

PARASITOLOGIE

La trypanosomose humaine africaine, apport des modèles expérimentaux.

B. Bouteille (1, 2), P. Millet (4), B. Enanga (1), J. Mezui Me Ndong (4), M. Keita (1), M.O. Jauberteau (1, 3), A. Georges (4) & M. Dumas (1) (5)

(1) Institut d'épidémiologie neurologique et de neurologie tropicale, Téléphone :05 55 43 58 20 ;Télécopie :05 55 43 58 21 ;E-mail :ient@unilim.fr

(2) Laboratoire de parasitologie, Faculté de médecine, 2 rue du Docteur Marcland,87025 Limoges Cedex, France

(3) Laboratoire d'immunologie, Faculté de médecine, 2 rue du Docteur Marcland,87025 Limoges Cedex, France

(4) Centre international de recherches médicales , BP 769, Franceville, Gabon.

(5) Communication MR1996/044 présentée au congrès SPE de novembre 1996 à l'île Maurice. Article accepté le 6 mars 1998.

Summary: Experimental Models of Human African Trypanosomiasis.

Melarsoprol has remained the chosen drug for the late-stage treatment of human African trypanosomiasis (HAT) due both to *Trypanosoma brucei* (T. b.) gambiense and T. b. rhodesiense ; however, arsenical encephalopathies, which are often fatal, occur in 5-10% of the treated cases. To date, two major problems have not been solved. The first one is the precise diagnosis of early involvement of the central nervous system (CNS) which determines the therapeutics to be administered. The second one is linked to the lack of data on in vivo efficacy of products which are effective in vitro against trypanosomes. Answers have to be provided by experimental animal models of HAT. Such models would allow for better studies of the pathology and pathogenesis of the disease, as well as therapeutic trials of potentially effective new drugs or combinations. We have developed acute and chronic murine and sheep experimental animal models of HAT infected by T. b. brucei. Meningoencephalitis and neurological signs are relatively difficult to obtain in murine models and require artificial means, such as suramin treatment on day 21 after-infection. The chronic murine model has demonstrated CNS involvement with meningitis, followed by meningoencephalitis with progressive astrocytosis. The sheep model develops a disease with CNS complications and cerebrospinal fluid can be collected. In the sheep model, we have described anti-galactocerebrosides antibodies, which represent major components of myelin, which may indicate an autoimmune process in the CNS. We then described these antibodies in the cerebrospinal fluids and sera from patients at a late-stage of the disease. From a therapeutic point of view, we have cured mice or sheep with low doses of melarsoprol, or with the nitroimidazole derivatives Ro 15-0216 and megalzol, alone or combined with suramin. Further studies of these nitroimidazole compounds, which could be proposed for human use, have to be carried out on a primate model infected by T. b. gambiense. To our knowledge, this primate model is not available. This is why we have recently developed a T. b. gambiense primate model of HAT on *Cercopithecus aethiops*.

Résumé :

Le seul médicament actif sur la phase nerveuse de la trypanosomose humaine africaine (THA) reste le mélarsoprol qui occasionne 5 à 10 % d'encéphalopathies réactives, le plus souvent mortelles. En effet, la THA due à *Trypanosoma brucei* (T. b.) gambiense et T. b. rhodesiense pose encore de nos jours deux problèmes majeurs en thérapeutique, celui de la méconnaissance du délai précis de l'envahissement du système nerveux central (SNC) qui conditionne cependant le choix thérapeutique, et celui de la méconnaissance de l'efficacité de molécules dont l'activité sur les trypanosomes a été démontrée in vitro. Les réponses à ces deux inconnues passent par l'établissement de modèles expérimentaux animaux qui doivent permettre de mieux étudier les mécanismes physiopathologiques de la THA, et de tester les molécules potentiellement actives en étudiant leur effet sur l'évolution de la maladie. Les modèles expérimentaux mis au point par notre équipe sont des modèles murins aigus et chroniques et un modèle mouton infectés par T. b. brucei, un trypanosome très proche de ceux qui sont pathogènes pour l'homme. Bien qu'une évolution chronique avec méningoencéphalite et signes neurologiques chez le modèle murin soit difficile à obtenir et nécessite des artifices (traitement par la suramine à 21 jours d'infection), celui-ci reste le plus souvent utilisé. Le mouton permet l'obtention d'une maladie subaiguë avec atteinte du SNC ; son intérêt majeur réside dans la possibilité de réaliser des ponctions de liquide céphalo-rachidien. Sur le plan physiopathologique, ces modèles nous ont permis de montrer la possibilité d'une participation auto-immune dans la THA grâce à la mise en évidence d'autoanticorps dirigés contre les galactocérébrosides ; nous avons ensuite pu décrire ces anticorps chez des patients en phase nerveuse de la THA. Sur le plan thérapeutique, ces modèles nous ont permis d'apprécier l'efficacité de faibles doses de mélarsoprol et, surtout, de montrer l'efficacité de dérivés nitroimidazolés, le Ro 15-0216 et le mégazol, seuls ou en association avec la suramine. La poursuite de l'étude de ces deux molécules prometteuses, qui pourraient être proposées en thérapeutique humaine, doit être réalisée sur un modèle expérimental primate infecté par un trypanosome pathogène pour l'homme. A notre connaissance, un modèle primate infecté par T. b. gambiense n'est pas disponible à l'heure actuelle. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris la mise au point d'un nouveau modèle expérimental de la THA sur le primate. Le choix s'est porté sur un primate sensible à l'infection par les trypanosomes pathogènes pour l'homme, *Cercopithecus aethiops* infecté par T. b. gambiense. Ce modèle permettra des études physiopathologiques de la maladie et des études d'efficacité et de pharmacocinétique de nouvelles molécules actives sur les trypanosomes.

