

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1994

Thèse n° 19

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement
le 13 Avril 1994

par

Mireille TROUBAT

née le 19 Janvier 1969

**ACTIVITE TRYPANOCIDE ET CINETIQUE PLASMATIQUE DE
L'HEXACHLOROIRIDIATE DE STILBAMIDINE DANS LA
TRYPANOSOMOSE EXPERIMENTALE DU MOUTON**

A Trypanosoma brucei brucei

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Monsieur NICOLAS, Professeur Président
Monsieur PENICAUT, Professeur Juge
Monsieur LOISEAU, Maître de Conférences Juge
Monsieur LACHATRE, Maître de Conférences-Praticien Hospitalier Juge
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences Juge

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTÉ : Monsieur le Professeur **RABY**
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1er Assesseur)
Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2ème Assesseur)

Personnel enseignant

* PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie galénique
NICOLAS Jean-Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SÉCRÉTAIRE GÉNÉRAL DE LA FACULTÉ-CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A notre Président de Thèse

Monsieur le Professeur A. NICOLAS,
Service de Bactériologie-Virologie-
Parasitologie,

*Nous sommes très sensible à l'honneur
que vous nous avez fait en acceptant
de présider ce Jury de soutenance.*

*Nous vous remercions pour l'aide
que vous nous avez apportée
dans la réalisation de nos travaux.*

*Veillez accepter ici l'expression
de notre profonde et respectueuse reconnaissance.*

A notre Directeur de Thèse

Monsieur le Docteur G. DREYFUSS,
Maître de Conférences,
Service de Bactériologie-Virologie- Parasitologie,

*Vous nous avez fait l'honneur
de diriger ce travail.*

*Veillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance
pour votre grande disponibilité
et pour tous les conseils que vous nous avez donnés.*

A nos Juges

Monsieur le Professeur Bernard PENICAUT,
Laboratoire de Chimie Analytique
Faculté de Pharmacie de Limoges

Monsieur le Docteur Philippe LOISEAU,
Maître de Conférences,
Laboratoire de Biologie et Contrôle des Organismes Parasites,
Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry
Université de Paris-Sud.

Monsieur Gérard LACHATRE,
Maître de Conférences de Toxicologie
Faculté de Pharmacie de Limoges
Praticien Hospitalier, CHRU de Limoges.

*Nous vous sommes très reconnaissante
d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Qu'il nous soit permis de vous exprimer
toute notre reconnaissance et nos remerciements.*

Nous adressons tous nos remerciements:

- à Monsieur NOUHAUD, Laboratoire de Toxicologie, CHRU de Limoges,
qui a bien voulu réaliser nos dosages.

- à Madame DEYFUSS, Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie de
Limoges,
pour les conseils qu'elle nous a prodigués.

A mes parents.

INTRODUCTION

La trypanosomose africaine est une parasitose en pleine recrudescence, qui, encore à l'heure actuelle, pose un gros problème de santé publique.

Près de 36 pays sont endémiques, ce qui représente plusieurs milliers de personnes parasitées. Mais, au delà des affections humaines, l'atteinte des troupeaux ovins, bovins, caprins, est encore plus dramatique, car, les pertes protidiques engendrées aggravent encore l'état de malnutrition des populations déjà infestées (Kuzoe, 1991).

Il est donc urgent de mettre au point des nouveaux médicaments trypanocides, actifs sur les deux phases de la maladie, à dose unique. De nombreux chercheurs s'y emploient, car les produits qui sont actuellement à notre disposition ne sont pas satisfaisants.

Notre modeste contribution à ce vaste programme de recherche a consisté à évaluer l'efficacité d'une molécule nouvelle sur un modèle de trypanosomose expérimentale du mouton.

Ainsi, dans la première partie de notre mémoire, nous ferons un bref rappel sur les trypanosomoses humaines et animales. Puis, dans une seconde partie, nous évaluerons l'activité trypanocide de l'IrCl₆²⁻ Stilbamidine, ainsi que la pharmacocinétique de l'Ir après injection sous-cutanée du complexe à des moutons parasités.

Chapitre premier

**RAPPELS SUR LES TRYPANOSOMOSES
AFRICAINES**

1. LA TRYPANOSOMOSE HUMAINE AFRICAINE

La trypanosomose africaine ou maladie du sommeil est une affection grave déterminée par des parasites (trypanosomes) transmis par une glossine (mouche tsé tsé). Cette affection touche aussi bien les hommes que les animaux. Elle représente un véritable fléau pour la population. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 50 millions de personnes sont exposées, et 25000 nouveaux cas sont recensés chaque année. Mais, compte-tenu de l'isolement de certaines communautés, le dépistage n'est pas facile, et on comprend aisément qu'il est difficile de donner des chiffres exacts.

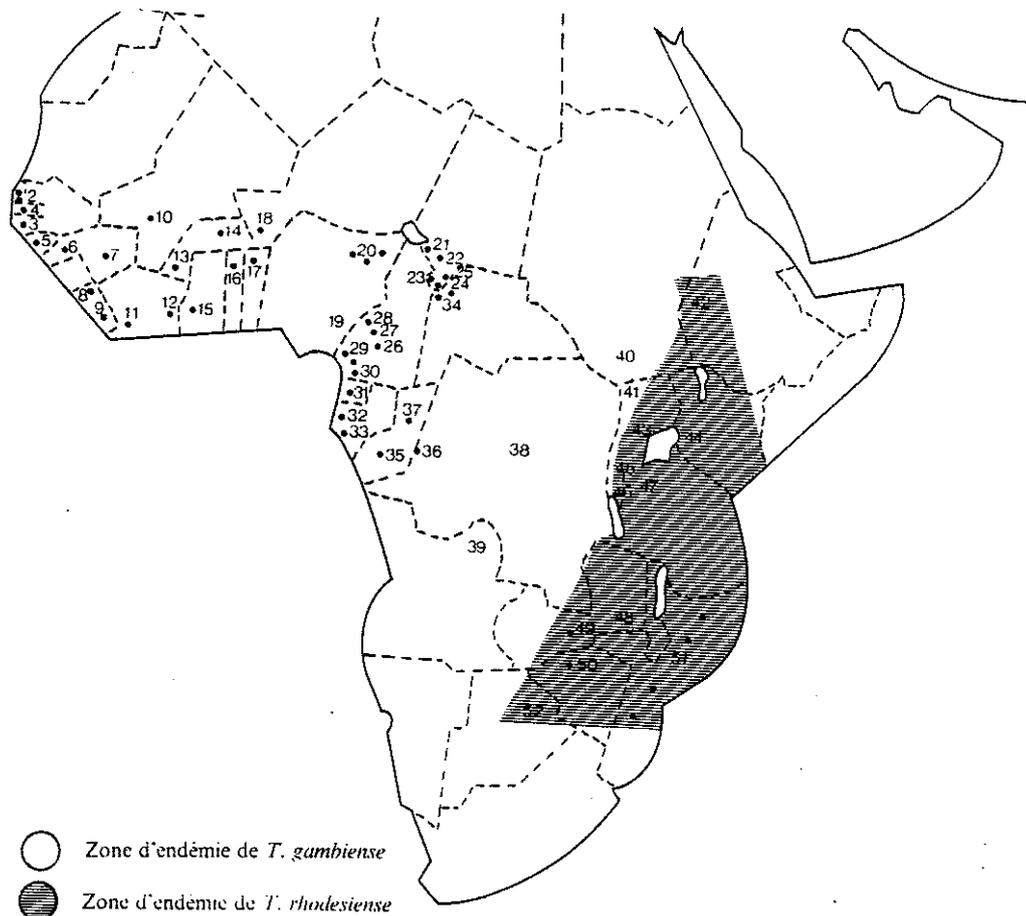
1.1. Epidémiologie :

La maladie du sommeil sévit du 15^{ème} parallèle nord au 15^{ème} parallèle sud : ceci représente 36 pays africains différents (Figure n°1).

1.1.1. Le parasite responsable :

Les trypanosomes responsables sont des protozoaires flagellés. Il existe deux sous-espèces pathogènes pour l'homme : *Trypanosoma brucei gambiense* et *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

* *T. b. gambiense* est responsable d'une trypanosomose principalement anthroponotique qui évolue sur un mode chronique, et qui sévit en Afrique occidentale et centrale.



- Répartition géographique des foyers de trypanosomioses africaines en activité ou éteints. En Afrique occidentale, la situation est relativement contrôlée. Certains foyers, M'Bour, Sangalkam, au Sénégal (foyers de la Somone), sont éteints; de même Say, au Niger. Mais des mesures énergiques doivent être maintenues ou reprises pour endiguer toute recrudescence au niveau de ces foyers qui risquent de s'enflammer à nouveau. On ne dispose d'aucun renseignement pour la Guinée et la Guinée-Bissau. La tendance générale est à la décroissance, mais « l'éradication de la maladie du sommeil dépasse les possibilités actuelles des médecins dits de secteurs, pour des raisons techniques (nécessité d'un matériel sophistiqué, onéreux et fragile), sociales (motivation insuffisante de la population), politico-économiques (déplacements importants de main-d'œuvre), politico-économiques (déplacements importants de main-d'œuvre mal surveillée au plan sanitaire) » (P. Lozac'Hmeur, OCCGE).

- | | | | |
|---|-----------------|---|------------|
| 1. foyer de M'bour | } Sénégal | 26. foyer de Bafia | } Cameroun |
| 2. foyer de Sangalkam | | 27. foyer de Dschang | |
| 3. foyer de la Casamance | | 28. foyer de Fontem (Manfe) | |
| 4. foyers de Gambie | } du Libéria | 29. foyer de Douala | } Gabon |
| 5. foyers de Guinée Bissau | | 30. foyer de Kribi | |
| 6-7. foyers de Guinée | } Côte d'Ivoire | 31. foyer de Guinée équatoriale | } Congo |
| 8. foyers de Nord-Est | | 32. foyer de l'estuaire (Libreville) | |
| 9. foyers de la province centrale | } Burkina-Faso | 33. foyer de Port Gentil | } Congo |
| 10. foyer de Bamako (Mali) | | 34. foyer de R.C.A. | |
| 11. foyer de Daloa-Bouafilé | } Burkina-Faso | 35. foyer de Jacob | } Congo |
| 12. foyer d'Abengourou | | 36. foyer du Couloir | |
| 13. foyer de Tagouara
(district d'Orodara) | } Tchad | 37. foyer de Gambona | } Congo |
| 14. foyer de Mane-Korsimoro
(district de Kaya) | | 38. foyers du Zaïre nombreux et importants mais mal délimités | |
| 15. foyers du Ghana | } Nigeria | 39. foyer de l'Angola (près de la frontière avec le Zaïre) | } Congo |
| 16. foyers du Nord Togo (Nagbeni, Galangachi, Bidjenba) | | 40. foyer du Soudan (Sud) | |
| 17. foyers du Nord-Bénin (Bénin) | } Tchad | 41. foyer de l'Ouganda (Nord) | } Congo |
| 18. foyer de Say (Niger) | | 42. foyer de Gambela (Éthiopie) | |
| 19. foyer du Biafra | } Tchad | 43. foyer de l'Ouganda (Sud-Est) | } Congo |
| 20. foyer de Jos | | 44. foyer du Kenya (Ouest) | |
| 21. foyer de Dressa | } Tchad | 45. foyer du Ruanda (Est) | } Congo |
| 22. foyer de Bahr-Erquig | | 46. foyer du Burundi (Est) | |
| 23. foyer de Deli | } Tchad | 47. foyers de Tanzanie (Nord-Ouest) | } Congo |
| 24. foyer de Timberi, Bekan et Goré | | 48. foyer vallée de la Luapula | |
| 25. foyer de Bekamba et Dobadene | } Tchad | 49. foyer vallée de la Luangwa | } Congo |
| | | 50. foyer du Lac Kariba (Zimbabwe) | |
| | | 51. foyers dispersés du Mozambique | |
| | | 52. foyers de Ngamiland et de Chobe (Botswana) | |

Figure n°1.

Répartition géographique des trypanosomoses humaines africaines.

(Gentilini et Duflo, 1986).

* *T. b. rhodesiense* détermine quant à lui, une maladie aiguë, d'origine zoonotique, qui sévit en Afrique orientale (Acha et Szyfres, 1989).

1.1.2. Le vecteur :

Les trypanosomes sont transmis par des glossines (mouches tsé tsé) qui sont des diptères brachycères piqueurs. Mâles et femelles sont hématophages, et piquent aussi bien les hommes que les animaux.

- Classification :

Il existe plusieurs espèces de glossines :

* *Glossina palpalis*, *G. fuscipes*, *G. tachinoides* vivent dans les forêts et le long des cours d'eau. Elles représentent les vecteurs principaux de *T. b. gambiense*. L'homme est un réservoir de parasites essentiel, mais on a également constaté que certains animaux peuvent être des hôtes possibles : c'est le cas des bovins par exemple ou encore des suidés. Il est donc impossible, avec les données connues actuellement, de nier tout caractère zoonotique à cette affection (Euzéby, 1984).

* *Glossina morsitans*, *G. pallidipes*, *G. swynnertoni* vivent dans les savanes à végétation basse, et sont vecteurs de *T. b. rhodesiense*. Ces glossines sont zoophiles ; elles piquent surtout les bovidés et les porcs. Mais parfois, elles peuvent piquer les hommes lorsqu'ils s'aventurent dans les biotopes habités par les animaux réservoirs et par les glossines vectrices. Ainsi, les plus touchés sont les pêcheurs, les chasseurs, les gardiens d'animaux, et parfois même, des touristes (lors de safari) [Acha et Szyfres, 1989].

- Cycle :

Le cycle de développement (Figure n°2) du parasite est hétéroxène (il nécessite deux hôtes) :

- un hôte invertébré : la glossine,
- un hôte vertébré : homme ou animal.

