

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science - Technologie - Santé

FACULTE de MEDECINE

Année : 2003

Thèse N° 100 B

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Neuropathologie

présentée et soutenue par

Annabelle DARSAUD

le 22 octobre 2003

ETUDE DE LA DYSRHYTHMIE CIRCADIENNE DE L'ALTERNANCE VEILLE-SOMMEIL,
SUIVI CLINIQUE ET VALIDATION THERAPEUTIQUE DANS UN MODELE
EXPERIMENTAL DE TRYPANOSOMOSE AFRICAINE.

Thèse dirigée par B. Bouteille et L. Bourdon

JURY :

M.M. DUMAS, Professeur (Limoges)

M. R. CESPUGLIO, Directeur de Recherches INSERM (Lyon)

M. P. VINCENDEAU, Professeur (Bordeaux)

MCS A. BUGUET, Maître de recherches (Marseille)

MCS L. BOURDON, Directeur de recherches (Grenoble)

M. B. BOUTEILLE, Maître de Conférences (Limoges)

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

co-Directeur de Thèse

Directeur de Thèse

Ce travail a été réalisé au Centre de recherches du Service de santé des armées, département des facteurs humains

IL A BENEFICIE DU SOUTIEN DE LA REGION RHONE-ALPES (FRANCE, THEMATIQUES PRIORITAIRES SANTE, 2000-2002 N° 01 018675 01), DE LA COMMUNAUTE EUROPEENNE AU TITRE DE L'OBJECTIF 3 ET DU CONSEIL REGIONAL DU LIMOUSIN.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans l'unité de physiologie de la vigilance du centre de recherches du service de santé des Armées à La Tronche. Je tiens à remercier :

Monsieur le Professeur Michel Dumas pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse ;

Messieurs les Docteurs Vincendeau et Cespuglio d'avoir bien voulu juger ce travail en acceptant d'être rapporteur ;

Monsieur le Docteur Bouteille qui a dirigé cette thèse ;

Monsieur le Docteur Bourdon qui a conjointement dirigé cette thèse. Sa compétence, sa patience et ses qualités humaines ont soutenu ce travail ;

Monsieur le Docteur Buguet qui m'a accueillie dans son unité ;

Tous les personnels et tous les étudiants de l'unité de physiologie de la vigilance ;

Les informaticiens pour leur gentillesse et leur disponibilité ;

Une pensée particulière est adressée à toute ma famille, ainsi qu'à tous mes amis de Limoges, Bordeaux et d'ailleurs qui ont su me soutenir dans les moments difficiles.

A mon Papa

La trypanosomose humaine africaine (THA) ou maladie du sommeil est provoquée par *Trypanosoma brucei gambiense* (Afrique de l'Ouest et Centrale) et par *T. b. rhodesiense* (Afrique de l'Est), protozoaires flagellés à développement extracellulaire, inoculés à l'homme par piqûre d'une glossine (mouche tsé-tsé) (Baker, 1995).

La distribution géographique de la THA, exclusivement africaine, occupe le tiers du continent bien que limitée à la ceinture tropicale en raison de la biologie du vecteur de transmission. Elle sévit en Afrique intertropicale, dans une zone délimitée entre 14° de latitude nord et 29° de latitude sud, qui correspond à la distribution géographique de son vecteur de transmission, la glossine (Molyneux et coll., 1996). Dans cette vaste zone, la répartition se fait en foyers dispersés.

La THA mortelle en l'absence de traitement constitue un problème de santé publique en Afrique où selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 60 millions d'individus sont exposés au risque de contamination (Kuzoe, 1993). Dans certaines zones endémiques, 10 % de la population est atteinte (Cattand, 1994). Actuellement, elle connaît une recrudescence remarquable caractérisée par l'éclosion de nouveaux foyers endémiques en raison d'une surveillance et d'un dépistage des patients d'inégale efficacité.

Les manifestations de la maladie du sommeil en Afrique sont connues depuis longtemps, le Soudan occidental constitue l'un des foyers historiques parmi les plus anciens (Bado, 1993). Les premières descriptions cliniques remontent au XVII^{ième} siècle, et soulignent le symptôme le plus caractéristique, le sommeil ou plutôt une manifestation léthargique incoercible.

Après une période d'incubation, la maladie évolue généralement en deux phases, parfois difficiles à distinguer (Poltera, 1985). Une première phase correspond à l'envahissement du système lymphatico-sanguin par les trypanosomes. Une deuxième phase d'atteinte du système nerveux central (SNC), définie par la présence du trypanosome dans le liquide céphalorachidien (LCR), se manifeste par une aggravation des signes neurologiques et l'apparition des troubles du cycle veille-sommeil (Buguet et coll., 1994 ; Villanueva, 1993). Cette phase de polarisation cérébrale avec méningo-encéphalite se développe de manière insidieuse, pendant des mois ou même des années après infection. Le diagnostic de cette seconde phase repose encore de nos jours sur la détection de trypanosomes dans le LCR.

Dans la THA, les mécanismes physiopathologiques restent mal connus, en particulier ceux liés à l'action propre du parasite et ceux indirects liés à la mise en jeu du système immunitaire qui peuvent surajouter leurs propres effets comme cela a été démontré dans d'autres protozooses.

Les mécanismes physiopathologiques de la THA semblent liés à l'incapacité du système immunitaire à éliminer le trypanosome de l'organisme hôte. Des vagues de parasitémie se succèdent, liées à l'apparition de parasites portant des glycoprotéines variables de surface (VSG) antigéniquement différentes. Cette variation est un des moyens permettant au trypanosome d'échapper aux défenses immunitaires, le nouveau variant exprimé n'étant pas reconnu par les anticorps produits contre les VSG antérieurement exprimées.

Le trypanosome peut agir directement ou indirectement sur les cellules du système immunitaire provoquant la synthèse de cytokines, de monoxyde d'azote et d'autres médiateurs (Olsson et coll., 1992). De plus, des perturbations biologiques caractéristiques ont été constatées parmi lesquelles des anomalies du métabolisme du tryptophane, précurseur de la sérotonine et une profonde dysrégulation du système immunitaire, avec, notamment hypergammaglobulinémie majeure et apparition d'auto-anticorps.

L'utilisation courante de dérivés arsenicaux comme traitement de référence au stade avancé de la maladie conduit à une encéphalite d'étiologie indéterminée chez 5 à 10 % des patients. Les mécanismes de la variation antigénique développés par le parasite pour échapper aux défenses immunitaires de l'hôte et la complexité du cycle évolutif du parasite dans chaque hôte constituent des obstacles au développement éventuel d'un vaccin.

Les différents modèles expérimentaux développés s'intéressent aux désordres immunohistochimiques impliqués dans l'atteinte méningo-encéphalitique de la maladie. Ces modèles animaux ont, pour la plupart, été mis au point avec des souches pathogènes pour l'homme et ont montré des lésions spécifiques du système nerveux central. Un nombre limité de travaux a été développé sur la base d'un suivi clinicophysiological de l'animal depuis l'inoculation du parasite jusqu'à la mort, permettant ainsi de mettre au point un modèle reproduisant la pathologie de la phase neurologique avec ses signes cliniques spécifiques. Un tel modèle expérimental présente une importance capitale dans les perspectives d'études de l'évolution de l'atteinte cérébrale de la THA et dans la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'apparition d'une perturbation clinique spécifique. En outre, la connaissance de la cinétique d'apparition d'un trouble clinique faciliterait la caractérisation des altérations physiologiques responsables des perturbations observées. De plus, l'utilisation d'une souche non-infectante pour l'homme constituerait une précaution supplémentaire contre les risques de contamination suite à des accidents de manipulation des souches pathogènes en laboratoire.

Une meilleure connaissance des signes cliniques, des dates d'infection du SNC par le parasite, de l'évolution des lésions en fonction du temps après infection pourrait conduire à une meilleure appréciation des protocoles de traitement existant et le développement de nouvelles thérapeutiques.

Table des Matières

ETAT DE LA QUESTION.....	15
1 CHAPITRE I : LA TRYPANOSOMOSE HUMAINE AFRICAINE.....	16
1.1 Localisation géographique.....	16
1.2 Epidémiologie.....	17
1.2.1 Résurgence.....	17
1.2.2 Prévalence.....	18
1.3 Le trypanosome.....	19
1.3.1 Taxonomie.....	19
1.3.2 Morphologie.....	20
1.3.3 Cycle de développement.....	21
1.4 La transmission.....	23
1.4.1 La glossine.....	23
1.4.2 Autre mode de contamination.....	24
1.5 La clinique des différentes phases d'évolution de la THA.....	25
1.5.1 Chancre d'inoculation.....	25
1.5.2 Incubation.....	25
1.5.3 La phase lymphatico-sanguine.....	26
1.5.4 La phase méningo-encéphalitique.....	27
1.5.5 Les formes cliniques.....	29
1.6 Immunopathologie de la THA.....	29
1.6.1 Les antigènes.....	29
1.6.1.1 Les glycoprotéines variables de surface.....	29
1.6.1.2 Autres antigènes.....	30
1.6.2 Dysrégulation du système immunitaire.....	31
1.6.2.2 Implications des lymphocytes T.....	33
1.6.3 Macrophages et monoxyde d'azote (NO).....	35
1.6.4 Immunopathologie du SNC.....	37
1.7 Le Diagnostic biologique.....	38
1.7.1 Signes biologiques aspécifiques.....	39
1.7.2 Le diagnostic sérologique.....	39

1.7.2.1	Recherche d'anticorps.....	40
1.7.2.2	Recherche d'antigènes.....	40
1.7.3	Le diagnostic parasitologique.....	42
1.7.3.1	Au niveau du chancre d'inoculation.....	42
1.7.3.2	Dans le suc ganglionnaire.....	42
1.7.3.3	Dans le sang.....	43
1.7.3.3.1	Techniques d'utilisation courante.....	43
1.7.3.3.2	Techniques non employées en pratique.....	43
1.7.3.4	Dans le liquide céphalorachidien.....	45
1.7.4	Nouvelles perspectives.....	45
1.8	Le traitement.....	46
1.8.1	Historique.....	46
1.8.2	La suramine (Bayer 205, Moranyl®, Germanin®).....	46
1.8.3	La pentamidine (Pentacarinat®).....	47
1.8.4	Le mélarsoprol (Arsobal®, Mel B).....	47
1.8.5	Le difluoro-méthyl-ornithine (Eflornithine).....	48
1.8.6	Axe de recherche thérapeutique.....	49
1.8.6.1	Le mégazol.....	49
1.8.6.2	Autres perspectives.....	49
1.8.6.3	Stratégie vaccinale.....	50
1.9	Troubles des rythmes circadiens.....	51
1.9.1	Trouble du sommeil.....	51
1.9.2	Troubles hormonaux.....	53
2	CHAPITRE II : LE CYCLE VEILLE-SOMMEIL CHEZ L'ANIMAL.....	56
2.1	I. Organisation de l'éveil et du sommeil chez le rat au cours d'un nyctémère.....	56
2.2	Phénoménologie.....	56
2.2.1	L'éveil.....	57
2.2.2	Le sommeil à ondes lentes ou sommeil lent.....	57
2.2.3	Le sommeil paradoxal.....	57
2.3	Structures impliquées dans les différents états de vigilance.....	58
2.3.1	Les structures impliquées dans les mécanismes de l'éveil.....	58
2.3.2	Les structures impliquées dans les mécanismes du sommeil à ondes lentes (figure 7)	63
2.3.3	Les structures impliquées dans les mécanismes du sommeil paradoxal.....	66
	TRAVAIL DE RECHERCHE.....	69

3	OBJECTIFS	70
4	CHAPITRE I : Etude de l'évolution clinique de la THA, Etablissement d'un modèle expérimental chez le rat infecté par <i>T. b. brucei</i>	72
4.1	PROBLEMATIQUE	73
4.2	METHODES	74
4.2.1	Trypanosomes	75
4.2.2	Animaux et infection	75
4.2.3	Mesures	76
4.2.3.1	Poids et prise alimentaire	76
4.2.3.2	Hématocrite	76
4.2.3.3	Test Open Field	76
4.2.4	Analyse Histologique	77
4.3	RESULTATS	79
4.3.1	Poids et prise alimentaire	79
4.3.2	La mesure de l'hématocrite	81
4.3.3	Les mesures d'Open Field	82
4.3.4	Etude histologique	84
4.3.4.1	Parasitémie	84
4.3.4.2	Histologie	84
4.4	DISCUSSION	86
5	CHAPITRE II : Validation du modèle par la thérapeutique	91
5.1	PROBLEMATIQUE	91
5.2	METHODES	93
5.2.1	Animaux	93
5.2.2	Infection	93
5.2.3	Mesures	93
5.2.3.1	Poids et prise alimentaire	93
5.2.3.2	Hématocrite	94
5.2.4	Traitement	94
5.3	RESULTATS	94
5.3.1	Temps de survie	95
5.3.2	Prise de poids	96
5.3.3	Prise alimentaire	97
5.3.4	Hématocrite	100
5.3.5	Parasitémie	101

5.4	DISCUSSION	103
6	CHAPITRE III : Etude des perturbations de l'alternance veille-sommeil dans notre modèle 108	
6.1	PROBLEMATIQUE	109
6.2	METHODES	110
6.2.1	Animaux	110
6.2.2	Chirurgie d'implantation des électrodes	110
6.2.3	Connexion au banc métrologique	112
6.2.4	Infection	112
6.2.5	Acquisition des données	113
6.2.5.1	Etude qualitative des tracés d'enregistrement	113
6.2.5.2	Etude qualitative	114
6.3	RESULTATS	117
6.3.1	ETUDE QUALITATIVE	117
6.3.1.1	ETUDE QUANTITATIVE	124
6.4	DISCUSSION	128
	DISCUSSION	136
7	Les perturbations ramenées à la mécanistique globale des reseaux en rapport avec l'activité veille-sommeil	137
7.1	Atteinte du réseau de déclenchement et de maintien de l'éveil	137
7.2	Atteinte du sommeil lent	140
7.3	Perturbations intéressant les mécanismes de déclenchement du SP	143
8	Hypotheses avancées dans la compréhension des troubles observés	145
8.1	Les cibles potentielles du SNC	146
8.1.1	Arguments en faveur de l'atteinte de l'hypothalamus	146
8.1.2	Atteinte du noyau raphé dorsal	148
8.1.3	Anomalies métaboliques	149
8.1.3.1	Perturbation de la sérotonine	150
8.1.3.2	Autres perturbations	152
8.2	Mécanismes mis en jeu	152
8.2.1	Rupture de la barrière hémato-encéphalique	152
8.2.2	Passage du parasite dans le SNC	154
8.3	Facteurs mis en jeu	156
8.3.1	Produits libérés par le Système Immunitaire	156
8.3.1.1	Les cytokines	157

8.3.1.1.1	Dysrégulation du réseau des cytokines dans la THA.....	158
8.3.1.1.2	Effet des cytokines inflammatoires sur le comportement alimentaire.....	159
8.3.1.1.3	Effets sur le comportement d'exploration et sur l'activité locomotrice.....	163
8.3.1.1.4	Influence des cytokines sur l'activité veille-sommeil.....	164
8.3.1.2	Les Auto-Anticorps.....	166
8.3.1.3	Le NO.....	167
8.3.1.3.1	Perturbation du NO dans la THA.....	167
8.3.1.3.2	Action dans le comportement de prise alimentaire.....	169
8.3.1.3.3	Action sur l'activité veille-sommeil.....	169
8.3.1.4	Produit libéré par le parasite	170
8.4	PERTINENCE DU MODELE.....	171
8.4.1	Diminution de l'hématocrite	171
8.4.2	Prise pondérale et alimentaire	172
8.4.3	Troubles comportementaux.....	172
8.4.4	Activité veille-sommeil.....	172
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	174
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	177

Tables des Tableaux et Figures

Figure 1: Répartition des foyers endémiques à Trypanosomose.	17
Figure 2: Classification des Trypanosomoses (Vickerman, 1985).	19
Figure 3: Ultrastructure d'un trypanosomose de l'espèce <i>Trypanosoma brucei</i> (Mulligan HW et Vickerman K).....	21
Figure 4: Représentation schématique du cycle de développement de <i>Trypanosoma brucei</i> chez le mammifère et le vecteur (d'après Vickerman, 1985).	23
Figure 5: Evolution de la parasitémie et de l'expression des VSG en fonction du cycle de développement de <i>T. brucei</i> (Pays, 1999).	31
Figure 6 : Schémas représentatif des réseaux neuronaux impliqués dans l'éveil.....	62
Figure 7: Schémas représentatif des réseaux neuronaux impliqués dans le sommeil lent.....	65
Figure 8: Schémas représentatif des réseaux neuronaux impliqués dans le sommeil paradoxal.....	68
Figure I- 1: Graphe de survie cumulée de Kaplan-meier après invection à <i>T. b. brucei</i> AnTat 1.1E (n = 24 rats infectés).	79
Figure I- 2a : Prise pondérale journalière des rats contrôles (n = 12) et infectés (n = 24). Le gain de poids est calculé par rapport à la valeur mesurée avant infection (J0). Chaque point représente la moyenne ± écart type. * Significativité valeur du groupe infecté vs valeur respective contrôle (ANOVA, p < 0,05).	80
Figure I- 3 : . Prise alimentaire (g) des rats contrôles et infectés. Chaque point représente la moyenne ± écart type. * Significativité valeur du groupe infecté vs. valeur respective contrôle (ANOVA, p < 0,05).	81
Figure I- 4 : Pourcentage d'hématocrite des rats contrôles (barres blanches) et infectés (barres noires) à la première (4 jours post infection, J4), deuxième (J9), et troisième mesure (J12) post-infection. Chaque point représente la moyenne ± écart type. *Différences significatives entre groupes (ANOVA ; p < 0,05).	82
Figure I- 5 : Distance totale parcourue (en cm) des rats contrôles (barres blanches) et infectés (barres noires) pendant les 10 min de session Open Field, pour le premier test d'Open Field (3 jours post infection, J3), le deuxième (J8) et le troisième test (J15). Chaque point représente la moyenne ± écart type. * Différences significatives entre groupes (ANOVA, p< 0,05).	83