Key-words: Human African trypanosomiasis - Experimental model - Primate - Nitroimidazole derivative

Mots-clés : Trypanosomose humaine africaine - Modèle expérimental - Primate - Dérivé nitro-imidazole

Introduction

La trypanosomose humaine africaine (THA) est une maladie mortelle en l'absence de traitement. Elle est due à deux trypanosomes du groupe *brucei*, *Trypanosoma brucei* (*T. b.*) *gambiense* en Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale et *T. b. rhodesiense* en Afrique de l'Est, transmis à l'homme par piqûre de glossines, ou mouches tsé-tsé, d'espèces différentes. La THA sévit dans 36 pays d'Afrique au sud du Sahara. Elle demeure un problème majeur de santé publique qui s'aggrave en raison des difficultés socio-économiques et de l'instabilité politique de la plupart de ces pays ; des prévalences supérieures à 10 ou 20 % sont décrites dans certains foyers (19, 37). La THA se caractérise par une invasion progressive et insidieuse du système nerveux central (SNC) (21, 42). L'acéturate de diminazène (Bérényl®) n'est pas commercialisé en vue d'une utilisation en thérapeutique humaine, l'éflornithine ou DFMO (Ornidyl®) n'a été disponible que pendant une très courte durée et le nifurtimox (Lampit®) n'a bénéficié que d'un usage très restreint. Il n'y a donc aujourd'hui encore que trois médicaments disponibles, tous connus depuis plus de cinquante ans, pour traiter les patients : la pentamidine (Lomidine®) qui n'est plus commercialisée et qui est remplacée par le Pentacarinat®, plus onéreux) et la suramine (Moranyl®) pour les cas précoces sans atteinte du SNC, et le seul mélasoprol (Arsobal®) pour le stade tardif méningo-encéphalitique. De plus, ce dernier est un produit très toxique qui entraîne la survenue d'une encéphalopathie chez 5 à 10 % des malades traités, mortelle le plus souvent (2, 37).

La recherche de nouveaux médicaments peu toxiques et d'administration aisée, actifs contre les trypanosomes à tous les stades de la maladie, est indispensable devant l'extension actuelle de la THA (19, 37). L'étude de thérapeutiques combinées, utilisant anciens et nouveaux produits, doit également être amplifiée (33, 34). Ces recherches passent par l'établissement de modèles expérimentaux de la THA, tant *in vitro* (cultures) qu'*in vivo* (souris, mouton, primate). Ces modèles doivent permettre, d'une part, de juger de l'efficacité d'un produit ou d'une association, mais aussi, d'autre part, de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie pour définir des critères objectifs de leur efficacité. De plus, une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans l'évolution de la THA devrait mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques, ainsi qu'une amélioration dans l'application des thérapeutiques existantes ou issues de la conception rationnelle de molécules actives sur les voies métaboliques propres au trypanosome (45).

Modèles expérimentaux décrits dans la littérature

Cultures in vitro de *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei a été cultivé pour la première fois par NOVY et MC NEAL en 1904 (43). HIRUMI et coll. réussissent en 1977 à maintenir en culture, de façon permanente, des formes sanguines de *T. brucei* en conservant leur pouvoir infectieux pour l'hôte (28, 29). Le tapis cellulaire nourricier est formé de cellules fibroblastiques provenant de tissus embryonnaires de bovins. BRUN et coll. en 1981 cultivent *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense* sur fibroblastes de poumon embryonnaire humain (17). En 1985, deux milieux semi-synthétiques sont décrits. Dès lors, il est possible de cultiver les trypanosomes en l'absence de cellules nourricières. Le seul

élément de composition mal définie est le sérum qui reste obligatoire pour supplémenter les milieux. Il s'agit du milieu décrit par BALTZ et coll., supplémenté en 2-mercaptoéthanol (4), et de celui décrit par DUSZENKO et coll., supplémenté en L-cystéine (22). Il semble que l'addition de ces produits réducteurs remplace l'action des cellules fibroblastiques. L'utilisation de systèmes de culture de trypanosomes en milieu semi-synthétique rend aisée la recherche *in vitro* d'une activité trypanocide.

Modèles expérimentaux murins d'infection à *Trypanosoma brucei*

La souris a permis d'étudier l'action de l'association acide salicylhydroxamique (SHAM) et glycérol sur *T. b. brucei* et *T. b. rhodesiense* (20, 23-25, 44) : première thérapeutique dont la cible métabolique soit parfaitement connue. Cependant, cette association est suivie de rechute car les doses efficaces ne sont pas atteintes dans les tissus.

Les modèles murins réalisent des infections suraiguës qui n'ont rien de commun avec la maladie humaine. Ils peuvent en général rendre compte d'une activité thérapeutique *in vivo* et sont complémentaires d'une activité trouvée en culture.

Cependant, certains isolats de *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* ou *T. b. gambiense* peuvent produire des infections à évolution subaiguë ou chronique chez le rat et la souris. BECKERS et coll. (5) et VAN MARCK et coll. (63) ont obtenu des infections chroniques : selon les isolats de *T. b. gambiense*, les durées moyennes de survie allaient de 24 à 59 jours chez la souris et de 82 à 221 jours chez le rat. Dans les mêmes conditions, WERY a rapporté, par examen histopathologique, que l'atteinte du SNC croît avec la prolongation de la durée de survie, faisant de ces infections chroniques des modèles de choix pour l'expérimentation thérapeutique (64). POLTERA et coll. (47-49) ont aussi décrit un modèle avec atteinte du SNC. C'est à partir de 1977 que JENNINGS et coll. ont élaboré un modèle de ce type pour étudier la thérapeutique des affections méningo-encéphalitiques de la THA (35). Les souches de trypanosomes utilisées par ces auteurs donnent une atteinte méningo-encéphalitique 21 jours après l'infection. La durée de l'infection avant traitement joue un rôle déterminant chez les modèles murins : l'acéturate de diminazène, qui ne passe pas la barrière hémato-encéphalique, guérit les souris infectées par *T. b. brucei* TREU667 ou *T. b. brucei* GVR35 s'il est administré 3 jours après l'infection, et ne les guérit pas 21 jours après, quand il y a atteinte du SNC (32). L'utilisation de tels modèles d'infection chronique avec atteinte du SNC se rapprochant de la maladie humaine permet d'étudier l'efficacité, au stade neurologique de la maladie, d'un produit reconnu actif sur les trypanosomes (32-35).