Les glossines se contaminent en piquant un homme ou un animal infecté. Les trypanosomes ingérés se multiplient dans l'intestin moyen de la mouche. Ils subissent ensuite diverses transformations et apparaissent environ trois semaines après au niveau des glandes salivaires sous forme métacyclique infectante.

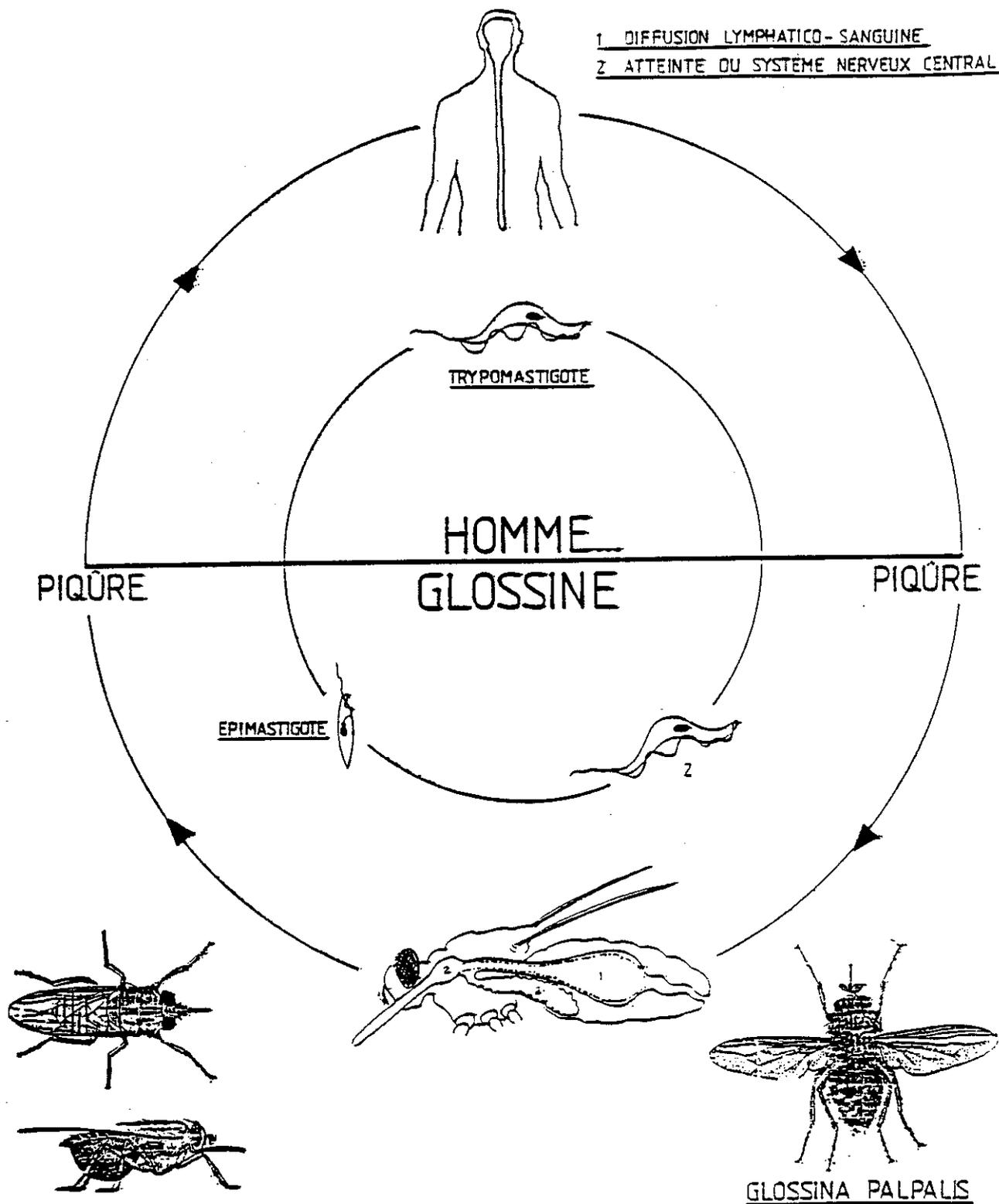


Figure n°2.
 Cycle de développement des trypanosomes africains.
 (Enseignement de Parasitologie ; Faculté de Pharmacie de Limoges).

Les trypanosomes sont inoculés à un nouvel hôte, à l'occasion d'un nouveau repas sanguin. Les formes métacycliques se transforment en trypomastigotes et envahissent rapidement le sang et le système lymphatique.

1.2. Symptomatologie :

La clinique observée peut être variable selon que l'on a à faire à une forme typique ou non. Classiquement, on peut séparer la symptomatologie en trois étapes, qui peuvent, selon les cas, être plus ou moins imbriquées (Boa *et al.*, 1988).

- Incubation :

L'incubation peut durer de cinq à vingt jours après la piqûre de la glossine. Celle-ci peut passer inaperçue, ou bien, peut provoquer un chancre ou trypanome, réalisant un pseudofuroncle. Il persiste quelques jours puis disparaît sans séquelle.

- Phase lymphaticosanguine :

Elle correspond à la phase de généralisation de la maladie. Il y a dissémination des trypanosomes dans tout l'organisme. On retrouve :

- des adénopathies surtout cervicales et sus-claviculaires,
- une hépatosplénomégalie (non constante),
- une fièvre qui est intermittente et fluctuante (38 à 38°5 C),
- altération de l'état général, perte de poids,
- signes cutanés (plus rarement) à type de placards érythémateux, sur le tronc et les membres.

- Phase de polarisation cérébrale :

Elle est caractérisée par l'envahissement du système nerveux central, probablement par passage des trypanosomes dans les plexus choroïdiens (Dumas *et al.*, 1986). Elle détermine une méningo-encéphalite avec des signes neurologiques :

- troubles du sommeil (au départ, inversion du rythme nyctéméral puis état d'hébétéité permanent) ;
- troubles psychiques avec modification du caractère de l'individu qui devient triste, apathique ;
- troubles moteurs : mouvements anormaux, crises convulsives,...
- troubles sensitifs (hyperesthésie), neuroendocriniens (aménorrhées, troubles

de la soif...).

Remarque : la trypanosomose à *T. b. rhodesiense* évolue rapidement, déterminant une maladie aiguë. Par contre, la trypanosomose à *T. b. gambiense* évolue plus classiquement en deux périodes comme précédemment décrites.

- Evolution :

Sans traitement, le malade évolue plus ou moins vite vers la cachéxie sommeilleuse ; le patient sombre dans le coma et meurt (Gentilini et Duflo, 1986).

1.3. Diagnostic biologique :

1.3.1. Diagnostic direct :

C'est la mise en évidence du trypanosome. Elle est essentielle ; c'est elle qui permet le diagnostic de certitude (Dumas et Girard 1978). On le recherche dans le sang et dans les ganglions (Golvan et Ambroise-Thomas, 1984).

* L'examen d'une goutte de sang frais entre lame et lamelle permet de voir les trypanosomes vivants. Mais, ceci n'est pas toujours évident, surtout dans les formes à évolution lente. On peut alors être amené à pratiquer des méthodes d'enrichissement du sang :

- utilisation d'un frottis après coloration au Giemsa,
- par centrifugation en tube capillaire : on recherche alors les parasites à l'état frais dans le culot de centrifugation (Euzéby, 1986),
- par séparation des trypanosomes et des hématies sur gel de cellulose (les trypanosomes mobiles passent dans l'éluat, sont centrifugés, et sont examinés au microscope à l'état frais) [Lanham et Godfrey, 1970].

*L'examen du suc ganglionnaire se fait à l'état frais. Il donne de meilleurs résultats que la recherche dans le sang (Léger *et al.*, 1992).

*Le liquide céphalorachidien (LCR) est examiné à l'état frais en cellule de Malassez ou de Nageotte (Bouteille, 1990).

Tous ces prélèvements biologiques peuvent être inoculés à des animaux sensibles (rats, souris).

1.3.2. Diagnostic indirect (Stanghellini, 1988) :

C'est un diagnostic immunologique où sont mis en évidence des anticorps élaborés par les sujets parasités, en réponse à la présence des trypanosomes. On recherche des anticorps dans le sang et dans le LCR. Plusieurs méthodes sont utilisées :

- Immunofluorescence indirecte (Oudart *et al.*, 1976).
- Agglutination directe sur carte (Croft, 1985).
- Méthode immunoenzymologique : ELISA (Euzéby, 1986).

De plus, au niveau du LCR, une prolifération polyclonale des lymphocytes B et une protéinorachie élevée sont caractéristiques de la trypanosomose : " Lorsque plus de 10% de la protéinorachie est faite d'immunoglobulines M, le diagnostic de la trypanosomose est pratiquement acquis " (Gentilini et Duflo, 1986).

1.4. Thérapeutique actuelle :

1.4.1. Introduction :

La maladie du sommeil pose encore à l'heure actuelle un gros problème thérapeutique : aucun médicament efficace et bien toléré n'a encore été découvert. Nous disposons aujourd'hui de produits qui ne passent pas tous la barrière hémato-méningée, et qui sont assez toxiques pour l'homme.

Les formules développées des différents produits utilisés sont présentées figure n°3.

1.4.2. Médicaments ne traversant pas la barrière hémato-méningée :

1.4.2.1. La pentamidine :

- Formule brute : $C_{23}H_{36}N_4O_{10}S_2$
- Poids moléculaire : 340
- Nom de commercialisation : LOMIDINE®

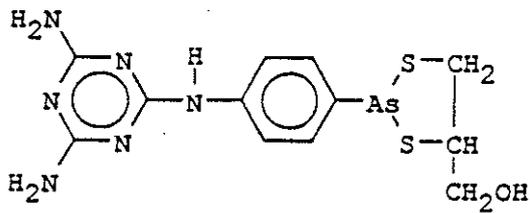
La pentamidine est une diamidine aromatique. Elle est uniquement active sur la phase lymphatico-sanguine de la trypanosomose (Breton et Dumas, 1990).

- Posologie :

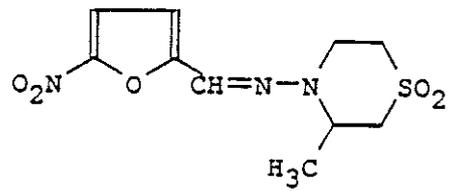
* à titre curatif : 3 à 4 mg/kg de poids/jour (jamais plus de 300mg), en 5 à 10 injections espacées de 24 à 48 heures.

* peut aussi être utilisée en prophylaxie (Gentilini et Duflo, 1986).

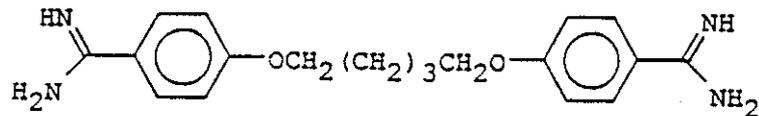
- Effets secondaires : elle provoque des douleurs au point d'injection, et un malaise pouvant



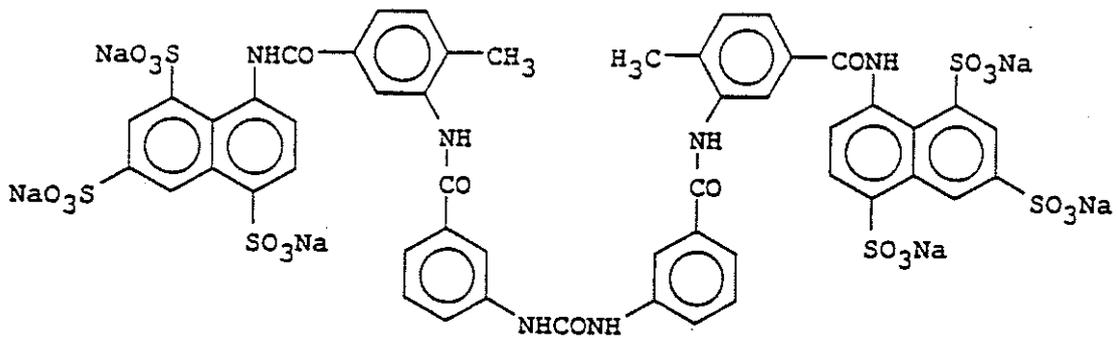
Méarsoprol



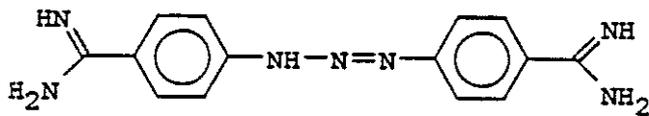
Nifurtimox



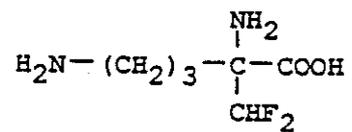
Pentamidine



Suramine



Acéturate de diminazène



Alpha-difluoromethyl ornithine

Figure n°3.

Formules développées des médicaments de la trypanosomose humaine africaine.

aller jusqu'au coma.

- Mode d'action : il y a une interaction entre la pentamidine et l'ADN du trypanosome (Goodman *et al.*, 1990). De plus elle agit en bloquant le catabolisme glucidique (Euzéby, 1986).

- Pharmacocinétique : la demi-vie est de 6 heures. Ce produit est bien absorbé par voie parentérale. Il est stocké au niveau du foie, des reins, de la rate, puis relargué progressivement au niveau sanguin. Son élimination rénale est lente et se fait sous forme inchangée : après l'arrêt du traitement, on peut trouver de la Pentamidine dans les urines pendant 6 à 8 semaines.

1.4.2.2. La suramine :

- Formule brute : $C_{51}H_{34}N_6Na_6O_{23}S_6$

- Poids moléculaire : 1429

- Nom de commercialisation : MORANYL®

C'est un uréide complexe, dérivé des solvants azoïques. La suramine est uniquement active sur la phase lymphaticosanguine de la trypanosomose (Breton et Dumas, 1990).

