

# ANNALES DE PARASITOLOGIE

## HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 59

1984

N° 2

© Masson, Paris, 1984.

*Ann. Parasitol. Hum. Comp.*,  
1984, t. 59, n° 2, pp. 115-132.

### MÉMOIRES ORIGINAUX

#### ÉRYTHROCYTÉMIE ET SPLÉNOMÉGALIE AU COURS D'UNE INFECTION EXPÉRIMENTALE A *TRYPANOSOMA BRUCEI GAMBIENSE* CHEZ LA SOURIS

P. M. MULUMBA et M. WÉRY

**RÉSUMÉ.** L'existence des corrélations très significatives, notées entre différents couples de paramètres abordés dans cette étude (durée de l'infection, parasitémie, masse splénique et densité en GR circulants : érythrocytémie) ou entre l'effondrement de l'érythrocytémie et l'effet conjugué de l'accroissement de tous les autres paramètres, est un fait habituellement observé dans les trypanosomiasés africaines expérimentales comme le rapporte la littérature.

Dans le modèle subaigu de l'infection de la souris par *T. b. gambiense*, nous avons établi statistiquement qu'en absence de variation de l'érythrocytémie, toute corrélation entre l'accroissement de la masse splénique et celle de la parasitémie s'annule. Ce résultat suggère l'existence d'une interaction non négligeable, au cours de l'infection, entre l'évolution de la splénomégalie et la chute de l'érythrocytémie, sans pour autant nous permettre de dire si c'est l'activité érythro-phagocytaire de la rate qui a augmenté avec son hypertrophie ou l'inverse ?

L'influence de la splénectomie sur le syndrome considéré à priori comme étant de l'hypersplénisme, a été étudiée. L'amputation, par la même occasion, des fonctions érythropoïétiques et immunologiques de la rate, n'a contribué ni à l'amélioration du tableau clinique ni à la survie des animaux infectés. Chez les rongeurs, les fonctions de production et de destruction des GR sont assurées par le même organe, ce qui rend très complexe l'étude de l'influence de la splénectomie.

Pour conclure, nous nous sommes demandés, si la séquestration et la destruction par le SRE des GR sensibilisés par les antigènes parasitaires s'étend également à tous leurs précurseurs ? Dans quelle mesure la population érythroblastique de la moelle osseuse (ou de la rate chez les rongeurs) peut-elle être à l'abri de la destruction, lorsqu'elle est marquée *in situ* — comme elle ne peut manquer de l'être — par les antigènes trypanosomiens que concentrent activement ces organes majeurs du SRE ?

\* *Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen.*

Accepté le 5 juillet 1983.

### **Erythrocytaemia and splenomegaly in mice experimentally infested with *Trypanosoma brucei gambiense*.**

**SUMMARY.** In accordance with observations reported in the literature concerning experimental african trypanosomiasis, highly significant correlations were found between any pair of the following parameters : duration of infection, parasitaemia, spleen volume, number of erythrocytes, or between the sharp decrease of the number of erythrocytes and the combines effect of the increase of all other parameters.

In subacute *T. gambiense* infections in mice, it was statistically demonstrated that, in the absence of variation in numbers of erythrocytes, any correlation between the increase of spleen volume and of parasitaemia is repealed. This result suggests the existence of a clear interaction, in the course of the infection, between the development of splenomegaly and the drop of erythrocytaemia. However, it is not clear which one, of the erythrophagocytic activity or the hypertrophy of the spleen is the cause of the other.

The influence of splenectomy was studied, assuming that the anaemic syndrome was due to augmentation of the phagocytic activity. However, the suppression on that occasion of the erythrocytic and immunological activities of this important organ, did not produce any improvement in the course of the disease or a prolongation of the survival time of the infected animals. In rodents, the functions of production and of removal of erythrocytes are indeed performed by the same organ, so that no conclusions can be drawn from the splenectomy.

We also wondered whether the sequestration and destruction of red cells sensitized by the parasitic antigen could not be extended to immature cells of the erythroblastic line present in the bone marrow (and also in the spleen, in rodents), if, as could be assumed, these cells are coated « in situ » by the soluble antigens actively concentrated by these major effector organs of the reticulo-endothelial system.

---

## **Introduction**

Dans les trypanosomiasés africaines, humaines ou animales, les fortes parasitémiés sont presque toujours solidaires d'une importante hépato-splénomégalie et d'une destruction érythrocytaire grave (Losos et Ikede, 1972 ; Ikede *et al.*, 1978 ; Losos et Mwambu, 1978 ; Anosa, 1980 ; Morrison *et al.*, 1981 ; Wéry *et al.*, 1982).

Chez les rongeurs, si l'hypertrophie de la rate est la conséquence d'une formidable hyperplasie portant aussi bien sur la lignée lymphocytaire que sur la lignée érythrocytaire (Morrison *et al.*, 1981), dans quelle mesure la séquestration et la destruction des globules rouges (GR) sensibilisés par les complexes immuns circulants (CIC) peut-elle également contribuer à l'hypertrophie de cet organe ou réciproquement ?

Comme rien n'interdit a priori l'étude des relations corrélatives existant entre deux ou plusieurs paramètres quelconques sans préjuger sur l'éventualité des liens de causalité, nous avons voulu caractériser les corrélations qui existent chez la souris NMRI infectée par *Trypanosoma brucei gambiense* entre l'intensité de la destruction des GR, la densité en trypanosomes dans le sang, l'âge de l'infection et l'influence de la rate, composante majeure du système réticulo-endothélial (SRE).

## Matériel et méthodes

### HÔTES EXPÉRIMENTAUX

La population expérimentale constituée de 150 souris NMRI non consanguines, femelles, âgées de 6 semaines, nous a été délivrée par les élevages de la K.U. Leuven (Belgique).

### AGENT PATHOGÈNE

Le stabilat d'un clone de *Trypanosoma brucei gambiense* (ITMAP 021178 Mba AnTat 11.1, 44<sup>e</sup> passage après isolement chez l'homme), sorti de la cryothèque est, après contrôle de viabilité, inoculé par voie intrapéritonéale (IP) à deux souris préparées la veille à la cyclophosphamide, administrée à la dose de 300 mg par Kg par voie IP, pour servir de donneuses de trypanosomes.

### INFECTION

Trois jours après l'inoculation, le sang d'une des deux souris donneuses contenant environ 250 millions de trypanosomes par ml, est adéquatement soumis à une série de dilutions dans du tampon phosphate glucosé (Lanham, 1968) pour l'amener à la concentration d'environ 200 mille trypanosomes par ml de suspension. L'inoculum utilisé pour infecter chacune des souris de ces expériences contient environ 100 mille trypanosomes.

