

**MORPHOMÉTRIE CONVENTIONNELLE ET ANALYTIQUE
AU MOYEN DE L'ORDINATEUR IBAS-1
DANS L'INFECTION EXPÉRIMENTALE
AVEC *TRYPANOSOMA B. BRUCEI***

J. A. DE DIEGO, A. HIGUERAS, C. GAMALLO, R. F. MAYER,
J. REY CALERO

RÉSUMÉ. Une étude morphométrique comparative a été réalisée dans une infection expérimentale avec *Trypanosoma b. brucei* en utilisant deux méthodes morphométriques, l'une conventionnelle (microscopique) et l'autre au moyen d'un ordinateur IBAS-1. La souche de *T. b. brucei* utilisée a été maintenue pendant 10 ans en laboratoire par des passages mécaniques de souris à souris.

L'administration d'une dose réduite de suramine agit sur le nombre des formes rencontrées.

Les résultats des études morphométriques varient selon la technique utilisée.

La présence des formes postéronucléaires, multinucléaires et « stumpy » en division a été confirmée pour notre souche et l'administration de doses réduites de suramine a augmenté de manière considérable le nombre de ces formes.

Mots-clés : Étude morphométrique. Suramine. Trypanosomes.

Conventional morphometry and analytic morphometry with the IBAS-1 (image basic analytic system) in the experimental infection with *Trypanosoma b. brucei*.

SUMMARY. A comparative morphometrical study of the experimental infection with *T. b. brucei* was realized using the conventional method and the IBAS-1 analytic computer.

The studied strain of *T. b. brucei* was preserved during 10 years in laboratory conditions, through inoculations from mice to mice.

The effect of a low dose of suramin upon the percentage of different morphological forms of the parasite was analysed and compared with the untreated lots.

Certain differences could be appreciated in the results of the two methods of morphometrical studies.

The presence of posteronuclear, multinuclear and « stumpy » dividing forms was confirmed in our study.

The administration of low doses of suramin produces a serious increase of the number of the dividing, multinuclear and « stumpy » forms.

Key-words : Morphometrical study. Suramin. Trypanosomes.

Laboratorio de Parasitología, Departamento de Medicina Social y Preventiva, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Calle de Arzobispo Morcillo n° 4, 28029-Madrid, Espana.

Accepté le 3 mars 1987.

Introduction

Une des principales caractéristiques des trypanosomes appartenant au groupe Brucei est leur pléomorphisme, bien qu'il s'agisse de trypanosomes du groupe *Salivaria* maintenus longtemps en laboratoire et qui pourraient ainsi perdre cette faculté (Levine, 1973 ; Molyneux et Ashford, 1983).

En ce qui concerne *T. brucei*, on peut affirmer que le pléomorphisme se maintient pendant plusieurs années (De Diego et coll., 1985). Une autre adaptation aux conditions de laboratoire peut consister en d'éventuelles modifications de structure comme la perte du kinétoplaste (Levine, 1973) chez la majorité des sous-espèces du groupe Brucei.

Le déplacement du noyau du protozoaire vers l'extrémité postérieure est souvent observé chez *T. b. brucei* et *T. b. rhodesiense* et correspond à une haute virulence de la souche.

Les formes « slender » (= effilées) des trypanosomes de ce groupe se multiplient habituellement par division binaire longitudinale. La signification de la présence des formes multinucléaires observées chez les mammifères (Böhringer et Hecker, 1975), ainsi que dans le tube digestif et la cavité générale des mouches infectées (Greenblatt et Rosenstreich, 1984), n'est pas très claire. Certains auteurs émettent l'hypothèse d'un échange génétique entre clones de trypanosomes, lors des infections mixtes donnant un développement complet du cycle chez l'insecte vecteur (Tait, 1980 ; Vickerman, 1974).

L'objet de ce travail est la réalisation d'une étude morphométrique comparative au moyen de la microscopie conventionnelle et de l'ordinateur (IBAS-1) qui nous permet de faire de la planimétrie et d'utiliser un plus grand nombre de paramètres concernant des souches de trypanosomes maintenues longtemps au laboratoire par passage mécanique de souris à souris.

L'étude morphologique a été complétée par le traitement des souris avec des doses réduites de suramine afin de voir de quelle manière la drogue exerce une influence sur l'apparition de formes non habituelles ou peu fréquentes chez les animaux d'expérience.

