogène 46
 gingivalis 61
 hartmanni 46, 60
 histolytica 41
 culture *in vitro* 226-228
 cycle minuta 42
 cycle pathogène 42
 porteurs de kystes
 diagnostic 51-52
 fréquence 56
 virulence des souches 46-48
 polecki 46, 61
Entamoebidae (famille des-) 41
Enterocytozoon 209
 bieneusi 211
Enteromonas hominis 79
 Enterotest® 75
 Enzyme test 47, 54

Enzyme-linked immunosorbent assay, voir ELISA
 Éosine (coloration à l'–) 51, 221
 Épimastigote 85, 86, 88, 91, 92, 96, 98, 107
 Épitope 97, 99, 145, 160, 165, 166, 174, 177, 243, 244, 250
 Espèce (nomenclature) 36
 Espundia 133, 134
 Euamoebida (ordre des–) 37, 59
 Eucaryote 21
 Exflagellation 139

F

Famille (nomenclature) 36
 Fansidar® 169, 170, 171
 Fansimef® 169, 171
 Fasigyn® 55, 75, 78
 Faust (technique de–) 51, 222
 Fénitrothion 260
 Fenthion 260
 Feulgen (coloration de–) 233
 Fièvre
 bilieuse hémoglobininurique 161, 162
 quarte 157
 tierce bénigne 154, 156
 tierce maligne 159
 Filtration (sur colonne de cellulose)
 dans la trypanosomiase 115
 technique 235–236
 Fixation (techniques de–) 223, 225, 231
 Fixation du complément
 dans la maladie de Chagas 98
 dans les leishmanioses 128
 Flagelle 25, 87
 Flagellés 36
 Flagentyl® 55, 75
 Flagyl® 55, 75, 78, 182
 voir aussi Métronidazole
 Flavoquine® 168
 Formol (conservation des selles) 52, 225
 Formol-gélification (dans la leishmaniose) 129
Frenkelia sp 201
 Frottis
 de matières fécales 223, 224
 de sang 231
 Fuchs-Rosenthal (cellule de–) 240
 Furamide® 55
 Furazolidone 75
 Furoate de diloxanide 55
 Furoxone® 75

G

Gamétocyte
 de *Babesia* 204

de coccidies 179
 de *P. falciparum* 157
 de *P. malariae* 156
 de *P. ovale* 155
 de *P. vivax* 153
 de *Plasmodium* 139, 144, 145, 160, 176
 de *Sarcocystis* 200
 de *Theileria* 207
 de *Toxoplasma* 191
 Gamétocytocide 168
 Genre (nomenclature) 36
 Germanin® 116
Giardia intestinalis 72
 culture *in vitro* 228
 réceptivité de l'hôte 76
 réponse immune 74
 zymodèmes 74
 Giardiase
 diagnostic 75
 traitement 75
 Giemsa (coloration de–) 231
 Globule rouge parasité
 par *Babesia* 204
 par *P. falciparum* 158
 par *P. malariae* 156
 par *P. ovale* 155
 par *P. vivax* 153
 par *Plasmodium* 144
 par *Theileria* 207
 Glossine
 adaptation des trypanosomes à la – 89
 comportement des trypanosomes chez la– 107
 contact avec l'homme 117, 119
 espèces transmettrices 106, 109, 118
 lutte contre la– 263–264
 mâles stériles 263
 piégeage 264
 taux d'infection 107
 GLSH (milieu–) 237
 Glucantime® 129, 131
 Glucose-6-phosphate déshydrogénase 144, 152
 Golgi (appareil de–) 23
 Goutte épaisse 231

H

Hackett (indice de–) 174
 Haemosporida (ordre des–) 37, 137
 Halfan® 168, 171
 Halofantrine 168, 169
Hartmannella 64
 HCH 260
 Hémagglutination passive
 dans l'amibiase 53
 dans les leishmanioses 128
 dans la maladie de Chagas 99