### ÉRYTHROCYTÉMIE

Le nombre de GR par microlitre d'un échantillon de sang de souris, prélevé à la queue de l'animal dans la première et la troisième expériences, ou à la veine cave inférieure (VCI) sur l'anticoagulant dans la seconde expérience, est, dans les deux cas, déterminée au Coulter Counter (Model Z<sub>B</sub>I-Biological). Pour la numération des GR de souris dont le volume (45 à 46 femtolitres, fl) est plus petit que ceux des humains (90 à 95 fl), la sonde de 70 microns d'orifice et les seuils suivants ont été utilisés : minimum 15 et maximum 75.

5 microlitres de sang aspirés par capillarité dans un tube calibré, sont aussitôt dilués en deux étapes pour atteindre une dilution finale de  $10^{-5}$  dans 20 ml de solution isotonique de NaCl (Isoton<sup>®</sup>). Les particules de 60 à 100 fl de volume comportant des érythrocytes, des leucocytes et des trypanosomes éventuels, présentes dans 500 microlitres de la suspension finale, sont dénombrées électroniquement dans un délai de 30 minutes. Une seconde numération de particules effectuée après hémolyse de GR par addition à la suspension de 6 gouttes d'une solution de saponine (Zapoin<sup>®</sup>), permet de déduire le nombre de GR présents par unité de volume de la suspension examinée ; le résultat obtenu, multiplié par le facteur 200, équivaut à l'érythrocytémie définie dans ce travail comme étant le nombre de GR par microlitre de sang. Les fortes dilutions utilisées permettent de minimiser les erreurs de passage en coïn-

cidence, c'est-à-dire des erreurs par défaut dues à la non discrimination des particules accolées ou étroitement voisines traversant simultanément l'orifice de la sonde de l'appareil.

#### SPLÉNECTOMIE

La splénectomie est effectuée sous anesthésie générale au Nembutal, administrée à la dose de 30 mg par Kg par voie IP.

#### PARASITÉMIE

La parasitémie a été déterminée par :

a) la méthode d'éluat de sang suivie de la concentration sur membranes des trypanosomes élués (Mulumba et Wéry, 1981). Un volume précis de sang parasité, 10 à 500 microlitres selon la richesse en trypanosomes de l'échantillon examiné à frais, est élué sur colonne de DEAE cellulose (Lanham, 1968 ; Lanham et Godfrey, 1970) ; aux 30 ml d'éluat recueillis, sont ajoutés 14 ml d'une solution tamponnée de formol à 3,7 %. Les trypanosomes fixés contenus dans une fraction bien déterminée de cet éluat, sont concentrés et colorés au Giemsa sur membrane d'acétate de cellulose et une simple numération de ceux-ci permet, après calcul, de déterminer leur concentration sanguine.

Cette méthode permet la détection des parasitémies mêmes inférieures à 100 trypanosomes par ml de sang (Lanham *et al.*, 1972 ; Van Meirvenne *et al.*, 1972) avec un coefficient de variation de 1,4 % environ (Mulumba et Wéry, 1981) ;

b) par « Matching Method » adaptée de la méthode proposée par Herbert et Lumsden (1976). La limite inférieure de détection de cette méthode est d'environ 25 mille trypanosomes par ml de sang systémique lorsque l'examen à frais, pratiqué sur une gouttelette d'un échantillon de sang prélevé à la queue, s'avère « négatif » pour 50 champs microscopiques au grossissement  $250 \times$  (Mulumba et Wéry, 1981).

#### PLAN EXPÉRIMENTAL

##### Expérience 1 :

30 souris infectées sont individuellement soumises à un contrôle hebdomadaire de la parasitémie effectuée par « Matching Method » et de l'érythrocytémie durant 13 semaines ; ces deux paramètres sont déterminés sur un échantillon de sang prélevé à la queue de l'animal. Un groupe de 10 souris non infectées, soumises aux mêmes manipulations, sert de témoin. L'évolution aussi bien individuelle que collective de la parasitémie et celle de l'érythrocytémie ainsi que les corrélations existant entre ces deux paramètres ont été analysées.

##### Expérience 2 :

Tous les 15 jours à partir de la date de l'inoculation, un échantillon de 9 souris extrait à l'aide d'une table des nombres au hasard d'une population expérimentale

de 100 souris infectées, a été sacrifié. Sur une période de 90 jours (1), 6 échantillons (le dernier comprenant 10 souris) soit 55 souris au total, ont été examinés au point de vue de la parasitémie (2), de l'érythrocytémie (3) et de la masse splénique (4).

#### Expérience 3 :

L'influence de la splénectomie sur l'évolution de la parasitémie et de l'érythrocytémie ainsi que sur le temps de survie, a été étudiée. Parmi vingt-six souris splénectomisées, dix-huit, choisies aléatoirement, ont été inoculées trois semaines plus tard et les autres ont servi de témoins. Les données individuelles concernant l'érythrocytémie et la parasitémie ont été relevées hebdomadairement durant onze semaines. Les comparaisons effectuées ont porté sur les groupes d'animaux infectés et non infectés, d'une part, et entre les animaux splénectomisés et non splénectomisés d'autre part. Le temps de survie des animaux infectés splénectomisés a été comparé à celui des animaux non splénectomisés.

#### ANALYSES STATISTIQUES.

La comparaison des moyennes a été effectuée par le test F de signification de Snedecor dans l'analyse de variance ou dans l'analyse de covariance à un ou à deux critères de classification selon le cas. Pour comparer les temps moyens de survie, on a égalisé les variances en prenant les inverses (transformation réciproque  $1/X$ ) des données observées (Lison, 1968).

L'étude des corrélations simples, partielles et multiples, ainsi que celle des composantes principales, ont permis de caractériser les relations existant entre les différents paramètres étudiés.

L'analyse en composantes principales, exécutée sur mini-ordinateur de bureau (Tandy TRS 80 modèle 1) à l'aide d'un logiciel approprié (Foucart, 1980), a permis de représenter graphiquement, dans un plan, les paramètres et les différents individus dans leurs rapports respectifs ; tandis que le calcul du taux d'éloignement biométrique (Defrise-Gussenhoven, 1955) a permis de connaître la probabilité de distribution de chacun des individus représenté dans le nuage des points, par rapport au centre de gravité de ce dernier.

Le seuil de probabilité (P) de 5 % a été choisi pour définir les différences significatives.

## Résultats

### A) EXPÉRIENCE 1 :

Dans les premières semaines de l'évolution de la maladie, la chute de l'érythrocytémie survenue à l'acmé de la parasitémie est, dans la plupart des cas, parfaitement surmontée comme l'illustre le relevé des parasitémies et des érythrocytémies effectué pour chaque individu durant 13 semaines (*fig. 1a et 1b*).