Matériel et méthodes

L'étude morphologique comparative a été effectuée sur une souche de *T. b. brucei* aimablement fournie par l'Institut Pasteur de Paris, isolée chez un bovidé d'Afrique Orientale. On a utilisé 30 souris mâles Swiss ICO NMRI (IOPS) pesant 25 ± 5 g. On a choisi des mâles, car ils sont moins résistants à l'infection (Black et coll., 1985).

A un autre lot de 10 souris ayant les mêmes caractéristiques, on a administré une dose réduite de suramine (0,468 mg/kg), puis on a comparé les résultats des 2 groupes.

Les frottis de sang colorés au Giemsa 24, 48 et 72 heures après l'inoculation ont été examinés à raison de 200 champs microscopiques pour chaque frottis (objectif $\times 100$, oculaire $\times 10$) en comptant le nombre des formes trypanomastigotes présentes durant les 3 jours suivant l'infection (*tableau I*).

Les souris traitées avec la suramine ont été examinées le 3^e jour après l'infection.

— Étude conventionnelle

Quarante trypanosomes appartenant à chaque type morphologique rencontrés ont été mesurés, sauf pour les formes « stumpy » (= trapues) qui étaient trop peu abondantes.

Les paramètres pris en considération pour les trois formes sont les suivants : L. (longueur totale), F. (longueur du flagelle), A. (largeur), N. A. (distance noyau-extrémité antérieure), N. P. (distance noyau-extrémité postérieure) et I. N. (NP/NA indice nucléaire).

Pour les formes en division, on a pris en considération seulement les trois premiers paramètres. A l'aide des données obtenues, on a calculé la moyenne et la déviation standard pour chaque paramètre.

— Étude à l'aide de l'analyseur d'image IBAS-1 (Image basic analytic system) par l'examen des formes étudiées antérieurement au microscope.

Ce système nous permet de faire de la planimétrie à l'aide d'un traceur incorporé au tableau digital de l'ordinateur.

TABLEAU I. — Formes rencontrées durant l'infection (trypanosomes pour 200 champs).

| Période post-inoculation | Parasitémie positive (%) | « Slender » | Intermédiaires | « Stumpy » | En division (fission binaire) | Multinucléaires | Total |
|--------------------------|--------------------------|----------------------|-------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|---------------------|
| | | % (n° tryp.) | % (n° tryp.) | % (n° tryp.) | % (n° tryp.) | % (n° tryp.) | % (n° tryp.) |
| 24 h | 76,6 | 91* (569)** | 0,3* (2)** | — | 8,6* (54)** | — | 100* (625)** |
| 48 h | 90 | 91,3* (22 260)** | 1,2* (283)** | 0,02* (5)** | 7,4* (1 796)** | 0,07* (18)** | 100* (24 362)** |
| 72 h | 100 | 90,2* (127 707)** | 2,2* (3 099)** | 0,01* (14)** | 7,5* (10 684)** | 0,1* (121)** | 100* (141 625)** |

* Pourcentage.

** Nombre de trypanosomes examinés.

L'avantage consiste dans la possibilité d'augmenter le nombre des paramètres considérés et de les mesurer avec plus de précision en éliminant les erreurs d'interprétation qui peuvent subsister en microscopie conventionnelle.

Les paramètres utilisés ont été les suivants : longueur totale du corps (L), longueur du flagelle libre (F), largeur (A), distance entre le noyau et l'extrémité antérieure (NA), distance entre le noyau et l'extrémité postérieure (NP), surface nucléaire (AN), périmètre du cytoplasme (PC), rapport noyau-cytoplasme (N/C), rapport flagelle/cytoplasme (F/C) et longueur du cytoplasme (LC).

Devant la possibilité de commettre des erreurs significatives, on a comparé le résultat des mesures effectuées deux fois. Ceci a prouvé l'absence de différences significatives pour les paramètres mesurés, le niveau de confiance étant de 90 %.

L'étude morphologique du groupe traité à la suramine a été effectuée sur des frottis de sang faits 24 heures après l'administration de la drogue, celle-ci ayant eu lieu 48 heures après l'inoculation.