 dans la maladie du sommeil 112
 dans le paludisme 166
 technique 249
 Hématoxyline d'Ehrlich (coloration à l'–) 77, 232
 Hématoxyline ferrique (coloration à l'–) 51, 223
 Hémoflagellates 83, 91, 103
 Hémoglobine (et *Plasmodium*) 143
 Hémoglobinurie 161
 Hémolyse
 dans le paludisme 161
 dans les babésioses 205
 Hémosidérine 161
 Hémozoïne 143, 161
Herpetosoma (sous-genre–) 91
 Hétéroxène (parasite–) 29
 Histolysaïne 47
Histolytica (trophozoïte) 42
Histomonas meleagridis 78
 Historique
 amibiase 41
 leishmanioses 123
 maladie de Chagas 92
 maladie du sommeil 108
 paludisme 149
 Toxoplasma gondii 189
 trypanosomiasis 83
 Hôte
 réceptivité 31–32
 HPS-1 de Meyer (milieu–) 75
 Hypnozoïte 146
 de *P. ovale* 155
 de *P. vivax* 153

I

IgA
 dans l'amibiase 45, 49, 54
 dans la giardiase 74
 dans la toxoplasmose 195
 IgG
 dans l'amibiase 45, 49, 53
 dans la cryptosporidiose 184
 dans la giardiase 74, 75
 dans la maladie de Chagas 98
 dans la toxoplasmose 194, 195, 196
 dans le paludisme 159, 161, 162
 IgM
 dans l'amibiase 45, 53
 dans la maladie de Chagas 98
 dans la toxoplasmose 195, 196
 dans le paludisme 161
 IgM aspécifiques
 dosage 242
 du LCR 112
 sériques 112
 Immunodiffusion, voir Précipitation en gel

- Immuno-électrophorèse
 dans le diagnostic de la maladie de Chagas 99
 dans le diagnostic des leishmanioses 128
 technique 251
- Immunofluorescence indirecte
 dans l'amibiase 53
 dans la cryptosporidiose 184
 dans la leishmaniose 128
 dans la maladie de Chagas 98
 dans la maladie du sommeil 112
 dans la microsporidiose 212
 dans la pneumocystose 217
 dans le paludisme 166
 dans la toxoplasmose 195, 196
 technique 252
- Immunosorbent agglutination assay, voir ISAGA
- Immunotransfert, voir Western Blot
- Indicateur de pH (préparation) 232
- Indice plasmodique 173
- Indice splénique 173
- Indice sporozoïtique 172, 174
- Infection opportuniste 29, 182, 190, 209, 210, 216
- Infiltrats périvasculaires (dans la trypanosomiase) 110
- Insectes
 mâles stériles 261
 piégeage 262
- Insecticides
 formulation 260
 pulvérisations intra-domiciliaires 262
 toxicité 261
- Iodamoeba butschlii* 62
- Iodofénphos 260
- Iodoquinol 55
- Ipéca 41
- ISAGA
 dans le diagnostic de la toxoplasmose 196
 technique 250
- Iséthionate de pentamidine 116, 119, 129, 131, 132, 206, 218
- Isoenzyme 33
- Isolat 35
- Isopora belli* 182
- Itraconazole 129, 212
- Ivermectine 264
- J**
- Jones (milieu de-) 55, 226
- K**
- kala-azar 129
- Keister (milieu de-) 228
- Kérandel (signe de-) 111
- kératite amibienne 64
- Kétoconazole 129
- Kinétoplaste 23, 84–87
- KIVI (trousse- pour culture de trypanosomes) 98, 238
- Knobs 144, 162
- Kohn (coloration de-) 51, 223
- K-Othrine 259, 263
- Krebs (cycle de-) 88
- Kyste 22
 de *Balantidium coli* 67
 de *Besnoitia* 201
 de *Blastocystis* 219
 de *Chilomastix mesnili* 71
 de *Endolimax nana* 62
 de *Entamoeba coli* 61
 de *Entamoeba hartmanni* 60
 de *Entamoeba histolytica* 42, 44, 56
 de *Giardia* 73, 76
 de *Hartmanella* 64
 de *Iodamoeba butschlii* 62
 de *Naegleria* 63
 de *Pneumocystis* 215
 de *Sarcocystis* 199
 de *Toxoplasma gondii* 192, 193
- L**
- Lait 192
- Lampit® 99, 116
- Lanham (technique de-), voir Filtration
- Lariam® 168, 171
- Latex (agglutination de particules de-)
 dans l'amibiase 53
 dans la maladie du sommeil 112
 dans les leishmanioses 128
 technique 249
- Laverania* 138
- LCR
 dosage des IgM aspécifiques 112, 242
 dosage des protéines 112, 241
 numération cellulaire 112, 240
 recherche de parasites 63, 114, 241
- Leishmania* 86
aethiopica 132
amazonensis 132
archibaldi 129
brasiliensis 133
chagasi 129
donovani 129
guyanensis 133
infantum 129
major 131
mexicana 131
panamensis 133
peruviana 133
pifanoi 132
tropica 132
- tableau comparatif des espèces 135
- Leishmania* (sous-genre-) 125
- Leishmanine (intradermo-réaction à la-) 129, 130, 132, 133, 134
- Leishmanioses
 contrôle des- 134
 cutanées
 de l'ancien Monde 131–132
 du Nouveau Monde 132–134
 diagnostic des- 127, 128, 130, 131, 132
 viscérales 130–131
- Leptomonas* 85
- Lignée 35
- Lindane® 260
- Liquide céphalo-rachidien, voir LCR
- Lugol (coloration au-) 51, 221
- Lumsden (technique de-), voir Filtration
- Lutte
 contre les anophèles 262
 contre les glossines 263
 contre les phlébotomes 264
 contre les réduvidés 265
- Lutte antivectorielle 259
- Lutzomyia* 124
- Lysosomes 24
- M**
- Macrogamétocyte 139, 179
- Macronucléus 67
- Macrophage
 et *Leishmania* 127
 et *T. cruzi* 96
 et *Toxoplasma* 192
- Macroschizonte 207
- Maladie de Chagas 92–101
 diagnostic 98–99
 distribution géographique 99
 mode de transmission 100
 prévalence 100
 prévention 101
 stades cliniques 97
 traitement 99
- Maladie du sommeil
 à *T. gambiense* 109–118
 dépistage 117–118
 diagnostic 110–116
 modes de transmission 116
 sensibilité des techniques de diagnostic 115
 stades 109, 110
 à *T. rhodesiense* 118–119
- Malaria voir Paludisme
- Malathion 260
- Malnutrition (et *Plasmodium*) 152
- Malocide® 168