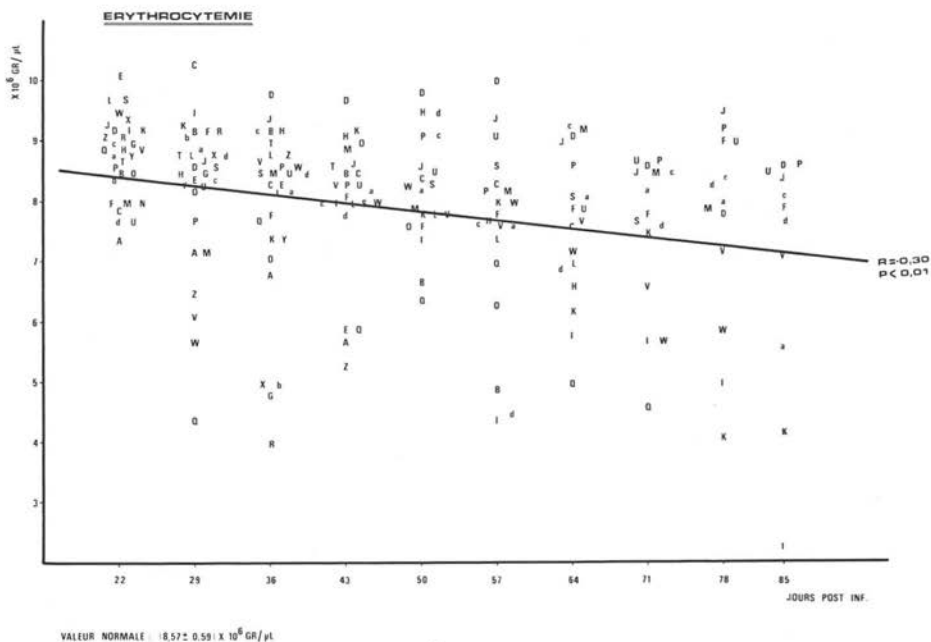


FIG. 1a.

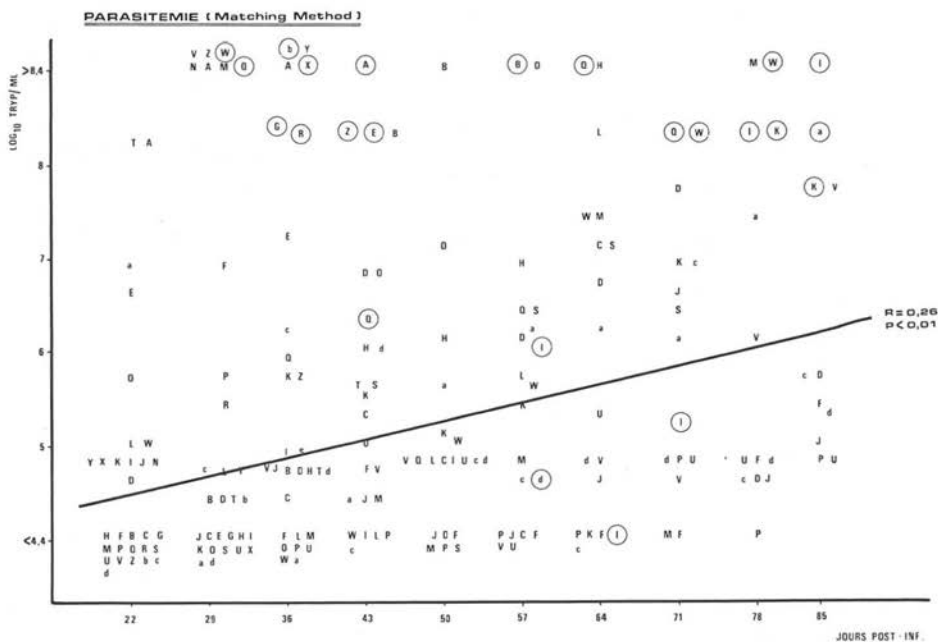


FIG. 1b.

Lorsque l'on suit l'évolution de chaque individu, on observe qu'entre les crises parasitémiques, les animaux, dans la plupart des cas, parviennent à reconstituer de façon remarquable leur capital érythrocytaire circulant. Malheureusement cette récupération n'est que de courte durée car les poussées parasitémiques subintrantes, caractéristiques du stade plus avancé de l'infection, rendent difficile toute récupération et les animaux finissent par succomber dans un tableau d'anémie aiguë solidaire d'une hyperparasitémie.

L'existence d'une variabilité importante de l'érythrocytémie et de la parasitémie entre périodes et entre individus a été observée (tableaux I et II). Globalement

TABLEAU I. — Étude des variations de l'érythrocytémie entre individus et entre périodes. (Expérience I.)  
— Analyse de variance bidimensionnelle.

Source de variation	SCE	ddl	CM	F	P
Entre individus	106,09	29	3,66	2,75	< 0,01
Entre périodes	42,98	9	4,78	3,60	< 0,01
(due à la régression linéaire)	(33,48)	(1)	33,48	25,21	< 0,01
(écart sur la régression)	(9,50)	(8)	1,19	0,89	> 0,05
Résiduelle	225,75	170	1,33		
Totale	374,82	208			

SCE = Somme des carrés des écarts par rapport à la moyenne

ddl = Degrés de liberté

CM = Carré moyen (CM = SCE/DL) ou estimation de la variance

F = Rapport de la variance factorielle sur la variance résiduelle

P = Probabilité

Les différences de l'érythrocytémie observées entre individus et entre périodes sont hautement significatives. L'allure de la décroissance de l'érythrocytémie est linéaire.

FIG. 1a. — Évolution de l'érythrocytémie individuelle d'un groupe de 30 souris infectées par *T. b. gambiense*. (Expérience 1.)

FIG. 1b. — Évolution de la parasitémie individuelle d'un groupe de 30 souris infectées par *T. b. gambiense*. (Expérience 1.)

Les 30 souris sont numérotées de (A) à (Z) et de (a) à (d). Malgré la dispersion importante des valeurs individuelles autour de la moyenne, on note l'accroissement de la parasitémie ainsi que la décroissance de l'érythrocytémie tous deux hautement significatifs. D'une période à l'autre, on note une importante fluctuation des valeurs individuelles de la parasitémie et de l'érythrocytémie ; les valeurs encerclées représentent un déficit de plus de 32 % en GR circulants par rapport aux témoins.

Certains individus présentent une basse parasitémie. Ce sont pour la plupart des cas des animaux ayant présenté la plus longue période de survie.

considéré (*tableau VII*) on note au cours du temps, une décroissance de la valeur moyenne de l'érythrocytémie ( $R = -0,30$ ) et un accroissement de la parasitémie ( $R = 0,26$ ) tous deux hautement significatifs. L'effondrement de l'érythrocytémie sous l'influence de la parasitémie est hautement significatif ( $R = -0,55$ ). Débarrassée de l'influence de la parasitémie par l'analyse de covariance (*tableau III*), les variations de l'érythrocytémie observées entre individus demeurent malgré tout hautement significatives, par contre, les variations entre périodes ne présentent plus de différence significative.