Modèles expérimentaux sur les primates infectés par *Trypanosoma brucei*

La description de primates naturellement infectés par des trypanosomes du groupe *brucei* est peu fréquente dans la littérature (16). Cependant, les singes ont été utilisés pour étudier des isolats de trypanosomes provenant de l'homme ou d'animaux. Généralement, des infections aiguës ou subchroniques ont été obtenues avec *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* (39) et, déjà rapportées par LAVERAN et MESNIL en 1912 (38), puis par PERUZZI en 1928 (46), VAN BOGAERT et DEWULF en 1938 (62) et BAKER en 1962 (3). L'étude récente d'un facteur sérique trypanocide pour *T. b. gambiense* a montré sa présence chez *Papio* sp, résistant à l'infection par ce trypanosome, et son

absence chez *Cercopithecus* sp, *Erythrocebus patas*, *Colobus* sp et *Macaca* sp, prédictive d'une sensibilité de ces primates à l'infection expérimentale à *T. b. gambiense* (61). *Cercopithecus aethiops*, *Macaca arctoides* et *Pan troglodytes*, infectés par *T. b. rhodesiense*, ont permis le développement d'une maladie avec atteinte du SNC et la recherche de l'efficacité de produits réputés trypanocides (27, 54, 56, 59, 60). Le modèle expérimental primate actuellement utilisé en recherche thérapeutique est *C. aethiops* infecté par *T. b. rhodesiense* (50, 52, 53, 55, 59). Il présente des lésions du SNC après une durée de survie moyenne de 65 jours sans traitement ; des trypanosomes sont mis en évidence dans le liquide céphalo-rachidien dès 19 à 41 jours après l'infection. Quand l'atteinte du SNC est reconnue, un traitement par l'acéturate de diminazène ou la suramine permet une forte augmentation de la durée de survie, environ un an, et l'obtention de signes de méningo-encéphalite plus marqués (51, 60). Plusieurs thérapeutiques ont été étudiées sur ce modèle : faibles doses de mélarsoprol, nitroimidazolés (MK 436, Ro 15-0216), DFMO, associations médicamenteuses (18, 57, 58).

Revue des principaux résultats

Cultures in vitro de trypanosomes (tableau I).

Tableau I.
Concentrations efficaces trypanocides de produits testés in vitro en milieu acellulaire semi-synthétique.

produit testé	concentration efficace en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
pentamidine	0,1
suramine	1
mélarsoprol	0,1
DFMO	50a
nifurtimox	1
Ro 15-0216	1
mégazol	0,1

a : concentration trypanostatique.

Trypanosoma brucei brucei AnTat 1-9 est un clone monomorphe dérivé de la souche EATRO (East African Trypanosomiasis Organization) 1125, isolée en 1966 du sang d'un *Trailephus scriptus* en Ouganda. Pour les cultures *in vitro*, nous l'avons adapté au milieu semi-synthétique acellulaire décrit en 1985 par BALTZ et coll. (4). Ce milieu

permet une excellente multiplication de ces trypanosomes qui conservent leur pouvoir infectieux pour la souris et l'étude *in vitro* de produits médicamenteux (8).

Nos essais *in vitro* ont confirmé l'efficacité du mélarsoprol sur *T. b. brucei* à des concentrations de l'ordre de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (8). Les concentrations sériques obtenues avec les doses de mélarsoprol habituellement prescrites chez l'homme sont de $0,2$ à $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (40). Une des applications actuelles des cultures s'attache à étudier la sensibilité de souches et la pharmacocinétique du mélarsoprol. *In vitro*, *T. b. brucei* AnTat 1-9 s'est montré sensible à la pentamidine à la dose de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, et à la suramine à $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (52). Nos essais *in vitro* ont montré l'effet trypanostatique de la DFMO à partir d'une concentration de $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (8). L'interférence de ce produit avec le métabolisme des polyamines a été bien démontrée (26). Ces résultats permettent d'expliquer en partie l'effet trypanostatique de la DFMO observé en culture et la non pathogénicité de la subinoculation à la souris des trypanosomes exposés à la DFMO. Le nifurtimox est un dérivé du nitrofurane utilisé dans le traitement de la maladie de CHAGAS. Nous avons montré son effet trypanocide *in vitro* à la concentration de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (9). Les essais *in vitro* concernant le 2-nitroimidazolé Ro 15-0216 (dérivé du benzimidazole ou Radanil® utilisé aussi dans le traitement de la maladie de CHAGAS) montrent son activité sur *T. b. brucei* AnTat 1-9 à la concentration de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (8). Une étude comparative de

la sensibilité au Ro 15-0216 des trypanosomes du groupe *brucei* a été réalisée par BOROWY et coll. (7) en utilisant le même milieu semi-synthétique : *T. b. rhodesiense* est le plus sensible, *T. b. gambiense* le moins sensible et *T. b. brucei* de sensibilité intermédiaire.

Le mégazol est un dérivé nitroimidazole-thiadiazole, synthétisé pour la première fois en 1968 par BERKHELAMMER et ASATO (6). La synthèse du mégazol et de dérivés du mégazol a été réalisée par le Laboratoire de chimie organique biologique (Jacques PERIE, Gérard CHAUVIÈRE) de l'université Paul SABATIER de Toulouse. Sur *T. b. brucei* AnTat 1-9, nous avons pu établir *in vitro* son activité trypanocide à $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (15).

Par ailleurs, un essai portant sur 45 produits médicamenteux commercialisés, connus pour passer la barrière hémato-encéphalique et appartenant à des classes thérapeutiques diverses (antidépresseurs, neuroleptiques, sédatifs, oxygénateurs cérébraux, anti-convulsivants...), a été infructueux (41).