Maloprim® 169
 Mastigamoebida (ordre des-) 36, 71
 Matières fécales
 colorations extemporanées 221
 colorations permanentes 223
 concentration 222
 conservation 225
 culture 226
 examen à frais 221
 Maurer (taches de-) 158
 Méfloquine 168, 169, 170
 Méga
 colon 97
 oesophage 97
Megatrypanum (sous-genre-) 91
 Méiose 24
 Mel B 116
 Mélsarsoprol 116, 119
 MEM (milieu-) 229
 Membrane
 du protozoaire 21–23
 ondulante 85
 péritrophique 107
 Méningo-encéphalite
 amibienne primitive 63
 toxoplasmique 194
 Mépacrine® 75, 168
 Mérogonie 204, 210
 Méronte 209, 210, 211, 212
 Mérozoïtes
 de coccidies 179, 191
 de *Plasmodium* 139, 140
 Métacycliques (trypanosomes-) 86, 107
 Méthoprène 260
 Méthoxychlore 260
 Métroimidazole 55, 68, 75, 78, 212
 voir aussi Flagyl®
 Microgamétocyte 139, 179
 Micronème 137, 140
 Micronucléus 67
 Micropyle 181, 182
 Microschizonte 207
 Microspora (embranchement des-) 38
 Microsporida (ordre des-) 38, 209
 Microsporidiose 212
 Microtubule 25
 Miesscher (tube de-) 199
 MIF (conservation des selles) 52, 225
 Milieux de culture
 pour hémoflagellates 236–238
 pour *Plasmodium* 238
 pour protozoaires fécaux 226–230
 voir aussi noms de milieux
Minuta (trophozoïte) 42

Mitochondrie 23, 87
 Mitose 24
 Moelle osseuse (ponction) 127
 Monofluo kit (pour le diagnostic
 du paludisme) 165
 Monoxène (parasite-) 29
 Montenegro (intradermo-réaction de-)
 voir Leishmanine
 Moranyl® 116
 Mott (cellule de-) 110
 Moustiquaires imprégnées 176, 263
 Moustiques transgéniques 261