TABLEAU II. — Étude des variations de la parasitémie entre individus et entre périodes. (Expérience 1.)  
— Analyse de variance bidimensionnelle.

Source de variation	SCE	ddl	CM	F	P
Entre individus	164,98	29	5,69	1,83	< 0,01
Entre périodes	70,62	9	7,85	2,53	< 0,01
(due à la régression linéaire)	(52,39)	(1)	52,39	16,87	< 0,01
(écart sur la régression)	(18,23)	(8)	2,28	0,73	> 0,05
Résiduelle	527,99	170	3,11		
Totale	763,59	208			

Les différences de parasitémie observées entre individus et entre périodes sont hautement significatives. L'allure de l'évolution de la parasitémie est linéaire.

TABLEAU III. — Étude des variations de l'érythrocytémie (Y) en fonction de la parasitémie (X) entre individus et entre périodes. (Expérience 1.)  
— Analyse de covariance bidimensionnelle.

Source de variation	ddl	SCE Parasitémie	SPE	SCE Érythrocyt.	ddl	SCE Érythrocyt.	CM	F	P
Entre individus	29	164,98	— 69,15	106,09	29	77,31	2,67	2,70	< 0,01
Entre périodes	9	70,62	— 50,68	42,98	9	15,06	1,67	1,69	> 0,05
Résiduelle	170	527,99	— 176,46	225,75	169	167,48	0,99		
Totale	208	763,59	— 296,29	374,82	207	259,85			

SPE = Somme des produits des écarts

SCE<sub>Y•</sub> = Somme des carrés des écarts de la variable dépendante (Y) débarrassée de l'influence de la variable indépendante (X)

$$(SCE_{Y\bullet} = SCE_Y - \frac{SCE_{XY}}{SPE^2})$$

Débarrassées de l'influence de la parasitémie, les variations de l'érythrocytémie observées entre individus présentent des différences hautement significatives, contrairement à celles observées entre périodes.

TABLEAU IV. — Résultats de l'expérience 2.

P : Parasitémie ( $\log_{10}$  du nombre de trypanosomes par ml de sang prélevé à la VCI)  
 S : Masse splénique (en décigramme)  
 E : Érythrocytémie (nombre de GR en million par microlitre de sang prélevé à la VCI)  
 TE : Taux d'éloignement biométrique.

Durée de l'infection (en jours)	Numéro souris	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Moyenne	Écart Type	
15	S	4,1	4,5	5,1	12,8	6,0	4,3	6,8	3,5	3,8	5,66	2,88	
	P	6,4	6,3	4,9	8,3	4,1	6,0	6,5	6,2	6,9	6,18	1,18	
	E	7,8	7,5	7,1	6,0	8,1	9,0	7,4	7,7	8,2	7,64	0,83	
	TE	0,68	0,66	0,48	0,06	0,18	0,31	0,70	0,64	0,68			
30	Numéro souris	10*	11	12*	13+	14	15+	16	17	18			
	S	5,2	12,6	34,3	7,6	8,0	3,9	8,8	6,2	14,5	11,23	9,29	
	P	7,9	4,2	8,9	2,0	4,4	4,8	4,0	3,4	7,5	5,23	2,32	
	E	4,7	8,5	3,6	8,6	8,1	10,3	7,3	8,0	5,9	7,22	2,11	
	TE	< 0,001	0,06	< 0,001	< 0,01	0,40	< 0,01	0,50	0,14	0,24			
45	Numéro souris	19	20	21	22	23	24	25	26	27			
	S	5,3	12,1	19,4	14,1	8,4	10,0	8,0	4,8	6,1	9,80	4,75	
	P	4,6	4,5	5,7	5,8	4,5	4,2	5,1	4,7	5,7	4,98	0,61	
	E	9,0	7,0	4,9	7,2	6,9	6,8	7,7	8,3	8,0	7,31	1,16	
	TE	0,19	0,89	0,40	> 0,90	0,71	0,74	0,85	0,44	0,85			
60	Numéro souris	28	29	30	31	32*	33	34	35	36			
	S	13,1	20,2	16,4	8,9	25,3	14,4	8,1	10,1	12,4	14,32	5,60	
	P	6,6	7,1	7,2	6,4	8,8	6,4	4,4	7,4	4,5	6,53	1,39	
	E	7,7	6,3	5,3	7,8	4,0	8,7	8,5	7,3	7,2	6,98	1,53	
	TE	0,90	0,53	0,16	> 0,90	< 0,001	0,42	0,30	0,79	0,85			
75	Numéro souris	37	38	39*	40	41	42	43	44*	45			
	S	6,6	11,7	26,5	16,8	20,2	16,3	19,2	9,4	11,4	15,34	6,19	
	P	4,0	4,7	8,3	5,6	5,7	4,4	7,8	2,0	4,2	5,19	1,95	
	E	8,9	6,5	5,4	5,8	6,9	6,8	6,2	9,2	8,7	7,16	1,42	
	TE	0,06	0,52	0,02	0,68	0,89	0,82	0,27	< 0,001	0,14			
90	Numéro souris	46*	47*	48	49*	50	51*	52	53	54	55		
	S	18,4	22,6	17,0	32,1	21,8	35,2	11,1	17,5	4,2	19,0	19,89	9,04
	P	9,5	9,3	5,8	6,7	4,8	8,4	5,1	6,1	6,6	8,6	7,09	1,73
	E	6,1	5,1	6,5	5,4	6,9	3,8	7,8	8,4	8,4	6,9	6,53	1,48
	TE	< 0,01	0,001	0,64	0,04	0,56	< 0,001	0,36	0,30	0,10	0,13		

\*/\* : Individus éloignés du centre de gravité du nuage de points de façon significative ( $p < 0,05$ ) ou hautement significative ( $p < 0,01$ ). Huit de ceux-ci (15 % du total) présentent un effondrement (\*) de leur érythrocytémie concomitant à une hyperparasitémie et une splénomégalie importante tandis que trois autres individus (\*) (6 % du total) présentent des valeurs anormalement élevées de l'érythrocytémie, avec une parasitémie et une splénomégalie bien nettement inférieures aux valeurs moyennes de l'échantillon

## B) EXPÉRIENCE 2 :

Dans les infections expérimentales subaiguës, on est souvent, à l'autopsie, frappé par la congestion présentée par presque tous les viscères que domine incontestablement l'hypertrophie imposante de la rate. Dans les cas extrêmes, cet organe peut doubler plus de cinq fois son poids.