Figure I- 6 : Parasitémie journalière par comptage du nombre de parasites par μl de sang. Chaque point représente la moyenne \pm écart type.....	84
Figure I- 7 : Ventricule latéral d'un rat infecté, 13 jours post-infection (a, barre = 500 μm et b = 100 μm). Présence de parasite [] et de cellules inflammatoires (flèches) dans les espaces interticiels des plexus choroïdes d'un même ventricule (c, barre = 25 μm et d = 50 μm). Coloration hématoéosine.	85
Figure II- 1: Graphe de survie cumulée de Kaplan-Meier pour les rats contrôles (C) et les rats infectés non-traités (I, n = 12 rats), traités avec la suramine (S, n = 12), le mégazol (M, n = 12) ou la combinaison des deux produits (S + M, n = 12).	95
Figure II- 2 : A) Prise pondérale journalière des rats contrôles (C), des rats infectés non-traités (I) et traités avec la suramine (S), le mégazol (M) ou la combinaison des deux (S + M). Cette différence est calculée avec comme référentiel la valeur pré-infection respective de chaque groupe.	97
Figure II- 3 : A) Evolution du poids au cours du traitement (T0) et les jours suivant l'administration de suramine (S), de mégazol (M) ou de la combinaison des deux (S + M).....	98
Figure II- 4 : Pourcentage d'hématocrite mesuré des rats contrôles (C), des rats infectés non-traités (I) et traités à la suramine (S), au mégazol (M) ou à la combinaison des deux (S + M). Chaque point représente la moyenne \pm écart type.....	101
Figure III- 1 : Hypnogramme d'un rat montrant une distribution de la veille (E), du sommeil lent léger (SLL), lent profond (SLP), et du sommeil paradoxal (SP) en enregistrement contrôle (a), au quatorzième jour post-infection (J14) (b), et le jour précédent la mort de l'animal (J ₂₁) (c). Après infection, l'éveil et le sommeil lent apparaissent être distribués de manière égale sur l'ensemble du nyctémère aussi bien en condition lumière (barre blanche en-dessous de l'hypnogramme) qu'obscurité (barre noire).....	118
Figure III- 2 : Pourcentage respectif d'éveil (E), de sommeil lent (SLL et SLP), et de sommeil paradoxal (SP) avant (histogramme) et après infection, en condition lumière (a) et obscurité(b). * différence significative par rapport aux valeurs contrôles à $p < 0.001$ (test de Student). Moyenne \pm écart type.....	119
Figure III- 3 : Proportion respective de sommeil lent léger (SLL) et de sommeil lent profond (SLP) en sommeil lent (SL) après infection, en condition lumière et obscurité. * différence significative par rapport aux valeurs contrôles à $p < 0,001$ (test t de Student). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type.	120

Figure III- 4 : Nombres et durées moyennes des épisodes d'éveil (E), de sommeil lent léger (SLL) et lent profond (SLP), et de sommeil paradoxal (SP) après infection, en condition lumière (symboles vides) et obscurité (symboles remplis). * différence significative par rapport aux valeurs contrôles à $p < 0,001$. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type.	121
Figure III- 5 : Nombre de changements de stades de vigilance et nombre d'épisodes d'endormissement direct en sommeil paradoxal (SOREMP, Sleep onset rapid eye movement periods) pendant l'infection avec une différenciation 12-h lumière et 12-h obscurité. * différence significative par rapport aux valeurs contrôles à $p < 0,001$ (test t de Student). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type.	122
Figure III- 6 : Altération de la morphologie des tracés électrocorticaux (ECoG) en sommeil lent (SL). Tracé en SL pendant la période d'enregistrements contrôles (a), 14 jours après infection (b) et 1 jour ante-mortem pour un rat mort au 21 ^{ème} jour post-infection (c).	123
Figure IV- 1 : Densité de puissance spectrale absolue ($\mu V^2 / Hz$) pour les cinq bandes de fréquence prédéfinies (delta, thêta, alpha, bêta bas ou I et bêta haut ou II) en éveil (E), sommeil lent léger (SLL), sommeil lent profond (SLP) et sommeil paradoxal (SP) en condition contrôle (a), une semaine (b) et deux semaines (c) après infection.	124
Figure IV- 2: Densité spectrale post-infection pour chaque bande de fréquences prédéfinies exprimée en pourcentage de densité spectrale absolue ($\mu V^2 / Hz$) mesurée pendant la période contrôle. Les valeurs sont représentées par stades de vigilance considérés : éveil (E), sommeil lent léger (SLL), lent profond (SLP) et sommeil paradoxal (SP).....	127
Tableau II- 1: Description des caractéristiques cliniques des rats infectés non traités (I) et traités avec la suramine (S) ou le mégazol (M), ou la combinaison des deux drogues (S + M). Valeurs moyennes \pm écart type.....	102
Tableau III- 1 : Pourcentage d'éveil (E), de sommeil lent (SLL et SLP) et de sommeil paradoxal (SP) en condition lumière (lum) et obscurité (obsc) en enregistrement contrôle (C), au douzième jour d'infection (J12), et deux jours ante-mortem (J-2). Résultats exprimés en moyenne \pm écart type.	119

Schéma III- 1: Localisation des électrodes et des vis de soutien.....	115
Schéma III- 2 : Banc métrologique nécessaire à l'enregistrement.....	116

ETAT DE LA QUESTION

1. CHAPITRE I : LA TRYPANOSOMOSE HUMAINE AFRICAINE

1.1. Localisation géographique

La trypanosomose humaine Africaine (THA) affecte l'Afrique sub-saharienne dans une zone s'étendant entre 14 degrés de latitude Nord et 29 degrés de latitude Sud (OMS, 1998). Ces latitudes correspondent aux limites d'extension géographique du vecteur, la glossine. Trente six pays sont concernés, en particulier la République démocratique du Congo, l'Angola, le Soudan, et l'Ouganda pour lesquels l'endémie relève un caractère d'extrême urgence (figure 1). La maladie se transmet à l'intérieur de foyers d'endémie établis de longue date dans toute la zone infectée par les glossines. Depuis les premières descriptions de cas de trypanosomose au début du siècle dernier et l'identification de l'agent causal, 250 foyers historiques sont recensés (Leak, 1998). Ces foyers irrégulièrement distribués, sont caractérisés par leur variation importante dans le temps et l'espace. La trypanosomose due à *T. b. gambiense* sévit en Afrique occidentale et centrale intertropicale, notamment en République Démocratique du Congo, en République de Centre-Afrique, au Cameroun, en Angola, au sud du Tchad. Les foyers de trypanosomose due à *T. b. rhodesiense* sont situés en Afrique orientale : Zambie, Ouganda et Tanzanie sont particulièrement touchés (Paquet et coll., 1995 ; Cattand, 1994 ; Molyneux et coll., 1996).

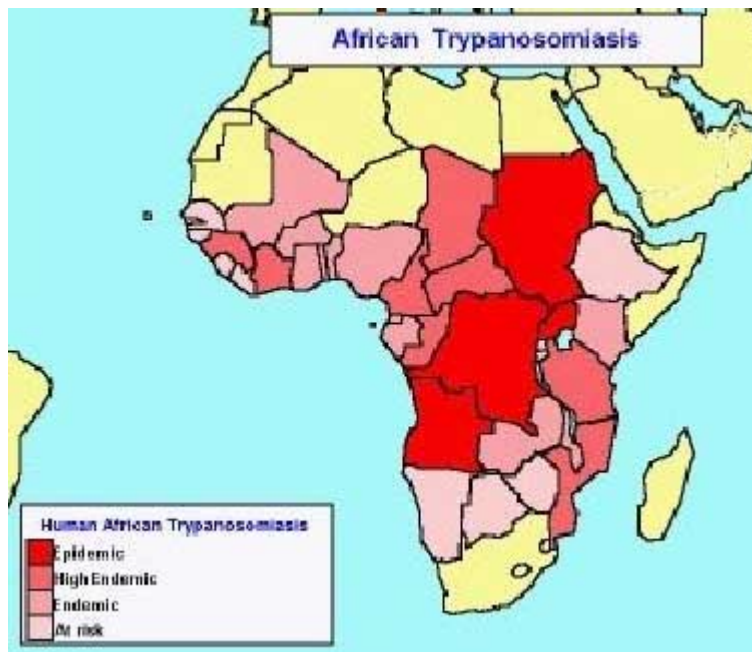


Figure 1: Répartition des foyers endémiques à Trypanosomose.

1.2. Épidémiologie

1.2.1. Résurgence

La maladie fut découverte par la caractérisation au début du XX^{ième} siècle de *Trypanosoma brucei gambiense* et *rhodesiense* dans le sang de malades. Elle est restée non contrôlée jusqu'à la mise en place de programmes de recherches systématiques de malades, par l'établissement de diagnostics et l'élaboration de traitements. Le médecin militaire français Jamot a développé au Cameroun la première équipe mobile de dépistage et de traitement qui permettra de contenir l'affection. La maladie fut pratiquement éradiquée vers les années 60 grâce aux campagnes internes de prophylaxie entreprises dans la majorité des régions endémiques. L'abandon progressif de ces campagnes de détection, associé aux dégradations des conditions sanitaires, économiques et politiques de beaucoup de pays ont mené à la résurgence de la maladie (Dumas, 2000). En outre, d'anciens foyers quiescents se sont réveillés, et donnent lieu à de nouvelles épidémies (Truc et Cuny, 2001). La dissémination de la maladie se fait rapidement et facilement, en raison des migrations de population. Ainsi, des foyers apparaissent de plus en plus près des villes, alors que la THA était auparavant circonscrite aux zones forestières, à la savane, près des rivières et ruisseaux, qui

correspondent aux zones d'habitats du vecteur (Cattand, 1994 ; Molyneux et coll., 1996 ; Van Nieuwenhove, 1998).

L'absence de dépistage actif par arrêt ou impossibilité d'action des équipes mobiles (situation sanitaire et sociale, conflits), les déplacements importants de population (réfugiés), la pathogénicité des trypanosomes ou encore l'évolution génétique des parasites, sont autant de facteurs aggravants.

En 1998 et en 1999, quelques 45 000 nouveaux cas sont notifiés annuellement à l'OMS par l'ensemble des pays endémiques africains. En République Démocratique du Congo (RDC), environ 10 000 cas étaient diagnostiqués chaque année à la fin des années 1980. En 1990, les activités de lutte ont été suspendues en raison de l'interruption de l'aide technique et financière extérieure. A la reprise timide des activités, en 1994, le nombre de nouveaux cas était de 30 000 (on estimait alors qu'au moins 150 000 individus étaient atteints). En Angola, le nombre de nouveaux cas fut multiplié par six à la suite de l'interruption du programme de lutte pour cause de guerre et de troubles sociaux. En 1999, pour la première fois dans l'histoire de la maladie, des foyers urbains et péri-urbains sont identifiés à Kinshasa et à Luanda.

1.2.2. Prévalence

L'Organisation mondiale de la Santé (Kuzoe, 1993 ; OMS, 1998) estime à 60 millions la population concernée et entre 300 000 à 500 000 le nombre de malades (OMS, 2000). Dans certaines régions, dans des villages de l'Est de la RDC par exemple, la prévalence est de 70%. La prévalence globale de pays tels que l'Angola ou la RDC est estimée entre 3 à 6%. Au Soudan, la situation est dramatique avec une prévalence de 20% au sud-ouest du pays (Van Nieuwenhove, 1998). En RDC, 101000 nouveaux cas ont été identifiés de 1991 à 1997, dont 25000 cas diagnostiqués en 1997, pour seulement 9% de la population exposée au risque et examinée (Van Nieuwenhove, 1998). La plupart des chiffres avancés sont basés sur des estimations, l'étendue réelle de l'endémie est très probablement loin d'être circonscrite.

1.3. Le trypanosome

1.3.1. Taxonomie

Les trypanosomes africains sont des protozoaires flagellés sanguinoles à développement extracellulaire appartenant à l'ordre des *Kinetoplastida*, famille des *Trypanosomatidae*, genre *Trypanosoma*.

Les *Trypanosomatidae* sont des organismes unicellulaires très mobiles à certaines phases du cycle de développement, répartis en huit genres. Les genres *Leishmania* et *Trypanosoma* comprennent les espèces pathogènes pour l'homme. Parmi les espèces du genre *Trypanosoma*, hormis les trypanosomoses africaines, une autre maladie humaine à trypanosome est connue, la maladie de Chagas, américaine, provoquée par *T. cruzi*. En Amérique, quelques rares cas de parasitisme à *T. rangeli* sont décrits chez l'homme, ils sont accidentels et de découverte fortuite (Coura et coll., 1996).

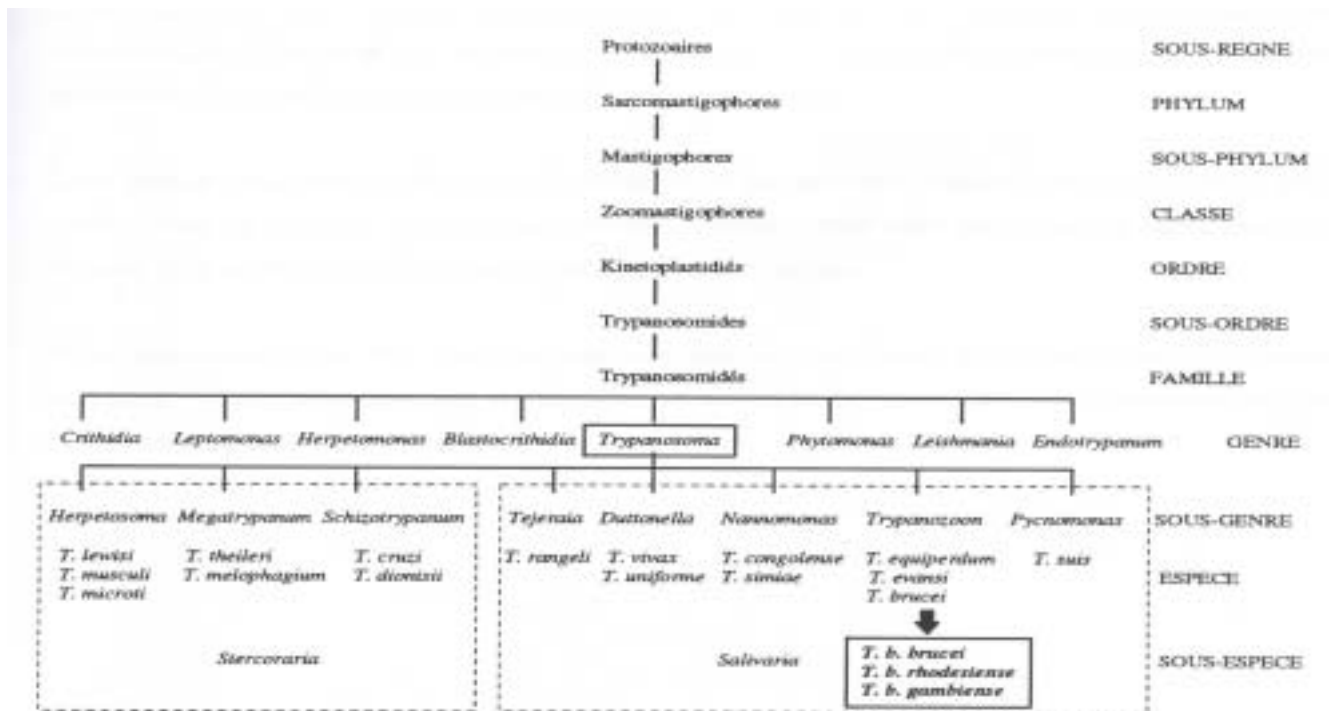


Figure 2: Classification des Trypanosomoses (Vickerman, 1985).

Les trypanosomes africains appartiennent au genre *Trypanosoma* et sont répartis en quatre sous-genres : *Trypanozoon* : [*T. brucei*, *T. evansi*, et *T. equiperdum*], *Duttonella* : [*T. vivax* et *T. uniforme*], *Nannomonas* : [*T. congolense* et *T. simiae*], *Pycnomonas* : [*T. suis*] (Figure 2).

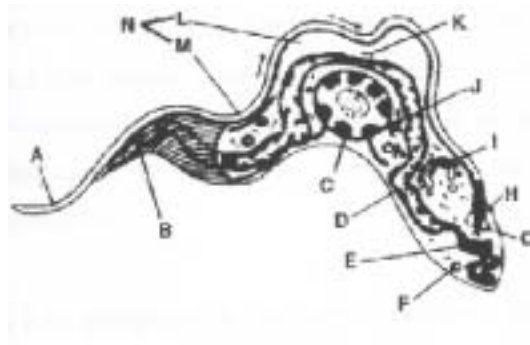
Les deux sous-espèces pathogènes pour l'homme, *T. gambiense* et *T. rhodesiense* appartiennent au groupe d'espèces *T. brucei*. Elles se distinguent par leur aire géographique, leur mode de transmission et la symptomatologie qu'elles déterminent. Les trypanosomes *T. b. brucei*, *T. congolense* et *T. vivax* infectent spécifiquement l'animal. Les différences morphologiques entre espèces sont peu marquées.