N

Naegleria 63
 Nagana 108
 Nageotte (cellule de-) 241
Nannomonas (sous-genre-) 89, 105
 Naxogyn® 78
 Nifurtimox 99, 116
 Nimorazole 78
 Nitrofurane 99
 Nitro-imidazoles 75, 99, 116
 Nivaquine® 168
Nosema (genre) 209, 212
 Noyau 24
 Numération
 de plasmodiums dans le sang 163
 des cellules dans le LCR 112, 240

O

Oocyste
 de *Cryptosporidium* 180
 d'*Eimeria* 180
 d'*Isospora* 180
 de *Plasmodium* 139, 145
 de *Sarcocystis* 199
 de *Toxoplasma gondii* 191
 Ookinète
 de *Babesia* 204
 de *Plasmodium* 139, 145
 de *Theileria* 207
 Opportuniste, voir Infection-
 Ordre (nomenclature) 36
 Organochlorés (insecticides-) 259
 Organophosphorés (insecticides-) 260
 Oriental Sore 132
 Ornidazole 55, 78
 Ornidyl® 116
 Ouchterlony, voir Précipitation en gel
 Ovalocyte (et *Plasmodium*) 143

P

Paludisme
 accès de- 151
 asymptomatique 151
 cérébral 162
 chimio prophylaxie 169
 contrôle 175–176
 diagnostic
 parasitologique 163–165
 sérologique 165–167
 tests hématologiques et biochimiques 167
 distribution géographique 154, 156, 157, 159
 épidémiologie
 incidence 175
 paramètres 171–175
 stabilité 175
 éradication 150
 historique 149
 immunité 160
 niveaux de parasitémie 151
 rechute 151, 154, 156
 recrudescence 151
 traitement 167–171
 vaccins 176
 Paludométrie 173–175
 Paludrine® 168
 Panmixie 34
 Pansporoblastique 210, 211
Panstrongylus 93
 Papier filtre (prélèvement sur-) 246
 Parasite
 définitions 29
 relations avec l'hôte 30–31
 PAS (coloration-) 233
 PBS (solution tamponnée) 247
 PBS tween 254
 PCR
 dans la leishmaniose 128
 dans le paludisme 165
 principe et procédure 245
 Pentacarinat®
 voir aussi Iséthionate de pentamidine
 Pentamidine
 Iséthionate de pentamidine
 Pentamidinisation 118
 Pentostam® 131
 Permas® 259
 Perméthrine 259, 263
 Phagocytose 22, 30
 chez les amibes 48
 Phagosome 22, 30
 Phénétique (méthode- et taxinomie) 34
 Phlébotomes 124
 lutte contre les- 264
 Pian-bois 133, 134, 135