- Doses utilisées : 20 mg/kg/j, 5 à 10 semaines consécutives (Gentilini et Duflo, 1986).

- Effets secondaires : accidents d'intolérance avec fièvre, arthralgies, éruptions cutanées ; Risque de néphrotoxicité qui implique une recherche obligatoire d'une protéinurie avant chaque injection.

- Mécanisme d'action : la suramine altère le catabolisme glucidique. De plus, elle altère le catabolisme protidique par inhibition d'une protéine kinase (Euzéby, 1986).

- Pharmacocinétique : la suramine doit être administrée par voie parentérale. La concentration plasmatique diminue très vite en quelques heures, puis plus lentement avec une demi-vie de 48 heures. Enfin, la concentration se met à diminuer très lentement (pendant plus de 50 jours). Dans le plasma, la suramine est transportée par l'albumine. Sa persistance dans la circulation explique son utilisation en prophylaxie. La suramine est éliminée par voie urinaire (Goodman *et al.*, 1991).

1.4.2.3. Acéturate de diminazène :

- Formule brute : $C_{22}H_{29}N_9O_6,4H_2O$

- Poids moléculaire : 587

- Nom de commercialisation : BERENIL®

Ce produit est surtout utilisé dans la trypanosomose animale, mais on l'utilise quelquefois chez l'homme (Marie-Daragon, 1993).

- Posologie : une injection intra-musculaire quotidienne de 2 mg/kg de poids pendant 7 à 10 jours.

- Mécanisme d'action : c'est une diamidine aromatique qui agit en bloquant le catabolisme glucidique du parasite et qui inhibe la synthèse des acides nucléiques (Goodman *et al.*, 1991).

En plus de la Pentamidine et de l'Acéturate de diminazène, une autre diamidine aromatique a été utilisée dans le traitement de la trypanosomose animale : la Stilbamidine.

-Mode d'action (Schnitzer et Hawking, 1963) :

La Stilbamidine est rapidement absorbée par le parasite. L'activité trypanocide est due au composé lui même et non pas à un métabolite.

-Activité :

* *in vitro*, sur *Trypanosoma equiperdum*,

* *in vivo*, sur *Trypanosoma rhodesiense*. Chez le lapin, la dose curative est de 1,25 à 5 mg/kg, en injection unique (ou 0,5 mg/kg pendant 5 jours consécutifs).

D'autre part, il existe un phénomène de résistance à la Stilbamidine dans lequel le produit est très peu absorbé par le parasite.

1.4.3. Médicaments traversant la barrière hémato-méningée :

1.4.3.1. Le mélarsoprol :

- Formule brute : $C_{12}H_{15}ON_6S_2As$

- Poids moléculaire : 398

- Nom de commercialisation : ARSOBAL®

C'est un composé arsénical trivalent découvert par Friedheim en 1949.

Le mélarsoprol est efficace aussi bien dans la phase lymphatico-sanguine que dans la phase neuro-méningée.

- Posologie : 3,6 mg/kg de poids/jour en intra-veineuse, tous les deux jours, par série de trois injections. Cette série peut être répétée une, deux, ou trois fois, en respectant un intervalle de 15 jours entre chaque injection (une série de trois injections si on se trouve en phase lymphaticosanguine, trois ou quatre séries en phase neuro-méningée) [Gentilini et

Duflo, 1986].

- Effets secondaires : les médicaments arsénicaux sont tous très toxiques et d'un maniement très difficile. Les injections doivent être strictement intra-veineuses. Il ne doit y avoir aucune trace d'eau sinon, il y a précipitation du produit. Nécessité d'une surveillance hospitalière du patient qui doit être maintenu au lit pendant toute la cure, et qui doit être à jeun 12 heures avant chaque injection.

- Autres effets secondaires : - accidents locaux fréquents (thrombose veineuse, nécrose cutanée...), risque de malaise, nausées, vertiges.
- chez 5% des sujets traités, survient une encéphalopathie arsénicale très grave et souvent mortelle (Dumas *et al.*, 1986).

Malgré ces dangers, le mélarsoprol reste le plus employé et le plus efficace à tous les stades de la maladie.

- Mécanisme d'action : il gênerait le métabolisme énergétique du trypanosome en inhibant la pyruvate kinase et la glycérophosphate deshydrogénase (Dumas *et al.*, 1985).

- Pharmacocinétique : il est administré en intra-veineuse. Une faible partie (mais néanmoins suffisante) entre dans le LCR et tue les trypanosomes (Bouteille, 1990). Le mélarsoprol et ses métabolites sont éliminés en 5 jours, par voies biliaire et urinaire (Bouteille, 1990).

1.4.3.2. Eflornithine :

- Formule brute : $C_6H_{12}O_2N_2F_2$

- Poids moléculaire : 182

- Nom de commercialisation : ORNIDYL®

L'Eflornithine ou alpha-difluorométhylornithine (DFMO) semble être plus active sur le *T. b. gambiense* que sur le *T. b. rhodesiense*. Elle franchit la barrière hémato-méningée et se révèle être active à tous les stades de la maladie. De plus, le DFMO a l'avantage d'être hydrosoluble, ce qui permet son utilisation par voie orale, dans l'eau de boisson (Breton *et al.*, 1988).

- Posologie : le protocole est lourd et nécessite l'hospitalisation du patient :

* perfusion de six heures avec 400 mg/kg de poids/jour pendant deux semaines,

* par voie orale, 300 mg/kg de poids/jour pendant trois semaines.

- Effets secondaires : ils sont limités et réversibles à l'arrêt du traitement : troubles digestifs, altération de la formule sanguine, baisse de l'acuité auditive à fortes doses (Kazyumba *et al.*, 1988).

- Mécanisme d'action : c'est un inhibiteur spécifique de l'ornithine décarboxylase, qui intervient dans la biosynthèse des polyamines (Furet *et al.*, 1987).

1.4.3.3. Nifurtimox :

C'est un nitrofurane utilisé surtout pour le traitement de la maladie de Chagas (Pepin *et al.*, 1989).

- Formule brute : $C_{10}H_{12}N_3O_5S_1$

- Poids moléculaire : 287

- Nom de commercialisation : LAMPIT®

Une étude a été menée vers 1980 sur l'utilisation du nifurtimox dans le traitement de la trypanosomose africaine à *T. gambiense*. Ces essais ont porté sur 8 malades résistants au mélarsoprol, et sur 7 nouveaux cas, traités uniquement par le nifurtimox.

La dose utilisée chez les adultes était de 12,5 à 15 mg/kg/jour, en 3 prises *per os*, et ceci pendant 2 mois. Les patients ont tous été surveillés pendant au moins 30 mois après le traitement. Cette étude a permis de conclure que : "Le nifurtimox peut être utilisé dans le traitement de la trypanosomose à *T. gambiense*... et semble être utile dans le traitement des malades résistants au mélarsoprol " (Moens *et al.*, 1984).

- Effets secondaires :
- allergie (dermite, fièvre, ictère...)
- troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements...)[Van Nieuwenhove, 1992].

- Mécanisme d'action : c'est un inhibiteur de la trypanothion-réductase, qui intervient dans la destruction des peroxydes (nuisibles au parasite) (Breton et Dumas, 1990).

1.4.4. Autres molécules en cours d'étude : les spiroarsoranes :

Ce sont des dérivés organoarséniés où la cyclisation de la molécule a permis d'obtenir des dérivés peu toxiques.

- Doses utilisées dans une expérimentation chez le mouton : 100 mg/kg en injection unique dans l'ars.

Ce nouveau produit semble prometteur car c'est un trypanocide puissant qui est actif sur les deux phases de la maladie, sur le modèle mouton (Dreyfuss *et al.*, 1988b, 1990).

2. LES TRYPANOSOMOSES ANIMALES AFRICAINES

2.1. Introduction :

Nous allons considérer les trypanosomoses animales sous deux aspects différents :

- d'une part, le rôle de réservoir de trypanosomes joué par les différents animaux sauvages et domestiques qui sont parasités ; ces animaux vivent dans les mêmes aires géographiques que les glossines et sont donc indirectement responsables de l'infestation de l'homme.

- d'autre part, les pertes infligées à l'élevage (Maurice, 1992), qui ont un impact économique dramatique. Selon Euzéby (1986), ces pertes s'élevaient à 5 millions de dollars en 1984. Des cheptels entiers sont décimés par la maladie, et les africains voient ainsi leurs ressources protéiques diminuer considérablement. On estime que la maîtrise de la trypanosomose permettrait la production de 1 500 000 tonnes de protéines bovines par an (Euzéby, 1986).

Les principaux médicaments utilisés en médecine vétérinaire sont présentés dans le tableau n°1.

2.2. Classification des parasites en cause :

Les parasites en cause dans la trypanosomose animale appartiennent tous au genre *Trypanosoma*, qui comprend deux groupes :

- groupe *Stercoraria* : avec entre autre l'espèce *T. cruzi* agent de la maladie de Chagas.
- groupe *Salivaria* : divisée en quatre sous-genres :
 - sous-genre *Dutonella* : avec l'espèce *T. vivax*.
 - sous-genre *Nannomonas* : avec les espèces *T. simiae*, *T. congolense*.
 - sous-genre *Trypanozoon* : avec *T. equiperdum*, et 3 sous-espèces chez *T. brucei* :
 - *brucei*,
 - *gambiense*,
 - *rhodesiense*.
 - sous-genre *Pycnomonas* : avec l'espèce *T. suis*.

Nous n'aborderons ici que les trypanosomoses strictement animales, c'est-à-dire que

l'on ne retrouve pas chez l'homme. Ainsi nous ne parlerons pas de *T. b. gambiense* et *rhodesiense*.

Médicaments	Animaux parasités	Trypanosomes	Activité thérapeutique
Acéturate de diminazène	-Chien -Porc -Bétail	<i>T. brucei, T. evansi,</i> <i>T. congolense</i> <i>T. simiae</i> <i>T. brucei, T. congolense,</i> <i>T. vivax</i>	-Curatif : 7 mg/kg (sc) -Prévention : 5 mg/kg (sc) -Curatif (excepté pour <i>T. brucei</i>)
Quinapyramine	-Bétail -Cheval -Chien -Porc	<i>T. brucei, T. evansi,</i> <i>T. vivax, T. congolense</i> <i>id. + T. equiperdum</i> <i>T. brucei, T. congolense</i> <i>T. brucei,</i> <i>T. simiae</i>	-Curatif -Prévention -Curatif : 5 mg/kg -Associé au diminazène, en prévention : 7,5 mg/kg (sc)
Homidium	-Bétail -Equidés	<i>T. vivax, T. congolense,</i> <i>T. brucei</i> <i>T. vivax</i>	-Curatif
Prothidium	-Bétail	<i>T. vivax, T. congolense</i>	-Curatif et préventif
Isoméamidium	-Bétail	<i>T. vivax, T. congolense,</i> <i>T. simiae</i>	-Curatif et préventif -Préventif à la dose de 12,5 à 35 mg/kg (associé au diminazène)
Suramine	-Chien -Cheval -Chameau	<i>T. brucei, T. evansi</i> <i>T. brucei, T. evansi</i> <i>T. evansi</i>	-Curatif à la dose de 7 à 10 mg/kg en intra-veineuse

Tableau n°1.

Principaux médicaments utilisés dans le traitement des trypanosomoses animales
(Fraser et Mays 1986) (sc = sous-cutané).

2.3. Epidémiologie, clinique :

* Tous ces trypanosomes sont en général transmis par des glossines. Cependant, d'autres modes de transmission peuvent intervenir :

- mécanique, par des Tabanidés et des Stomoxes, pour *T. evansi* et *T. vivax*.
- vénérienne, pour *T. equiperdum*.

* La répartition géographique de ces trypanosomes coïncide tout à fait avec celle des glossines vectrices.

Ainsi on retrouve :

- *T. congolense*, *T. simiae*, *T. suis*, en Afrique orientale ;
- *T. brucei* en Afrique orientale, centrale et occidentale ;
- *T. vivax* en Afrique occidentale et centrale.

* La clinique diffère très peu de celle de l'homme. Cependant, on peut distinguer des particularités selon les animaux infectés et le parasite en cause. Nous pouvons les résumer dans le tableau n°2 :

Animaux parasités	Trypanosomes en cause	Pathogénicité décrite
Bovins	- <i>T. congolense</i> - <i>T. vivax</i> - <i>T. brucei</i>	-Parasite le plus pathogène -Maladie d'évolution lente, rémissions fréquentes. -Forme chronique, évoluant souvent vers l'anémie et la cachéxie.
Equidés	- <i>T. equiperdum</i> - <i>T. brucei</i> - <i>T. vivax</i> et <i>T. congolense</i>	-Agent de la "Dourine" : mort en 2 ou 3 mois. -Forme aiguë ou subaiguë, d'évolution très rapide. -Sont moins pathogènes. Evolution chronique.
Dromadaires	- <i>T. congolense</i> et <i>T. simiae</i>	-Forme aiguë et rapidement mortelle.
Porcs	- <i>T. simiae</i> - <i>T. suis</i>	-Forme suraiguë. Mort en quelque jours. -Forme chronique chez les adultes ; forme subaiguë chez les jeunes, avec mort en 2 ou 3 jours.
Carnivores	- <i>T. brucei</i> et <i>T. congolense</i>	-Animaux très réceptifs.

Tableau n°2.
Rôle pathogène de quelques espèces de trypanosomes africains chez l'animal.
(D'après Euzéby, 1986).