1.3.2. Morphologie

Les trypanosomes ont une forme allongée avec un noyau central légèrement ovale et hétérochromatique qui contient l'essentiel du génome (Figure 3). Le kinétoplaste est postérieur et contient de l'ADN extra-nucléaire. Les apports d'énergie sont assurés par la mitochondrie. Son degré de développement, variable au cours du cycle de développement du parasite, conditionne la position plus ou moins postérieure du kinétoplaste (Vickerman, 1969). Le flagelle, extrêmement mobile, naît près du kinétoplaste et se prolonge libre à l'extrémité antérieure du parasite. Il s'agit d'un prolongement du cytoplasme soutenu par des microfibrilles, qui longe le corps dans un repli de la membrane plasmique formant une membrane ondulante. A la base du flagelle, une invagination membranaire forme la poche flagellaire. La taille du trypanosome varie de 15 à 30 μm selon l'espèce.

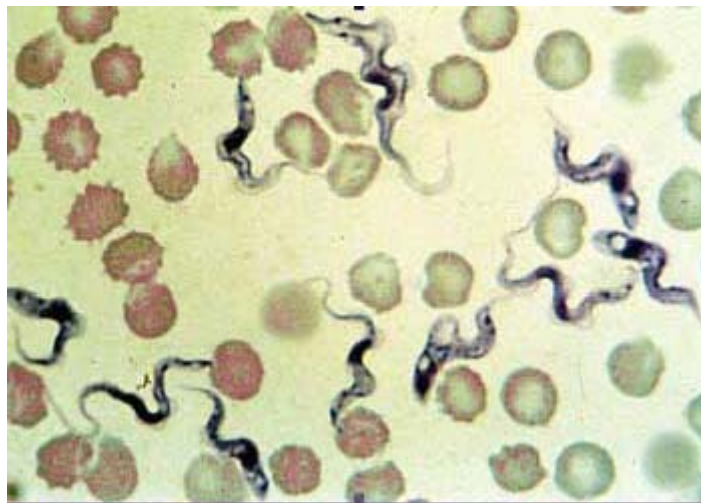
Chez l'hôte mammifère, la membrane plasmique est revêtue de glycoprotéines de surface de 12 à 15 nm d'épaisseur (Cross, 1975 ; Van Meirvenne et coll., 1975) dont la variabilité antigénique lui permet d'échapper au système immunitaire. Le cytosquelette du trypanosome est essentiellement constitué d'un système de microtubules superficiels, dits « pelliculaires », situés à 10 nm sous la membrane plasmique et espacés régulièrement de 25 à 30 nm, présentant ainsi une structure en forme de palissade sous le manteau de glycoprotéines (Vickerman, 1973). Le trypanosome se développe en différents stades dans le sang de l'hôte vertébré et dans le système digestif de l'hôte invertébré vecteur. Des différences morphologiques, métaboliques et antigéniques existent en fonction des stades successifs.

Dans les ganglions et le liquide céphalo-rachidien (LCR), la morphologie du trypanosome est identique à la forme sanguine. L'existence de formes amastigotes et trypomastigotes intracellulaires a été décrite (Ormerod et Venkatesan, 1971 ; Mattern et coll., 1972), mais reste jusqu'à présent controversée.



A: flagelle, B: cytosquelette, C: noyau, D: mitochondrie, E: kinétoplaste, F: glycosome, G: poche flagellaire, H: corps basal, I: appareil de Golgi, J: reticulum endoplasmique, K: membrane ondulante, L: attachement du flagelle à la membrane ondulante, M: attachement du flagelle directement à la cellule

Figure 3: Ultrastructure d'un trypanosome de l'espèce *Trypanosoma brucei* (Mulligan HW et Vickerman K).



1.3.3. Cycle de développement

Les trois sous-espèces *brucei*, *gambiense* et *rhodesiense* sont comparables sur le plan morphologique. Chez l'hôte vertébré, la forme trypomastigote revêt deux aspects : une forme longue (25 à 30 μm) avec une membrane ondulante et un flagelle bien développés, et une forme courte (15 à 20 μm) sans flagelle libre. Ces deux formes cohabitent et peuvent être retrouvées sur un même frottis sanguin.

Le cycle chez la glossine dure entre 20 et 30 jours, durant lesquels il est possible de distinguer une forme procyclique, une forme mésocyclique et une forme épimastigote (figure 4).

Les formes trypomastigotes sont ingérées par la glossine lors de son repas sanguin. Seules les formes courtes sont capables de poursuivre leur évolution chez le vecteur, les formes longues étant responsables de la multiplication et de l'envahissement tissulaire chez le mammifère. Dans l'intestin moyen de la mouche les trypomastigotes courts se multiplient et se transforment en trypomastigotes allongés procycliques, puis mésocycliques et migrent dans le proventricule sous forme épimastigote. La migration se poursuit vers la trompe, l'hypopharynx et les glandes salivaires où les épimastigotes prennent leur forme infestante trypomastigote métacyclique (Vickerman, 1985). Durant toute la vie de la mouche, des formes métacycliques se génèrent à partir des épimastigotes.

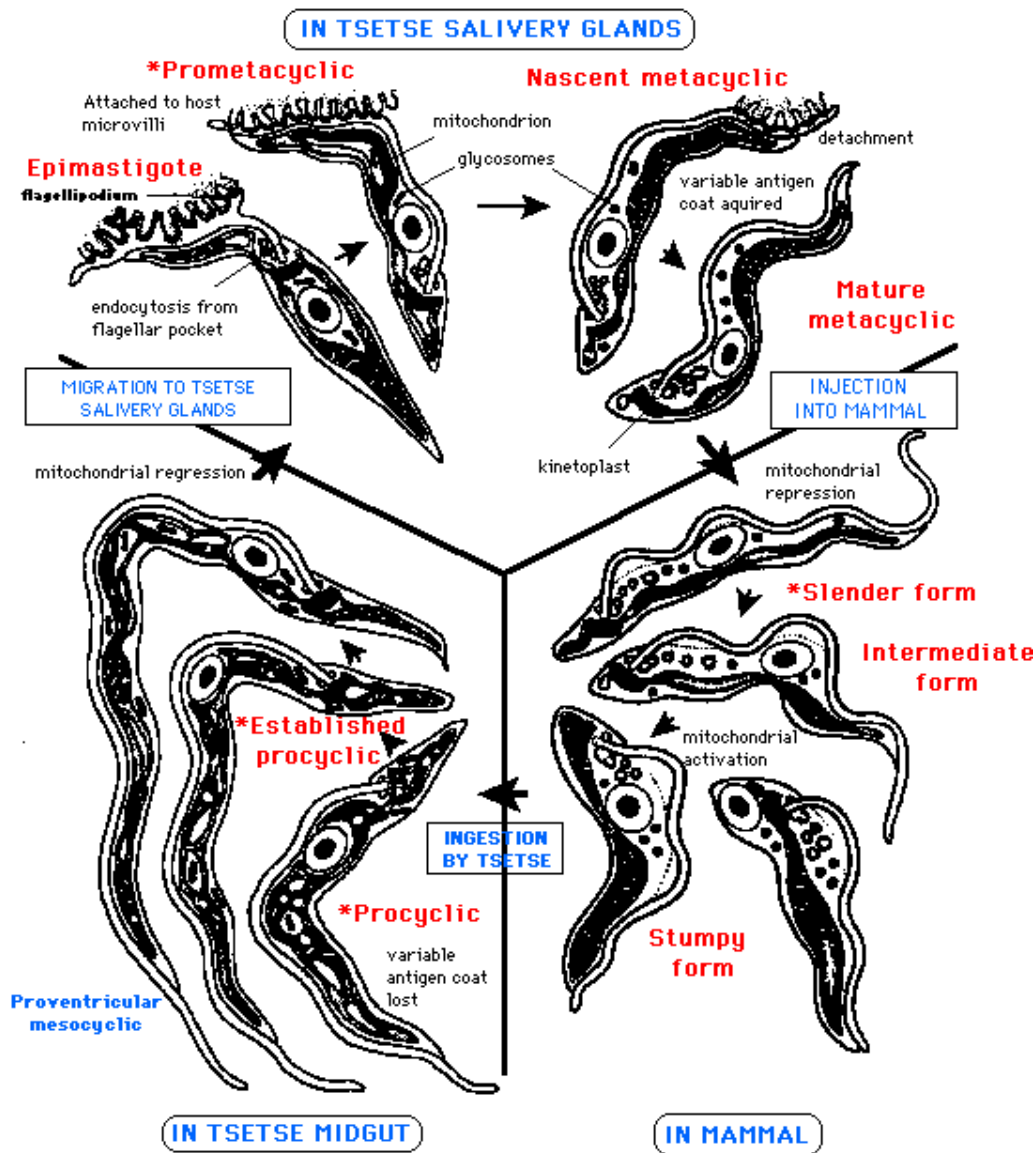


Figure 4: Représentation schématique du cycle de développement de *Trypanosoma brucei* chez le mammifère et le vecteur (d'après Vickerman, 1985).

1.4. La transmission

1.4.1. La glossine

Les glossines appelées mouches tsé-tsé dans le sud de l'Afrique à cause du bruissement de leurs ailes, sont des insectes diptères Muscidae de la sous-famille des *Glossinidae*, constituée du seul genre *Glossina* dont 31 espèces et sous espèces sont actuellement décrites (Eouzan et Louis 1994). La transmission de la maladie du sommeil est limitée à 7 espèces du groupe *morsitans* pour *T. b. rhodesiense* et *palpalis* pour *T. b. gambiense*.

Depuis que la mouche tsé-tsé a été identifiée comme vecteur spécifique de la THA, sa biologie, ses habitudes de vie, sa reproduction et son biotope ont été étudiés précisément afin de spécifier des moyens de lutte efficace.

Les espèces du groupe *morsitans* sont xérophiles et préfèrent les vastes savanes arborescentes chaudes et sèches de l'Afrique de l'Est (du sud Soudan au Zimbabwe et au Botswana), mais elles sont également localisées dans les savanes d'Afrique centrale ou d'Afrique de l'Ouest. Les espèces du groupe *palpalis* sont hygrophiles et vivent dans les forêts chaudes et très humides d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique centrale, du Sénégal en Ouganda. Ainsi, en raison de leur spécificité de répartition, la trypanosomose à *T. b. gambiense* est majoritairement rencontrée en Afrique de l'Ouest et Centrale, et celle à *T. b. rhodesiense* en Afrique de l'Est et du Sud-Est.

La mouche tsé-tsé n'est pas un simple vecteur mécanique de la maladie. Il existe un cycle évolutif des trypanosomes dans son système digestif. Pour les espèces du groupe *brucei*, le parasite se développe d'abord dans l'intestin, puis dans la trompe, avant d'arriver à maturité dans les glandes salivaires.

Les lieux de contacts entre le vecteur et l'homme varient en fonction des régions. Dans les zones de mangrove, aux alentours des grands estuaires, les activités de pêche favorisent les contacts. Le long des grands fleuves ou rivières, en zone tropicale et équatoriale, l'homme se contamine lors des activités domestiques nécessitant de l'eau mais également lors de la pêche, de la chasse ou simplement de passages à gué. Les contacts sont aussi fréquents en bordure de forêt (exploitations forestières, plantations) et à proximité des villages si les abords sont laissés à l'abandon.

1.4.2. Autre mode de contamination

Les moustiques du genre *Mansonia* peuvent pendant une courte période inoculer *T. brucei* (Martin et coll., 1909). Ce mode de transport passif explique sans doute en partie les épidémies touchant des familles entières, les épidémies de case, observées de longue date par les médecins, et qui ont fait croire longtemps à une contamination interhumaine directe (Gouteux et coll., 1988). L'importance épidémiologique de la transmission passive est difficile à évaluer, mais ces vecteurs occasionnels n'étant en aucun cas des réservoirs de parasite, le danger se limite aux zones d'épidémie et le rôle de ces insectes semble annexe. Cependant, des travaux récents (Auregan et Duvallet, 1980) décrivent encore des foyers de trypanosomose sans glossines.

Quelques cas de trypanosomose congénitale ont été rapportés (Kazyumba et coll., 1978 ; Sina et coll., 1979 ; De Raadt, 1985). Enfin, les risques d'infection de laboratoire sont importants par piqûre accidentelle avec du matériel souillé, notamment à l'occasion de l'isolement et du maintien des souches (Herbert et coll., 1980 ; Robertson et coll., 1980 ; Receveur et coll., 1993).

1.5. La clinique des différentes phases d'évolution de la THA

Il fallut attendre 1903 et la découverte de *T. gambiense* chez l'homme pour être en mesure de diagnostiquer précocement l'affection, à un stade où les troubles du sommeil sont encore absents. Depuis, la description clinique s'est enrichie et il est désormais classique de diviser l'évolution de la maladie en deux phases distinctes, une phase de généralisation ou lymphatico sanguine et une phase de polarisation cérébrale ou méningo-encéphalitique (Boa et coll., 1988 ; Dumas et Boa, 1988). Cette description est cependant critiquée. En effet l'évolution de la maladie est un continuum, et l'envahissement des structures nerveuses peut être très précoce. Seul l'intérêt didactique de cette séparation en deux phases pousse à la conserver dans les descriptions cliniques.

1.5.1. Chancre d'inoculation

Une semaine environ après la piqûre par une glossine infectée, apparaît une lésion cutanée indurée, de quelques centimètres de diamètre, prenant l'aspect d'un nodule rouge-violacé accompagné d'adénopathies satellites qui disparaît en deux à trois semaines. Cette lésion ne s'observe jamais dans les suites d'une piqûre de glossine non infectante, et semble due à la multiplication locale des trypanosomes. Une zone d'hyperpigmentation peut demeurer après la cicatrisation.

1.5.2. Incubation

Sa durée est très variable et difficile à estimer car l'apparition des premiers signes passe souvent inaperçue, et la notion de chancre d'inoculation est rarement retrouvée. Cependant, la maladie peut apparaître en quelques semaines, comme elle peut rester latente plusieurs années avant de se manifester. Dans la trypanosomose est-africaine (*T. b. rhodesiense*) la durée d'incubation est courte, ne dépassant pas quelques semaines.

1.5.3. La phase lymphatico-sanguine

C'est la phase de généralisation de la maladie attribuée à la dissémination des parasites par voie sanguine et lymphatique, et aux réactions immunitaires qui en découlent (Vachon et coll., 1986). Les signes sont variés, rarement tous présents, et peuvent persister longtemps ou au contraire disparaître, laissant croire à une rémission, avant de réapparaître ou de s'aggraver (Dumas et Bouteille, 1996 ; Molyneux et coll., 1996).

La fièvre est le plus constant et le plus précoce des signes à cette période (Poltera, 1985). Elle est irrégulière tant dans le nyctémère que dans sa périodicité et résiste aux traitements antipyrétiques et antimalariques. Elle est contemporaine des vagues de parasitémie et s'accompagne habituellement d'une altération de l'état général. La fréquence des accès de fièvre tend à diminuer au long de cette phase avec parfois une normalisation de la température corporelle après quelques semaines ou mois d'évolution.

Les adénopathies sont très fréquentes et concernent essentiellement les chaînes cervicales (signe de Winterbottom au niveau des trapèzes) et sus-claviculaires. Elles atteignent parfois les territoires axillaires ou inguinaux. De taille moyenne, elles sont classiquement indolores, non inflammatoires et aisément ponctionnables.

L'atteinte cardio-vasculaire est constante, mais sa traduction clinique est très pauvre. Elle se traduit le plus souvent par une chute de la tension artérielle, un assourdissement des bruits du cœur ou une arythmie cardiaque, plus rarement, par des palpitations ou des syncopes. Les atteintes cardiaques sont plus sévères dans les formes est-africaines. De rares évolutions vers l'insuffisance cardiaque ont été décrites dans des formes très chroniques.

Des atteintes cutanées sont également décrites (Tatibouet et coll., 1982). Le prurit est le signe le plus fréquemment retrouvé. Il peut être généralisé ou localisé au tronc ou aux bras. Son intensité est variable, et il est parfois responsable d'importantes lésions de grattage. Les trypanides, visibles surtout sur peau blanche, sont des éruptions érythémateuses polycycliques avec un petit bourrelet périphérique, mesurant 5 à 10 cm de diamètre et siégeant essentiellement sur le tronc et les racines des membres. Elles disparaissent sans laisser de traces. De diagnostic difficile sur peau noire, leur présence est très évocatrice de la maladie. Les œdèmes sont fréquents et siègent tant au niveau des membres inférieurs que de la face (surtout les paupières) donnant le faciès bouffi assez typique des trypanosomés.

Les céphalées sont très fréquentes. Typiquement fronto-occipitales ou diffuses, elles sont d'intensité modérée et apparaissent plutôt la nuit.

Les manifestations douloureuses sont diverses, rachialgies, acroparesthésies, douleurs musculaires (crampes, courbatures, myalgies diffuses). L'atteinte rénale est classique et se traduit par une protéinurie.

L'atteinte de l'état général est habituelle bien qu'elle soit peu marquée au début et se traduit par des sensations d'asthénie, de vertiges, un amaigrissement limité et un syndrome anémique.

1.5.4. La phase méningo-encéphalitique

Sa définition anciennement clinique repose désormais sur les critères biologiques du LCR (cytorachie et présence de trypanosomes). L'OMS préconise, pour un diagnostic de deuxième période, une cytorachie supérieure à 5 éléments / μ l, et/ou une protéinorachie supérieure à 37 mg/100 ml, avec ou sans mise en évidence des trypanosomes dans le LCR (OMS, 1998). Les signes de la phase de généralisation diminuent et les signes neuropsychiques s'installent peu à peu pour dominer finalement la scène clinique (Collomb, 1957 ; Greenwood et Wittle, 1980 ; Molyneux et coll., 1984 ; Boa et coll., 1988 ; Dumas et Boa, 1988 ; Nkanga et coll., 1988). Une fébricule est quasi constante, de même que les troubles de la faim et de la soif.