- Piège (à glossines) 264
 Pigment malarien 143
 Pinocytose 22
 Pirodog® (vaccin antibabésiose) 206
 Piroplasmida (ordre des-) 37, 137, 203
 Piroplasmose 205
 Placenta et paludisme 162
Plasmodium
 antigènes de- 159, 176
 berghei 138
 caractères du genre 138
 effets généraux 161
 effets spécifiques 161
 falciparum 157–159
 culture 238
 malariae 156–157
 ovale 155–156
 schizogonie érythrocytaire 139, 140, 142–144
 schizogonie pré-érythrocytaire 139, 140, 146
 sporogonie 139, 141, 145–146
 vivax 153–155
Pneumocystis carinii 215
 culture *in vitro* 218
 Pneumocystose
 diagnostic 217
 et SIDA 218
 pathogénèse 217
 prévalence 218
 traitement 218
 Poche flagellaire 22, 87
 Polymerase chain reaction, voir PCR
 Précipitation en gel
 dans l'amibiase 53
 dans la maladie de Chagas 99
 dans les leishmanioses 128
 technique 250
 Précocène® 260
 Prémunition (dans le paludisme) 159
 Primaquine 168
 Procycliques (trypanosomes-) 86, 107
 Proguanil 168, 169
 Promastigote 85, 123, 125
 Propoxur 260
 Protubérances ("knobs") 144, 162
 Pseudokyste (chez *Toxoplasma*) 192
 Pseudopodes 26
Psychodopygus 124
 PVA (conservation des selles) 52
Pycnomonas (sous-genre-) 105
 Pyrèthre 259
 Pyrèthrinoides synthétiques 259
 Pyriméthamine 168, 170, 196, 198
- Q**
 Quantitative buffy-coat (QBC) 164, 234
 Quinacrine 75, 132, 168
 Quingasu 168
 Quinine 168, 169, 170, 171
 historique 149
 résistance à la- 170
- R**
 Radanil® 99
 Rate (dans le paludisme) 161, 173
 Rechutes (dans le paludisme) 151, 154, 156
 Recrudescence de parasitémie (dans le paludisme) 151
 Réduvidés 93, 94
 lutte contre les- 265–266
 Reproduction (chez les protozoaires) 26
 Répulsifs 262
 Réservoir
 de *Balantidium coli* 68
 de *Entamoeba histolytica* 56
 de *Giardia intestinalis* 76
 de *Leishmania* 124
 de parasites 29
 de *T. b. brucei* 108
 de *T. cruzi* 93
 de *T. gambiense* 116
 de *T. rhodesiense* 118, 119
 de *Toxoplasma gondii* 190
 Résistance au sérum humain des trypanosomes
 voir Blood incubation infectivity test
 Résistance médicamenteuse (mesure de la- dans le paludisme) 170
 Réticulum endoplasmique 23
 Retortamonadida (ordre des-) 36, 71
Retortamonas intestinalis 79
 Rhizopoda (embranchement) 37
Rhodnius, 93
 Rhoptrie 25, 33, 137, 140, 192
 Ribosomes 23
 Ritchie (technique de-) 51, 222
 Rochagas® 99
 Romaña (signe de-) 97
 Rovamycine® 196
 Rumen (ciliates du-) 69
- S**
 Sabin et Feldman (test de-) 195
 Safranine-bleu de méthylène (coloration-) 184, 224
 Salivaria 86
 classification 103
 comparaison des espèces et synthèse 120
- Sandfly 124
 Sang (mise en évidence des parasites du-)
 culture 236–240
 examen direct 231–232
 examen en frottis 231
 examen en goutte épaisse 231
 techniques de concentration 234–236
Sarcocystis sp 199
 Sargeant (coloration de-) 51, 222
 Schaudinn (fixateur de-) 223
 Schizogonie 26
 chez *Babesia* 204
 chez les microsporidies 210
 chez les plasmodiums 143
 chez *Theileria* 207
 pré-érythrocytaire chez *Plasmodium* 139, 146
 reproduction par- 26
 Schizonte 139, 140, 153, 155, 156, 158, 179, 191, 207, 210
 Schizonticide 167, 168, 170
 Schizopyrenida (ordre des-) 36, 59
Schizotrypanum (sous-genre-) 92
 Schüffner 153, 155
 Secnidazole 55, 75
 Selles, voir Matières fécales
 Sérum
 conservation des échantillons 246
 prélèvement 246, 247
 Sevin® 260
 Sicard et Cantaloube (méthode de-) 112, 241
 SIDA
 et leishmaniose 130
 et maladie de Chagas 97
 et toxoplasmose 194
 voir aussi Infection opportuniste
 Sinéfungine 212
 Sonde nucléique
 dans le paludisme 165
 principe 245
 Souche 35
 Spiramycine 185, 196
 Splénectomie (et babésiose) 205
 Splénomégalie
 dans la leishmaniose viscérale 130
 dans le paludisme 161, 173
 Spores (de microsporidies) 210
 Sporoblaste 210, 211, 212
 voir aussi Sporocyste
 Sporocyste 180, 186, 191, 199
 voir aussi Sporoblaste
 Sporonte 209, 210, 211, 212
 Sporonticide 168
 Sporoplasme 210, 212
 Sporozoïtes
 de *Babesia* 205