Deux cents champs microscopiques ont été observés afin d'établir le nombre et les formes de trypanosomes présents. Nous avons calculé le coefficient χ^2 pour

TABLEAU II. — *T. b. brucei* : valeurs morphométriques (en μm).

| Aspects morphologiques | L $\bar{X} \pm \text{DT}$ | F $\bar{X} \pm \text{DT}$ | A $\bar{X} \pm \text{DT}$ | NA $\bar{X} \pm \text{DT}$ | NP $\bar{X} \pm \text{DT}$ | IN $\bar{X} \pm \text{DT}$ |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| « Slender » | 20,6 \pm 1,3 18-23* | 3,9 \pm 0,9 2-5* | 1,9 \pm 0,3 1-3* | 9,6 \pm 1,2 7-13* | 7,1 \pm 1 5-9* | 0,7 \pm 0,2 0,4-1* |
| Intermédiaires | 23,1 \pm 2,4 16-28* | 2,3 \pm 0,8 1-4* | 3,7 \pm 0,9 2-7* | 11,8 \pm 1,9 9-15* | 8,9 \pm 1,4 6-13* | 0,7 \pm 0,1 0,5-1* |
| « Stumpy » | 13,8 \pm 2,5 9-19* | 1,8 \pm 1,3 0-4* | 4,9 \pm 1,2 3-7* | 7,9 \pm 1,5 5-11* | 4,2 \pm 1,5 2-7* | 0,5 \pm 0,2 0,2-0,8* |
| En division | 22,1 \pm 2 18-25* | 2,8 \pm 0,8 2-5* | 2,9 \pm 0,6 2-4* | — | — | — |
| Multi-nucléaires (3-7n) | 23,9 \pm 1,9 20-29* | 2 \pm 0,9 1-4* | 4,5 \pm 1,7 2-9* | — | — | — |

L = longueur totale (flagelle libre inclus)

F = longueur du flagelle libre

A = largeur du corps

NA = distance noyau-extrémité antérieure

NP = distance noyau-extrémité postérieure

IN = indice nucléaire

\bar{X} = moyenne

DT = déviation standard

* = valeurs extrêmes.

déterminer la présence d'éventuelles différences significatives dans certaines formes qui ont été comparées à celles rencontrées au cours de l'infection chez les souris non traitées par la suramine.

Résultats

Le cours de l'infection, ainsi que le nombre total de trypanosomes et le pourcentage de chaque forme sont exprimés dans le *tableau I*. On note un plus grand nombre de formes intermédiaires ou de transition évoluant vers les formes « stumpy » durant l'infection.

L'étude morphométrique conventionnelle des formes rencontrées durant l'infection est relatée dans le *tableau II*. En ce qui concerne les dimensions, on note que les formes « stumpy » sont généralement plus courtes que les autres formes présentes.

On peut aussi apprécier une réduction graduelle de la largeur des trypanosomes à partir des formes « stumpy » en passant par les formes multinucléaires, intermédiaires, en division et « slender ».

On constate également une présence habituelle de formes à noyau postérieur plus accentuée chez les formes « stumpy ».

Les résultats de l'étude morphométrique au moyen de l'autoanalyseur d'image (IBAS-1) sont présentés dans le *tableau III*. Les mesures réalisées à l'aide de l'IBAS-1 présentent des valeurs supérieures à celles de la microscopie conventionnelle. La différence est due à la planimétrie, bien que les valeurs obtenues puissent être comparées à celles obtenues par la microscopie conventionnelle, sauf pour les formes multinucléaires dont la longueur paraît plus grande.

L'étude comparative entre souris traitées à doses réduites de suramine et souris non traitées peut être suivie dans le *tableau IV*.

Les souris traitées à la suramine présentent une diminution des formes « slender », chez lesquelles la multiplication devient plus active et provoque une hausse du nombre des formes en division par fission binaire et des formes multinucléaires. Le test du χ^2 permet d'observer des différences significatives concernant toutes les formes à l'exception des formes intermédiaires.

Discussion

En comparant les deux méthodes morphométriques utilisées, on a pu observer des différences importantes en ce qui concerne les paramètres étudiés, les mesures linéaires effectuées avec l'autoanalyseur d'images IBAS-1 ne pouvant être obtenues avec la morphométrie conventionnelle, qui n'offre pas la même précision.