Chapitre deuxième

**METHODE D'ETUDE DES MEDICAMENTS
TRYPANOCIDES**

Nous venons de développer rapidement les différents aspects de la trypanosomose et ses conséquences pour les pays africains. Nous sommes forcés de constater que nous manquons cruellement de médicaments ACTIFS contre la trypanosomose, et NON TOXIQUES pour les sujets parasités. De plus, des phénomènes de résistance peuvent apparaître à tout moment. Il apparaît donc nécessaire et urgent de trouver de nouveaux produits trypanocides. De nombreuses molécules sont synthétisées, mais il faut vérifier qu'elles sont bien actives contre la trypanosomose. Pour cela, deux principales méthodes sont utilisées : étude *in vitro* et étude *in vivo*, en utilisant des modèles animaux qui reproduisent une trypanosomose proche de celle des hommes.

* étude *in vitro* :

Selon Bouteille (1990), "*T. brucei* a été cultivé pour la première fois par Novy et Mac Neal en 1904". Depuis, de nombreux milieux de culture ont été proposés : au départ, on utilisait des milieux enrichis en cellules fibroblastiques de souris, de bovins. Puis, à partir de 1985, les premiers milieux de culture acellulaires sont apparus ; on a ainsi pu réaliser des cultures de trypanosomes en continu, utilisées pour tester les nouveaux produits synthétisés, et pour prouver leur efficacité en tant que trypanocide. On parle d'essais de criblage.

* étude *in vivo* :

Une fois que l'efficacité des molécules a été démontrée *in vitro*, il convient de faire des essais *in vivo*. Pour cela, différents modèles animaux sont utilisés :

- le plus souvent, c'est le modèle murin qui est proposé ;
- des animaux plus proches du "modèle" humain sont nécessaires. C'est le cas des primates, mais leur utilisation est trop coûteuse pour qu'elle se généralise.

Les principales études effectuées sur les différents modèles animaux sont résumées dans le tableau n°3 (page suivante).

Un autre modèle animal a été étudié : il s'agit du modèle ovin (Bouteille *et al.*, 1988). Il nous intéresse tout particulièrement car c'est celui que nous avons choisi pour nos travaux personnels.

Pourquoi avoir utilisé ce modèle ?

- Au départ, de nombreux cas d'infestations naturelles des moutons par les trypanosomes ont été observés :

- en 1969, un rapport de FAO/WHO reconnaît l'importance de cette parasitose chez les bovins.

- en 1972, Robson *et al.* estiment qu'au Kenya, 5% des ovins sont infectés par *T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*.

- Ensuite, certains cas de trypanosomoses expérimentales ont été décrits. D'après Bouteille (1990), "ces trypanosomoses expérimentales sont peu nombreuses, mais elles montrent bien la réceptivité du mouton à *T. brucei*".

- Ainsi, l'utilisation des ovins en tant que modèles animaux paraît logique. De plus, d'autres aspects non négligeables confortent ce choix :

- le mouton est un animal qui s'élève facilement,
- les prix de revient sont beaucoup plus faibles que ceux des singes,
- les prélèvements biologiques (sang, LCR) sont facilement réalisables.

Les molécules étudiées ont été synthétisées par le Professeur Craciunescu (Faculté de Pharmacie de Madrid, Espagne). Elles sont ensuite évaluées sur des souris CD1 par l'équipe du Docteur Loiseau à Chatenay-Malabry : ce sont les essais de criblage primaire. Enfin, quand leur efficacité trypanocide a été prouvée sur le modèle murin, les produits parviennent à Limoges pour subir des essais sur le modèle ovin.

Malgré de nombreux travaux de synthèse chimique, le nombre de médicaments trypanocides est toujours aussi réduit. Néanmoins, cette dernière décennie a été marquée par l'apparition de nouvelles classes de médicaments très intéressantes.

Modèles animaux	Parasites utilisés	Références	Commentaires
Souris Swiss IRC/HA	<i>T. b. rhodesiense</i> souche Wellcome CT	Rane <i>et al.</i> (1976) Kinnamon <i>et al.</i> (1980)	5500 molécules sont évaluées : 507 sont efficaces.
Souris Swiss IRC	<i>T. b. brucei</i> souche EATRO 110	Nathan <i>et al.</i> (1979, 1981 a, b, 1984) Bacchi <i>et al.</i> (1980, 1981)	Efficacité de la bléomycine...?
Souris CF1	<i>T. b. brucei</i>	Poltera (1980), Poltera <i>et al.</i> (1980, 1981)	Détermine une clinique subaiguë.
Souris CF1	<i>T. b. brucei</i> souche TREU 667.	Jennings <i>et al.</i> (1977) Clarkson <i>et al.</i> (1983, 1984)	Prouve l'inefficacité du BERENIL® sur la phase méningo-encéphalique. Action synergique du DFMO et de la Suramine (ou de la Bléomycine).
Souris GVR 35	<i>T. b. brucei</i>	Jennings (1988)	Efficacité du DFMO + Arsobal®.
Singes : <i>Cercopithecus</i> <i>sp.</i>	<i>T. rhodesiense</i>	Corson (1938)	Montre la sensibilité de ce modèle.
<i>Macaca arctoides</i>	<i>T. rhodesiense</i>	Raether et Seidenath (1976)	Prouvent l'inefficacité du BERENIL®.
<i>Cercopithecus aethiops</i>	<i>T. b. rhodesiense</i> EATRO 1989	Schmidt et Sayer (1982a, b)	Rechute après traitement par BERENIL®.

Tableau n°3.
Rongeurs et Primates utilisés comme modèles animaux expérimentaux dans la trypanosomose animale africaine (D'après Bouteille, 1990).

Parmi celles-ci, nous devons citer :

- **L'alpha-difluorométhylornithine**, qui, rappelons-le, est un inhibiteur spécifique de l'ornithine-décarboxylase, constituait une alternative intéressante au traitement de la trypanosomose (produit actif sur les deux phases de la maladie, très peu toxique, administrable par voie orale).

- **Les spiroarsoranes (nouvelle série d'organoarséniés) :**

Les dérivés arsénicaux sont connus pour leur efficacité dans la phase neuro-méningée de la maladie. Cependant, leur grande toxicité (encéphalopathies sous Mélarsoprol) limite fortement leur utilisation.

Avec les spiroarsoranes, la cyclisation de la molécule a permis d'isoler l'arsenic et donc de le rendre peu toxique. Des études réalisées sur la souris puis sur le modèle ovin (Dreyfuss *et al.*, 1988b, 1990) ont finalement conclu que ce produit était un trypanocide puissant, actif à dose unique chez le mouton, sur les deux phases de la maladie. C'est un médicament peu coûteux, peu toxique, qui pourrait être utilisé en chimioprophylaxie chez l'animal et chez l'homme.

- **Les dérivés organométalliques :**

De nombreux complexes organométalliques ont été et sont encore beaucoup étudiés. Ces produits sont connus comme anticancéreux en agissant comme intercalant de l'ADN. Par analogie, certains chercheurs ont essayé d'utiliser ces produits comme trypanocides (Craciunescu *et al.*, 1991). Ainsi, des éléments métalliques comme le Platine, l'Iridium, le Palladium, l'Osmium, ont été chélatés par des produits connus comme trypanocides : la Pentamidine, l'Acétate de diminazène, le Nifurtimox. Des essais *in vitro* et *in vivo* sont réalisés sur le modèle murin et ovin (Dreyfuss *et al.*, 1988a), afin de confirmer ou d'infirmer l'effet trypanocide de ces produits, et d'étudier leur cinétique sérique.

Chapitre troisième

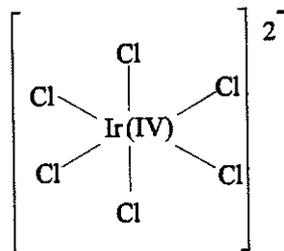
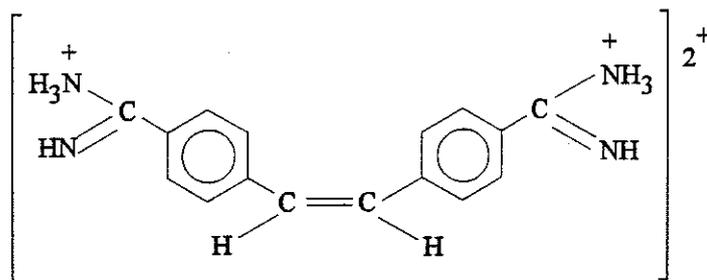
**ETUDE DE L'ACTIVITE TRYPANOCIDE ET
CINETIQUE PLASMATIQUE DE L'Ir Cl_6^{2-}
STILBAMIDINE CHEZ LE MOUTON**

1. METHODOLOGIE.

1.1. Molécule utilisée :

La formule brute de ce sel est la suivante : Ir Cl_6^{2-} Stilbamidine.

Selon Craciunescu (communication personnelle), la formule développée pourrait être la suivante :



Hexachloroiridate de stilbamidine

MM = 671,22

La masse moléculaire = 671,22 g/mole.

Caractères organoleptiques : poudre cristalline de couleur verdâtre.

Poudre stable à la lumière, à l'air (Craciunescu : communication personnelle).

La solubilité : peu soluble dans l'eau, la pyridine, le tétrahydrofurane ; un peu plus soluble dans le DMSO, le CH₂Cl₂. Soluble dans 10% DMSO + 90% eau (Craciunescu *et al.*, 1991).

Ce produit est utilisé entre autre pour son activité trypanocide.

La dose létale 50 a été déterminée ; elle est de 1200mg/kg chez la souris, en injection intrapéritonéale (IP).

Le produit que nous allons étudier semble actif à la dose de 2 à 2,5mg/kg de poids en IP.

1.2. Matériel utilisé :

1.2.1. Matériel biologique :

1.2.1.1. Le modèle ovin :

Pour effectuer notre étude expérimentale, nous avons choisi d'utiliser le modèle mouton (*Ovis aries*), qui s'avère particulièrement réceptif à *T. b. brucei*.

Nous avons travaillé sur 5 moutons mâles, âgés de 2 à 3 mois. Avant l'expérimentation, chacun d'entre eux a été soigneusement identifié et pesé.

Chaque mouton a été déparasité à son arrivée. Remarquons que nous avons utilisé uniquement des mâles, afin de surveiller l'apparition éventuelle d'une orchite, qui est l'un des signes cliniques fréquents de la trypanosomose.

1.2.1.2. Le parasite :

L'agent pathogène utilisé est la souche Antat 1-9 de *T. b. brucei*, fournie aimablement par le laboratoire de Parasitologie du CHRU de Limoges.

Cette souche est conservée dans l'azote liquide à -180°C. Elle est entretenue sur la souris Swiss selon le schéma suivant : une certaine quantité de parasites est injectée en IP à une souris ; celle-ci est ensuite surveillée 2 fois par jour. Au bout de 48 h, il y a contrôle de la parasitémie (goutte de sang à l'état frais, entre lame et lamelle) ; ces contrôles sont effectués régulièrement, jusqu'à l'apparition des trypanosomes (environ 3 à 5 jours après l'infestation). Quand on considère que le parasite est à nouveau virulent, on prélève 1 à 2

gouttes de sang à l'extrémité de la queue de la souris, afin d'évaluer la concentration en trypanosomes. Cette observation se fait également à l'état frais entre lame et lamelle. On veut obtenir environ 5 à 10 trypanosomes par champ microscopique à l'objectif 40 (on quantifie le nombre de parasites par ml à la cellule de Malassez). Quand cette concentration est atteinte, on effectue des repiquages sur un ou plusieurs lots de nouvelles souris. On leur injecte alors 200 μ l de suspension (sang parasité+eau physiologique) en IP. Nous considérons qu'à cette concentration-là, les souris infectées vont survivre 3 à 4 jours. Donc, 2 à 3 fois par semaine, on réalise de nouveaux repiquages sur de nouvelles souris.

1.2.2. Autre matériel :

1.2.2.1. Matériel à inoculation :

- seringues type insuline,
- aiguilles,
- solution de PBS (tampon phosphate,NaCl), pH7,2.

1.2.2.2. Pour la cinétique :

- préparation du produit à tester : le produit est injecté sous la forme d'une suspension dans la carboxyméthylcellulose (CMC) à 1%.
- matériel de prélèvement : tubes héparinés pour évaluer la parasitémie, tubes secs pour faire la cinétique proprement dite, aiguilles type Vacutainer[®].

1.2.2.3. Matériel analytique :

L'analyse est effectuée par spectrophotométrie d'absorption atomique. Pour cela, nous avons utilisé :

- Spectrophotomètre Varian : Spectro AA 300/400 Zeeman,
- Four graphite Zeeman,
- Lampe à vapeur d'Ir à cathode creuse Photron,
- Passeur automatique d'échantillons Zeeman,
- Lecture spectrophotométrique effectuée à 264 nm.

1.3. Protocole :

Deux études sont menées parallèlement :

- dans un premier temps, on évalue l'efficacité trypanocide du composé :

* en phase initiale de la maladie : des moutons sont infectés à J₀ par les trypanosomes, puis sont traités à J₈, à dose unique. La surveillance de la parasitémie permet d'évaluer l'activité.

* en phase méningée : les moutons infectés à J₀, sont traités à J₃₀, à dose unique. La surveillance clinique permet d'évaluer l'activité.

- dans un deuxième temps, des prélèvements sanguins sont effectués régulièrement afin de suivre l'évolution de la concentration plasmatique en iridium au cours du temps.

1.3.1. Expérimentation animale :

1.3.1.1. Infestation des moutons :

- Entretien de la souche de trypanosomes sur la souris Swiss.
- Evaluation de la parasitémie chez la souris, pour déterminer la quantité de sang qu'il faudra injecter au mouton afin qu'il reçoive environ 10⁵ trypanosomes : (nous prélevons 2 gouttes de sang au bout de la queue d'une souris infectée + 0,2 ml d'eau physiologique, puis nous comptons les parasites dans une cellule de Malassez).

Résultats : environ 3000 trypanosomes/mm³.

En définitive, pour être certain d'avoir un nombre suffisant de parasites, nous préférons mettre une goutte de sang murin dilué dans 4 ml de PBS.

- Chaque mouton reçoit 0,2 ml de cette solution ; les injections se font en sous-cutanée, dans l'ars du mouton.