- de coccidie 179, 180, 186, 191, 199, 201
de *Plasmodium* 139, 145
de *Theileria* 207
- Stabilat 35
- Stercoraria 86
classification 91
- Stibogluconate de sodium 129, 131
- Strout (technique de-) 98
- Sulfadiazine 196, 198
- Sulfadoxine 168
- Sulfadoxine-pyriméthamine 169
- Sulfaméthoxazole 168, 182, 218
- Sulfamides 168
- Sulfones 168
- Sumithion® 260
- Suramine 116, 119
- Symbiose 29
- Syndrome d'immunodéficience acquise, voir SIDA
- T**
- Tabanidae (et transmission des trypanosomes) 104
- Tachyzoïte 190, 191, 192
- Tampons 232, 235, 247
- Taux d'inoculation (dans le paludisme) 172
- Taxinomie (méthodes de-) 34
- Tejeraia* (sous-genre-) 105
- Téméphos 260
- Tétracycline 168
- Theileria* sp. 207
- Theileriose
diagnostic 207
- Tiberal® 55, 78
- Tinidazole 55, 75, 78
- Tiques
genres transmettant *Babesia* 203
genres transmettant *Theileria* 207
- TNF (dans le paludisme) 161, 162
- Tobie (milieu de-) 88, 236
- Toxoplasma gondii*
circuits naturels 197
prévalence 198
stades chez l'hôte intermédiaire 191, 192
stades chez les félidés 190, 191
stades infectants 197
voies de pénétration 197
- Toxoplasmose
acquise 193
cinétique des anticorps dans la- 195, 196
congénitale 193
dépistage chez la femme enceinte 197
diagnostic
parasitologique 194
sérologique 195
- et SIDA 194
infections latentes 194
prophylaxie 198
- TPS avec hydrolysate de caséine (milieu-) 55
- TPS-1 de Diamond (milieu-) 75
- Transfusion
et maladie de Chagas 100, 101
et paludisme 171
- Transplacentaire
transmission- de *T. cruzi* 100
transmission- de *Toxoplasma gondii* 193
transmission- du paludisme 171
- Triatoma* 93
- Trichomonadida (ordre des-) 36, 71
- Trichomonas*
hominis 76
tenax 77
vaginalis 77
culture *in vitro* 229
- Trichomonase
diagnostic 77
traitement 78
transmission 78
- Triméthoprime 168, 182, 218
- Triple centrifugation du sang (technique de la-) 114
- Trophozoïte
de *Balantidium coli* 67
de *Entamoeba histolytica* 43
de *Giardia* 73
de *Naegleria* 63
de *Plasmodium* 140, 153, 155, 156, 157
de *Pneumocystis* 215
de *Toxoplasma* 191, 192
- Trypanide 111
- Trypanosoma* 85
brucei
brucei 106-108
gambiense 109-118
rhodesiense 118-119
tableau comparatif des 3 sous espèces 120
cruzi 92-96
evansi 104
lewisi 91
rangeli 105
theileri 91
- Trypanosomatida (ordre des-) 36
- Trypanosomatidae (famille des-)
classification 83
- Trypanosomiases
animales 91-92, 101, 103-108
humaines 92-101, 109-120
africaines, voir Maladie du sommeil
américaine, voir Maladie de Chagas
- Trypanozoon* (sous-genre-) 89, 103
- Trypomastigote 85, 86, 88, 92, 93, 94, 96, 106, 107
- Tsé-tsé (mouche-) 103
voir aussi Glossine
- Tubuline 25, 75
- Tumor necrosis factor, voir TNF
- TYI-S-33 (milieu-) 55, 226
- U**
- ulcère colique
à *Balantidium coli* 67
à *Entamoeba histolytica* 48
- Ulcère du Chiclero 133
- Urétrite 77
- Urine 77, 78, 100, 161, 167, 192, 197, 212
- Uta 133, 134, 135
- V**
- Vaccination
antipaludique 146, 176
contre la babésiose 206
dans la leishmaniose 135
- Vacuoles 24
- Vaginite 77
- Vapona® 260
- Variant 109, 112
- Vecteur 29
- Vestibulifera (ordre des-) 38
- Viannia* (sous-genre-) 125
- Vibramycine® 168
- Vinckeia* 138
- W**
- Western blot 255
dans l'amibiase 53
- Winterbottom (signe de-) 111
- Woo (Buffy-coat selon-) 98, 114, 234
- X**
- Xénodiagnostic 98, 115
- Z**
- Ziehl-Neelsen (coloration de-) 224
- Zoonose 29
- Zygote 24-26, 139, 179, 191, 204
- Zymodème 33
de *Entamoeba histolytica* 46, 48
de *Giardia* 74
de *Trypanosoma cruzi* 100

Universités francophones

E. CAUMES, J.A. ESTRADA, C. FRANCHIMONT, G.E. PIÉRARD
DERMATOLOGIE TROPICALE.

M. DANIS, J. MOUCHET
PALUDISME.

D. FASSIN, Y. JAFFRÉ
SOCIÉTÉS, DÉVELOPPEMENT ET SANTÉ.

M. GENTILINI, M. DUMAS
NEUROLOGIE TROPICALE.

P^R. LAPOINTE
SIDA, TRANSMISSION MÈRE-ENFANT.