Les troubles du sommeil sont très précoces et constants, et ont donné leur nom à la maladie. Ils définissent un dérèglement progressif du rythme circadien de la veille et du sommeil. Les malades présentent des insomnies ou des agitations nocturnes, des épisodes de somnolence diurne. Ces troubles s'aggravent à mesure que la maladie évolue, avec des endormissements incoercibles lors des activités de la vie quotidienne. Les patients sont très difficilement stimulables, indifférents aux facteurs perturbateurs extérieurs. Ils présentent alors des alternances de phases de sommeil et d'éveil totalement désorganisées sur l'ensemble du nyctémère. En phase terminale de la maladie, l'encéphalite démyélinisante provoque des comas irréversibles. Ces troubles veille-sommeil seront détaillés dans le paragraphe concernant les perturbations des rythmes circadiens.

Des réflexes ostéo-tendineux amples, vifs, un signe de Babinski bilatéral, plus rarement une trépidation épileptoïde des pieds sont décrits. D'autre part, on observe une libération des réflexes archaïques du tronc cérébral, en particulier un réflexe palmo-mentonnier quasi-constant. Ces signes, très fréquents traduisent un syndrome pyramidal et leur intensité augmente dans le décours de la maladie.

Cette phase est marquée par de mouvements désordonnés et involontaires, rarement de type déficitaire, bien que des cas d'hémiplégie soient décrits (Sonan et coll., 1988). En revanche les mouvements anormaux sont très fréquents, très variables dans leur topographie d'un malade à l'autre. Il peut s'agir de tremblements de repos ou d'attitude, de mouvements choréo-athétosiques ou d'une hypercinésie bucco-linguale. Ces troubles entraînent une maladresse et des gesticulations assez caractéristiques de l'affection. Classiquement les patients présentent une hypertonie extrapyramidale avec rigidité plastique. Des formes hypotoniques sont plus rarement décrites.

Des troubles sensitifs apparaissent. Les patients ressentent une vive douleur à toute stimulation sensitive profonde ; le signe de la clé ou signe de Kerandel, du nom d'un médecin militaire français atteint de THA qui a décrit ce signe (Kerandel, 1910) est une caractéristique récurrente. La symptomatologie douloureuse peut aussi consister en des crampes musculaires ou des névralgies de topographie variée, tronculaires ou radiculaires.

Des troubles endocriniens se manifestent avec au premier plan les troubles sexuels (impuissance, aménorrhée) (Laquieze et Berny, 1933a et 1933b ; Noireau et coll., 1988). Des manifestations d'insuffisance thyroïdienne peuvent survenir, avec en particulier une grande frilosité. La sécrétion hormonale est perturbée, surtout dans sa composante circadienne, et sera décrite ultérieurement dans le chapitre traitant des perturbations des rythmes circadiens.

Les troubles psychiques sont de différents ordres et peuvent mimer une grande partie de la pathologie psychiatrique (Martin et Ringenbach, 1910). Ils sont quasi constants, au moins dans leurs formes mineures et sont souvent intriqués. Les malades présentent fréquemment des signes de désintérêt, d'indifférence et de labilité thymique. Ils sont volontiers irritables, opposants et ont des réactions disproportionnées aux contrariétés ou à l'opposé apparaissent indifférents à l'environnement immédiat. Ces signes sont les plus précoces et peuvent évoluer vers des formes plus sévères.

La confusion mentale, la démence sont des formes classiques auxquelles on peut rattacher les formes mnésiques dans lesquelles les patients cherchent leurs mots, les confondent ou présentent de véritables amnésies antérogrades.

Les formes pseudo-psychotiques peuvent définir des accès maniaques et mégalomaniaques avec agitation, violence et délires mégalomaniaques ou paranoïaques. Ces états conduisent parfois à des actes délictueux. A l'inverse, la symptomatologie peut être mélancolique. L'alternance des formes maniaque et mélancolique peut mimer une psychose maniaco-dépressive. Les formes délirantes pures ou hallucinatoires chroniques sont plus rares.

1.5.5. Les formes cliniques

La THA Est africaine évolue sur un mode plus fulgurant, avec des signes généraux très marqués et des signes neurologiques précoces. Le décès survient habituellement avant l'installation des signes psychiques et des perturbations veille-sommeil. Un choc anaphylactique est possible (Harries et Wirima, 1988). Les atteintes cardiaques sont souvent plus importantes que dans la THA à *T. b. gambiense*. Il existe des tableaux sub-aigus comparables dans la THA Ouest africaine. La survenue de telles formes pourrait être liée à des variations de pathogénicité au sein des souches de trypanosome et à l'état immunitaire initial déficient du patient.

Des formes très chroniques, peu symptomatiques, évoluant pendant plusieurs années sont l'apanage de l'infection à *T. b. gambiense*. Des épisodes de silence clinique peuvent simuler une guérison.

1.6. Immunopathologie de la THA

1.6.1. Les antigènes

1.6.1.1. Les glycoprotéines variables de surface

Le parasite est recouvert d'un manteau de glycoprotéines de surface. Le revêtement antigénique se compose d'un antigène majeur ou VSG (Variable Surface Glycoprotein) et de divers antigènes mineurs (Pays et Berberof, 1995). Ce manteau de surface est visible au microscope électronique sous la forme d'une couche dense caractéristique de 12 à 15 nm d'épaisseur, situé au-dessus de la couche lipidique externe de la membrane. Les VSG ne recouvrent que les formes sanguicoles infectantes du parasite, ainsi que les formes métacycliques des glandes salivaires de la glossine. Ce manteau de VSG pourrait constituer une stratégie d'adaptation face aux mécanismes de défense de l'hôte, lui permettant d'échapper à la réaction du système immunitaire. La VSG est une glycoprotéine membranaire fixée à la membrane par un radical glycosylphosphatidylinositol. Elle recouvre la totalité du parasite, hormis la poche flagellaire protégée du courant sanguin. Cet antigène présente la faculté de varier dans le temps pour tromper le système immunitaire de l'hôte (Pays, 1990).

Le trypanosome possède dans son ADN nucléaire environ un millier de gènes de VSG différents mais ne synthétise qu'un seul type de VSG à la fois (Van Der Ploeg, 1992 ; Borst et Rudenko,

1994). Les antigènes variants ou VAT (Variant Antigen Type) sont portés par les VSG. En réponse à l'agression, l'hôte développe une réponse immunoglobulines de type M contre le VAT exprimé, la parasitémie diminue, aboutissant à une phase de rémission. Les anticorps produits provoquent la destruction du trypanosome par phagocytose ou par fixation du complément et lyse massive, qui se traduit cliniquement par des pics fébriles en première phase de la maladie. Cependant, une partie mineure de la population parasitaire qui exprime un autre type de VSG portant un VAT différent se multiplie, créant ainsi une colonie nouvelle, antigéniquement différente de la première et hors de portée de la première vague d'anticorps. Ce second VAT devient le type dominant, donnant lieu à une recrudescence de la parasitémie, et à la synthèse de nouveaux anticorps. Plusieurs phases de destruction identiques peuvent se succéder, provoquant un épuisement de la réponse humorale (figure 5).

1.6.1.2. Autres antigènes

Les formes procycliques possèdent une glycoprotéine majeure, la procycline qui remplace la VSG dans le manteau de surface du parasite. Le rôle de cette protéine de structure différente de celle de la VSG reste à définir, elle pourrait être impliquée dans la protection du parasite chez l'insecte.

Des composants stables des formes sanguines sont localisés dans la poche flagellaire où ils sont protégés des cellules immunitaires de l'hôte (Webster et Russel, 1993). Parmi ces antigènes de surface non variants, il faut noter les récepteurs de la transferrine (Overath et coll., 1994) capables de stimuler la croissance du parasite, des adénylyl cyclases présentes uniquement sur le flagelle qui sont impliquées dans la différenciation des stades évolutifs. L'existence d'un grand nombre de récepteurs présent essentiellement dans la poche flagellaire est supposée, en particulier le récepteur aux HDL (High Density Lipoprotein), à l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou à l'interféron- γ (IFN- γ).

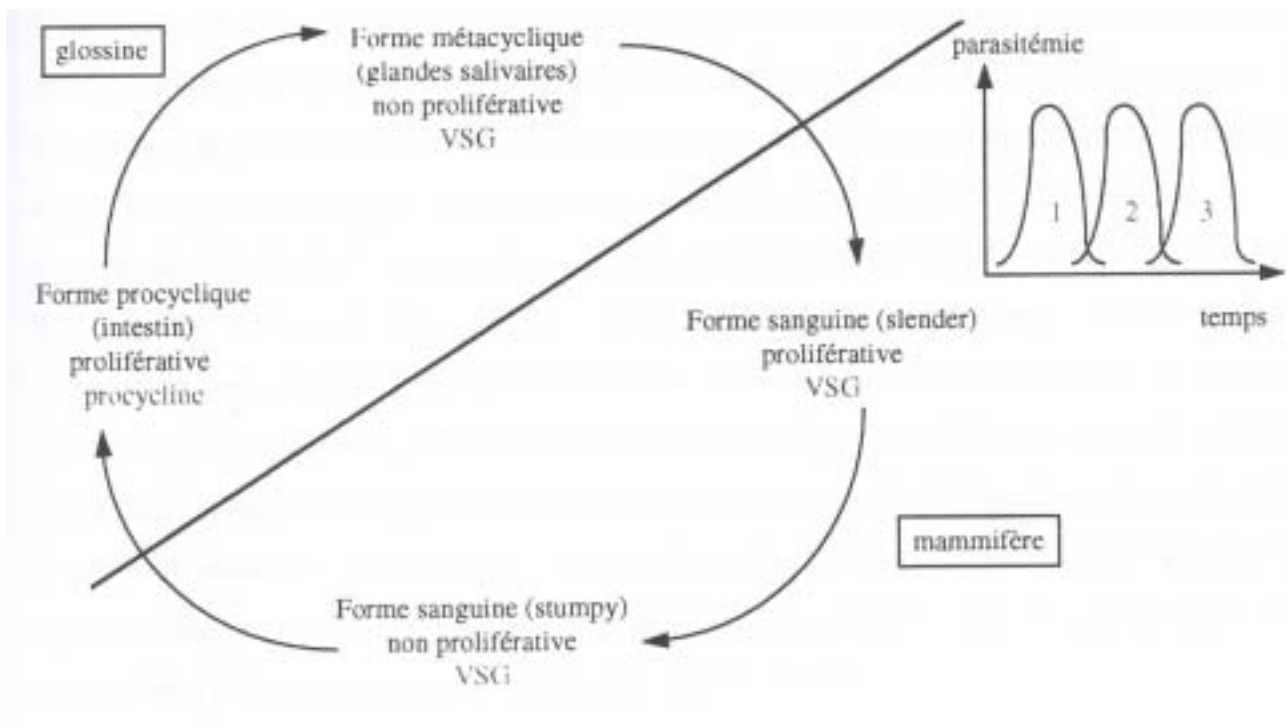


Figure 5: Evolution de la parasitémie et de l'expression des VSG en fonction du cycle de développement de *T. brucei* (Pays, 1999).

1.6.2. Dysrégulation du système immunitaire

Implications des lymphocytes B

Au cours de la THA, une importante augmentation du taux des immunoglobulines de classe M (IgM) est observée dans le sérum et le LCR (Philip et coll., 1994). Cette hypergammaglobulinémie correspond à une activation polyclonale des cellules B. Les anticorps (Ac) produits sont dirigés contre les Ag du trypanosome, particulièrement les VSG. Ces Ac-anti VSG apparaissent dès le début de l'infection et participent à l'élimination successive des différents VAT exprimés (Reinitz et Mansfield, 1990). La concentration sérique en IgM atteint au minimum quatre fois le taux normal, ce qui fait du dosage des IgM un moyen de diagnostic et de dépistage (Mattern, 1968 ; Van Meirvenne et Le Ray, 1985).

Des phénotypes aberrants des lymphocytes B ont été observés suite à l'infection de souris par *T. brucei*, se traduisant par une perturbation de l'expression de marqueurs de surface spécifiques et par diminution de l'expression des Ag du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Sacco et coll., 1994).

En raison de l'immunosuppression progressive induite des cellules T, la réponse cellulaire B dépendante des lymphocytes T disparaît progressivement au profit d'une réponse indépendante des cellules T.

Une autre caractéristique de la réponse des lymphocytes B est la production d'auto-anticorps variés, dirigés contre de nombreux déterminants antigéniques d'hématies (Kobayakawa et coll., 1979), de cellules musculaires lisses (Wolga et coll., 1981), d'acides nucléiques, de filaments intermédiaires (Anthoons et coll., 1986), d'Ig (les facteurs rhumatoïdes) (Kazyumba et coll., 1986) ou de cardiolipide (McKenzie et Boreham, 1974).

Des auto-Ac spécifiques de composants du SNC ont également été décrits tels que des Ac anti-MBP spécifiques de la protéine basique de la myéline (Myelin-Basic Protein) (Asongyani et coll., 1989; Hunter et Kennedy, 1992), des Ac anti-neurofilaments (Ayed et coll, 1997), des Ac anti-gangliosides, des Ac anti-tryptophane-like (Okomo-Assoumou et coll., 1995a), ainsi que des Ac dirigés contre les galactocérébrosides (glycolipide majeur de la myéline, GalC) (Amevigbe et coll, 1992; Jauberteau et coll, 1994, Bisser et coll, 2000). Ces auto-anticorps dirigés contre des constituants du SNC sont retrouvés tant chez l'animal que chez l'homme, et leur taux est parfois corrélé à l'atteinte neurologique clinique de l'hôte. Leur étude présente un intérêt majeur car leur rôle dans la physiopathologie des troubles neurologiques a été proposé.

Les Ac anti-GalC ont été détectés dans les sérums de modèle expérimental de THA, le mouton inoculé par *T. b. brucei* (Jauberteau et coll., 1991) et dans les sérums et les LCR de patients en

phase neuronale de THA (Amevigbe et coll., 1992). Chez l'animal, *in vivo*, ces Ac pourraient participer à l'induction des lésions (Saida et coll., 1979). Leur présence est associée aux manifestations neurologiques de la seconde phase de la maladie (Jauberteau et coll., 1991 ; Ayed et coll., 1997 ; Bisser et coll., 2000), et leur détection dans le LCR pourrait constituer un bon marqueur de la phase neurologique de la THA et ainsi permettre une discrimination simple des stades de la maladie. Leur origine et leur rôle dans la pathogénie restent à définir.

Les Ac anti-MBP et les Ac dirigés contre les gangliosides ont été trouvés dans les sérums des souris infectées par *T. b. brucei* (Hunter et coll., 1992). Cette même étude a montré une corrélation positive entre les titres en autoAc dirigés contre une variété d'Ag du SNC (protéine basique de la myéline, galatocérebrosides, gangliosides) et l'atteinte neurologique chez les souris infectées par *T. b. brucei* (Hunter et coll., 1992). Des Ac dirigés contre des protéines myéliniques humaines non caractérisées ont été détectées (Asonganyi et coll., 1989).

L'origine exacte de la production d'auto-Ac au cours de la THA n'est pas encore totalement déterminée. La réactivité croisée entre des déterminants antigéniques du parasite et des constituants de l'hôte (Ayed et coll., 1997) et/ou la libération d'autoAg résultant de lésions cellulaires sont fortement envisagées. Les Ac naturels, en raison de leur forte polyréactivité ont également été suspectés. Müller et coll. (1993) ont montré que des Ac autoréactifs de souris non infectées réagissent avec des constituants du cytosquelette du parasite.

1.6.2.1. Implications des lymphocytes T

Le trypanosome active la prolifération de lymphocytes T via certains de ses composants antigéniques (Tolson et coll., 1994 ; Schleifer et coll., 1993), particulièrement les VSG.

Lors de l'infection à *T. b. brucei*, une inhibition de la synthèse d'interleukine 2 (IL-2), cytokine impliquée dans la régulation de la prolifération lymphocytaire T, ainsi qu'une diminution concomitante de l'expression de son récepteur spécifique sur les cellules T sont observées (Sileghem et coll., 1987 ; Bowlin et coll., 1988, Kierszenbaum et coll., 1991). Ce déficit conduit à une réduction de la réponse proliférative des lymphocytes T (Sztejn et Kierszenbaum, 1991). La réponse cellulaire est ainsi altérée par un phénomène d'immunodépression portant sur les cellules T, rencontré dans les trypanosomoses expérimentale et humaine. L'activation macrophagique directe par le trypanosome est impliquée dans cette inhibition de prolifération en réponse à la présence

d'antigènes parasitaires. Les macrophages inhibent la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T CD4+ via la production de prostaglandines E (PGE) (Schleifer et Mansfield, 1993), et diminuent l'expression des récepteurs à l'IL-2 à la surface des cellules CD4+ et CD8+ via la production d'IFN- γ par ces dernières (Darji et coll., 1993).

Chez les souris infectées par *T. b. brucei*, l'activité cytotoxique des cellules Natural Killer (NK), cellules T non spécifiques, est fortement diminuée (Askonas et Bancroft, 1984).