1.3.1.2. Surveillance des moutons :

1.3.1.2.1. Clinique :

Selon Bouteille (1990), un protocole de surveillance des animaux a été établi. Les signes principaux à rechercher sont :

- une anémie,
- une perte de poids,
- des lésions oculaires,
- l'apparition tardive d'une orchite,
- un changement dans le comportement général.

Dans notre étude, nous nous sommes contenté de surveiller l'apparition de lésions oculaires, et d'une orchite, et ce, pendant environ 3 mois.

1.3.1.2.2. Biologique :

Elle consiste à évaluer la parasitémie des animaux. Nous avons prélevé une petite quantité de sang au niveau de la veine jugulaire, dans des tubes héparinés. Ensuite, nous avons observé une goutte de sang à l'état frais entre lame et lamelle, puis séparé les trypanosomes sur DEAE-cellulose, selon la technique de Lanham et Godfrey (1970).

1.3.1.3. Traitement des moutons :

Ce traitement consiste à injecter en sous-cutané (dans l'ars), un certain volume du produit à étudier : IrCl_6^{2-} Stilbamidine.

- Préparation du produit :

Le sel de Stilbamidine est injecté sous la forme d'une suspension dans la CMC à 1% (1 g de CMC dans 100 ml d'eau stérile ; étuve à 37°C pendant 24 h)

Après avoir pesé une quantité suffisante de sel (900 mg), il faut incorporer petit à petit la CMC en solution, et mélanger l'ensemble dans un mortier. Ceci permet d'obtenir une granulométrie plus fine et surtout plus homogène.

- Doses injectées :

Concentration de la suspension médicamenteuse = 100 mg/ml.

L'expérimentation porte sur 2 concentrations différentes : 2 mg/kg et 10 mg/kg.

Ainsi :

- moutons 155 et 156 traités à la dose de 2 mg/kg à J₈,
- moutons 162 et 164 traités à la dose de 10 mg/kg à J₈,
- mouton 161 traité à 10 mg/kg à J₃₀.

Les quantités injectées sont les suivantes :

- 0,5 ml en injection sous-cutanée (SC) pour le mouton 155,
- 0,44 ml en SC pour le mouton 156,
- 2,9 ml en SC pour le mouton 162,
- 2,5 ml en SC pour le mouton 164,
- 1,5 ml en SC pour le mouton 161.

1.3.1.4. Pharmacocinétique :

Les prélèvements sont effectués au niveau de la veine jugulaire du mouton. Les temps

de prélèvement sont reportés dans le tableau n°4 :

Numéros des prélèvements	Horaires de prélèvements en heures			
	mouton 155	mouton 156	mouton 162	mouton 164
T ₀ .	0	0	0	0
T ₁	1	0,917	0,93	0,83
T ₂	2	2,784		
T ₃	8,6	8,44	8,35	8,164
T ₄	30,1	30,3	29,85	29,63
T ₅	49,51	49,28	49,21	49
T ₆	121,68	121,48	121,35	121,13

Tableau n°4.
Chronologie des prélèvements sériques
effectués chez des moutons traités par l'Ir Cl₆²⁻ Stilbamidine.

Remarque : la cinétique ne portera pas sur le mouton 161 qui ne sera traité qu'à J₃₀, afin de confirmer ou d'infirmer l'efficacité du produit sur la phase neuro-méningée.

Une fois les prélèvements effectués, les tubes sont conservés au réfrigérateur afin d'obtenir une séparation nette du sérum et du caillot sanguin.

Le sérum est alors recueilli puis séparé à la pipette Pasteur après centrifugation.

Le sérum obtenu est enfin stocké dans des tubes à hémolyse, puis conservé au congélateur à -18°C .

1.3.2. Protocole analytique :

Le dosage est effectué par spectrophotométrie d'absorption atomique. La technique que nous avons utilisée nous a été communiquée par le constructeur (Perkin Elmer).

Une extraction préalable n'a pas été nécessaire, contrairement au dosage du Cis-Pt Pentamidine (selon méthode de Hull *et al.*, 1981).

La méthode d'étalonnage utilisée pour réaliser l'analyse des prélèvements est celle des ajouts dosés. Elle consiste à surcharger la prise d'essai à analyser de quantités croissantes et connues de la substance à doser (étalon d'Ir).

Cette méthode permet de maîtriser les interférences possibles dues au milieu complexe dans lequel nous travaillons : sérum et excipient complexe (CMC). De plus, elle permet d'améliorer la sensibilité d'un dosage quand l'échantillon est très faiblement dosé (Pradeau, 1992).

La programmation du four graphite est présentée dans le tableau n°5.

Les mesures sont effectuées à 264 nm.

Le gaz utilisé est de l'argon.

L'étalon d'Ir à 1000 µg/ml dans HCl à 20% provient de Johnson Matthey, Karlsruhe (Allemagne).

Le volume d'échantillon prélevé est de 28 µl.

La mesure est réalisée sur les hauteurs du pic d'absorbance.

Phases	Températures (°C)	Temps de maintien en température (s)	Gas flow (l/mn)
1	85	5	3
2	95	40	3
3	130	10	3
4	130	10	3
5	1000	10	3
6	1000	20	3
7	1000	1,5	0
8	2900	1	0
9	2900	1,5	0
10	2900	1,5	3

Tableau n°5.
Programmation du four graphite pour le dosage de l'iridium sérique.

2. RESULTATS.

2.1. Activité trypanocide :

Huits jours après l'infestation des moutons, nous avons fait des prélèvements sanguins afin d'évaluer la parasitémie (ces prélèvements ont été bien entendu effectués avant l'injection de la suspension médicamenteuse).

L'examen microscopique d'une goutte de sang frais entre lame et lamelle n'a pas permis de retrouver de parasite. Un enrichissement par la méthode de la goutte épaisse, après coloration au Giemsa, a donné le même résultat.

Nous nous sommes donc contentés d'une surveillance clinique régulière des moutons, qui a porté sur 2 signes principaux : des lésions oculaires, et l'apparition d'une orchite. Cette surveillance a duré environ 3 mois. Pendant cette période, les moutons traités n'ont pas présenté de signes caractéristiques de la maladie. Seul le mouton parasité et traité à J₃₀ a présenté un léger larmolement et un gonflement des paupières (à J₄₅) pendant quelques jours. Ceci n'élimine pas la possibilité d'une autre infection oculaire.

Au bout des 3 mois de surveillance, chacun des 5 moutons infestés et traités a survécu à l'expérimentation.

2.2. Résultats de la pharmacocinétique expérimentale :

2.2.1. Valeurs expérimentales :

Les valeurs expérimentales sont regroupées dans les tableaux n° 6, 7, 8 et 9 :

Horaires de prélèvements (h)	0	1	2	8.6	30	50	121	700
Concentration en Ir en µg/l	<10	530	411	260	246	318	270	125

Tableau n°6.
Cinétique sérique de l'Iridium chez le mouton 155 traité à 2 mg/kg.

Horaires de prélèvements (h)	0	1	2.8	8.5	30	50	121	700
Concentration en Ir en $\mu\text{g/l}$	0	138	188	121	111	154	131	39

Tableau n°7.
Cinétique sérique de l'Iridium chez le mouton 156 traité à 2 mg/kg.

Horaires de prélèvements (h)	0	1	8.3	30	50	121	700
Concentration en Ir en $\mu\text{g/l}$	0	2120	1140	1350	1620	1200	650

Tableau n°8.
Cinétique sérique de l'Iridium chez le mouton 162 traité à 10 mg/kg.

Horaires de prélèvements (h)	0	1	8	30	50	121	700
Concentration en Ir en $\mu\text{g/l}$	0	1850	965	980	1180	810	414

Tableau n°9.
Cinétique sérique de l'Iridium chez le mouton 164 traité à 10 mg/kg.

2.2.2. Courbes expérimentales de cinétique sérique :

Un traitement informatique des valeurs obtenues précédemment permet de tracer les courbes de cinétique sérique de l'iridium (Figures n°4, 5 et 6) , pour les 4 moutons prélevés.

Nous observons que les 4 courbes obtenues ont une allure générale identique.

La concentration plasmatique de l'iridium est maximale dès la 1^{ère} heure. Ensuite, on note une décroissance rapide jusqu'à la 10^{ème} heure, puis une augmentation lente jusqu'à un second pic vers la 50^{ème} heure. A partir de là, la concentration diminue lentement. Nous pouvons noter que le dernier prélèvement effectué 30 jours après l'administration du médicament révèle encore la présence d'iridium en quantité non négligeable.

Figure n°4 : CINETIQUE PLASMATIQUE DE Ir, APRES TRAITEMENT PAR $[\text{IrCl}_6]^{2-}$ STILBAMIDINE
 Moutons parasités par *Trypanosoma brucei brucei*