Modèles expérimentaux chez la souris Swiss

Pour l'établissement de ces modèles, nous avons utilisé deux clones de *T. b. brucei*, tous deux dérivés de EATRO 1125 citée plus haut. Le clone *T. b. brucei* AnTat 1-9, monomorphe, provoque une infection aiguë chez la souris et sa mort en trois à quatre jours. Le clone *T. b. brucei* AnTat 1-1E, pléomorphe, permet une durée d'évolution beaucoup plus longue, 30 jours en moyenne, avec atteinte du SNC vers le 21ème jour d'évolution (8, 9, 15). Ce deuxième clone ne subit pas de passages répétés chez la souris Swiss pour éviter son évolution vers le monomorphisme et une pathogénicité plus aiguë ; des cryostabilisants sont utilisés à chaque nouvelle expérimentation. L'efficacité des essais thérapeutiques est mesurée dans le temps par l'absence de rechute parasitaire après traitement : 4 mois pour le modèle aigu à *T. b. brucei* AnTat 1-9 et 12 mois pour le modèle chronique à *T. b. brucei* AnTat 1-1E.

Tableau II.

Traitement du modèle expérimental murin aigu à *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1-9 par la suramine ou le mégazol administré par voie intra-péritonéale ou per os.

traitement ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$)	voie intrapéritonéale		voie per os	
	nb d'heures après infection	nb de souris guéries / traitées	nb d'heures après infection	nb de souris guéries / traitées
contrôle d'infection		0 / 32		0 / 10
suramine (20)	12	3 / 5		NF
suramine (40)	12	5 / 5		NF
mégazol (20)	12	5 / 5	12	4 / 5
mégazol (80)	24	5 / 5	24	5 / 5
mégazol (80)	48	5 / 5	48	6 / 6

NF : non fait.

Modèle murin aigu à *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1-9 (tableau II)

La suramine à la dose unique intrapéritonéale de $20 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ guérit 50 % des souris. Une dose plus élevée de suramine, $40 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, est nécessaire pour obtenir un effet trypanocide *in vivo*. La DFMO est inactive sur cette souche, *per os* et en injection intrapéritonéale, à des doses 10 fois supérieures à celles préconisées dans le traitement de la THA, soit $4 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$, deux fois par jour pendant six jours par voie intra-péritonéale, ou *ad libitum* dans l'eau de boisson pendant la même durée. Le nifurtimox à la dose de $100 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1} \times 15$ permet 50 % de guérisons. A la posologie de $200 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1} \times 4$, le produit est actif, mais les troubles de neurotoxicité sont importants, entraînant 20 % de mortalité. Le protocole suivant, $200 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1} \times 3$ suivi de $100 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1} \times 7$, permet 90 %

de guérisons avec seulement de légers signes de neurotoxicité, rapidement régressifs. Le mégazol à la dose unique de 20mg.kg⁻¹ a une efficacité totale sur ce modèle expérimental. Son important effet trypanocide persiste à la dose unique de 80 mg.kg⁻¹, administrée 48 heures après l'infection, lorsque la parasitémie est déjà très élevée et les souris difficiles à guérir.

Tableau III.

Efficacité des associations suramine-nifurtimox et suramine-mégazol sur le modèle expérimental murin chronique à *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1-1E.

traitement (mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ x nb de jours)	application du traitement (nb de jours après infection)	nb de souris guéries/traitées
contrôle d'infection		0 / 10
suramine IP ^a (20x1)	21	0 / 10
nifurtimox IP ^a (200x3)	25 à 27	0 / 10
mégazol IP ^a (80x4)	21 à 24	0 / 10
suramine IP ^a (20x1) puis nifurtimox IP ^a (200x3)	25 26 à 28	5 / 10
suramine IP ^a (20x1) puis nifurtimox IP ^a (200x3 suivi de 100x14)	25 26 à 42	10 / 10 ^c
suramine IP ^a (20x1) puis mégazol IP ^a (80x3)	21 22 à 24	10 / 10 ^c
suramine IP ^a (20x1) puis mégazol PO ^b (150x3)	21 22 à 24	10 / 10 ^c
suramine IP ^a (20x1) puis mégazol IP ^a (80x4)	100 101 à 104	15 / 15 ^c
suramine IP ^a (20x1) puis mégazol PO ^b (80x4)	100 101 à 104	14 / 15 ^c

a : voie intra-péritonéale (IP) ;

b : voie per os (PO) ;

c : avec disparition des lésions à l'histopathologie du SNC.

Modèle murin chronique à *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1-1E (tableau III).

Ce modèle présente à 21 jours d'infection une atteinte du SNC mise en évidence par une méningite avec infiltration lympho-plasmocytaire à l'examen histopathologique. Les souris traitées à 21 jours par la suramine à 20 mg.kg⁻¹ font des rechutes parasitémiques et meurent. Après traitement par la suramine, les subinoculations de sang ne sont pas infectieuses, des souris saines restent sans parasite décelable dans le sang, tandis que les subinoculations de broyats de cerveau provoquent l'infection des souris saines, prouvant que des trypanosomes restent dans l'encéphale, à l'abri du traitement par la suramine.

Les traitements itératifs par la suramine à la dose de 20mg.kg⁻¹, à chaque rechute parasitémique, permettent une très importante durée de survie des souris parasitées, jusqu'à plus de 300 jours, avec une intensification progressive des lésions du SNC et l'apparition de manifestations cliniques neurologiques (paralysies, troubles de la coordination, état de somnolence). Le nombre de souris présentant une telle symptomatologie augmente avec le temps ; la méningite devient plus étendue, évoluant vers une méningo-encéphalite avec progression à travers les espaces de VIRCHOW ROBIN. Des trypanosomes sont mis en évidence dans les méninges et les plexus choroïdiens, puis dans le reste du parenchyme pour les infections de longue durée. Les coupes d'encéphale, examinées en immunohistochimie pour la GFAP (glial fibrillary acid protein), permettent d'observer une astrocytose croissante avec le temps (36). Ce modèle reproduit les caractéristiques cliniques et histopathologiques observées dans la maladie humaine, il est donc intéressant de l'utiliser pour connaître l'efficacité d'un produit au stade neurologique de l'affection. Indirectement, ce modèle renseigne sur la capacité du produit testé à passer la barrière hémato-encéphalique. Traitées pendant la quatrième semaine d'infection par la suramine, le nifurtimox ou le mégazol, les souris font des rechutes parasitémiques et meurent. Les traitements combinés utilisant une dose de

suramine suivie de l'administration du nifurtimox ou du mégazol permettent la guérison de tous les animaux infectés (15). Ce fait est remarquable dans la combinaison suramine-mégazol où le mégazol, administré en injection intra-péritonéale ou *per os*, entraîne la guérison de toutes les souris après 100 jours d'infection, quand il existe une forte infiltration cellulaire du SNC (résultats personnels non publiés).