L'implication des lymphocytes T dans la dysrégulation immunitaire au cours de la THA concerne la production de cytokines. En réponse à l'infection, il existe une stimulation complexe du réseau des cytokines, molécules de coopération entre les cellules effectrices du système immunitaire, qui jouent un rôle capital dans l'immunopathologie de la maladie. Une profonde dysrégulation des cytokines est observée qui se traduit par une altération de leur profil de sécrétion. Ces cytokines, en particulier le TNF (Tumor Necrosis Factor)- α et l'IFN- γ participent aux mécanismes d'immunosuppression rencontrés au cours de la THA avec cependant une importante dualité d'action puisqu'elles interviennent également dans la défense de l'hôte contre son agresseur. Impliquées dans le déclenchement de la réponse immunitaire, elles jouent un rôle fondamental dans l'activation et la prolifération des cellules effectrices, mais également dans la modulation de cette réponse. Une notion de balance entre les cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-1 β , IL-6, TNF- α) et anti-inflammatoires (IL-10, TGF (transforming growth factor)- β , IL-4) prend effet avec comme intervenants majeurs, les lymphocytes T helper (Th) dont le rôle est régulateur. Ainsi, la synthèse d'IL-4, associée à la susceptibilité d'infection par *T. b. brucei*, favorise la survie de souris infectées en agissant sur le contrôle la parasitémie (Bakhiet et coll., 1996a ; Inoue et coll., 1999).

Les cytokines apparaissent dès les premiers stades de la maladie (Liu et coll., 1999 ; Sharafeldin et coll., 2000). Leur production peut être facilitée par des facteurs solubles du parasite, ainsi l'expression des ARNm du TGF- β induite par le TLTF (Trypanosome Lymphocyte Triggering Factor) est observée lors de trypanosomose expérimentale (Bakhiet et coll., 1996b).

Le TNF- α ou cachectine est une cytokine pro-inflammatoire, sécrétée par les cellules Th1, par les macrophages activés par l'IFN- γ et, au niveau du SNC par les astrocytes et les cellules microgliales. Le parasite peut également induire la synthèse de TNF- α par les macrophages (Magez et coll., 1993) et ainsi intervenir en retour dans le contrôle de la parasitémie (Lucas et coll., 1993, Magez et coll., 1997, 1999, Daulouède et coll., 2001). Le TNF- α est une molécule particulièrement cytotoxique et cytostatique (Cerami et Beutler, 1988). Le TNF- α stimule les macrophages et la synthèse d'autres cytokines. L'IL-10, cytokine anti-inflammatoire est sécrétée par les macrophages, les cellules B et les cellules Th2, en réponse à la présence de TNF- α (Carswell et coll., 1975 ;

Beutler et Cerami, 1989). Il facilite l'extravasation des leukocytes et l'infiltration du parenchyme en induisant l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (Kherl et coll., 1987). Une réduction de la synthèse d'IFN- γ et une reprise de prolifération des cellules T a été observée suite à l'application d'Ac anti-TNF à des cultures de cellules T et de macrophages suppresseurs (Lucas et coll., 1990), suggérant son implication dans l'immunosuppression.

L'IFN- γ , produit au cours de la THA est également capital dans la compréhension de la dysrégulation du système immunitaire. Le parasite stimule la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8+ ou par des neurones de la corne postérieure de la moelle en produisant le TLTF (Olsson et coll., 1993). L'IFN- γ en retour favorise la synthèse du TLTF (Hamadien et coll., 2000) et la prolifération du parasite (Olsson et coll., 1991 ; Bakhiet et coll., 1996c). Des Ac anti-TLTF ont un effet protecteur chez des souris infectées par *T. b. brucei* (Olsson et coll., 1993).

La déplétion des lymphocytes T CD8+ par un Ac monoclonal anti-CD8 entraîne une diminution de la parasitémie et une augmentation de la survie des rats infectés (Olsson et coll., 1992). Après administration d'Ac dirigés contre l'IFN- γ , les souris sensibles à l'infection par *T. b. brucei* deviennent résistantes (Uzonna et coll., 1998).

1.6.3. Macrophages et monoxyde d'azote (NO)

Les macrophages jouent un rôle déterminant dans la réponse de l'hôte aux infections par des protozoaires (Blackwell et Alexander, 1983 ; Ash, 1991). En raison de leur abondance, de leur distributivité et de leur mobilité, ils sont impliqués dans la plupart des réponses inflammatoires et immunitaires : phagocytose, synthèse de cytokines et de médiateurs inflammatoires, présentation de l'Ag.

Au cours de la THA, les macrophages augmentent en nombre et en taille (Vincendeau et coll., 1981) et exercent une activité parasiticide en impliquant le complément ou par phagocytose médiée par des récepteurs (Macaskill et coll., 1980). Ces cellules agissent également en synthétisant des facteurs solubles tels que des réactifs dérivés de l'oxygène (ROI), du monoxyde d'azote (NO) et du TNF- α (Grosskinsky et coll., 1983 ; Vincendeau et coll., 1992 ; Mnaimneh et coll., 1997). Le NO a une activité cytotoxique propre (Vincendeau et coll., 1992), alors que le TNF- α agit soit directement par fixation et lyse, soit indirectement par stimulation autocrine de la production de NO (Daulouède et coll., 1994).

Ces cellules sont également impliquées dans la production de prostaglandines (PG), notamment de PGE2 fortement augmentée chez la souris infectée par *T. b. brucei*. Issues de la dégradation des phospholipides membranaires, les PGE2 exercent un rôle immunosuppresseur en inhibant la libération de TNF- α et d'IL-1 et régulant l'expansion clonale des lymphocytes T.

Lors de l'activation macrophagique, une enzyme induite, la NO synthase (NOS) métabolise la L-arginine en citrulline et en NO qui possède des propriétés antitumorales et antiparasitaires (James et Hibbs, 1990 ; Shellito et coll., 1996). Différentes isoformes de l'enzyme existent, qui diffèrent par leur localisation, leur possible régulation d'activité par le calcium intracellulaire, ou leur mode d'expression (Fukuto et Chaudhuri, 1995). Deux isoformes constitutives, cytosoliques, calcium dépendantes, exprimées dans les neurones (NOS-I) et les cellules endothéliales (NOS-III), interviennent dans les processus physiologiques. Une isoforme inductible (NOS-II), cytosolique, indépendante de la concentration en calcium mais activée par des cytokines ou des endotoxines, exprimée dans les macrophages et les cellules gliales, intervient dans les phénomènes pathologiques en produisant de grandes quantités de NO (Ding et coll., 1988 ; Moncada et coll., 1991 ; Zhang et Snyder, 1995). Le NO possède de nombreux rôles physiologiques. Il intervient dans la relaxation du muscle lisse vasculaire contrôlée par l'endothélium (Palmer et coll.), dans la vasodilatation des vaisseaux et l'agrégation plaquettaire au niveau du système vasculaire (Bredt et Snyder, 1994). Au niveau du SNC, il est impliqué dans les processus de plasticité synaptique, de différenciation et de régénération des neurones (Bohme et coll., 1991). Son rôle est primordial dans le mécanisme de signalisation médié par le glutamate (Bawin et coll., 1994). Outre des fonctions physiologiques, le NO intervient au niveau central dans divers processus pathologiques, notamment l'ischémie cérébrale (Iadecola et coll., 1995) et la dégénérescence après lésion axonale (Wu et coll., 1994). Un excès de NO est impliqué dans les mécanismes de toxicité nerveuse (Bredt et Snyder, 1994 ; Zhang et Snyder, 1995). Au niveau du système immunitaire, il s'agit d'un composé pro-inflammatoire, constituant le médiateur de l'activité bactéricide et tumoricide des macrophages (Hibbs et coll., 1987). Chez les rongeurs, l'induction de la NOS-II dans les macrophages activés est responsable de la génération du NO et de ses dérivés, contribuant à tuer différentes variétés de micro-organismes (Nathan et Hibbs, 1991), aussi bien qu'à induire une cytotoxicité anti-tumorale (Hibbs et coll., 1987). Le NO est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses infections parasitaires telles que la leishmaniose (Mossalayi et coll., 1995) et le paludisme (Jacobs et coll., 1995 ; Kremsner et coll., 1996). L'origine du NO mis en jeu dans les réactions immunitaires est essentiellement liée à l'activation de la NOS-II. Divers stimuli endogènes et exogènes modulent la synthèse de ce radical libre. Ainsi, l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-1 en synergie avec les lipopolysaccharides (LPS) bactériens stimulent la production de NO macrophagique (Eissa et coll., 1996). A l'inverse, des cytokines

telles que le TGF- β , l'IL-4 et l'IL-10 inhibent l'expression de la NOS-II (Liew, 1995). D'autre part, outre son rôle cytostatique, le NO inhibe la prolifération lymphocytaire T, notamment en diminuant la synthèse d'IFN- γ par les lymphocytes Th1 et participe ainsi à l'immunosuppression (Sternberg et Mabbott, 1996). Dans la THA, le NO contribue au processus d'immunosuppression causé par le trypanosome dans la rate et les organes lymphoïdes, en agissant sur la prolifération lymphocytaire (Schleifer et Mansfield, 1993 ; Mabbott et coll., 1995). En plus, la libération du NO par les macrophages de la moelle contribue à l'anémie associée à la trypanosomose par inhibition de l'érythropoïèse (Mabbott et Sternberg, 1995). Le NO présente une activité cytotoxique et cytostatique *in vivo* et *in vitro* sur *T. cruzi* (Munoz-Fernandez et coll., 1992) et *T. b. brucei* (Vincendeau et coll., 1992 ; Sternberg et coll., 1994). Dans les modèles expérimentaux, il a été observé une augmentation de la production de NO dans le SNC des animaux infectés par *T. b. brucei* et une diminution concomitante dans le compartiment sanguin, probablement due à l'activation préférentielle de la voie de l'arginase dans ce compartiment (Buguet et coll., 1996 ; Cespuglio et coll., 1996, Gobert et coll., 2000). Les sites de production du NO et la présence des dérivés toxiques du NO dans le SNC des animaux infectés par les trypanosomes ne sont pas clairement définis, cependant Keita et coll. (2000) ont mis en évidence la NOS-inductible au niveau des macrophages dans les infiltrats périvasculaires cérébraux de souris infectées par *T. b. brucei*, ainsi que des peroxy-nitrites.

1.6.4. Immunopathologie du SNC

Astrocytes et microglie sont impliqués dans de nombreux processus inflammatoires du SNC (Hayes et coll., 1987), en raison de leurs propriétés les apparentant aux macrophages (Fontana et coll., 1984 ; Hellendal et coll., 1997).

Les astrocytes ont un rôle primordial au sein du SNC de par leur capacité à communiquer et à intervenir au niveau des autres cellules du névraxe. Elles assurent le soutien de la migration neuronale et de la croissance neuritique, le contrôle de l'homéostasie, du développement et la prolifération des oligodendrocytes. Elles agissent également en tant que cellules présentatrices de l'Ag en relation étroite avec les cellules microgliales et endothéliales impliquées dans les processus inflammatoires. Les astrocytes synthétisent du TGF- β et de l'IL-10 (Hertz et coll., 1990 ; Gurruchaga et coll., 1996) ainsi que du TNF- α après activation antigénique. Le TNF- α toxique pour les oligodendrocytes (Robbin et coll., 1987), favorise l'augmentation de la perméabilité endothéliale, et induit les astrocytoses réactionnelles. Certaines cytokines telles que l'IFN- γ , le

TNF- α et le TGF- β ont une action stimulatrice. En outre, l'IL-1 augmente leur prolifération et leur synthèse de TGF- β , et de PGE2 notamment.

Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du SNC interagissant étroitement avec les neurones. Elles présentent des activités similaires à celle des macrophages périphériques. Ces cellules sont les principales productrices de cytokines dans le cerveau, notamment d'IFN- γ et de TNF- α (Giulian et coll., 1986 ; Mauerhoff et coll., 1988 ; Woodroffe et coll., 1991 ; Tardieu et coll., 1991).

La phase méningo-encéphalitique de la THA s'accompagne d'une importante astrogliose (Adams et coll., 1986). Ce phénomène est également rencontré dans les expérimentations animales (Anthoons et coll., 1989 ; Keita et coll., 1997). Les astrocytes pourraient être responsables des lésions inflammatoires observées, par la synthèse de cytokines. Ainsi, chez des souris infectées par *T. b. brucei*, les astrocytes sont activés et les transcrits de l'IFN- γ ainsi que ceux d'autres cytokines tels que l'IL-1, l'IL-4, l'IFN- γ et le TNF- α sont produits (Hunter et coll., 1991 ; 1992b), conduisant aux réactions inflammatoires dans le SNC. Des composants du trypanosome peuvent induire *in vitro* une astrogliose (Pentreath et coll., 1994). Il a été récemment montré que le TLTF induit l'expression d'IFN- γ dans les cellules gliales de rat (Eltayeb et coll., 2000). Un autre argument en faveur de l'implication des cellules astrocytaires et microgliales dans la physiopathologie réside dans leur capacité à exprimer la NOS-II et à produire du NO en culture *in vitro* en présence de *T. b. brucei* (Girard et coll., 2000). Chez l'homme, la production de NO est exclusivement détectée dans les astrocytes stimulés par de l'IL-1 et de l'IFN- γ , et pas dans les cellules microgliales (Simmons et Murphy, 1992 ; Lee et coll., 1993 ; Peterson et coll., 1994 ; Liu et coll., 1996). En présence de *T. b. brucei* ou de ses facteurs solubles, les astrocytes et fibroblastes en culture produisent des prostaglandines, PGD2 et PGE2 (Alafiatayo et coll., 1994). Leur intervention dans les mécanismes impliqués dans l'altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE) a été suspectée.

1.7. Le Diagnostic biologique

Il existe divers signes biologiques qui constituent un faisceau d'arguments en faveur du diagnostic, cependant aucun symptôme ou groupe de symptômes n'est pathognomonique de la THA (Jannin et

coll., 1993). La symptomatologie n'a donc qu'une valeur d'orientation du diagnostic. En raison de la toxicité des médicaments disponibles, cette valeur n'est pas suffisante pour entreprendre un traitement d'épreuve comme cela est réalisé dans d'autres affections tropicales comme le paludisme. Seule la détection du parasite permet sans ambiguïté d'établir le diagnostic, quelque soit le liquide biologique étudié (sang ou le LCR) et la technique employée. Cependant, la fluctuation de parasitémie et l'inconstance de la détection du parasite dans le LCR au cours des ponctions lombaires rendent difficile leur mise en évidence.

1.7.1. Signes biologiques aspécifiques

De très nombreuses altérations sanguines et céphalorachidiennes ont été décrites au cours de l'atteinte. L'anémie est fréquemment rencontrée. Son dépistage grossier, par simple examen de la conjonctive oculaire ou plus précis par dosage de l'hémoglobine ou mesure de l'hématocrite est facile d'application. Sa valeur diagnostique reste cependant faible en raison de la multiplicité d'autres facteurs causatifs en zones intertropicales.

Les patients présentent une augmentation de la vitesse de sédimentation et des taux d'IgG et IgM élevés. L'augmentation considérable des taux d'IgM, de 4 à 10 fois la concentration habituelle est particulièrement évocatrice, notamment dans le LCR qui en est normalement dépourvu (Büscher, 1998 ; Bouteille et Dumas, 1999). Une recherche des IgM dans le LCR par un test d'agglutination de particules de latex sensibilisées est en cours d'investigation (Lejon et coll., 1998). Sa simplicité d'emploi devrait en faire rapidement un élément clé dans le diagnostic de phase mais aussi dans le suivi des patients traités.

1.7.2. Le diagnostic sérologique

La mise en évidence de signes indirects d'infection (détection d'anticorps ou d'antigènes spécifiques) est utile mais reste prédictive et n'emporte pas la décision. La recherche d'anticorps sur le terrain, dans le cadre d'une stratégie de dépistage à l'échelle d'une collectivité permet une première sélection dans la population, ce qui limite le nombre d'examens parasitologiques.

Cependant, une sérologie positive ne peut avoir qu'une valeur d'orientation en raison de la persistance des anticorps après traitement curatif efficace (Frézil et coll., 1979) et de la possibilité de réactions croisées.

1.7.2.1. Recherche d'anticorps

La sensibilité et la spécificité des tests de sérodiagnostic dépendent des antigènes utilisés. Pour les infections à *T. gambiense*, les VSG sont mises à contribution : chaque trypanosome a le potentiel génétique d'exprimer plusieurs centaines de VSG, correspondant à un répertoire très important d'antigènes variables (VAT, variable antigen type). Les trypanosomes présentent également plusieurs centaines à plusieurs milliers d'antigènes non variables, encore peu étudiés. *Trypanosoma rhodesiense* a un potentiel de variabilité antigénique si important que la mise en évidence d'un VAT commun est impossible, limitant l'emploi d'un sérodiagnostic.

Classiquement sont différenciées les techniques prescrites au laboratoire de celles utilisables sur le terrain. Les techniques d'immunofluorescence indirecte (IFI), d'ELISA ou d'agglutination en microplaque (PATT, procyclic agglutination trypanosomiasis test, et MoPATT, modified plate agglutination trypanosomiasis test) demandent une technicité de laboratoire et sont le plus souvent dévolues au laboratoire. Sur le terrain, la technique d'agglutination sur carte (CATT/*T.b.gambiense*®), développée en 1978, a été une véritable révolution (Magnus et coll., 1978). Cette technique a depuis été modifiée et deux nouvelles versions sont actuellement disponibles, le microCATT, qui se pratique sur un éluat de sang séché sur papier filtre (Miezan et coll., 1991) et le LATEX/*T.b.gambiense*® qui associe 3 VAT, ce qui augmente la sensibilité et permet un meilleur diagnostic sérologique (Büscher et coll., 1999).

1.7.2.2. Recherche d'antigènes

Deux techniques sont actuellement décrites, ELISA et CIATT (card indirect agglutination trypanosomiasis test), mais non utilisées en pratique.