Les résultats de cette expérience sont présentés dans le *tableau IV*. Leurs analyses ont mis en évidence l'existence de nombreuses corrélations très significatives entre différents couples de variables étudiées à savoir : la parasitémie, la masse splénique, la durée de l'infection et l'érythrocytémie (*tableau Va*) ; elles appellent quelques commentaires :

1) Le coefficient de corrélation linéaire simple, qui est hautement significatif entre la parasitémie et la splénomégalie ( $R = 0,53$ ) s'annule lorsqu'interviennent d'autres paramètres en l'espèce, l'érythrocytémie et la durée de l'infection, maintenus constants par l'analyse des corrélations partielles (*tableau Vb*).

2) L'érythrocytémie diminue de façon hautement significative en fonction de la parasitémie ( $R = -0,65$ ) et de la masse splénique ( $R = -0,75$ ) et de façon significative en fonction de la durée ( $R = -0,21$ ). Tout autre chose restant égale, on constate, d'une part, que l'augmentation de la masse splénique en fonction de la parasitémie s'annule et que, d'autre part, la tendance à la diminution de l'érythrocytémie en fonction de la durée de l'infection s'inverse (*tableau Vb*).

TABLEAU V. — Coefficients de corrélation entre la durée de l'infection, la parasitémie, la masse splénique et l'érythrocytémie. (Expérience 2.)

a) *Coefficients de corrélation linéaire simple*

	Durée	Parasitémie	Masse splénique	Érythrocytémie
Durée	1	0,18	0,56**	— 0,21*
Parasitémie		1	0,53**	— 0,65**
Masse splénique			1	— 0,75**
Érythrocytémie				1
ddl = 53		$R_{0,05} = 0,2236$	$R_{0,01} = 0,3468$	

b) *Coefficients de corrélation linéaire partielle*

	Durée	Parasitémie	Masse splénique	Érythrocytémie
Durée	1	0,02	0,61**	0,34**
Parasitémie		1	0,04	— 0,44**
Masse splénique			1	— 1,67**
Érythrocytémie				

\* Corrélation significative ( $P < 0,05$ )

\*\* Corrélation hautement significative ( $P < 0,01$ )

- 3) La chute de l'érythrocytémie peut être expliquée pour près de 70 % de variation à partir du coefficient de détermination multiple ( $R^2 = 0,69$ ) faisant intervenir simultanément la durée de l'infection, l'intensité de la parasitémie et l'importance de la splénomégalie. Le coefficient de corrélation multiple correspondant ( $R = -0,83$ ) est de très haute signification.
- 4) Deux premières composantes principales condensant 86 % d'informations (variance totale) exprimées par les quatre paramètres étudiés, ont été caractérisés (fig. 2) ; elles représentent deux axes d'évolution absolument indépendants.

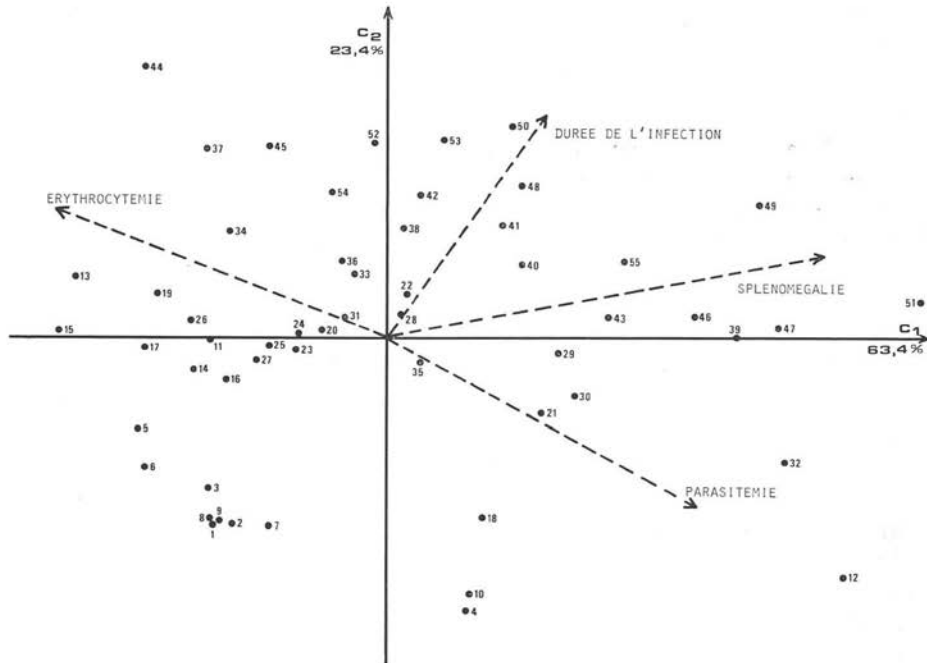


FIG. 2. — Projection des 55 souris examinées au point de vue de leur parasitémie, érythrocytémie et masse splénique au cours d'une trypanosomiase expérimentale à *Trypanosoma brucei gambiense* durant 90 jours d'évolution. (Expérience 2.)

Analyse en composantes principales.

Le point de croisement des deux composantes principales est le centre de gravité du nuage de points projetés ; il correspond à la moyenne respective de chaque paramètre étudié (centroïde). La proximité des points traduit leur similitude et celle des paramètres l'intensité de leur corrélation.

On note sur la première composante ( $C_1$ ), la nette opposition entre l'érythrocytémie et les autres paramètres, et sur la deuxième composante celle de la parasitémie et les autres paramètres. 16 % d'animaux sont fortement parasités : ils présentent une importante splénomégalie et une anémie profonde ; ce sont pour la plupart des cas, des animaux autopsiés vers la fin de l'expérience et ils sont nettement projetés à droite du centroïde dont ils s'éloignent de façon hautement significative selon la première composante principale.

Autour de la seconde composante ( $C_2$ ), sont groupés les animaux sans anémie importante et présentant une parasitémie et une splénomégalie modérées.

A gauche du centroïde, se retrouvent les animaux ayant une parasitémie et une splénomégalie très peu importante avec une érythrocytémie presque normale : la majorité d'animaux sacrifiés en première période de l'évolution sont rassemblés dans cette zone.

La première composante principale représentant 63 % de variance totale, oppose nettement l'évolution de l'érythrocytémie à celle des autres paramètres. Par ordre décroissant d'intensité, elle se trouve liée de façon hautement significative à la masse splénique ( $R = 0,91$ ), à l'érythrocytémie ( $R = -0,87$ ), à la parasitémie ( $R = 0,77$ ) et à la durée de l'infection ( $R = 0,56$ ).