Modèle mouton à *Trypanosoma brucei brucei*

Le mouton est réceptif à l'infection par *T. brucei* (39). Le maniement et l'élevage de cet animal sont aisés. Les prélèvements de liquides biologiques sont facilement réalisables. Les moutons sont infectés par voie sous-cutanée par *T. b. brucei* AnTat 1-9. La durée de survie est de 34 à 172 jours (moyenne : 75 jours). Après l'infection, les animaux présentent une hyperthermie, une anémie, une perte de poids, des œdèmes. A partir de la troisième semaine, les animaux présentent une anorexie, peu de réponse à la stimulation et des troubles de la marche. La parasitémie apparaît vers le neuvième jour, elle est faible tout au long de l'évolution. Les trypanosomes et une hypercytorachie apparaissent dans le LCR entre le 27ème et le 71ème jour (10). Les protéines totales plasmatiques sont fortement augmentées, surtout les IgM, avec inversion du rapport albumine sur globulines (11). L'activité hémolytique du complément chez le mouton est faible (23,30 unités hémolytiques 50 % par ml). Chez les animaux infestés, cette activité hémolytique n'est plus détectable dès le cinquième jour après l'infection et jusqu'à la mort (12). En revanche, des complexes immuns circulants sont détectés à partir du treizième jour. Les protéines totales du LCR sont peu augmentées, ne dépassant jamais 1 g.l⁻¹ ; les IgM représentent rapidement plus de 10 % de la protéinorachie. L'analyse histopathologique a révélé une atteinte organique constante des organes prélevés, à l'exception des reins et des poumons. L'encéphale présente, en particulier, des infiltrats lymphoplasmocytaires diffus et périvasculaires typiques de la maladie humaine.

Nous avons recherché sur ce modèle des auto-anticorps dirigés contre des substances du SNC dont la présence pourrait être prédictive de l'atteinte neurologique typique de la trypanosomose humaine. Par des techniques immunoenzymatiques et de chromatographie des glycolipides, nous avons montré la réactivité importante des sérums et LCR du modèle mouton avec le galactocébroside, constituant majeur de la myéline (1, 30). Ces autoanticorps ont pu ensuite être mis en évidence dans le sérum et le LCR de patients atteints de THA. La proportion de LCR de patients présentant des anti-galactocébroside va de 5,5 % pour le stade lymphatico-sanguin à 84,6 % pour le stade neurologique avec signes cliniques (30, 31).

Le mouton, infecté expérimentalement par *T. b. brucei* AnTat 1-9, reproduit la maladie humaine (11, 12). Ce modèle peut être utilisé pour réaliser des expérimentations de molécules actives sur les trypanosomes africains. Nous l'avons utilisé pour montrer l'activité du Ro 15-0216 dès la dose de 25 mg.kg⁻¹, et pour mettre en évidence l'efficacité du mélarso-*prol* à partir de 0,9 mg.kg⁻¹, soit une posologie quatre fois inférieure à celle préconisée en thérapeutique humaine (13, 14).

Modèle primate à *Trypanosoma brucei gambiense*

A l'heure actuelle, la recherche sur la THA ne dispose pas d'un modèle expérimental primate à *T. b. gambiense*. Le seul modèle existant est *C. aethiops* infecté par *T. b. rhodesiense*

(58, 59). Or, ce modèle présente une durée de survie faible sans traitement (de l'ordre de deux mois) et l'atteinte du SNC n'est exploitable qu'en prolongeant la survie des animaux par un traitement par l'acéturate de diminazène ou la suramine, de la même façon que pour les modèles expérimentaux chroniques murins (51, 60). Il est donc nécessaire, puisque certains primates sont sensibles à l'infection par *T. b. gambiense* (61), de mettre au point un modèle expérimental primate reproduisant l'atteinte méningoencéphalitique décrite dans la THA à *T. b. gambiense* sans que celle-ci soit provoquée par un traitement médicamenteux. Nous avons entrepris l'élaboration d'un tel modèle en infectant un *C. aethiops* par une souche de *T. b. gambiense* provenant d'un patient zaïrois. Les résultats préliminaires sont encourageants. Le primate présente plusieurs vagues parasitémiques concordant avec des poussées hyperthermiques. L'examen clinique décèle des adénopathies, une splénomégalie, une perte de poids et une anémie. L'atteinte du SNC est tardive avec l'apparition, 170 jours après l'infection, de signes neurologiques accompagnés d'une hypercystorachie et de trypanosomes dans le LCR de ce primate.

Conclusion

Les méthodes de culture et les modalités d'étude de la chimiosensibilité des trypanosomes ne sont pas standardisées, rendant les résultats de la littérature difficilement comparables. Les expérimentations animales, elles aussi, devraient faire l'objet de protocoles plus standardisés incluant les règles d'éthique reconnues aux animaux par le droit et les usages pour limiter le nombre d'animaux utilisés et faciliter leur emploi aux laboratoires poursuivant des objectifs similaires. Cependant, les modèles expérimentaux de THA disponibles ne reproduisent encore qu'imparfaitement l'évolution de la maladie humaine. Cette lacune, limitant la fiabilité des recherches tant physiopathologiques que thérapeutiques, devrait être levée par la mise au point d'un modèle expérimental primate, *C. aethiops* infecté par *T. b. gambiense*. Malgré le désintérêt de l'industrie pharmaceutique pour le développement de nouveaux médicaments actifs contre la THA, quelques produits méritent une expérimentation plus poussée en vue d'une utilisation en thérapeutique humaine. Il s'agit, pour notre propre expérience, du Ro 15-0216 et du mégazol. Ces dérivés nitro-imidazolés possèdent un pouvoir mutagène *in vitro*, non prouvé *in vivo*. Mais il semble paradoxal que cela puisse limiter les recherches devant une maladie en recrudescence, mortelle sans traitement, et dont la thérapeutique spécifique actuelle entraîne la survenue d'encéphalopathies le plus souvent fatales.