Le test ELISA, mis au point par Liu et Pearson (Liu et Pearson, 1987 ; Liu et coll., 1989), est efficace à la recherche d'antigènes de *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*. Cette technique est cependant peu utilisée en raison de la nécessité d'un équipement sophistiqué et de résultats contradictoires en expérimentation animale (Rebeski et coll., 1999).

Développé en 1997 (Nantulya, 1997) et présenté comme le complément du CATT, l'un mettant en évidence des anticorps et l'autre des antigènes, CIATT est en cours d'évaluation. Une étude en Côte d'Ivoire en zone non endémique a montré que sa spécificité ne serait que de 61 % (Meda et coll., 1999), ce qui impliquerait un nombre de faux positifs important.

1.7.3. Le diagnostic parasitologique

La sérologie ne peut remplacer le diagnostic parasitaire. L'établissement du diagnostic de THA repose sur la mise en évidence du parasite. Un nombre important de techniques sont disponibles, aucune n'emporte l'adhésion de tous à l'heure actuelle.

Le diagnostic parasitologique repose sur l'examen microscopique du suc dermique, de suc ganglionnaire, sang ou de LCR. L'examen est soit direct, à l'état frais, la présence de trypanosomes vivants est alors recherchée, soit secondaire à des techniques de coloration spécifiques. La mise en œuvre de techniques de concentration est largement pratiquée pour les infections à *T. b. gambiense* en raison de la faible densité parasitaire.

1.7.3.1. Au niveau du chancre d'inoculation

Le recueil exsangue du suc dermique au niveau chancre d'inoculation permet un diagnostic très précoce de la maladie avant même le développement de la phase lymphatico-sanguine. Cette technique est dévolue aux THA d'incubation courte, notamment *T. b. rhodesiense*.

1.7.3.2. Dans le suc ganglionnaire

La sérosité ganglionnaire est recueillie à l'aide d'une aiguille après ponction du ganglion suspect. Le liquide est examiné directement entre lame et lamelle. Il s'agit d'une technique simple mais de sensibilité variable (40 % à 80 %) dépendant de nombreux facteurs, notamment du stade de l'atteinte, de la souche parasitaire et de l'interférence avec des pathologies autres, responsables d'adénopathies.

1.7.3.3. Dans le sang

1.7.3.3.1. Techniques d'utilisation courante

L'examen d'un étalement de sang frais

De 5 à 10 µl de sang sont étalés entre lame et lamelle et examinés à l'état frais. Le seuil de détection est de 10000 trypanosomes par ml. En pratique, cette technique n'intéresse que des THA à parasitémie élevée, en particulier *T. b. rhodesiense*.

La goutte épaisse colorée au Giemsa

La goutte épaisse colorée au Giemsa, qui permet l'exploration à l'objectif à immersion d'environ 20 µl de sang, présente un meilleur rendement puisque le seuil de détection est de 5000 trypanosomes par ml.

La centrifugation en tube capillaire (CTC) ou technique de Woo

La CTC nécessite 50 à 60 µl de sang recueillis dans un tube capillaire contenant de l'EDTA ou de l'héparine. La recherche de trypanosomes se fait par observation microscopique à l'interface globules-plasma, après centrifugation 5 minutes à 12 000 tours/minute. Elle offre un seuil de détection de 500 trypanosomes par ml. En zone équatoriale, la grande fréquence des filarioses peut poser un problème de lecture.

La mini-colonne échangeuse d'ions

La mini-colonne échangeuse d'ions (*mAECT, mini anion exchange centrifugation technique*) a été mise au point en 1979 (Lumsden et coll., 1979). 300 µl de sang sont passés en chromatographie anionique, l'éluat est alors concentré par une centrifugation douce. Le seuil de détection des parasites est de l'ordre de 100 trypanosomes/ ml, ce qui en fait le test de référence.

1.7.3.3.2. Techniques non employées en pratique

Le QBC test®

Le QBC test® (quantitative buffy coat) a été développé à l'origine pour la recherche d'hématozoaires du paludisme, adapté à la recherche des trypanosomes en 1981 (Carrié, 1979) et utilisé avec succès sur le terrain à partir de 1992 (Bailey et Smith, 1992 ; Truc et coll., 1994). Le test nécessite également environ 60 µl de sang recueillis dans un tube capillaire pré-traité avec de l'EDTA et de l'acridine orange. Ce test, qui demande un équipement un peu onéreux, est simple, rapide et sensible puisque le seuil de détection des trypanosomes est inférieur à 500 trypanosomes par ml. Il est maintenant bien adopté sur le terrain. La production de l'équipement de base (centrifugeuse, source de lumière UV) est cependant compromise dans l'avenir.

Le DIFAT

Le DIFAT (direct immunofluorescent assay for trypanosomiasis) est une combinaison de la goutte épaisse et de l'imprégnation par un conjugué fluorescent. Jusqu'à 40 fois plus rapide qu'une coloration par le Giemsa, elle nécessite cependant une lecture en lumière UV.

La culture in vitro

Le KIVI (*kit for in vitro isolation*) a été développé en 1992 pour l'isolement des trypanosomes sur le terrain (Aerts et coll., 1992) et immédiatement utilisé comme aide au diagnostic quand les autres techniques n'emportaient pas la décision. Le principe en est simple : une grande quantité de sang (10 ml) est inoculée stérilement à un milieu de culture. Les trypanosomes éventuellement présents se transforment en formes procycliques et commencent à se multiplier. Le flacon de culture est conservé à +27 °C dans l'obscurité et examiné pendant plusieurs semaines. Le principal handicap du test repose sur ce délai d'attente.

Culture et inoculation

Lorsque les recherches décrites sont demeurées négatives et que la suspicion de THA est très forte, des prélèvements de sang, de LCR ou de suc ganglionnaire peuvent être mis en culture sur des milieux spéciaux. Ces méthodes sont réservées à des structures spécialisées et sont longues.

De même, l'inoculation à des animaux de laboratoire préparés par des immunosuppresseurs ou splénectomisés permet en cas d'échec diagnostique de multiplier et d'isoler le parasite.

1.7.3.4. Dans le liquide céphalorachidien

La ponction lombaire doit être pratiquée après mise en évidence du trypanosome dans le sang ou le suc ganglionnaire, afin de déterminer la phase de la maladie. En effet, la survie des trypanosomes étant limitée dans le LCR, leur présence n'est effective qu'au stade méningo-encéphalitique (Pentreath et coll., 1992). L'examen parasitologique direct est la méthode de choix pour déterminer rapidement la présence du parasite dans le LCR. La détection du trypanosome est cependant difficile sur un examen conventionnel au moment de l'établissement de la cytorachie. Une double centrifugation suivie d'un examen du culot augmente la sensibilité d'autant plus que le volume de sang est important (Cattand et coll., 1988).

1.7.4. Nouvelles perspectives

Les techniques de biologie moléculaire appliquées à la détection du trypanosome constituent de nouvelles voies de recherche.

La détection de l'ADN par PCR (polymerase chain reaction) est une méthode d'une grande sensibilité et spécificité. S'il est facile de diagnostiquer le genre *Trypanosoma*, la détermination de l'espèce et de la sous espèce reste problématique (Bromidge et coll., 1993). La complexité de préparation des échantillons et le coût des équipements sont également des freins à leurs expansions. Ces techniques sont difficilement applicables sur le terrain et restent actuellement limitées au domaine de recherche (Kabiri et coll., 1999).

La RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction), technique de détection de l'ARNm apparaît plus résistante aux contaminations éventuelles durant l'échantillonnage. En outre, elle permet la distinction entre infection active et ADN persistant de trypanosomes morts. La détermination des amorces nécessaires et utiles pour la discrimination entre les souches est encore difficile. Son utilisation future lors d'études de chimiorésistances, dans le suivi d'essais thérapeutiques ou encore lors d'essais vaccinaux est fortement suggérée.

1.8. Le traitement

1.8.1. Historique

Nielly (1881) écrivait « Prophylaxie et traitement de la maladie du sommeil ne seront jamais établis tant qu'on n'aura pas fixé d'une manière plus exacte l'étiologie de l'affection (...). On est donc tenu à la médecine des symptômes». En effet, jusqu'à la découverte du trypanosome, les médications administrées visaient à lutter de façon aspécifique contre les manifestations de la maladie, en particulier la somnolence. La première substance à se révéler efficace fut l'arsenic, utilisée au moment de la découverte du parasite en 1903. L'idée d'utiliser l'arsenic dans la trypanosomose humaine africaine découlait des travaux de Lingard qui, aux Indes, avait obtenu de nombreuses guérisons de cas de trypanosomose équine grâce à l'acide arsénieux. Les travaux de Brumpt et Wurtz en 1904 montrèrent que l'acide arsénieux était le seul médicament qui, testé sur un modèle animal, s'était montré efficace, mais également très toxique. L'Atoxyl® (anilarsinate de sodium) est un arsenic pentavalent qui, malgré des résultats préliminaires prometteurs s'est montré inefficace en phase neurologique de la maladie. Les rechutes après traitement étaient fréquentes. De nombreux autres arsenics pentavalents furent testés avec plus ou moins de succès et d'inconvénients jusqu'à la mise au point en 1949 d'une combinaison de melarsen oxide (arsenic trivalent) et de British Anti Lewisite (BAL) baptisé Arsobal® (mélarsoprol). L'Arsobal® se révéla rapidement très supérieur en efficacité et tolérance. Premier produit médicamenteux actif en phase nerveuse de la maladie, il reste, en 2003, le traitement de référence de la maladie du sommeil en phase méningo-encéphalitique.

Synthétisée en 1937, la pentamidine ou Lomidine® (dérivé de la guanidine) est utilisée en première intention en phase primaire. Sa tolérance est satisfaisante. La Lomidine® est remplacée aujourd'hui par un produit équivalent, le Pentacarinat®.

1.8.2. La suramine (Bayer 205, Moranyl®, Germanin®)

Utilisable en phase lymphatico-sanguine, elle est aussi efficace sur *T. b. gambiense* que sur *T. b. rhodesiense*. La posologie habituelle est d'une injection intraveineuse hebdomadaire de 20 mg/kg pendant 5 à 10 semaines consécutives. Les effets secondaires les plus fréquents sont la fièvre, les arthralgies, irruptions cutanée ou neuropathies périphériques.

1.8.3. La pentamidine (Pentacarinat®)

Cette molécule est utilisée classiquement lors de la phase primaire de la maladie, en cure de 7 à 10 injections intramusculaires espacées de 24 à 48 h. La dose unitaire est de 4 mg/kg. Les effets secondaires les plus fréquents sont des douleurs au point d'injection, des crises douloureuses abdominales ou des malaises avec nausées, sueurs ou hypersialorrhée. Ces manifestations cèdent habituellement au traitement antihistaminique ou vasopresseur. Son efficacité trypanocide est très satisfaisante avec seulement 2% de rechutes après traitement bien conduit.

1.8.4. Le mélarsoprol (Arsobal®, Mel B)

Cet arsenic trivalent est depuis les années 50 le médicament de référence de la phase neurologique de la THA. Efficace sur la pyruvate kinase du glycosome, il inhibe la production d'énergie du parasite en s'intercalant dans la chaîne de production de l'ATP. Plus récemment, il a été suggéré que la phospho-fructo-kinase, une autre enzyme clef du cycle glycolytique, pourrait être la principale cible du médicament. Il est administré par voie intraveineuse directe. Le traitement consiste habituellement en 1 à 4 cures de 3 injections, en fonction de la cytologie du LCR (protocole de Neujean) et de tolérance clinique du produit. La dose classique est de 3,6 mg/kg par injection, les cures doivent être espacées de 8 à 15 jours. L'utilisation de doses croissantes augmente la tolérance. L'Arsobal® a cependant de nombreux inconvénients. Les seringues et les aiguilles utilisées ne doivent pas comporter de plastique car le produit le fait fondre en quelques minutes, interdisant également l'usage concomitant de matériel de perfusion. Il faut donc bannir le matériel à usage unique pour n'employer que du matériel stérilisable en verre et métal. Ce mode particulier d'administration du mélarsoprol nécessitant du matériel stérilisable peut difficilement être préconisé sur le terrain et réduit son utilisation à un environnement strictement hospitalier. Sa toxicité entraîne

des nécroses cutanées et des escarres si l'injection n'est pas strictement intraveineuse. Les thromboses veineuses ne sont pas rares même lorsque le produit est bien administré. Les malaises et accidents d'intolérance, représentés par des nausées, des malaises ou des irrptions cutanées, sont fréquents. Cependant, l'effet secondaire le plus redouté est l'encéphalopathie arsenicale, déjà décrite avec d'autres sels d'arsenic, qui apparaît dans 5 à 10 % des cas et dont l'issue est le plus souvent fatale. Son mécanisme est mal élucidé et ne semble pas être lié à la toxicité propre de l'arsenic, mais à une réaction auto-immune par précipitations d'immuns complexes sur l'endothélium des vaisseaux du cerveau. Sa fréquence peut être diminuée en fractionnant les doses ou en prémédiquant les malades avec de fortes doses de corticoïdes (Pépin et coll., 1989) associés ou non à des antihistaminiques.

Les rechutes constituent également un problème majeur dans le traitement de la THA par le mélarsoprol. Au cours des dernières décennies, les taux rapportés ont varié de 1 à 10 %. Plus récemment, les divers rapports indiquent des taux nettement plus élevés : 19 % au Sud Soudan, 26 % en Ouganda du Nord, 20 % dans la province du Zaïre en Angola. Ces rechutes restent un phénomène clinique d'origine inconnue. Le développement de parasites résistants ou l'insuffisance des concentrations de médicament dans des compartiments biologiques sont avancés. Les réinfections sont envisagées mais leur fréquence est probablement plus faible.

1.8.5. Le difluoro-méthyl-ornithine (Eflornithine)

Cette molécule utilisée en cancérologie est un inhibiteur de la synthèse des polyamines, en particulier de l'ornithine décarboxylase permettant la formation de spermidine, substances indispensables à la croissance du parasite et à la biosynthèse du trypanothion, équivalent du glutathion chez le trypanosome. Utilisé pour la première fois en 1982 (Pépin et coll., 1987 ; De Groof et coll., 1992), le DFMO s'est montré efficace (Janin et coll., 1990), et a été utilisé à de nombreuses reprises (Bertrand et coll., 1995 ; Peceny et coll., 1995). Il est actif en phase neurologique d'où son intérêt dans les cas de résistance au mélarsoprol (Eozenou et Zitsamale-Cody, 1989). Des résistances ont été décrites dans la THA à *T. b. rhodesiense*. De nombreux schémas thérapeutiques ont été proposés (Milord et coll., 1992). La posologie conseillée est de 400 mg/kg par jour par voie intraveineuse, pendant 15 jours. De nouveaux protocoles sont en cours d'étude (Khonde et coll., 1997). Des diarrhées, nausées, douleurs abdominales, plus rarement des anémies, leucopénies ou thrombopénies peuvent apparaître. Ces troubles sont classiquement

réversibles. Par ailleurs, son coût et son mode d'administration limitent son utilisation aux centres d'expérimentation.

Tous ces médicaments, s'ils sont encore produits et donc prescriptibles, induisent des effets secondaires multiples non négligeables. Une nouvelle voie d'approche thérapeutique met l'accent sur le bénéfice des traitements combinés. Cependant, l'établissement et l'efficacité sur le terrain de protocoles cliniques d'essais thérapeutiques nécessitent un encadrement lourd et un suivi d'une durée minimale de deux ans, difficile à mettre en œuvre dans les régions endémiques. A cela s'ajoutent des problèmes de résistance aux médicaments, une résistance dite « primaire » de *T. b. rhodesiense* au DFMO (Iten et coll., 1995), une résistance « acquise » de *T. b. gambiense* au mélarsoprol (Kaminsky et coll., 1998). La sensibilité aux arsenicaux melaminophényl met en jeu un transporteur de nucléosides de *Trypanosoma brucei*. Un variant de la molécule non fonctionnel, exprimé par les trypanosomes résistants a récemment été impliqué dans le phénomène de résistance (Maser et coll., 1999).

1.8.6. Axe de recherche thérapeutique

1.8.6.1. Le mégazol

Parmi les molécules testées chez l'animal sur diverses souches de trypanosomes, le mégazol, dérivé nitro imidazolé, semble prometteur (Bouteille et Chauvière, 1999; Chauvière et coll., 2003). En effet, il est trypanocide à de faibles concentrations et passe bien la barrière hémato-encéphalique (Marie-Daragon et coll., 1994 ; Enanga et coll., 1998 et 2000).

1.8.6.2. Autres perspectives

Les recherches en matière de thérapeutique s'orientent vers des produits actifs à tous les stades de la maladie et présentant le moins d'effets secondaires possibles.

L'inhibition de la glycolyse, unique source d'énergie du parasite, est un axe de recherche toujours d'actualité (Verlinde et coll., 1994 ; Périé et coll., 1994). Cette réaction qui a lieu dans le glycosome, organelle spécialisée du trypanosome, met en jeu différentes enzymes, cibles potentielles de nouveaux médicaments. L'enzyme la mieux connue est la glycéraldéhyde-3-

phosphate déshydrogénase. L'inhibition de son cofacteur NAD⁺ bloque le métabolisme du parasite. En fait, la suramine exerce très probablement son effet trypanocide par inhibition de la glycolyse, comme le suggère sa très forte affinité pour les enzymes du glycosome. L'efficacité de ce médicament encourage les essais de synthèse de nouvelles molécules plus spécifiques encore et plus intéressantes sur le plan pharmacodynamique (passage de la barrière hémato-encéphalique) (Opperdoes, 1995).