La seconde composante principale représentant 23 % de variance totale, oppose l'évolution de la parasitémie à celle des autres paramètres ; elle est liée de façon hautement significative à la durée de l'infection ( $R = 0,80$ ) et à la diminution de la parasitémie ( $R = -0,42$ ), de façon significative à l'augmentation de l'érythrocytémie ( $R = 0,32$ ) et de façon non significative à la masse splénique.

La mesure du taux d'éloignement biométrique montre que 20 % d'individus (11 cas sur 55) sont éloignés du centroïde de façon hautement significative. Parmi eux, on distingue, d'une part les individus présentant un effondrement hautement significatif de l'érythrocytémie (8 cas sur 11) solidaire d'une parasitémie et d'une splénomégalie importantes, et d'autre part, des individus montrant une érythrocytémie anormalement élevée avec une parasitémie et une splénomégalie discrètes (3 cas sur 11).

TABLEAU VI. — Moyenne générale de l'érythrocytémie et de la parasitémie des animaux splénectomisés et non splénectomisés. (Expérience 3.)

Durée d'observation (Jours)	Groupe non infecté		Groupe infecté	
	Splénectomisés	Non splénectomisés	Splénectomisés	Non splénectomisés
46	7,58 ± 0,77 (8)	8,49 ± 0,34 (10)	7,23 ± 0,53 [4,47 ± 1,46] (18)	7,88 ± 1,48 [5,10 ± 2,18] (24)
53	7,13 ± 0,42 (8)	8,57 ± 0,59 (10)	6,91 ± 0,59 [5,21 ± 1,38] (18)	8,10 ± 0,90 [5,43 ± 1,89] (20)
60	7,04 ± 0,63 (8)	8,36 ± 0,47 (10)	6,86 ± 0,67 [5,11 ± 1,46] (17)	7,45 ± 1,51 [5,20 ± 1,82] (20)
67	7,02 ± 0,92 (80)	8,44 ± 0,54 (10)	6,73 ± 0,04 [5,36 ± 1,84] (15)	7,51 ± 1,22 [5,67 ± 2,10] (18)
74	7,57 ± 0,53 (8)	8,65 ± 0,49 (10)	7,18 ± 0,70 [4,83 ± 1,68] (12)	7,42 ± 1,29 [5,83 ± 1,70] (15)

1) L'érythrocytémie est exprimée en million de G.R. par  $\mu$ l de sang. Par rapport aux témoins, notez l'effondrement plus marqué de l'érythrocytémie dans les deux groupes d'animaux splénectomisés, infectés et non infectés que dans le groupe d'animaux infectés non splénectomisés ;

2) Les parasitémies (valeurs mises entre crochets) observées dans les groupes splénectomisé et non splénectomisé, ne présentent pas de différence significative ;

3) Le temps de survie des souris infectées splénectomisées et celui des souris non splénectomisées (les effectifs respectifs sont mis entre parenthèses) ne présentent pas de différence significative.

C) EXPÉRIENCE 3 :

La splénectomie entraîne une déplétion significativement importante et persistante de l'érythrocytémie, confirmant bien le rôle de la rate dans l'érythrocytémie chez les rongeurs (*tableaux VI et VIII*).

La fluctuation de l'érythrocytémie sous l'influence de la parasitémie semble significativement plus importante dans le groupe des souris non splénectomisées que dans le groupe splénectomisé (*tableaux VI et VIII*) : les souris splénectomisées infectées et non infectées ne présentent pas de différence significative au point de vue de leur érythrocytémie.

On a également observé, seulement dans le groupe des souris non splénectomisées, contrairement au groupe splénectomisé, que l'accroissement de la parasitémie et la décroissance de l'érythrocytémie semble évoluer corrélativement avec la durée de l'infection de façon hautement significative (*tableau VII*) ; aussi bien dans le

TABLEAU VII. — Étude des coefficients de corrélation linéaire simples, partiels et multiples existant entre la durée de l'infection, la parasitémie et l'érythrocytémie établis sur 2 groupes d'animaux infectés splénectomisés (valeurs mises entre parenthèses) et non splénectomisés.

a) Coefficients de corrélation linéaire simple

	Durée	Parasitémie	Érythrocytémie
Durée	1	0,26** (0,09)	— 0,30** (— 0,09)
Parasitémie		1	— 0,55** (— 0,50**)
Érythrocytémie			1

b) Coefficients de corrélation linéaire partielle

	Durée	Parasitémie	Érythrocytémie
Durée	1	0,12 (0,05)	— 0,19 (— 0,05)
Parasitémie		1	— 0,52** (— 0,50**)
Érythrocytémie			1

c) Coefficient de corrélation multiple liant l'érythrocytémie aux 2 autres paramètres :

- souris infectées non splénectomisées : R = — 0,57\*\*
- souris infectées splénectomisées : R = — 0,50\*\*

\*\* Corrélation hautement significative

Les coefficients de corrélation relatifs au groupe d'animaux infectés splénectomisés sont mis entre parenthèses. Ces coefficients ont été déterminés à partir de la totalité de mesures individuelles relevées durant la période d'observation : 80 mesures pour le groupe infecté splénectomisé (Expérience 3) et 209 mesures pour le groupe infecté non splénectomisé (Expérience 1).

groupe splénectomisé que non splénectomisé, la chute de l'érythrocytémie sous l'influence conjuguée de l'augmentation de la parasitémie et de la durée de l'infection est hautement significative (*tableau VII*).

Le nombre relatif de survivants et de morts ne diffère pas significativement entre les populations de souris infectées splénectomisées et non splénectomisées après 13 semaines d'évolution ( $Khi\text{-carré} = 0,82$ ), ainsi que leur temps de survie respectif (*tableau IX*) même si la mortalité semble plus précoce chez les souris non splénectomisées (*tableaux VI et IX*).

TABLEAU VIII. — Analyse de variance de l'érythrocytémie (moyenne individuelle) des souris infectées et non infectées, splénectomisées et non splénectomisées. (Expérience 3.)

Source de variation	SCE	ddl	CM	F	P
Entre tous les groupes	86,88	3	28,96	51,71	< 0,01
1. Souris infectées versus souris non infectées	(51,71)	(1)	51,71	92,34	< 0,01
2. Souris non infectées splénectomisées versus non splénectomisées	(6,81)	(1)	6,81	12,16	< 0,01
3. Souris infectées splénectomisées versus non splénectomisées	(28,36)	(1)	28,36	50,64	< 0,01
Résiduelle	34,47	62	0,56		
Totale	121,35	65			

1) Il existe une différence significative entre les groupes de souris infectées et non infectées, splénectomisées et non splénectomisées.

2) Les souris non infectées présentent une érythrocytémie hautement significative-ment plus élevée que celle des souris infectées.

3) Chez les témoins non infectés, les souris splénectomisées présentent un effondrement hautement significatif de leur érythrocytémie.