Avec les deux méthodes, on a obtenu des mesures concernant l'indice nucléaire des formes « stumpy », qui oscille entre 0,53 et 0,37, ce qui nous indique la présence des formes postéro-nucléaires dans notre souche. Cette particularité a déjà été mise

TABLEAU III. — Étude morphométrique de *T. b. brucei* (IBAS-1).

| | « Slender » $\bar{X} \pm \text{DT}$ | Intermé- diaires $\bar{X} \pm \text{DT}$ | « Stumpy » $\bar{X} \pm \text{DT}$ | Multi- nucléaires $\bar{X} \pm \text{DT}$ |
|-----|--|--|---------------------------------------|---|
| L | 26,6 \pm 3,8 19,8-33,4* | 28 \pm 3,2 21,7-31,8* | 18,1 \pm 5 8,8-26,1* | 35,4 \pm 5,2 29,5-50,6* |
| F | 4,4 \pm 1,3 0,9-7,5* | 3,4 \pm 2,1 0-6,7* | 2,5 \pm 2 0-4,8* | 2,5 \pm 1,8 0-5,7* |
| A | 2,2 \pm 0,4 1,5-2,9* | 3,4 \pm 0,5 2,7-4,3* | 5,6 \pm 1,3 3,2-7,8* | 4,4 \pm 1,4 2,2-8,2* |
| NP | 9,9 \pm 1,4 7,7-12,7* | 11,1 \pm 1,9 8,1-13,6* | 4,5 \pm 1,4 2,9-7* | |
| NA | 11,9 \pm 2,1 8,3-15,8* | 11,8 \pm 2,9 7-16* | 12,2 \pm 3,7 7,2-18,7* | |
| IN | 0,9 \pm 0,1 0,6-1,1* | 1 \pm 0,3 0,7-1,5* | 0,4 \pm 0,1 0,3-0,7* | |
| AN | 3,3 \pm 1 2-6* | 7,1 \pm 0,8 5,9-8* | 4,3 \pm 1,2 2,3-6,5* | |
| PN | 7,3 \pm 1,4 5,6-10,3* | 11,1 \pm 1 9,3-12* | 8,4 \pm 1,3 5,8-10,4* | |
| AC | 26,9 \pm 5,5 19-42,9* | 49,3 \pm 8,9 38,9-67* | 38 \pm 11,7 19,9-57,6* | 76,1 \pm 23,2 38,8-133* |
| PC | 40 \pm 4,5 31,2-47,8* | 45,1 \pm 6,3 37,3-55,5* | 30,9 \pm 8,4 17,8-41,5* | 57,8 \pm 7,5 44,3-75* |
| N/C | 0,1 \pm 0 0,1-0,2* | 0,1 \pm 0 0,1-0,2* | 0,1 \pm 0 0,1-0,1* | |
| F/C | 0,2 \pm 0,1 0-0,3* | 0,2 \pm 0,1 0-0,3* | 0,2 \pm 0,1 0-0,4* | 0,1 \pm 0,1 0-0,2* |
| LC | 22,2 \pm 3,2 15,6-28,9* | 24,5 \pm 4,5 16,8-29,8* | 15,6 \pm 4,1 8,1-22,4* | 32,9 \pm 4,6 27,4-45,8* |

L = Longueur totale du corps. F = Longueur du flagelle libre. A = Largeur. NA = Distance entre le noyau et l'extrémité antérieure. NP = Distance entre le noyau et l'extrémité postérieure. IN = Indice nucléaire. AN = Surface nucléaire. PC = Périmètre cytoplasme. AC = Surface cytoplasme. N/C = Relation noyau-cytoplasme. F/C = Relation flagelle-cytoplasme. LC = Longueur du cytoplasme. \bar{X} = Moyenne. DT = Déviation standard. * = Valeurs extrêmes.

TABLEAU IV. — Étude morphologique comparative à partir de 72 heures après inoculation à des souris non traitées et traitées par des doses réduites de suramine (200 champs microscopiques).

| | | « Slender » | En division (fission binaire) | Intermédiaires | Multinucléaires | « Stumpy » | Total |
|--------------|--------------|----------------|-------------------------------|----------------|-----------------|------------|---------------|
| Non traitées | N° tryp. (%) | 127 707 (90,2) | 10 684 (7,5) | 3 099 (2,2) | 121 (0,1) | 14 (0,01) | 141 625 (100) |
| Traitées | N° tryp. (%) | 21 711 (59,8) | 10 725 (29,5) | 431 (1,2) | 3 250 (9) | 227 (0,7) | 36 344 (100) |

en évidence en ce qui concerne *T. b. brucei* et *T. b. rhodesiense* par d'autres auteurs (De Diego et coll., 1985 ; Hoare, 1985), correspondant, selon nos observations, à une haute virulence de la souche.

L'apparition des formes « stumpy » en division continue, bien qu'à une fréquence plus réduite (Bowman, 1974; De Diego et coll., 1985; De Rall et Seed, 1973), confirmant les observations similaires d'autres auteurs (De Diego et coll., 1985 ; Evans et Ellis, 1983).