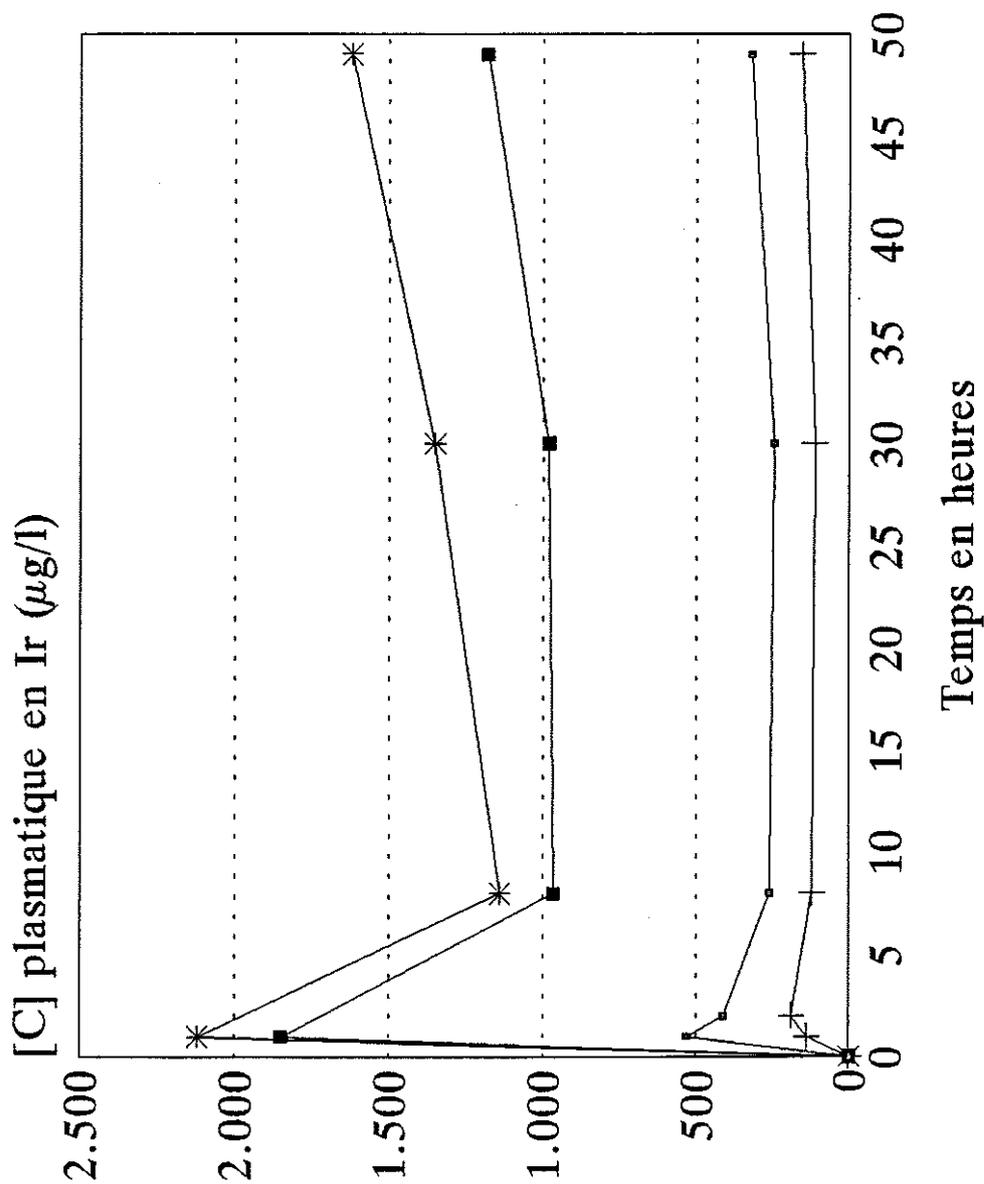
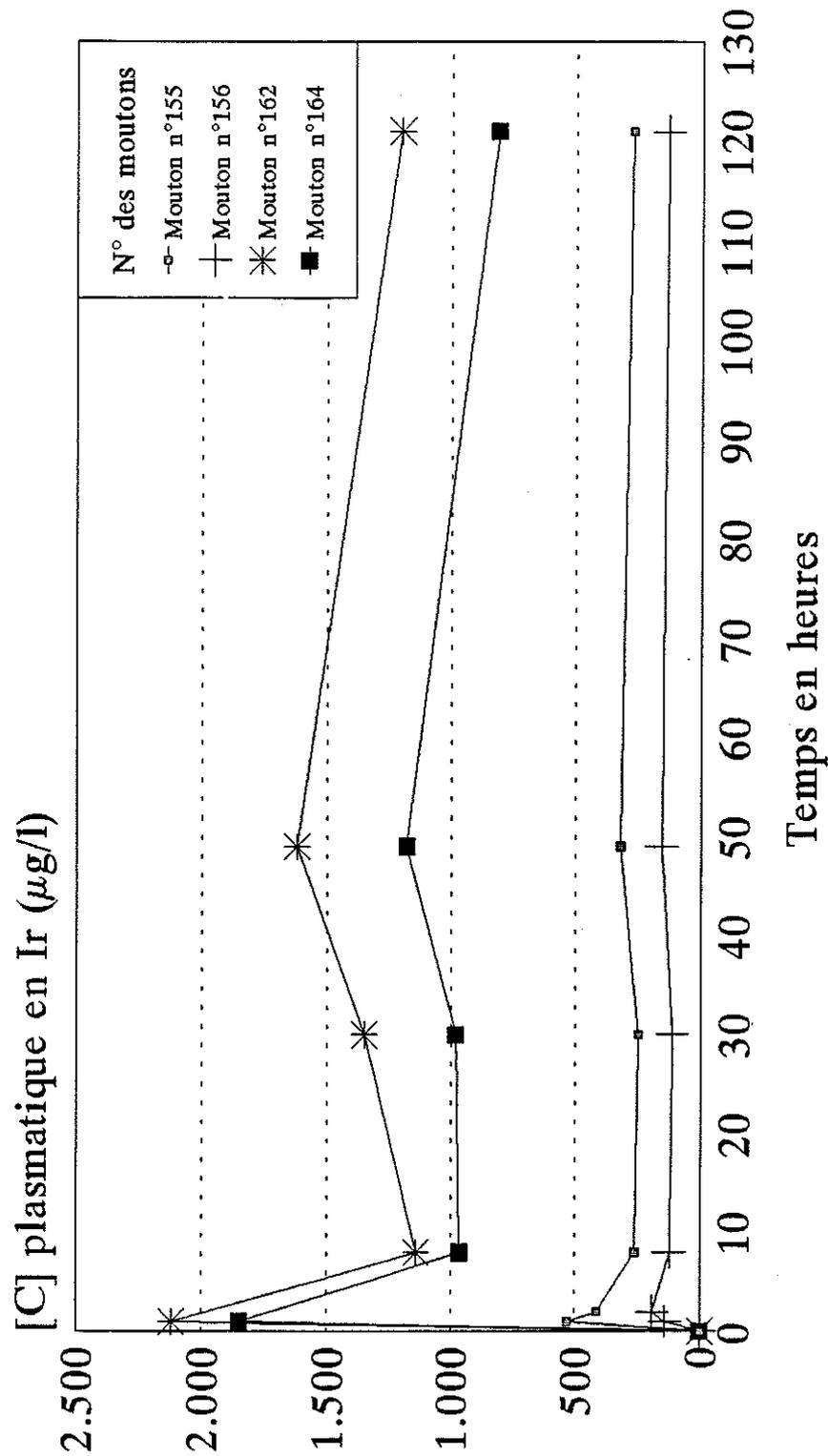
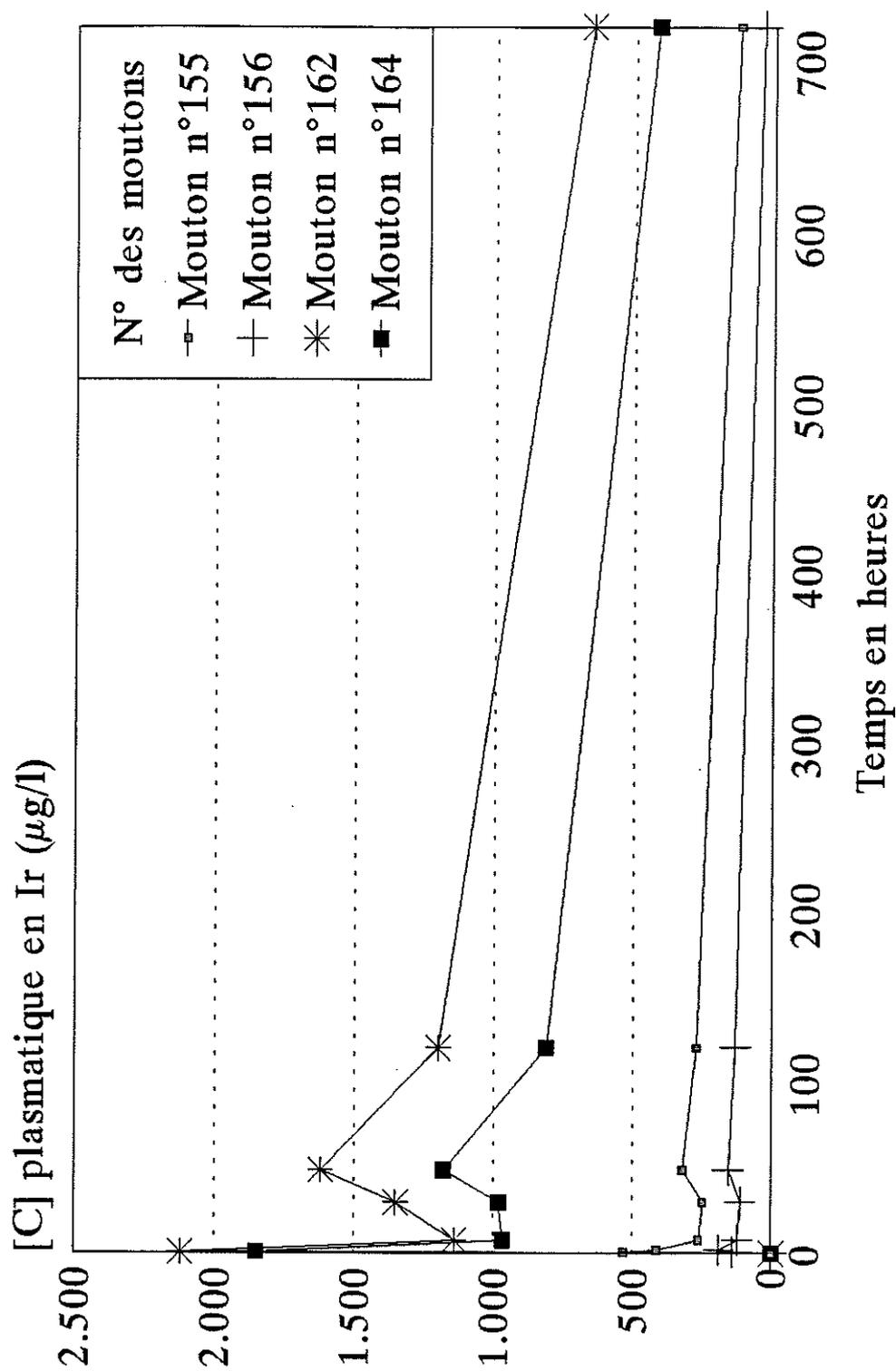


Figure n°5 : CINETIQUE PLASMATIQUE DE Ir, APRES
 TRAITEMENT PAR $[\text{IrCl}_6]^{2-}$ STILBAMIDINE
 Moutons parasités par *Trypanosoma brucei brucei*



De T₀ à T₁₂₀

Figure n°6 : CINETIQUE PLASMATIQUE DE Ir, APRES TRAITEMENT PAR $[\text{IrCl}_6]^{2-}$ STILBAMIDINE
 Moutons parasités par *Trypanosoma brucei brucei*



De T_0 à T_{700}

3. DISCUSSION.

3.1. Protocoles et méthode :

- L'infection des moutons en elle-même ne nous a pas posé de problème particulier.
- La surveillance des moutons a porté sur une période de 3 mois. Aucun d'entre eux n'a présenté de signes cliniques marqués de la trypanosomose (mis à part les signes oculaires chez le mouton 164).

- Nous ne pouvons pas remettre en cause l'infestation des moutons ; l'inoculation a été réalisée dans de bonnes conditions :

* les trypanosomes ont été mis en suspension dans une solution de tampon phosphate car une étude précédente (Laroche, 1992) a mis en doute la survie des parasites dans l'eau physiologique (environ 10 minutes).

*enfin, l'inoculum a été préparé sur place, et a immédiatement été injecté aux moutons.

- Une semaine après l'infestation des moutons, nous avons tenté d'évaluer la parasitémie de chaque animal. Mais, aucun trypanosome n'a pu être mis en évidence, que ce soit à l'état frais entre lame et lamelle, ou après enrichissement par la méthode de la goutte épaisse. Il est bien certain que les prélèvements sanguins ont été réalisés dans des conditions peu favorables à la survie des parasites : température extérieure proche de 0°C, observations microscopiques effectuées 6 à 8 heures après les prélèvements.

- En ce qui concerne le traitement proprement dit : nous avons injecté le sel de Stilbamidine sous la forme d'une suspension dans la CMC à 1%. Nous aurions pu choisir de faire une dissolution du produit dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à 70%, mais des études précédentes ont montré que ce produit est très irritant pour l'animal, et crée une douleur importante au point d'injection (Laroche, 1992). De plus, nous nous sommes référés à des études réalisées par Loiseau *et al.* (1992) sur l'effet trypanocide de nouveaux complexes organométalliques. Le fait qu'il ait utilisé une suspension médicamenteuse dans la CMC à 1% conforte notre choix.

3.2. Effet trypanocide :

Les quatre moutons ont survécu plus de 3 mois et n'ont présenté aucun signe clinique de trypanosomose. Le traitement des animaux à J₈ a donc été efficace et nous pouvons conclure que l'IrCl₆²⁻ Stilbamidine s'avère actif sur la phase lymphatico-sanguine de la maladie.

En ce qui concerne l'efficacité du produit sur la phase neuro-méningée, nos résultats sont difficilement interprétables. En effet, le mouton parasité puis traité à J₃₀ n'a pas présenté de signes de trypanosomose (si ce n'est les larmolements).

* Nous pouvons nous demander si, au bout des 30 jours d'infestation, les parasites ont franchi la barrière hémoméningée :

- On peut envisager qu'ils ne l'ont pas franchie, car, d'après la description du modèle ovin par Bouteille (1990), l'apparition des trypanosomes dans le LCR n'est observée en moyenne que 47 jours après l'infestation.

- De plus, le parasite que nous avons utilisé (*Trypanosoma brucei brucei*) reste souvent au niveau sanguin sans développer de phase neuroméningée.

* Peut-on envisager que la Stilbamidine a traversé la barrière hémoméningée ? Aucune étude n'a été réalisée à ce sujet. En revanche, la Pentamidine a fait l'objet de différents travaux qui concluent qu'elle ne passe pas dans le LCR. Or, si on compare la structure de la Stilbamidine à celle de la Pentamidine, nous constatons qu'elles sont très proches. Ce sont toutes deux des diamidines aromatiques et elles vont vraisemblablement se comporter de la même façon vis-à-vis du système nerveux central.

En l'absence de prélèvements et d'étude du LCR, nous ne pouvons pas apporter de réponse à ces interrogations. Néanmoins, il semble peu probable que la Stilbamidine soit active sur la phase neuro-méningée de la maladie.

Au vu de tous ces résultats, l'IrCl₆²⁻ Stilbamidine apparaît donc comme un produit trypanocide, efficace sur la phase lymphaticosanguine de la trypanosomose expérimentale chez le mouton.

3.3. Cinétique sérique de l'Iridium :

3.3.1. Courbes expérimentales :

Quelle que soit la dose injectée (2mg/kg ou 10 mg/kg), les courbes obtenues ont toutes le même aspect.

Une heure après l'injection sous-cutanée du produit, il y a une augmentation très rapide de la concentration en iridium dans le sang, puis une décroissance également très rapide, jusqu'à la 10^{ème} heure environ. Ceci peut correspondre à la libération massive de l'Ir à partir du site d'injection vers le compartiment sanguin. Ensuite, nous pouvons envisager qu'il y a métabolisation d'une partie du médicament dans le sang, et probablement diffusion d'une autre partie dans l'ensemble de l'organisme, avec fixation au niveau des organes profonds (poumons, foie, rate...).

A partir de là, nous pouvons noter une augmentation de la concentration en Ir jusqu'à la 50^{ème} heure environ, qui peut être due à la libération du produit à partir des sites de fixation. De plus, viennent s'ajouter des phénomènes d'élimination naturelle (urinaire, fécale ?) qui expliquent l'ascension modérée de la courbe.