Une seconde approche thérapeutique consiste en l'inhibition de la synthèse du trypanothion, molécule particulière au parasite, indispensable à sa survie (Fairlamb et coll., 1985 ; Fairlamb, 1990).

1.8.6.3. Stratégie vaccinale

Cette voie reste à l'heure actuelle difficilement envisageable en raison de la variabilité antigénique du trypanosome. La mise en évidence de constituants stables du parasite, et accessibles malgré le manteau de VSG reste la solution potentielle (Overath et coll., 1994).

Des stratégies nouvelles utilisant les vaccinations par l'ADN, pour un Ag conservé, avec des adjuvants adaptés ont été développées. Les résultats sont probants avec *T. cruzi* (Leclerc et Ronco, 1998 ; Pereira-Chioccola et coll., 1999).

Des essais de vaccination avec de la tubuline, constituant important du cytosquelette du trypanosome, ont permis de protéger des souris de l'infection par *T. brucei*. Les sérums inhibaient la croissance du parasite en culture, une réponse AC semble requise pour cette protection, qui reste à confirmer (Lubega et coll., 1998).

Des recherches récentes montre qu'une forme sanguine mutante de *T. brucei* exprimant une variante inactive d'ornithine décarboxylase protégerait des souris de l'infection par la forme sauvage. Une nouvelle approche basée sur la mise au point de mutants apparaît prometteuse (Mutomba et coll., 1999), bien que l'effet thérapeutique se limite aux parasites de sous-groupes de VAT similaires.

1.9. Troubles des rythmes circadiens

1.9.1. Trouble du sommeil

La maladie du sommeil se caractérise par une perturbation du cycle de veille et sommeil classiquement décrite comme une hypersomnie par les médecins coloniaux. Dangaix en 1861 (Dechambre, 1861) séparait les manifestations en trois degrés : tendance au sommeil pour le premier, sommeil presque constant avec intelligence obscurcie, marche titubante pour le deuxième, et sommeil plus profond et plus continu avec abrutissement, amaigrissement, faiblesse extrême pour le troisième degré. Nielly (1881) décrivit une période caractérisée par des troubles du sommeil ou somnolence, chute de la paupière supérieure, marche titubante, mutisme, indifférence, et une période d'aggravation avec de plus en plus d'accès de sommeil et de nombreux signes neurologiques (hémiparésie, fourmillements et convulsions). Mackensie (1890) rapporta la première observation continue d'un malade, ne présentant pas d'hypersomnie, mais dormant peu, à tout moment du nycthémère. Il décrivait ainsi son malade : «Il dormait souvent mais peu de temps chaque fois, aussi bien la nuit que le jour, de sorte que la durée totale de son sommeil ne dépassait pas le chiffre moyen des individus bien portants ». Ainsi le caractère circadien des troubles du cycle veille-sommeil était-il évoqué, chez des patients « somnolents le jour et agités la nuit » (Manson-Bahr, 1942).

Les états de vigilance sont déterminés, chez l'homme, grâce à la technique de polyhypnographie, selon les prérogatives codifiées en 1968 par Rechtschaffen et Kales. L'enregistrement polyhypnographique qui permet la classification des états de vigilance, comporte au minimum le recueil de trois critères électrophysiologiques : l'électroencéphalogramme (EEG), enregistré avec des électrodes placées sur le scalp selon le système 10-20 international, l'électromyogramme (EMG), recueilli avec des électrodes cutanées placées en regard des muscles de la houppe du menton et des jambiers antérieurs et enfin l'électro-oculogramme (EOG), enregistré avec des électrodes disposées autour des orbites au niveau des canthus externes de chaque œil, permettant le recueil des variations du dipôle cornéorétinien. Ces trois enregistrements permettent de différencier l'éveil, le sommeil lent (léger et profond), et le sommeil paradoxal. Le sommeil de sujets adultes en climat tempéré est monophasique et nocturne.

Les premiers enregistrements polyhypnographiques de sommeilleux ont été réalisés par Gallais (Gallais et coll., 1951 ; 1953), Radermecker (Radermecker, 1955 ; 1956) et Collomb (Collomb et coll., 1961). En particulier, Radermecker rapportait chez des patients en phase avancée de la THA, l'existence de figures EEG anormales typiques décrites comme « souvent pseudorythmiques et pouvant même ressembler aux perturbations bioélectriques observées dans les leucoencéphalites ».

Par la suite, des études complémentaires ont confirmé les constatations antérieures sur un échantillon moins restrictif de patients. En 1965, Bert et coll. élargirent la connaissance de la pathologie intéressant l'EEG. Des enregistrements polygraphiques exclusivement nocturnes ont été pratiqués au Sénégal, chez 18 patients parmi lesquels 17 présentaient une phase méningo-encéphalitique déclarée. Une véritable destruction du sommeil a été caractérisée, accompagnée de la disparition des grapho-éléments tels que les complexes K et les fuseaux de sommeil, mettant un terme à la caractérisation d'une simple hypersomnie.

En 1970, Schwartz et Escande ont recueilli en discontinu l'activité électropolygraphique d'un patient atteint de THA sur une période de 4 mois, au total 9 enregistrements (3 tracés de routine le matin, 5 tracés polygraphiques prolongés d'après-midi, 1 tracé de nuit). Les tracés ont principalement révélé des anomalies de la morphologie EEG en sommeil lent avec la caractérisation de bouffées delta monomorphes pathologiques, ainsi qu'une organisation de type narcoleptique du sommeil avec une survenue précoce de la première phase de mouvements oculaires rapides.

Ces deux dernières études se sont intéressées à la morphologie des tracés, mettant en évidence des anomalies spécifiques, mais les enregistrements pratiqués ne couvraient pas un nyctémère. C'est à Niamey en 1988 que de tels enregistrements polyhypnographiques ont été conduits pour la première fois, chez un patient ayant voyagé en Côte d'Ivoire, dans une région d'endémie connue (foyer de Gagnoa) (Buguet et coll., 1989). La distribution veille-sommeil présentait une distribution anormale, caractérisée par 8 épisodes de sommeil distincts répartis sur l'ensemble du nyctémère, avec néanmoins un épisode majeur survenant la nuit. Le patient a présenté des épisodes de sommeil paradoxal survenant sur un mode narcoleptique (avec une latence très courte d'apparition du sommeil paradoxal). Cependant, les états de vigilance étaient parfaitement distincts malgré de nombreuses anomalies morphologiques du tracé EEG.

Deux études complémentaires ont alors été conduites à Daloa (Côte d'Ivoire) puis à Brazzaville (Congo), pour approfondir les constatations faites chez le premier patient (Buguet et coll., 1993 et 1994). Les hypnogrammes recueillis ont confirmé la perturbation de la rythmicité du cycle veille-sommeil. Chez les patients les plus gravement atteints, les épisodes de sommeil ont tendance à se répartir indifféremment sur l'ensemble du nyctémère. Malgré ces altérations de la distribution

circadienne de la veille et du sommeil, le temps de sommeil total est resté dans les limites de la normale infirmant la notion d'hypersomnie. Par ailleurs, l'alternance veille-sommeil est survenue en cycles d'autant plus courts et nombreux que les malades étaient plus gravement atteints. Les épisodes narcoleptiques (SOREMP, sleep onset REM periods) sont nombreux et proportionnels à la sévérité de l'atteinte clinique. En phase avancée de méningo-encéphalite, les SOREMP initialisent la majorité des épisodes de sommeil, survenant avec une périodicité voisine de 90 minutes, illustrant le « basic rest activity cycle » évoqué par Kleitman en 1969.

Après traitement au mélarsoprol, les perturbations régressent, la rythmicité circadienne du cycle veille-sommeil se normalise et les SOREMP diminuent jusqu'à disparaître chez les patients les moins sévèrement atteints. Cette amélioration est également décrite au stade avancée de méningo-encéphalite avec une normalisation progressive nécessitant une période de réversibilité des troubles plus longue.

Des anomalies des tracés électroencéphalographiques ont également été décrites. Progressivement, avec l'évolution de la maladie, la morphologie de l'électroencéphalogramme adopte un caractère monotone, avec une différenciation des différentes phases de sommeil lent délicate. Les complexes K et les fuseaux de sommeil (12 à 16 Hz), caractéristiques du stade 2 sont peu nombreux. Bien que la réactivité alpha (9 à 13 Hz) persiste pendant l'éveil, un ralentissement des processus d'éveil se manifeste par l'invasion d'anomalies lentes associant une activité thêta diffuse (6 à 7 Hz) à des bouffées d'ondes lentes de la bande delta (0,5 à 4 Hz) à prédominance frontale. A un stade d'évolution avancée de la méningo-encéphalite le ralentissement des processus d'éveil est marqué avec la survenue récurrente d'évènements hypersynchrones hypnopompiques, la disparition des fuseaux de sommeil et l'invasion progressive d'ondes lentes de la bande de fréquence delta.

1.9.2. Troubles hormonaux

Des études hormonales ont été entreprises pour déterminer l'étendue des perturbations du rythme circadien chez les patients trypanosomés. Il a été montré que de nombreux rythmes endocriniens sont également modifiés proportionnellement à l'intensité des manifestations cliniques de la maladie. Au cours des expérimentations menées à Daloa et à Brazzaville (Buguet et coll., 1993 et 1994), des prélèvements sanguins ont été réalisés avec une périodicité d'1 heure (Daloa) et de 10

minutes (Brazzaville), afin d'étudier le rythme de sécrétion de diverses hormones, notamment le cortisol, l'hormone de croissance (GH), la prolactine et la mélatonine.

Chez le sujet sain, le cortisol et la mélatonine présentent une sécrétion variable sur 24 heures, mais totalement indépendante des épisodes de sommeil. La sécrétion de cortisol présente cependant une relation privilégiée avec les épisodes de sommeil lent qui n'apparaissent qu'en phase descendante des pics sécrétoires. La prolactine est dépendante du sommeil, associée aux épisodes de sommeil de longue durée. L'hormone de croissance (GH) est sécrétée en phase avec le sommeil. Un pic sécrétoire de GH apparaît en début de nuit en relation étroite avec le sommeil lent profond.

L'étude des cycles hormonaux chez les patients trypanosomés en phase neurologique montre que la sécrétion du cortisol est altérée proportionnellement à la gravité clinique. Le rythme de sécrétion du cortisol est aboli chez les patients les plus atteints. L'altération est intermédiaire chez les patients à un stade moins avancé d'atteinte méningo-encéphalite (Radomski et coll., 1995). Bien le rythme circadien de l'amplitude des pics de sécrétion soit inexistant, la pulsativité hormonale persiste et garde ses relations avec les états de sommeil. Les phases de diminution des pics de sécrétion restent en effet associées au sommeil lent profond. La quantité de cortisol sécrété sur une période de 24h ne varie pas. L'atteinte de la rythmicité circadienne concerne l'amplitude des pics de sécrétion.

Le profil de sécrétion de prolactine ancré au sommeil, augmentant à l'endormissement et diminuant au réveil est conservé à un stade précoce d'évolution de la THA. Au stade avancé de la maladie, la sécrétion de prolactine perd sa rythmicité circadienne. Les dosages montrent une disparition de la relation entre sécrétion et cycle veille-sommeil. La sécrétion de prolactine devient indépendante du sommeil en raison de la fragmentation excessive du sommeil interdisant la survenue d'épisodes de longue durée. Cependant la pulsativité sécrétoire de cette hormone et sa relation avec les stades de sommeil est conservée (Brandenberger et coll., 1994 et 1996). La sécrétion de rénine plasmatique connaît une perturbation de rythmicité circadienne également liée à la courte durée des épisodes de sommeil, en particulier du sommeil lent profond.

Par ailleurs, il n'y a pas d'altération de l'association entre pic de GH et sommeil lent même chez les patients très atteints (Radomski et coll., 1996). La sécrétion hormonale de GH, malgré une forte dérégulation circadienne, maintient ses relations privilégiées avec le sommeil lent profond. Chez le patient en phase méningo-encéphalitique avancée, des pics de sécrétion de moindre amplitude sont observés en phase avec le sommeil, le plus souvent en concomitance avec le sommeil lent profond.

Il existe donc, pour la GH et la prolactine, une atteinte de la composante circadienne de leur rythme sécrétoire, sans altération de leur lien avec les stades de sommeil.

Le rythme de sécrétion de la mélatonine, synchroniseur des rythmes circadiens persiste chez les patients trypanosomés (Claustrat et coll., 1998). La sécrétion nocturne de mélatonine augmente la nuit et l'amplitude du rythme de sécrétion ne diffère pas. Cependant l'acrophase survient en avance de phase de près de 2 heures par rapport à celle des sujets sains.

L'oestradiol chez la femme et la testostérone chez l'homme sont diminuées de 50% environ, sans anomalies des gonadotrophines (FSH et LH). Leurs composantes circadiennes n'ont pas été explorées.

Enfin, l'exploration thyroïdienne montre une diminution de T3 et de sa fraction libre alors que la mesure de T4 présente une concentration normale (Hublart et coll., 1988).

2. CHAPITRE II : LE CYCLE VEILLE-SOMMEIL CHEZ L'ANIMAL

2.1. Organisation de l'éveil et du sommeil chez le rat au cours d'un nycthémère

Chez le rat, au cours d'un nycthémère, l'organisation des phases d'éveil et de sommeil est soumise à un rythme circadien d'une période d'environ 24 heures (le rat est un animal actif la nuit, qui reste éveillé pendant 70% de la phase nocturne et 30% de la phase diurne) surimposé à un rythme ultradien (occurrence spontanée des cycles E (éveil)- SL (sommeil lent)- SP (sommeil paradoxal) successifs). Le rythme circadien du cycle veille-sommeil est influencé par des « synchroniseurs » externes tels que l'alternance lumière-obscurité, la prise alimentaire et les influences sociales. Il persiste chez des animaux soustraits à l'influence du cycle lumière-obscurité mais il évolue alors en libre cours. Ces données indiquent que le rythme veille-sommeil, comme de nombreux rythmes, est sous le contrôle d'une horloge interne qui serait localisée au niveau des noyaux suprachiasmatiques (Ibuka et coll., 1977). Cette horloge serait aussi sous l'influence de l'épiphyse (Cassone, 1990) et des noyaux mésencéphaliques du raphé.

2.2. Phénoménologie

Les trois états de vigilance se différencient selon leurs caractéristiques comportementales et polygraphiques.

2.2.1. L'éveil

Du point de vue comportemental, l'animal éveillé peut avoir une activité motrice importante (éveil agité) ou être immobile (éveil calme), les yeux ouverts. Il est très réactif aux informations extérieures. Son rythme cardiaque est de fréquence élevée, sa respiration rapide.

L'analyse polygraphique caractérise cet état par la présence d'une activité corticale désynchronisée, rapide (de 15 à 25 Hz) et de bas voltage associée à un tonus musculaire corrélé à l'activité de l'animal. Les mouvements oculaires sont fréquents.

2.2.2. Le sommeil à ondes lentes ou sommeil lent

Au cours du sommeil à ondes lentes (SL), l'animal est immobile et a les yeux fermés. Il adopte une posture caractéristique, allongé, la tête repliée sous le corps ou le nez posé au niveau de la queue. Les postures de sommeil sont aussi dépendantes de la température ambiante et des conditions d'éclairage (Valatx et coll., 1973 ; Van Betteray et coll., 1991). Les rythmes cardiaque et respiratoire sont ralentis.

L'analyse polygraphique permet de caractériser cette phase de sommeil par la lecture d'une activité corticale synchronisée constituée d'ondes lentes (de 1 à 4 Hz) de haut voltage et de fuseaux de fréquence rapide (de 11 à 15 Hz). Le tonus musculaire est fortement diminué par rapport à l'éveil. Il peut également être absent.

2.2.3. Le sommeil paradoxal

Du point de vue comportemental, il n'y a pas de différence notable entre le SL et le sommeil paradoxal (SP).

L'analyse polygraphique a toutefois permis de différencier ces deux types de sommeil (Jouvet et coll., 1959). Le SP se caractérise par une activité corticale désynchronisée semblable à celle observée pendant l'éveil, une atonie des muscles de la posture parfois ponctuée de secousses musculaires (le plus fréquemment au niveau de la face et des membres distaux), des mouvements rapides des yeux, et une érection, mise en évidence chez l'homme et le rat (Fisher et coll., 1965 ; Schmidt et coll., 1994). Chez le chat, des ondes amples monophasiques peuvent être enregistrées dans les noyaux pontiques, les corps genouillés latéraux et le cortex visuel. Ces ondes ponto-

géniculo-occipitales ont été enregistrées pour la première fois au niveau des corps genouillés latéraux par Mikiten et coll. (1961) et baptisées "activité PGO" par Jeannerod (1965). Très difficilement enregistrées chez le rat, elles conduiraient aux mouvements oculaires rapides.

2.3. Structures impliquées dans les différents états de vigilance

2.3.1. Les structures impliquées dans les mécanismes de l'éveil

L'éveil est un état d'intense activité physique et mentale, lié à la convergence d'une multitude d'informations à tous les niveaux d'intégration du système nerveux central. Il se traduit au niveau cortical par une activité neuronale désynchronisée permettant le déclenchement des réponses comportementales et autonomes adaptées. La désynchronisation corticale ou activation tonique des neurones corticaux peut être considérée comme la conséquence d'une part de l'activation directe du télédiencephale et d'autre part du blocage des systèmes produisant les fuseaux et ondes lentes caractéristiques du SL.