Les formes multinucléaires continuent à être présentes régulièrement, avec un nombre de noyaux oscillant entre 3 et 7. Ces formes ont été observées antérieurement chez des mammifères, ainsi que chez l'insecte vecteur (Böhringer et Hecker, 1975 ; Greenblatt et Rosenstreich, 1984).

Étant un caractère héréditaire, l'absence du kinétoplaste continue à être une constante de notre souche (Evans et Ellis, 1983 ; De Diego et coll., 1985). Cet organite n'est pas nécessaire dans un cycle monogénétique, son métabolisme sanguin ne dépendant pas de la respiration mitochondriale (Böhringer et Hecker, 1975 ; Evans et Ellis, 1983 ; James et Gilles, 1985 ; Jenni et coll., 1986).

Le traitement à dose réduite de suramine exerce une influence sur la vitesse de division du parasite, comme on peut s'en rendre compte dans ce travail, avec une augmentation du nombre des formes en division binaire et des formes multinucléaires. La drogue exerce une action très forte sur les formes « slender » (Seebeck et Kurath, 1985).

BIBLIOGRAPHIE

- BLACK S. J., SENDASHONGA C. N., O-BRIEN C., BOROWY N. K., NAESSENS M., WEBSTER P., MURRAY M. : Regulation of parasitaemia in mice infected with *Trypanosoma brucei*. In: The Biology of Trypanosomes (Hudson L., ed.). Springer-Verlag, Berlin, 1985, 93.
- BÖHRINGER S., HECKER H. : Quantitative ultrastructural investigations of the life cycle of *T. brucei*: a morphometric analysis. *J. Protozool.*, 1975, 22, 463.
- BOWMAN I. B. R. : Intermediary metabolism of pathogenic flagellates. In: Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' Disease, Ciba Found., Symp. No. 22 (new ser.) (Elliot K., O'Connor M., Wolstenholme G. E. W., eds.). Elsevier Excerpta Medica, New York, 1974, 255.

- DE DIEGO J. A., ESCRIBANO C., MAYER R. F., DEL REY CALERO J., DE DIEGO M. S., GAMALLO C. : Persistence du pléomorphisme et présence des formes multinucléaires dans l'infection expérimentale avec *T. b. brucei*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1985, 60, 653.
- DE RAAD P., SEED J. R. : Trypanosomes causing disease in man in Africa. In: Parasitic Protozoa (Kreier J. P., ed.). *Academic Press*, New York, 1977, 175.
- EVANS D. A., ELLIS D. S. : Recent observations of the behaviour of certain Trypanosomes within their insect hosts. *Adv. Parasitol.*, 1983, 22, 2.
- GREENBLATT H. C., ROSENSTREICH D. L. : *Trypanosoma rhodesiense* infection in mice: sex dependence of resistance. *Infect. Immun.*, 1984, 43, 337.
- HOARE C. A. : The Trypanosomes of mammals. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, 1972, 476 p.
- JAMES D. M., GILLES H. M. : Human antiparasitic drugs: pharmacology and usage. *Wiley J. & Sons*, St. Edmundsbury Press, Chichester, 1985, 72.
- JENNI L., MARTI S., SCHEWEIZER J., BETSCHART B., LE PAGE R. W. F., WELLS J. M., TAIT A., PAINDAVOINE P., PAYS E., STEINERT M. : Hybrid formation between African Trypanosomes during cyclical transmission. *Nature*, 1986, 173.
- LEVINE N. D. : The haemoflagellates. In: Protozoan parasites of domestic animals and of man. *Burgess Publishing Company*, Minnesota, 1973, 36.
- MOLYNEUX D. H., ASHFORD R. W. : The Biology of trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals (Taylor et Francis, eds.). *British Library*, London, 1983, 293.
- SEEBECK T. H., KURATH V. : Two simple media for biochemical experimentation with cultured procyclic *Trypanosoma brucei*. *Acta Trop.*, 1985, 42, 127.
- TAIT A. : Evidence for diploidy and mating in Trypanosomes. *Nature*, 1980, 287, 536.
- VICKERMAN K. : The ultrastructure of pathogenic flagellates. In: Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' Disease, Ciba Found., Symp. No. 20 (new ser.) (Elliot K., O'Connor M., Wolstenholme G. E. W., eds.). *Elsevier Excerpta Medica*, New York, 1974, 255.
-