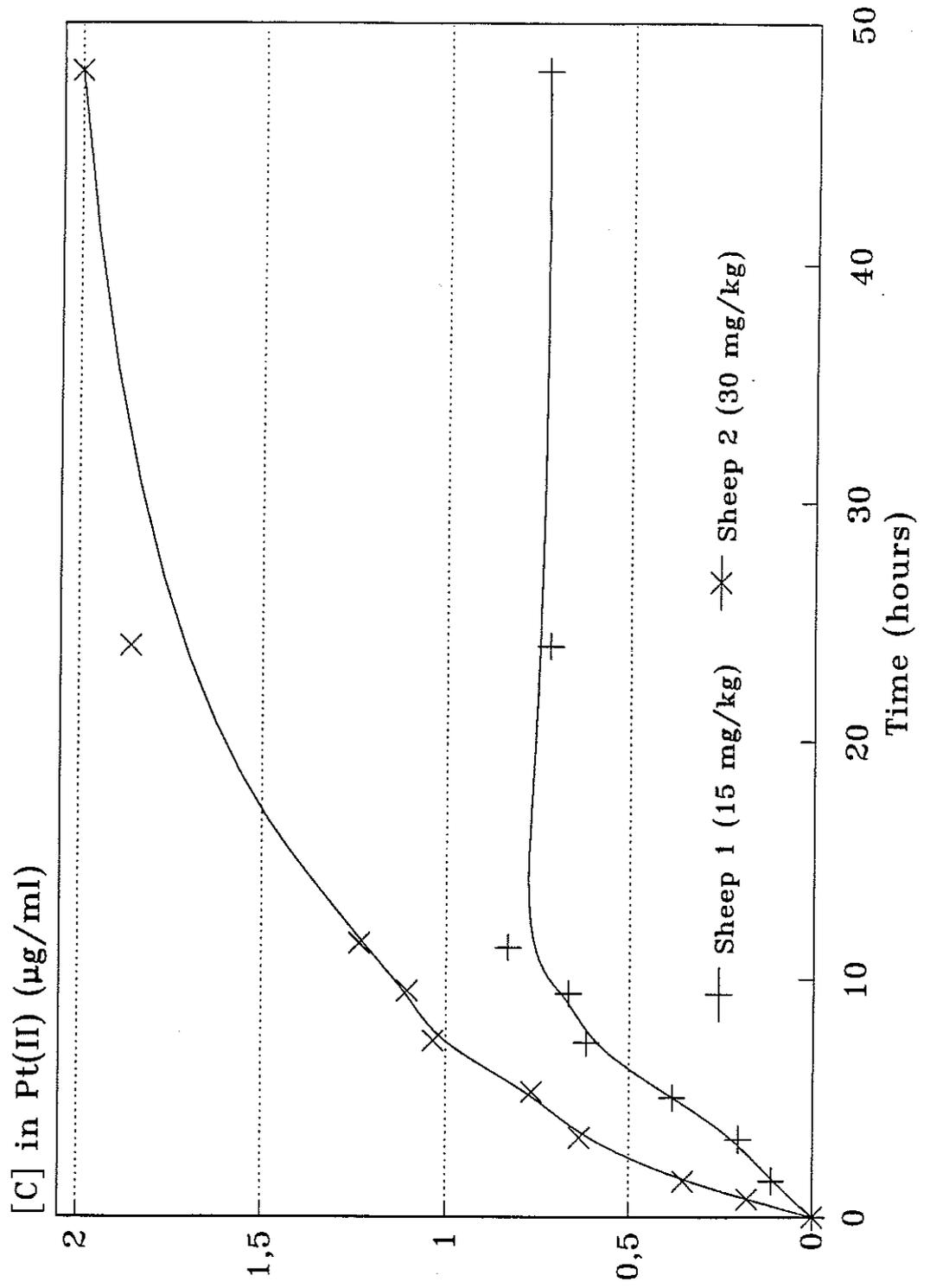
Enfin, à partir de la 50^{ème} heure, s'amorce une décroissance très lente de la courbe. L'Ir persiste très longtemps au niveau sanguin : au bout de 700 heures, nous retrouvons encore des quantités non négligeables d'Ir de l'ordre de 500 µg/l pour les moutons traités à 10 mg/kg (et de 50 à 100 µg pour ceux traités à 2 mg/kg). Ceci est favorable à une activité trypanocide en phase lymphaticosanguine très prolongée dans le temps. N'oublions pas que ces molécules sont avant tout destinées à traiter des animaux, et nous voyons là un aspect pratique du produit, avec la possibilité d'espacer les injections dans le temps.

Il paraît intéressant de comparer nos résultats avec ceux obtenus dans l'étude de la cinétique du Pt(II) après injection :

- de l'iodure de cis Pt pentamidine (Dreyfuss *et al.*, 1993),
- du chlorure de cis Pt pentamidine (Dreyfuss *et al.*, 1990), suivant un protocole pratiquement identique au nôtre.

Figure n°7.

Cis-Pt(II) pentamidine iodide Experimental plasmatic kinetics



3.3.2. Comparaison avec l'Iodure de cis Pt Pentamidine :

La cinétique du Pt est globalement comparable à celle de l'Ir (Figure n°7).

Notons cependant que la libération du Pt du site d'injection (l'ars) vers le compartiment sanguin se fait progressivement, et non pas massivement comme avec l'Ir. La concentration maximale s'observe entre la 10^{ème} et la 48^{ème} heure pour le Pt, alors que le pic de l'iridium apparaît dès la 1^{ère} heure.

Pourtant, l'iodure de Cis-Pt Pentamidine a été injecté sous la forme d'une solution dans le DMSO à 70%. Or, ce produit est très irritant et entraîne une inflammation et donc une hypervascularisation au niveau de l'ars. Ceci augmente la perméabilité des tissus, et facilite donc le passage transmembranaire du produit. En revanche, dans notre étude, nous avons injecté une suspension dans la CMC à 1%, dont la caractéristique principale est une consistance de gel, sans activité inflammatoire.

Nous pouvons donc supposer que la différence de résorption est finalement due à la structure même des molécules étudiées, et en particulier à la nature de l'anion. Dans notre molécule, la présence de 6 chlorures autour de l'iridium doit jouer un rôle très important, en augmentant la lipophilie, et donc en facilitant le passage du produit à travers les membranes.

Après libération dans le sang, le Pt (comme l'Ir) doit se fixer au niveau des organes profonds car la concentration reste stable pendant plusieurs heures.

Enfin, contrairement à notre étude, le comportement du Pt n'est connu que jusqu'à la 48^{ème} heure. Donc, il est difficile de comparer l'élimination des 2 produits.

3.3.3. Comparaison avec le chlorure de Cis Platine Pentamidine :

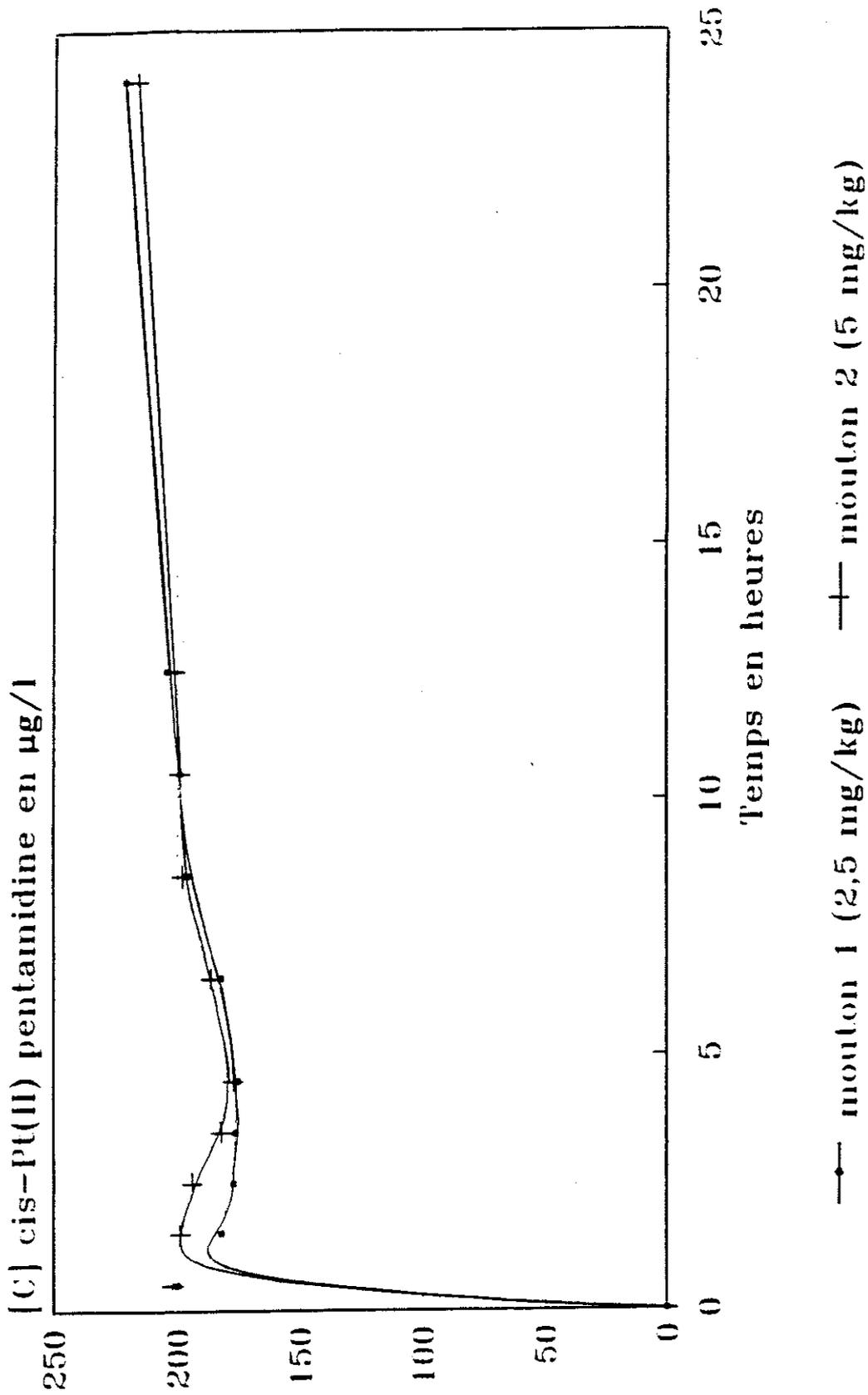
La cinétique du Pt s'apparente tout à fait à celle de l'Iridium (Figure n°8).

Comme dans notre étude, la résorption du produit doit se faire très rapidement, car les concentrations en Pt atteignent des valeurs maximales dès la 1^{ère} heure.

Dans ces travaux, l'utilisation du DMSO peut expliquer cette résorption rapide, mais cela ne suffit pas car nous aurions alors une courbe comparable à celle obtenue par Laroche (1992).

Comme dans notre étude, c'est le rôle du chlore qui apparaît, et qui est ainsi confirmé.

Figure n°8.



Cinétique sérique expérimentale de la cis-Pt(II) pentamidine chez le mouton trypanosomé, après injection sous-cutanée (courbe lissée selon la méthode des courbes de Bézier).

Le Pt, après passage dans le sang, semble également être retenu dans les organes profonds et les espaces extravasculaires.

Enfin, comme pour l'iodure, les prélèvements n'ont été effectués que jusqu'à la 25^{ème} heure. Il nous est donc impossible de connaître entièrement la courbe d'élimination du Pt.

CONCLUSION.

Au vu de ces résultats, l'IrCl₆²⁻ Stilbamidine apparait comme un produit actif sur la phase lymphatico-sanguine de la trypanosomose expérimentale du mouton.

Nous pouvons de plus supposer que ce produit est inefficace sur la phase neuro-méningée de la maladie. Cependant, pour confirmer ou infirmer ce résultat, il serait intéressant, dans des études futures, de pratiquer, parallèlement aux prélèvements sanguins, des prélèvements du LCR afin de retrouver (ou non), les trypanosomes (en fonction du stade de l'infection), et de doser l'Ir .

Il serait également intéressant de comparer la cinétique et l'activité trypanocide de notre produit à celles de la Stilbamidine seule (à partir de données bibliographiques).

L'IrCl₆²⁻ Stilbamidine a été efficace à dose unique, ce qui pourrait en faire un produit intéressant dans le traitement de la trypanosomose animale, mais, son prix trop élevé compromet grandement son utilisation.

Enfin, la perspective d'utiliser un jour ce produit dans la trypanosomose humaine est encore lointaine.

BIBLIOGRAPHIE

ACHA P.N., SZYFRES B. (1989).

Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux,
éditions O.I.E. 1063 p.

BACCHI C.J., NATHAN H.C., HUTNER S.H., DUCH D.S., NICHOL C.A. (1981)

Prévention by polyamines of the curative effect of amicarbalide and imidocarb for
Trypanosoma brucei infections in mice. *Biochem. Pharmacol.* **30** 883-886 in
BOUTEILLE (1990).

BACCHI C.J., NATHAN H.C., HUTNER S.H., Mc CANN P.P., SJOERDSMA A.
(1980).

Polyamine metabolism : a potential therapeutic target in trypanosomes. *Science*, **210**
332-334 in BOUTEILLE (1990).

BOA F., TRAORE M.A., DOUA F., KOUASI-TRAORE M.T., KOUASSI B.E.,
GIORDANO C. (1988).

Les différents tableaux cliniques actuels de la trypanosomiase humaine africaine à *T.*
b. gambiense. Analyse de 300 dossiers du foyer de Douala, Côte d'Ivoire. *Bull.*
Soc. Path. Ex. **81** 427-444.

BOUTEILLE B. (1990)

Le traitement de la trypanosomose humaine africaine. Etude d'un modèle
expérimental : le mouton (*Ovis aries*). *Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences*
pharmaceutiques, Université de Limoges. 354 p.

BOUTEILLE B., DARDE M.L., DUMAS M., CATANZANO G., PESTRE-
ALEXANDRE M., BRETON J.C., NICOLAS J.A., N'DO D.C. (1988).

The sheep (*Ovis aries*) as an experimental model of african trypanosomiasis. I. Clinical
study. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **82** 141-148.

BRETON J.C, BOUTEILLE B., SONAN T. (1988).

Le DFMO : alternative thérapeutique de la trypanosomose humaine africaine. *Bull. Soc. Path. Ex.* **81** 571-577.

BRETON J.C., DUMAS M. (1990).

Traitement de la trypanosomose africaine : place de l'éflornithine (DFMO).
In "Chimiothérapie des parasitoses". Ed. Arnette Paris. 69-78.

CLARCKSON A. B.Jr., BACCHI C. J., MELLON G.H., NATHAN H.C., Mc CANN P.P., SJOERDSMA A. (1983).

Efficacy of combinations of difluorométhiornithine and bléomycin in a mouse model of central nervous system African trypanosomiasis. *Proc. Natl. Acad.Sci. US USA*, **80** 5729-5733 *in* BOUTEILLE (1990).

CLARKSON A.B. Jr., BIENEN E.J., BACCHI C.J., Mc CANN P.P., NATHAN H.C., HUTNER S.H., SJOERDSMA A. (1984).

New drug combination for experimental late-stage African trypanosomiasis : DL-alphadifluoromethylornithine (DFMO) with suramine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **33** 1073-1077, *in* BOUTEILLE (1990).

CORSON J.F. (1938).

The cerebrospinal fluid of monkeys (*Cercopithecus* sp.) infected with a strain of *Trypanosoma rhodesiense*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **32** 197-199, *in* BOUTEILLE (1990).

CRACIUNESCU D.G., MOLINA C., DOADRIO-VILLAREJO J.C., GUTIERREZ ROS M.T., ALONSO M.P., PARRONDO IGLESIAS E., DE FRUTOS M.I., DOADRIO LOPEZ A. (1991).