Remerciements

Les auteurs remercient de leur collaboration le Professeur Nestor VAN MEIRVENNE, le Professeur Dominique LE RAY et Monsieur Yves CLAES de l'Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold d'Anvers (Belgique). Ce travail a bénéficié de l'appui du Conseil régional du Limousin et du soutien du Ministère de la coopération dans le cadre du Programme mobilisateur trypanosomiase (projets TR-9601 et TR-9603).

Références bibliographiques

- AMEVIGBE M, JAUBERTEAU-MARCHAN MO, BOUTEILLE B, DOUA F, BRETON JC *et al.* - Human African trypanosomiasis: presence of antibodies to galacto-cerebrosides. *Am J Trop Med Hyg*, 1992, **47**, 652-662.

- ARROZ JOL - Melarsoprol and reactive encephalopathy in *Trypanosoma brucei gambiense*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1987, **81**, 192.
- BAKER JR - Infection of the chimpanzee (*Pan troglodytes verus*) with *Trypanosoma rhodesiense* and *T. brucei*. *Ann Trop Med Parasitol*, 1962, **56**, 216-217.
- BALTZ T, BALTZ D, GIROUD C & CROCKETT J - Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *EMBO J*, 1985, **4**, 1273-1277.
- BECKERS A, WERY M, VAN MARCK E & GIGASE P - Experimental infections of laboratory rodents with recently isolated stocks of *Trypanosoma brucei gambiense*. 1. Parasitological investigations. *Z Parasitenkd*, 1981, **64**, 285-296.
- BERKELHAMMER G & ASATO G - 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1, 3, 4-thiadiazole. A new antimicrobial agent. *Science*, 1968, **162**, 1146.
- BOROWY NK, NELSON RT, HIRUMI H, BRUN R, WAITHAKA HK *et al.* - Ro 15-0216: a nitroimidazole compound active *in vitro* against human and animal pathogenic African trypanosomes. *Ann Trop Med Parasitol*, 1988, **82**, 13-19.
- BOUTEILLE B, DARDE ML & PESTRE-ALEXANDRE M - Action des médicaments testés en milieu acellulaire et chez la souris infectée par *Trypanosoma brucei brucei*. *Bull Soc Path Ex*, 1988, **81**, 533-542.
- BOUTEILLE B, DARDE ML & PESTRE-ALEXANDRE M - Efficacité du nifurtimox sur *Trypanosoma brucei brucei* *in vitro* et *in vivo* sur souris Swiss. Etude préliminaire. *Bull Soc Fr Parasitol*, 1988, **6**, 15-20.
- BOUTEILLE B, DARDE ML, DUMAS M, CATANZANO G, PESTRE-ALEXANDRE M *et al.* - The sheep (*Ovis aries*) as an experimental model for African Trypanosomiasis. I. Clinical study. *Ann Trop Med Parasitol*, 1988, **82**, 141-148.
- BOUTEILLE B, DARDE ML, DUMAS M, CATANZANO G, PESTRE-ALEXANDRE M *et al.* - The sheep (*Ovis aries*) as an experimental model for African Trypanosomiasis. II. Biological study. *Ann Trop Med Parasitol*, 1988, **82**, 149-158.
- BOUTEILLE B, DARDE ML, MONTEIL J & PESTRE-ALEXANDRE M - Le complément : témoin d'infestation par *Trypanosoma brucei brucei* chez le mouton, modèle expérimental ; son évolution après traitement. *Bull Soc Path Ex*, 1988, **81**, 522-529.
- BOUTEILLE B, DARDE ML, PESTRE-ALEXANDRE M, DUMAS M, BRETON JC *et al.* - Traitement de la trypanosomiase expérimentale du mouton à *Trypanosoma brucei brucei* : recherche d'une dose minima active de Mélarsozol. *Bull Soc Path Ex*, 1988, **81**, 548-554.
- BOUTEILLE B, DARDE ML, PESTRE-ALEXANDRE M, DUMAS M, BRETON JC *et al.* - Traitement de la trypanosomiase expérimentale du mouton à *Trypanosoma brucei brucei* : efficacité du Ro150216 (dérivé 2-nitroimidazole). *Bull Soc Path Ex*, 1988, **81**, 616-622.
- BOUTEILLE B, MARIE-DARAGON A, CHAUVIERE G, DE ALBUQUERQUE C, ENANGA B *et al.* - Effect of megazol on *Trypanosoma brucei brucei* acute and subacute infections in Swiss mice. *Acta Trop*, 1995, **60**, 73-80.
- BRUCE D, HAMERTON AE, BATEMAN HR, MACKIE FP & Lady BRUCE - Experiments to ascertain whether the mammals, birds or reptiles in Uganda, living on or near the lake-shore, harbour *Trypanosoma gambiense*. *Reports of the Sleeping Sickness Commission of the Royal Society*, 1911, **11**, 100-104.
- BRUN R, JENNI L, SCHONENBERGER M & SCHELL KF - *In vitro* cultivation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *J Protozool*, 1981, **28**, 470-479.
- BURUDI EME, KARANJA SM, NJUE AI, GITHIORI JB & NDUNG'U JM - Establishment of a partly DFMO-sensitive primate model of *Trypanosoma rhodesiense* sleeping sickness. *Acta Trop*, 1995, **59**, 71-73.
- CATTAND P - Trypanosomiase humaine africaine. Situation épidémiologique actuelle, une recrudescence alarmante de la maladie. *Bull Soc Path Ex*, 1994, **87**, 307-310.
- CLARKSON AB & BROW FH - Trypanosomiasis : an approach to chemotherapy by the inhibition of carbohydrate catabolism. *Science*, 1976, **194**, 204-206.
- DUMAS M & BOA FY - Human African trypanosomiasis. In: *Handbook of Clinical Neurology*, Revised Series, Vol. 8., 1988, VINKEN PJ, BRUYN GW & KLAWANS HL ed.. Elsevier Sciences Publishers, Amsterdam, pp 339-344.
- DUSZENKO M, FERGUSON MAJ, LAMONT GS, RIFKIN MR & CROSS GAM - Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms *in vitro*. *J Exp Med*, 1985, **162**, 1256-1263.
- EVANS DA & BRIGHTMAN AJ - Pleomorphism and the problem of recrudescence parasitaemia following treatment with salicylhydroxamic acid (SHAM) in African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1980, **74**, 601-604.
- EVANS DA, BRIGHTMAN AJ & HOLLAND MF - Salicylhydroxamic acid/glycerol in experimental trypanosomiasis. *Lancet*, 1977, **ii**, 769.