4) Chez les souris infectées, l'effondrement de l'érythrocytémie est hautement significativement plus importante chez les souris splénectomisées.

5) Les souris splénectomisées, infectées et témoins, ne semblent pas présenter de différence significative au point de vue de leur érythrocytémie moyenne ( $F < 1$ ;  $P > 0,05$ ).

TABLEAU IX. — Analyse de variance du temps de survie des souris infectées splénectomisées et non splénectomisées (transformation  $1/x$  des données).

Source de variation	SCE	ddl	CM	F	P
Entre les groupes	0,0002	1	0,0002	2,33	> 0,05
Résiduelle	0,0048	46	0,0001		
Totale	0,0050	47			

Dans cette étude, on n'observe pas de différence significative entre le temps de survie des souris infectées splénectomisées et non splénectomisées.

## Discussion

Les paramètres explicatifs abordés dans cette étude, malgré leur pertinence, sont loin d'épuiser la problématique de la destruction érythrocytaire au cours des trypanosomiases.

L'étude des coefficients de corrélation linéaire établis entre deux variables peut quelquefois conduire à des conclusions contradictoires qui ne doivent pas nous surprendre surtout lorsque l'on fait intervenir un ou plusieurs autres paramètres dont l'influence est maintenue constante : la valeur de ces coefficients établis entre deux variables peut s'inverser ou même s'annuler. Ce fait doit particulièrement nous inciter à plus de prudence lorsque nous limitons nos analyses uniquement au niveau de la corrélation linéaire simple de Bravais-Pearson. On se rappellera aussi que deux variables peuvent bien présenter une corrélation linéaire nulle alors qu'elles sont fortement liées de façon non linéaire (Dagnélie, 1975 ; Lefèbvre, 1980).

L'augmentation hautement significative de la masse splénique en fonction de la parasitémie s'annule lorsque la durée de l'infection et l'érythrocytémie sont maintenues constantes. Si ce résultat suggère que l'hypertrophie splénique est fortement liée à la destruction des GR circulants, il ne nous indique pourtant pas lequel des deux paramètres agit sur l'autre ou s'il existe une interaction entre eux. La diminution hautement significative de l'érythrocytémie en fonction de la durée de l'infection, s'inverse lorsque l'influence de la parasitémie et celle de la splénomégalie sont annulées. Ce résultat, corroboré par l'analyse en composantes principales, suggère l'existence sous-jacente d'une érythropoïèse non encore décompensée chez la plupart des animaux de cette étude.

Si l'évolution de la première composante traduit la phase de recrudescence de l'affection dans laquelle se trouve une partie de la population, celle de la seconde composante correspondrait donc à la phase de rémission dans laquelle se situe l'autre partie ; et au niveau de chaque individu, elles traduiraient l'existence des deux forces antagonistes qui sous-tendent le développement de la maladie.

Les mécanismes pathogéniques de la destruction des GR sont multiples et complexes ; ils semblent devoir être induits et entretenus dans tous les cas par la seule présence d'antigènes parasitaires dans différents compartiments de l'organisme de l'hôte vertébré.

Parmi les hypothèses proposées, Tizard *et al.* (1978) ont fait ressortir le rôle des acides gras libres, tel l'acide linoléique, libérés par la lyse des trypanosomes et dont l'activité hémolytique serait évidemment proportionnelle au nombre de trypanosomes détruits. Par ailleurs Kobayashi *et al.* (1976), ayant mis en évidence la présence des CIC absorbés à la surface externe des GR, ont proposé la théorie de la séquestration suivie de la destruction principalement dans les organes majeurs du SRE, des GR sensibilisés et fragilisés par les CIC constitués d'antigènes parasitaires, d'anticorps correspondants et du complément. Or, dans les trypanosomiases africaines, il semble établi que la présence d'antigènes parasitaires dans les CIC soit un fait inconstant : ce seraient surtout des IgG et IgM complexées aux anticorps anti-idiotypiques corres-

pondants qui y sont régulièrement retrouvées ; de plus, la densité sanguine en CIC ne semble guère évoluer corrélativement avec la parasitémie (Lindsley *et al.*, 1981). A côté de tous ces mécanismes, Kobayakawa *et al.* (1979) ont montré l'existence d'une réponse autoimmune directement dirigée contre les GR et qui évoluerait parallèlement à l'activation des lymphocytes B et proportionnellement à la parasitémie.

Bien que subsistent encore des controverses à son propos, on peut également invoquer l'inadaptation de la réponse érythropoïétique à la destruction des GR comme cause d'aggravation — du moins en ce qui concerne les bovidés (Dargie, 1979 ; Anosa, 1980). Chez ces derniers, contrairement à ce qui s'observe chez les rongeurs (Jennings *et al.*, 1974), l'absence quasi totale de réticulocytose contraste avec l'hyperplasie de la lignée rouge.

Selon les observations faites chez les bovidés au stade ultime de l'affection, une hémodilution dont le mécanisme intime demeure encore inconnu, surviendrait quelquefois ; elle peut être accompagnée ou non d'une hypervolémie et a obligatoirement comme conséquence un effondrement fatal de l'hématocrite (Dargie *et al.*, 1979 ; Maxie et Valli, 1979 ; Anosa, 1980).

L'étude conduite par Dargie *et al.* (1979) sur l'évolution de l'érythrocytémie chez les bovidés N'dama et Zébu infectés expérimentalement par *Trypanosoma congolense*, illustre bien la complexité des interactions hôte-parasite. En effet, les N'dama, contrairement aux Zébus, manifestent une trypano-tolérance évidente, caractérisée, d'une part, par le maintien de la parasitémie à un niveau très bas et, d'autre part, par une réponse médullaire et un métabolisme martial compensant efficacement la destruction des GR.

On ne trouve pas dans la littérature une réponse satisfaisante à la question réciproque consistant à savoir si, à parasitémie égale et pour un hôte déterminé, un type donné de trypanosome est plus anémiant qu'un autre.

A la lumière des données de la littérature, on peut considérer que les trypanosomiasés aiguës réalisent un syndrome d'hypersplénisme typique comportant : (1) une splénomégalie, (2) une intense hyperplasie des organes érythropoïétiques, (3) une pancytopenie périphérique et (4) de façon inconstante, une réticulocytose chez les rongeurs ou une réticulocytémie normale ou à peine élevée chez les bovidés (Jeannings *et al.*, 1974 ; Dargie *et al.*, 1980).

Le syndrome d'hypersplénisme qui s'établit dans les trypanosomiasés africaines, est-il ou n'est-il pas un facteur d'aggravation de l'état d'anémie ?

Chez la souris NMRI, l'état d'anémie ne semble guère être améliorée par la splénectomie. Au contraire cette intervention qui prive l'organisme d'un organe érythropoïétique important, se traduit par une chute importante et persistante de l'érythrocytémie.