Estudio de las actividades farmacológicas duales "*in vivo*" (antitripanosómicas y antitumorales) y de las toxicidades de algunos nuevos complejos neutros del iridio (III). *An. Real Acad. Farm.* **57** 221-256.

CROFT S.L. (1985).

Serodiagnostic test for West African Trypanosomiasis. *Parasitol. Today* 1 4 115.

DREYFUSS G., GAYRAL P., DUBOST G., NICOLAS J.A., CRACIUNESCU D.G.
(1988a).

Activité antiparasitaire du Cis-Pt(II) pentamidine dans la trypanosomose expérimentale du mouton à *Trypanosoma brucei brucei*. *Bull. Soc. Path. Ex.* 81 626-631.

DREYFUSS G., LOISEAU P., WOLF J.G., BORIES C., GAYRAL P., NICOLAS J.A.
(1988b).

Une nouvelle série d'organoarséniés antiparasitaires : les Spiroarsoranes. *Bull. Soc. Path. Ex.*, 81 561-570.

DREYFUSS G., PENICAULT B., NICOLAS J. A., CRACIUNESCU D., LOISEAU P. (1993).

Trypanocidal activity and platinum plasma kinetics of cis platinum pentamidine iodide in *trypanosoma brucei* sheep model. *Trop. Med. Parasitol.* 44 95-98.

DREYFUSS G., PENICAUT B., WOLF J.G., DUBOST G., NICOLAS J.A. (1990).

Cinétique plasmatique d'un spiroarsorane chez le mouton parasité. *Bull. Soc. Path. Ex.* 83 360-366.

DUMAS M., BRETON J.C., PESTRE-ALEXANDRE M., GIRARD P.L., GIORDANO C.
(1985).

Etat actuel de la thérapeutique de la trypanosomiase humaine africaine. *Presse Méd.* 14 253-256.

DUMAS M., GIRARD P.L. (1978).

Human African trypanosomiasis (sleeping sickness). In *Handbook of Clinical Neurology*, 35. VINKEN P.J., BRUYN G.W. ed. North Holland Publishing Company. Amsterdam. 67-83.

DUMAS M., LEGER J.M., PESTRE-ALEXANDRE M. (1986).

Trypanosomiase humaine africaine. Rapport de neurologie. Manifestations neurologiques et psychiatriques des parasitoses, Ed. Masson, 152-162.

EUZEBY Y.J. (1984).

Les parasitoses humaines d'origine animale. Caractères épidémiologiques. Ed. Flammarion Médecine Science. 58-67.

EUZEBY Y.J. (1986).

Protozoologie médicale comparée, Vol. 1. Fondation Marcel Mérieux Ed., Lyon. 465 p.

FRASER C.M., MAYS A. (1986).

The Merck Veterinary Manual, 6th edition, Merck & Co. Inc., Rahway, N.J., U.S.A., 1677 p.

FURET Y., DUONG T.H., COMBESCOT C., BRETEAU M. (1987).

Une molécule nouvelle en thérapeutique antiparasitaire : l'alphadifluorométhylornithine. *Path. Biol.* 35 398-404.

GENTILINI M., DUFLO B. (1986).

Médecine tropicale, Flammarion ed., Paris, 840 p.

GOLVAN Y.J., AMBROISE-THOMAS P. (1984).

Les nouvelles techniques en parasitologie, Ed. Flammarion Médecine Science, 298 p.

GOODMAN-GILMAN A., RALL T.W., NIES A.S., TAYLOR P. (1991).

The pharmacological basis of therapeutics, 8th ed., Pergamon Press ed., New York., 1811 p.

HULL D.A., MUHAMMAD N., LANESE J.J., REICH S.D., FINKELSTEIN T.T., FANDRICH S. (1981).

Determination of platinum in serum and ultrafiltrate by flameless atomic absorption spectrophotometry. *J.Pharm. Sci.* **70** 500-502.

JENNINGS F.W., WHITELAW D.D., URQUHART G.M.(1977).

The relationship between duration of infection with *Trypanosoma brucei* in mice and the efficacy of chemotherapy. *Parasitology* **75** 143-153, in BOUTEILLE (1990).

JENNINGS F.W. (1988).

The potentiation of arsenicals with difluoromethylornithine (DFMO) : experimental studies in murine trypanosomiasis. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **81** 595-607, in BOUTEILLE (1990).

KAZYUMBA G.L., RUPPOL J.F., TSHEFRI A.K., NKANGA N. (1988).

Arsénorésistance et difluorométhylornithine dans le traitement de la trypanosomiase humaine africaine. *Bull. Soc. Path. Ex.* **81** 591-594.

KINNAMON K.E., STECK E.A., RANE D.S. (1980).

Anticancer agents and antitrypanosomiasis activity in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **64** 391-394, in BOUTEILLE (1990).

KUZOE F.A.S. (1991).

Perspectives in research on and control of African trypanosomiasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, **85** 33-41.

LANHAM S.M., GODFREY D.G. (1970).

Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* **28** 521-534.

LAROCHE F. (1992).

Activité trypanocide et cinétique plasmatique du Platine chez le mouton traité par l'Iodure de Cis-Pt Pentamidine. *Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Limoges.* 78 p.

LEGER N., NOTTEGHEM M.J., PESSON B. (1992).

Parasitologie médicale. Guide pratique. Ed. Biologiste et praticien, 95p.

LOISEAU P.M., CRACIUNESCU D.G., DOADRIO-VILLAREJO J.C., CERTAD-FOMBONA G., GAYRAL P. (1992).

Pharmacomodulations on new organometallic complexes of Ir, Pt, Rh, Pd, Os : *in vitro* and *in vivo* trypanocidal study against *T. b. brucei*. *Trop. Med. Parasitol.* **43** 110-114.

MARIE-DARAGON A. (1993).

Essais d'activité antiparasitaire de 17 composés et du Mégazole dans la trypanosomose expérimentale à *T. b. brucei* de la souris. *Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Limoges.* 195 p.

MAURICE J. (1992).

La France et la recherche sur les maladies tropicales. Ed. Ellipses. 159 p.

MOENS F., DE WILDE M., NGATO K. (1984).

Essai de traitement au nifurtimox de la trypanosomiase humaine africaine. *Ann. Soc. Belg. Méd. Trop.* **64** 37-43.

- NATHAN H.C., BACCHI C.J., HUTNER S.H., RESCIGNO D., McCANN P.P., SJORDSMA A. (1981a).
Antagonism by polyamins of the curative effect of α -difluoromethylornithine in *Trypanosoma brucei brucei* infections. *Biochem. Pharmacol.* **30** 3010-3013, in BOUTEILLE (1990).
- NATHAN H.C., BACCHI C.J., NICHOL C.A., DUCH D.S., MULLANEY E.A., HUTNER S.H. (1984).
Antitumor phtanilides active in acute and chronic *Trypanosoma brucei brucei* mice infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **33** 845-850, in BOUTEILLE (1990).
- NATHAN H.C., BACCHI C.J., SAKAI T.T., RESCIGNO D., STUMPF D., HUTNER S.H. (1981b).
Bleomycin-induced life prolongation of mice infected with *Trypanosoma brucei brucei* EATRO 110. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75** 394-398, in BOUTEILLE (1990).
- NATHAN H.C., SOTO K.V.M., MOREIRA R., CHUNOSOFF L., HUTNER S.H., BACCHI C.J. (1979).
Curative effects of the antiprotozoals amicarbalide and imidocarb on *Trypanosoma brucei* infection in mice. *J. Protozool.*, **26** 657-660, in BOUTEILLE (1990).
- LOUDART L., DIALLO B., ROLEZ S. (1976).
Contribution du laboratoire au diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine. *Méd. Afr. Noire* **23** 31-37.
- PEPIN J., MILORD F., GUERN C., SCHECHTER P.J. (1987).
Difluoromethylornithine for arsenoresistant *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *Lancet* **II** 1431-1432.

POLTERA A.A. (1980).

Immunopathological and chemotherapeutic studies in experimental trypanosomiasis with a special reference to the heart and brain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74** 706-715, in BOUTEILLE (1990).

POLTERA A.A., HOCHMANN A., LAMBERT P.H. (1981).

Trypanosoma brucei brucei : the response to Melarsoprol in mice with cerebral trypanosomiasis. An immunopathological study. *Clin. Exp. Immunol.*, **46** 363-374, in BOUTEILLE (1990).

POLTERA A.A., HOCHMANN A., RUDIN W., LAMBERT P.H. (1980).

Trypanosoma brucei brucei : a model for cerebral trypanosomiasis in mice - an immunological, histological and electromicroscopic study. *Clin. Exp. Immunol.*, **40** 496-507, in BOUTEILLE (1990).

PRADEAU D. (1992).

Analyse pratique du médicament. Ed. Médicales Internationales, 1067 p.

RAETHER W., SEIDENATH H. (1976).

Trypanocidal effect of diamine 98/202 in experimental *Trypanosoma rhodesiense* infection of the stump-tailed macaque (*Macaca arctoides*). *Tropenmed. Parasitol.*, **27** 238-244, in BOUTEILLE (1990).

RANE L., RANE D.S., KINNAMON K.E. (1976).

Screening large numbers of compounds in a model based on morbidity of *Trypanosoma rhodesiense* infected mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **25** 395-400, in BOUTEILLE (1990).

SCHMIDT H., SAYER P. (1982a).

Trypanosoma brucei rhodesiense infection in Vervet monkeys. I. Parasitologic, hematologic, immunologic and histologic results. *Tropenmed. Parasitol.*, **33** 249-254, in BOUTEILLE (1990).

SCHMIDT H., SAYER P. (1982b).

Trypanosoma brucei rhodesiense infection in Vervet monkeys . II. ,Provocation of the encephalitic late phase by treatment of infected monkeys. *Tropenmed. Parasitol.*, **33** 255-259, in BOUTEILLE (1990).

SCHNITZER R. J., HAWKING F. (1963).

Experimental chemotherapy. Academic Press Ed. New York. 1008 p.

STANGELLINI A. (1988).

La trypanosomiase à *T. b. gambiense* : méthodes de lutte. *Bull. Soc. Path. Ex.* **81** 637-644.

VAN NIEUWENHOVE S. (1992).

Advances in sleeping sickness therapy. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, **72**, Suppl. I : 39-51.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
RAPPELS SUR LES TRYPANOSOMOSES AFRICAINES	2
LA TRYPANOSOMOSE HUMAINE AFRICAINE	3
Epidémiologie	3
Le parasite responsable	3
Le vecteur	5
Symptomatologie	7
Diagnostic biologique	8
Diagnostic direct	8
Diagnostic indirect	9
Thérapeutique actuelle	9
Introduction	9
Médicaments ne traversant pas la barrière hémato-méningée	9
La pentamidine	9
La suramine	11
Acéturate de diminazène	11
Médicaments traversant la barrière hémato-méningée	12
Le mélarsoprol	12
Eflornithine	13
Nifurtimox	14
Autres molécules en cours d'étude : les spiroarsoranes	14
LES TRYPANOSOMOSES ANIMALES AFRICAINES	15
Introduction	15
Classification des parasites en cause	15
Epidémiologie, clinique	17
METHODE D'ETUDE DES MEDICAMENTS TRYPANOCIDES	19

ETUDE DE L'ACTIVITE TRYPANOCIDE ET CINETIQUE PLASMATIQUE DE L'Ir	
Cl ₆ ²⁻ STILBAMIDINE CHEZ LE MOUTON	24
METHODOLOGIE	25
Molécule utilisée	25
Matériel utilisé	26
Matériel biologique	26
Le modèle ovin	26
Le parasite	26
Autre matériel	27
Matériel à inoculation	27
Pour la cinétique	27
Matériel analytique	27
Protocole	27
Expérimentation animale	28
Infestation des moutons	28
Surveillance des moutons	28
Traitement des moutons	29
Pharmacocinétique	29
Protocole analytique	30
RESULTATS	32
Activité trypanocide	32
Résultats de la pharmacocinétique expérimentale	32
Valeurs expérimentales	32
Courbes expérimentales de cinétique sérique	33
DISCUSSION	37
Protocoles et méthode	37
Effet trypanocide	38
Cinétique sérique de l'Iridium	39
Courbes expérimentales	39
Comparaison avec l'Iodure de cis Pt Pentamidine	41
Comparaison avec le chlorure de Cis Platine Pentamidine	41

CONCLUSION	44
BIBLIOGRAPHIE	45

TROUBAT Mireille. ACTIVITE TRYPANOCIDE ET CINETIQUE PLASMATIQUE DE L'HEXACHLOROIRIDIATE DE STILBAMIDINE DANS LA TRYPANOSOMOSE EXPERIMENTALE DU MOUTON A *Trypanosoma brucei brucei*. Université de Limoges, 1994. 56 p.

De nos jours, des millions de personnes et d'animaux vivent en région d'endémie des trypanosomoses africaines.

Les médicaments trypanocides actuellement à notre disposition sont assez décevants car aucun n'est capable d'être actif pendant toutes les phases de la maladie, sans être toxique.

Le but de notre étude a été d'évaluer l'activité d'un produit original, l'hexachloroiridiate de stilbamidine, dans la trypanosomose expérimentale du mouton à *Trypanosoma brucei brucei*. Administré par voie sous-cutanée, ce produit s'est avéré actif pendant la phase lymphatico-sanguine de la maladie, à la dose unique de 2 mg par kg de poids corporel.

L'étude de la cinétique plasmatique de l'iridium montre que le métal disparaît lentement de ce compartiment, ce qui explique en partie l'activité trypanocide à dose unique.

Bien que non efficace en phase de polarisation neuro-méningée de la maladie, ce composé peut néanmoins être proposé pour le traitement des trypanosomoses animales.

MOTS-CLES. Cinétique sérique - Ir Cl_6^{2-} stilbamidine - Complexe organométallique - Activité trypanocide - Trypanosomose