25. FAIRLAMB AH, OPPERDOES FR & BORST P - New approach to screening drugs for activity against African trypanosomes. *Nature*, 1977, **265**, 270-271.
26. FAIRLAMB AM, HENDERSON GB, BACCHI J & CERAMI A - *In vivo* effects of difluoromethylornithine on trypanothione and polyamine levels in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Molec Biochem Parasitol*, 1987, **24**, 185-191.
27. GODFREY DG & KILLICK-KENDRICK R - Cyclically transmitted infections of *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense* in the chimpanzees. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1967, **61**, 781-791.
28. HIRUMI H, DOYLE JJ & HIRUMI K - African trypanosomes. *In vitro* cultivation of animal-infective *Trypanosoma brucei*. *Science*, 1977, **196**, 992-994.
29. HIRUMI H, DOYLE JJ & HIRUMI K - Cultivation of bloodstream *Trypanosoma brucei*. *Bull OMS*, 1977, **55**, 405-409.
30. JAUBERTEAU MO, BEN YOUNES-CHENNOUFI A, AMEVIGBE M, BOUTEILLE B, DUMAS M *et al.* - Galactocerebrosides are antigens for immunoglobulins in sera of an experimental model of trypanosomiasis in sheep. *J Neurol Sci*, 1991, **101**, 82-86.
31. JAUBERTEAU MO, BISSER S, AYED Z, BRINDEL I, BOUTEILLE B *et al.* - Détection d'autoanticorps anti-galactocérebrosides au cours de la trypanosomose humaine africaine. *Bull Soc Path Ex*, 1994, **87**, 333-336.
32. JENNINGS FW - The potentiation of arsenicals with difluoromethylornithine (DFMO) : experimental studies in murine trypanosomiasis. *Bull Soc Path Ex*, 1988, **81**, 595-607.
33. JENNINGS FW - Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis. 2. Combination therapy and African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1990, **84**, 618-621.
34. JENNINGS FW - Combination chemotherapy of CNS trypanosomiasis. *Acta Trop*, 1993, **54**, 205-213.
35. JENNINGS FW, WHITELAW DD & URQUHART GM - The relationship between duration of infection with *Trypanosoma brucei* in mice and the efficacy of chemotherapy. *Parasitology*, 1977, **75**, 143-153.
36. KEITA M, BOUTEILLE B, ENANGA B, VALLAT JM & DUMAS M - *Trypanosoma brucei brucei* : a long-term model of human African trypanosomiasis in mice, meningo-encephalitis, astrocytosis, and neurological disorders. *Exp Parasitol*, 1997, **85**, 183-192.
37. KUZOE FAS - Current situation of African trypanosomiasis. *Acta Trop*, 1993, **54**, 153-162.
38. LAVERAN A & MESNIL F - *Trypanosomes et trypanosomiasis*. 1912, Masson éd., Paris, pp 702-716.
39. LOSOS GJ & IKEDE BO - Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *Vet Pathol*, 1972, **9** (suppl.), 1-71.
40. MAES L, DOUA F & HAMERS R - ELISA assay for melarsoprol. *Bull Soc Path Ex*, 1988, **81**, 557-560.
41. MARIE-DARAGON A, ROUILLARD MC, BOUTEILLE B, BISSER S, DE ALBUQUERQUE C *et al.* - Essais d'efficacité sur *Trypanosoma brucei brucei* de molécules franchissant la barrière hémato-méningée et du mégazol. *Bull Soc Path Ex*, 1994, **87**, 347-352.
42. MOLYNEUX DH - African trypanosomiasis. *Clin Trop Med Commun Dis*, 1986, **1**, 535-555.
43. NOVY FG & McNEAL WJ - On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J Infect Dis*, 1904, **1**, 1.
44. OPPERDOES FR, AARSEN PN, VAN DER MEER C & BORST P - *Trypanosoma brucei* : an evaluation of salicylhydroxamic acid as a trypanocidal drug. *Exp Parasitol*, 1976, **40**, 198-205.
45. PÉRIE J, DE ALBUQUERQUE C, BLONSKI C, CHAUVIERE G, GEF-FLAUT T *et al.* - Conception rationnelle et études de molécules actives contre les différentes trypanosomiasis. *Bull Soc Path Ex*, 1994, **87**, 353-361.
46. PERUZZI MRI - Pathologico-anatomical and serological observations on trypanosomiasis. *Final Report. League of Nations International Committee on Human Trypanosomiasis*, 1928, **3**, 245-328.
47. POLTERA AA - Immunopathological and chemotherapeutic studies in experimental trypanosomiasis with special reference to the heart and brain. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1980, **74**, 706-715.
48. POLTERA AA, HOCHMANN A & LAMBERT PH - *Trypanosoma brucei brucei* : the response to Melarsoprol in mice with cerebral trypanosomiasis. An immunopathological study. *Clin Exp Immunol*, 1981, **46**, 363-374.
49. POLTERA AA, HOCHMANN A, RUDIN W & LAMBERT PH - *Trypanosoma brucei brucei* : a model for cerebral trypanosomiasis in mice - an immunological, histological and electronmicroscopic study. *Clin Exp Immunol*, 1980, **40**, 496-507.
50. POLTERA AA & SAYER PD - Cardiac lymph drainage in experimental African trypanosomiasis in vervet monkeys. *Bull Soc Path Ex*, 1983, **76**, 614-621.
51. POLTERA AA, SAYER PD, GRICHOUSE G, BOVELL D & RUDIN W - Immunopathological aspects of trypanosomal meningoencephalitis in vervet monkeys after relapse following Berenil treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1985, **79**, 527-531.
52. POLTERA AA, SAYER PD, RUDIN W & BOVELL D - Trypanosomal cardiac valvulitis in vervet monkeys. *Trop Med Parasitol*, 1985, **36**, 77-80.
53. POLTERA AA, SAYER PD, SCHMIDT H & NJOGU AR - *Une étude comparative des trypanosomiasis cardiaques africaines chez l'homme, les souris et les singes*. Conseil scientifique international de recherche sur les trypanosomiasis et leur contrôle. OUA/STRC publication n° 112, Arusha (Tanzania), 1981, pp 254-258.
54. RAETHER W & SEIDENATH H - Trypanocidal effect of diamidine 98:202 in experimental *Trypanosoma rhodesiense* infection of the stump-tailed macaque (*Macaca arctoides*). *Tropenmed Parasit*, 1976, **27**, 238-244.
55. RUDIN W, POLTERA AA & JENNI L - An EM study on cerebral trypanosomiasis in rodents and primates. *Contr Microbiol Immunol*, 1983, **7**, 165-172.
56. SADUN EH, JOHNSON AJ, NAGLE R & DUXBURY R - Experimental infections with African trypanosomes. V. Preliminary parasitological, clinical, hematological, serological and pathological observations in rhesus monkeys infected with *Trypanosoma rhodesiense*. *Am J Trop Med Hyg*, 1973, **22**, 323-330.
57. SAYER PD, GOULD SS, WAITUMBI JN, MURRAY PK & NJOGU AR - *Guérison des singes infectés par Trypanosoma rhodesiense au moyen de faibles doses de mélsarsoprol ou de suramine et de nitroimidazole*. Conseil scientifique international de recherche sur les trypanosomiasis et leur contrôle. OUA/STRC publication n° 113, Harare (Zimbabwe), 1985, p 131.
58. SAYER PD, ONYANGO JD, GOULD SS, WAITUMBI JN, RASEROKA BH *et al.* - *Treatment of African trypanosomiasis with combinations of drugs with special reference to suramin and nitroimidazoles*. International Scientific Council for trypanosomiasis Research and Control. 19th Meeting, Lomé (Togo), 1987, pp 205-210.
59. SCHMIDT H & SAYER P - *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection in vervet monkeys. I. Parasitology, hematology, immunology and histologic results. *Tropenmed Parasit*, 1982, **33**, 249-254.
60. SCHMIDT H & SAYER P - *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection in vervet monkeys. II. Provocation of the encephalitic late phase by treatment of infected monkeys. *Tropenmed Parasit*, 1982, **33**, 255-259.
61. SEED JR, SECHELSKI B & LOOMIS MR - A survey for a trypanocidal factor in primate sera. *J Protozool*, 1990, **37**, 393-400.
62. VAN BOGAERT L & DEWULF A - Etudes sur le mode d'extension et l'histo-pathologie des trypanosomiasis expérimentales. 1. La méningo-encéphalite à *Trypanosoma gambiense* chez *Papio jubilaeus*. *J Belge Neuro Psychiatr*, 1938, **38**, 559-582.
63. VAN MARCK EAE, GIGASE PLJ, BECKERS A & WERY M - Experimental infections of laboratory rodents with recently isolated stocks of *Trypanosoma brucei gambiense*. 2. Histopathological investigations. *Z Parasitenkd*, 1981, **64**, 187-193.
64. WERY M - Improvements in laboratory models for drug-testing using stocks of *Trypanosoma brucei gambiense* of low virulence. In: *Parasitological Topics*, Special Publication n°1 of the Society of Protozoologists. EU CANNING ed., 1981, pp 275-283.