S'il est admis que les organes du SRE séquestrent et détruisent les GR rendus fragiles et/ou non reconnaissables comme soi par les CIC qui marquent leur surface (Kobayashi *et al.*, 1976), peut-on généraliser cette hypothèse en l'appliquant aux précurseurs des GR ?

Pourquoi le pouvoir de concentration des antigènes parasites et des CIC par la rate et la moelle osseuse (Diffley et Jayawardena, 1982) n'amènerait-il pas celles-ci à étouffer, pour ainsi dire dans l'œuf, tous les précurseurs des GR sensibilisés *in situ* ?

REMERCIEMENTS. Nous sommes redevables envers le Docteur Andrée Beckers, Mademoiselle Pura Roca, Madame Sabine Desager, Messieurs Luc Hendrix et Jan Weyn pour l'aide amicale qu'ils nous ont fournie.

Nous remercions sincèrement le Professeur R. Vlietinck du Département de Génétique des Populations de la K.U. Leuven pour les précieux conseils qu'il nous a prodigués, pour l'analyse statistique et l'interprétation de nos données.

BIBLIOGRAPHIE

- ANOSA V. O. : Studies on the parasitaemia plasma volumes, leucocyte and bone marrow cell counts, and the moribund state in *Trypanosoma brucei* infection of splenectomised and intact mice. *Z. bl. Vet. Med. B.*, 1980, 27, 169-180.
- DAGNELIE P. : L'analyse statistique à plusieurs variables. *Les Presses agronomiques de Gembloux*, 1975.
- DARGIE J. D., MURRAY P. K., MURRAY M., MCINTYRE W. I. M. : The blood volumes and erythrokinetics of Ndama and Zebu cattle experimentally infected with *T. brucei*. *Res. Vet. Sci.*, 1979, 26, 245-247.
- DARGIE J. D. : Erythropoietic response in bovine trypanosomiasis. Pathogénicité des trypanosomes. Compte rendu d'un atelier tenu à Nairobi, Kenya, 20-23 novembre 1978, pp. 128-134 (paru en 1979).
- DEFRISE-GUSSENHOVEN E. : Ellipses équiprobables et taux d'éloignement en biométrie. *Bull. Inst. R. Sci. Nat. Belgique*, 1955, 31, 1-31.
- DIFLEY P., JAYAWARDENA A. N. : Surface coat antigen of *Trypanosoma brucei brucei* : its clearance from blood and concentration in organs of normal, infected and immune mice. *Infect. Immun.*, 1982, 35, 173-178.
- FOUCART T. : Analyse factorielle : Programmation sur micro-ordinateurs. *Masson*, Paris, 1982.
- HERBERT W. J., LUMSDEN W. H. R. : *Trypanosoma brucei* : a rapid matching method for estimating the host's parasitaemia. *Exp. Parasitol.*, 1976, 40, 427-431.
- IKEDE B. O., LULE M., TERRY R. S. : Anaemia in trypanosomiasis : mechanisms of erythrocyte destruction in mice infected with *T. congolense* or *T. brucei*. *Acta Trop.*, 1977, 34, 53-60.
- JENNINGS F. W., MURRAY P. K., MURRAY M., URQUHART G. M. : Anaemia in Trypanosomiasis : studies in rats and mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Res. Vet. Sci.*, 1974, 16, 70-76.
- KOBAYAKAWA T., LOUIS J., IZUI J., LAMBERT P. H. : Autoimmune response to DNA, red blood cells, and thymocyte antigens in association with polyclonal antibody synthesis during experimental African Trypanosomiasis. *J. Immunol.*, 1979, 122, 296-301.
- KOBAYASHI A., TIZARD I. R., WOO P. T. K. : Studies on the anaemia in experimental African Trypanosomiasis. II. The pathogenesis of the anaemia in calves infected with *T. congolense*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1976, 25, 401-406.
- LANHAM S. M. : Separation of Trypanosomes from the blood of infected rats and mice by anion-exchangers. *Nature*, 1968, 218, 1273-1274.
- LANHAM S., GODFREY D. G. : Isolation of salivarian Trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.*, 1970, 28, 521-530.
- LANHAM S., WILLIAMS J. E., GODFREY D. G. : Detection of low concentration of Trypanosomes in blood by Columns separation and membrane-filtration. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1972, 66, 624-627.
- LEFEBVRE J. : Introduction aux analyses statistiques multidimensionnelles, 2<sup>e</sup> édit., *Masson*, Paris, 1980.
- LINDSLEY H. B., JANECEK L. L., GILMAN-SACHS A. M., HASSANEIN K. M. : Detection and composition of immune complexes in experimental African Trypanosomiasis. *Infect. Immun.*, 1981, 33, 407-414.
- LISON L. : Statistique appliquée à la Biologie expérimentale. *Gauthier-Villars*, Paris, 1968.
- LOSOS G., IKEDE B. O. : Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *Vet. Pathol.*, 1972 (suppl.), 9, 1-71.

- LOSOS G. J., MWAMBU P. M. : Organ and tissue weights in diseases caused by *T. vivax* and *T. congolense*. Pathogenicity of trypanosomes. Proceeding of a workshop held at Nairobi, Kenya, 20-23 November 1978.
- MAXIE M. G., VALLI V. E. O. : Hemodilution in bovine trypanosomiasis. Dans : Losos G. et Chouinard A. (eds.) La pathogénicité des trypanosomes. Compte-rendu d'un atelier tenu à Nairobi, Kenya, 20-23 novembre 1978 (paru en 1979).
- MORRISON W. I., MURRAY M., BOVELL D. L. : Response of the Murine lymphoid system to a chronic infection with *Trypanosoma congolense*. I. The spleen. *Lab. Invest.*, 1981, 45, 547-557.
- MULUMBA P. M., WÉRY M. : Méthodes pour un contrôle plus précis de l'évolution de la trypanosomiase expérimentale à *Trypanosoma brucei gambiense* chez la souris. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 1981, 61, 31-55.
- TIZARD I. R., HOLMES W. L., NIELSEN K. : Mechanisms of anemia in trypanosomiasis : studies on the role of the hemolytic fatty acids derived from *Trypanosoma congolense*. *Tropenmed. Parasit.*, 1978, 29, 108-114.
- VAN MEIRVENNE N., JANSSENS P. G., MAGNUS E., MOORS A. : Column separation and membrane filtration : a routine method for the detection of African Trypanosomes in human blood. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 1972, 53, 109-112.
- WÉRY M., MULUMBA P. M., LAMBERT P. H., KAZYUMBA L. : Hematologic manifestations, diagnosis and immunopathology of African Trypanosomiasis. *Sem. Hematol.*, 1982, 19, 83-92.
-