B. LEBEAU
PNEUMOLOGIE.

G. RICHET
NÉPHROLOGIE.

M. ROSENHEIM, A. ITOUA-NGAPORO
*SIDA, INFECTION À V.I.H.,
Aspects en zone tropicale.*

F. THOMAS
CARDIOLOGIE.

J.-M. TOURANI, C. BOAZIZ, F. CAPRON, B. LEBEAU, B. MILLERON
LES CANCERS BRONCHIQUES À PETITES CELLULES.

À paraître

H. SANSARRICQ
LA LÈPRE.

Chez De Boeck-Université

J. BROSTOFF, G.K. SCADDING, D. MALE, I.M. ROITT
IMMUNOLOGIE CLINIQUE.

J. DARNELL, H. LODISH, D. BALTIMORE
BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE LA CELLULE, 2^e édition.

Chr. de DUVE
UNE VISITE GUIDÉE DE LA CELLULE VIVANTE.

L.P. GARTNER, J.L. HIATT
ATLAS D'HISTOLOGIE EN COULEURS, 2^e édition.

S.K. HOLGATE, M.K. CHURCH
ALLERGOLOGIE.

H.R. HORTON
PRINCIPES DE BIOCHIMIE.

D. MALE
*IMMUNOLOGIE
AIDE-MÉMOIRE ILLUSTRÉ.*

J.P. REVILLARD
IMMUNOLOGIE.

I.M. ROITT, J. BROSTOFF, D.K. MALE
IMMUNOLOGIE, 3^e édition.

J.D. WATSON, M. GILMAN, J. WITKOWSKI, M. ZOLLER
ADN RECOMBINANT, 2^e édition.

M. WÉRY
PROTOZOOLOGIE MÉDICALE.

PROTOZOOLOGIE MÉDICALE

• W É R Y •

Protozoologie médicale met en relief le comportement parasitaire chez l'homme d'une série de **microorganismes eucaryotes**.

Partant de la description détaillée du cycle évolutif, il insiste d'abord sur les **méthodes** mises au point pour repérer les parasites chez l'homme infecté grâce à leur morphologie, leur constitution antigénique ou leurs séquences génomiques. Il aborde ensuite leur étude au laboratoire incluant entretien de souches, lignées, clones, modèles expérimentaux ou culture.

Réservant une attention particulière à la **circulation** du parasite dans la **communauté** et présentant de manière critique les méthodes qui permettent d'en mesurer l'importance, l'ouvrage fournit enfin un inventaire des **médicaments actifs** et suggère quelques schémas thérapeutiques éprouvés.

Ce livre s'adresse aux professionnels des laboratoires de diagnostic médical et aux praticiens de la santé désirant acquérir une connaissance de base sur les parasites responsables d'endémies. Son côté didactique en fait un outil quotidien pour les étudiants en médecine et en sciences dans leur apprentissage de la biologie parasitaire.

Marc WÉRY

Docteur en médecine de l'Université catholique de Louvain, Ph.D. en parasitologie de la London School of Tropical Medicine, il a été responsable de l'Unité de parasitologie de l'Université nationale du Zaïre. Il est Professeur et Chef de service du Laboratoire de protozoologie à l'Institut de Médecine tropicale d'Anvers et enseigne la parasitologie à l'Université catholique de Louvain. Il est membre du réseau thématique de recherche Paludisme de l'AUFELF-UREF, dirigé par le Professeur M. Gentilini. Il est expert OMS et auteur ou coauteur de publications scientifiques touchant aux domaines de la parasitologie médicale, de l'épidémiologie, de l'immunologie, de la santé publique et de la thérapeutique.



250 FRF - 1480 BEF - 75 \$ CDN - Prix préférentiel UREF 60 FRF

ISBN 2-8041-2048-1



9 782804 120481

WERPRO B964
Diffusion Ellipses ou Edicef selon pays

58-4679-3