Commentaire en séance (congrès SPE, nov 1996)

Intervention de Mme Receveur :

Comment expliquer l'abandon du DFMO dans la trypanosomose à *Trypanosoma gambiense* ?

Réponse :

Le DFMO est actif chez les patients adultes infectés par Trypanosoma gambiense, mais les enfants sont moins sensibles au traitement et le DFMO n'est pas efficace sur les infections à T. rhodesiense (Pépin J - The treatment of human African trypanosomiasis. Adv Parasitol, 1994, 33, 1-47). Le protocole actuel nécessite une hospitalisation de 14 jours avec administration du produit par perfusion lente de 6 heures afin de maintenir une concentration sanguine optimale de ce produit dont l'élimination est rapide. Le coût global du traitement est élevé, largement supérieur à celui du mélsarsoprol. D'autre part, le DFMO n'a pas été retenu ni comme produit anti-cancéreux, ni dans les pneumopathies à Pneumocystis carinii du sida. Compte tenu de ces éléments, sa production a été arrêtée par le fabricant. Une tentative de production en Inde, selon un nouveau protocole de fabrication, n'a pas été couronnée de succès dans un premier temps (PNUD/Banque Mondiale/OMS Recherche concernant les maladies tropicales : progrès 1995-1996 - Treizième Rapport du Programme TDR. OMS, Genève, 1997, p 134). En 1996, l'OMS possédait, pour le programme CTD/TRY, un stock de DFMO destiné à la mise au point de nouveaux protocoles de traitement, en particulier chez des patients réfractaires au mélsarsoprol seul (protocole de traitement court de 7 jours, en association avec le mélsarsoprol) et pour des demandes ponctuelles (OMS, Division de la lutte contre les maladies tropicales. Trypanosomiasis humaine africaine, rapport annuel 1996, p 29).