La régulation de l'éveil est un phénomène complexe mettant en jeu des structures multiples et redondantes (figure 6). Aucune structure, prise isolément n'est indispensable à l'activation corticale. A cela s'ajoutent des systèmes distincts projetant sur le cortex, activés par d'autres systèmes du tronc cérébral, suffisants au maintien de l'activation corticale.

- *Le système thalamique :*

Les neurones intralaminaires du thalamus, relais des informations sensorielles et motrices, projettent sur l'ensemble du cortex (Jones et Leavitt, 1974 ; Itoh et Mizuno, 1977, Kennedy et Baleyrier, 1977 ; Molinari et coll., 1986 ; Hendry et coll., 1979). Sakai et coll. (1990) ont injecté des cholinomimétiques dans les noyaux intralaminaires chez le chat et ont obtenu une désynchronisation corticale prolongée tandis que des microinjections de muscimol, agoniste GABA_A ont induit une synchronisation des rythmes électroencéphalographiques corticaux. L'activation des neurones thalamocorticaux provoque la libération d'acides aminés excitateurs tels que l'aspartate et le glutamate, au niveau cortical (Glenn et Steriade, 1982 ; Ottersen et coll., 1983 ; Macchi et Bentivoglio, 1985). Ces données suggèrent que ces neurones activent les neurones corticaux et induisent la désynchronisation corticale.

- *Le système diffus de l'hypothalamus postérieur* :

La stimulation électrique de l'hypothalamus postérieur déclenche un éveil hyperactif. Sa lésion électrolytique chez le chat entraîne un coma prolongé caractérisé par des ondes lentes corticales. Sa lésion neurotoxique produit le même effet mais de façon transitoire (Sallanon et coll., 1988 ; Denoyer et coll., 1991).

Un des maillons de ce système contient le seul groupe de cellules synthétisant l'histamine (le noyau tubéromammillaire et la partie caudale de l'aire hypothalamique latérale). En effet, les neurones présentant une activité tonique pendant l'éveil, de fréquence lente et diminuant au cours du sommeil (Vanni-Mercier et coll., 1984), enregistrés en extracellulaire dans le noyau tubéromammillaire chez le chat non anesthésié, ont les mêmes caractéristiques électrophysiologiques que ceux à histamine enregistrés *in vitro* (Haas et Reiner, 1988). De plus, le noyau tubéromammillaire contient presque exclusivement des neurones à histamine. Il est donc fort probable que ces neurones dont l'activité est maximale spécifiquement pendant l'éveil, soient de nature histaminergique. Les données pharmacologiques appuient la notion d'un rôle éveillant des neurones histaminergiques de l'hypothalamus postérieur (Lin et coll., 1986 ; 1988 ; 1990 ; McCormick et Williamson, 1989).

D'autres neurones de l'hypothalamus postérieur sont impliqués dans les systèmes d'éveil mais leur nature neurochimique n'est toujours pas clairement définie.

- *Le système du télencéphale basal* :

Les neurones cholinergiques du télencéphale basal envoient des projections diffuses au cortex et aux noyaux thalamiques (Mesulam et coll., 1983 ; Woolf et Butcher, 1986 ; Steriade et coll., 1987 ; Levey et coll., 1987). Leur stimulation est éveillante et leur lésion neurotoxique par l'acide iboténique, chez le rat, entraîne l'apparition d'ondes lentes (Buzsaki et coll., 1988). L'action de l'acétylcholine consiste en un blocage des oscillations rythmiques des neurones réticulés thalamiques GABAergiques, et en l'activation directe des neurones intralaminaires thalamiques ainsi désinhibés (Krnjevic et coll., 1971 ; McConnick, 1990).

Ces trois systèmes reçoivent des activations d'autres structures et systèmes.

- *Les noyaux mésopontins cholinergiques : les noyaux tegmental latérodorsal de Castaldi et pédonculopontin :*

Les neurones cholinergiques de ces noyaux mésopontins se projettent sur les différents noyaux du thalamus chez le chat et chez le rat (Woolf et Butcher, 1986 ; Hallanger et coll., 1987 ; Paré et coll., 1988 ; Smith et coll., 1988 ; Steriade et coll., 1988). Cette constatation a été faite par traçage rétrograde des voies nerveuses et immunohistochimie de la choline acétyltransférase, l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine. La stimulation des noyaux parabrachial et mésopontin induit une hyperpolarisation des neurones réticulés du thalamus. L'acétylcholine exerce une double action : une action muscarinique inhibitrice par hyperpolarisation des neurones réticulés du thalamus (McConnick et Prince, 1986) et une action nicotinique activatrice par dépolarisation des neurones thalamocorticaux et corticaux (McConnick et Prince, 1987) conduisant à la désynchronisation corticale.

- *La formation réticulée :*

La formation réticulée mésencéphalique forme avec les neurones cholinergiques mésopontins, la voie réticulo-thalamo-corticale. Les neurones de cette structure se projettent massivement sur les noyaux thalamiques mais pas directement sur le cortex chez le chat et le rat (Jones et Yang, 1985 ; Sakai, 1985 ; Satoh et Fibiger, 1986 ; Smith et coll., 1988 ; Steriade et coll., 1988). La stimulation de ces neurones déclenche un éveil prolongé. Les neurotransmetteurs utilisés par les neurones de la formation réticulée mésencéphalique ne sont pas connus. Cependant, il a été montré que ces neurones exercent une action excitatrice directe, à courte latence et de courte durée, sur des neurones thalamocorticaux identifiés par stimulation antidromique (Steriade et Glenn, 1982). Ces données suggèrent que les neurones réticulaires du mésencéphale utilisent des acides aminés excitateurs comme neurotransmetteurs.

Le noyau réticulé magnocellulaire bulbaire contient des neurones cholinergiques ou aspartate/glutamatergiques qui se projettent sur la formation réticulée mésencéphalique, l'hypothalamus postérieur et les groupes cholinergiques mésopontins. Cet ensemble forme la voie réticulo-hypothalamo-corticale. La stimulation du noyau réticulé magnocellulaire provoque un éveil intense et prolongé.

- *Le noyau du locus coeruleus :*

Ce noyau contient des neurones noradrénergiques qui envoient des projections directes vers le cortex, le thalamus et l'hippocampe (Jones et Yang, 1985). Ces neurones reçoivent de nombreuses afférences activatrices et inhibitrices, confirmant leur rôle modulateur de l'éveil (Luppi et coll., 1995). La noradrénaline induit une dépolarisation des neurones corticaux et une inhibition des noyaux réticulés thalamiques, facilitant ainsi le transfert des informations vers le cortex cérébral (McCormick et Prince, 1988 ; McCormick et Williamson, 1989). Sa déplétion par administration d' α -méthyltyrosine, entraîne une diminution de la désynchronisation corticale (King et Jewett, 1971).

- Les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé :

Les neurones des noyaux raphés dorsal et médian se projettent sur le cortex, le thalamus et l'hypothalamus (Bobillier et coll., 1976 ; Vertès, 1991). Ils sont actifs pendant l'éveil et silencieux pendant le SP (McGinty et Harper, 1976 ; Trulson et Jacobs, 1979). Les données de la littérature concernant ces neurones suggèrent qu'ils pourraient avoir un effet neuromodulateur pendant l'éveil.

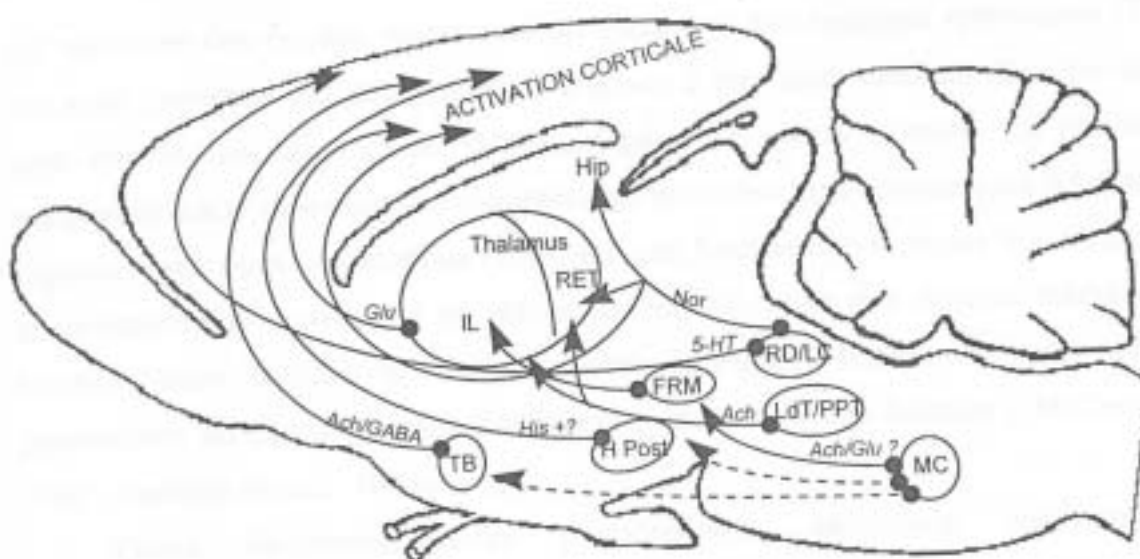


Figure 6 : Schémas représentatif des réseaux neuronaux impliqués dans l'éveil.

Hip : hippocampe ; **IL** : noyau intralaminaire du thalamus ; **RET** : noyau réticulaire du thalamus ; **TB** : télencéphale basal ; **H Post** : hypothalamus postérieur ; **FRM** : formation réticulaire mésencéphalique ; **RD** : noyau du raphé dorsal ; **LC** : locus coeruleus ; **LDT/PPT** : noyaux latérodorsal et pédonculopontin du tegmentum pontique ; **MC** : noyau réticulé bulbaire magnocellulaire. **Ach** : acétylcholine ; **GABA** : acide γ -amino butyrique ; **Glu** : glutamate ; **His** : histamine ; **Nor** : noradrénaline ; **5-HT** : 5-hydroxytryptamine.

2.3.2. Les structures impliquées dans les mécanismes du sommeil à ondes lentes (figure 7)

Lors de l'endormissement une "désafférentation" sensorielle du cortex s'installe progressivement. Les premiers signes électroencéphalographiques de l'état de somnolence s'accompagne de l'interruption des informations sensorielles et motrices au niveau du thalamus. En outre, ce phénomène a lieu sans qu'aucun signe d'inhibition de la transmission synaptique ne soit observé au niveau des relais pré-thalamiques (Steriade et coll., 1971). C'est sur cette observation que s'appuie l'idée selon laquelle les mécanismes intrathalamiques jouent un rôle majeur dans la désafférentation cérébrale conduisant au sommeil. Cette phase s'accompagne de l'apparition de fuseaux caractéristiques de cet état de vigilance.

- *Le noyau réticulé thalamique :*

L'enregistrement des fuseaux dans les noyaux intralaminaires du thalamus chez le chat ayant subi une décortication bilatérale et une section au niveau de la partie rostrale du tronc cérébral a démontré la genèse thalamique de ces ondes (Morison et Bassett, 1945). De nombreuses données expérimentales indiquent que l'origine de ces fuseaux est due à des neurones GABAergiques présents dans les noyaux réticulés thalamiques (Steriade et coll., 1985, 1987 ; Buzsaki et coll., 1988). Les neurones réticulés thalamiques GABAergiques, grâce à leurs propriétés intrinsèques, présentent une activité "pacemaker" *in vivo*. Ces cellules imposeraient ainsi aux neurones thalamocorticaux, via des PPSI (potentiels post-synaptiques inhibiteurs) une inhibition rythmique bloquant le transit des informations sensorielles vers le cortex (Steriade, 1990).

- *La région préoptique :*

Cette structure est impliquée dans l'apparition du SL. La stimulation électrique de la région préoptique engendre des ondes lentes corticales accompagnées d'un comportement de sommeil (Serman et Clemente, 1962). Des stimulations pharmacologiques par des substances cholinomimétiques ont confirmé ces résultats (Hernandez-Peon et Ibarra, 1963).

La lésion électrolytique bilatérale de la région préoptique supprime le sommeil du chat pendant une durée de trois semaines (McGinty et Serman, 1968 ; McGinty, 1969). Les effets de la lésion de la région préoptique sont confirmés par Lucas et Serman (1975) qui rapportent en plus, une

diminution importante du rythme veille-sommeil pendant la phase de récupération qui suit l'insomnie. Chez le rat, la destruction bilatérale de la région préoptique augmente fortement la quantité d'éveil (Szymusiak et Satinoff, 1985). Enfin, la destruction par l'acide kaïnique ou iboténique de l'aire préoptique latérale engendre une insomnie (Szymusiak et McGinty, 1986a ; Sallanon et coll., 1989).

La majeure partie des neurones de la région préoptique ont une activité unitaire maximale pendant le SL et le SP par rapport à l'éveil (Kaitin, 1984). L'augmentation de la fréquence de décharge de ces neurones anticipe le début de la phase de SL (Szymusiak et McGinty, 1986b).

- Les neurones sérotoninergiques :

Il a été montré que les fibres 5-HT de l'hypothalamus proviennent des noyaux antérieurs du raphé (Bobillier et coll., 1976 ; Vertès, 1991 ; Sakai et coll., 1990). L'injection intratissulaire de 5-HTP, précurseur immédiat de la sérotonine, dans l'hypothalamus antérieur induit l'apparition du SL et du SP chez l'animal prétraité à la para-chlorophénylalanine (Denoyer et coll., 1989). Ces données suggèrent que la 5-HT serait impliquée dans les mécanismes d'apparition du SL.

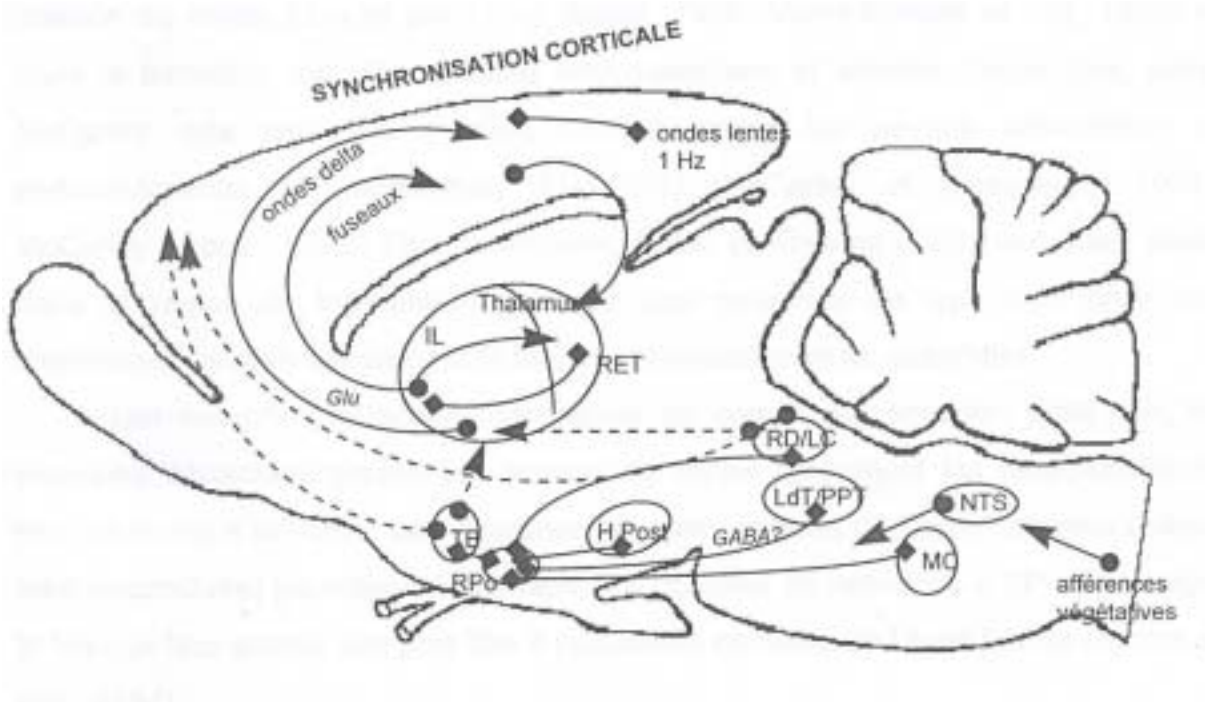


Figure 7: Schémas représentatif des réseaux neuronaux impliqués dans le sommeil lent.

Hip : hippocampe ; **IL** : noyau intralaminaire du thalamus ; **RET** : noyau réticulaire du thalamus ; **TB** : télencéphale basal ; **H Post** : hypothalamus postérieur ; **FRM** : formation réticulaire mésencéphalique ; **RD** : noyau du raphé dorsal ; **LC** : locus coeruleus ; **LDT/PPT** : noyaux latérodorsal et pédonculopontin du tegmentum pontique ; **MC** : noyau réticulé bulbaire

magnocellulaire ; **Rpo** : région préoptique ; **NTS** : noyau du faisceau solitaire. **GABA** : acide γ -amino butyrique ; **Glu** : glutamate.

2.3.3. Les structures impliquées dans les mécanismes du sommeil paradoxal

Le SP est un état d'activations centrales phasiques et toniques, contemporaine à l'inhibition des entrées sensorielles et des sorties motrices. Les données expérimentales de transections complètes (préparations dites "cerveau isolé" avec éviction des structures rostrales au pont), indiquent que les structures essentielles à la genèse des phénomènes phasiques et toniques du SP sont localisées dans le tronc cérébral inférieur (Jouvet, 1962, 1965) (figure 8). Ces résultats ont été par la suite largement confirmés démontrant que les structures rostrales au pont ne sont pas indispensables au SP. En revanche, les structures rostrales à la moelle épinière et caudales au mésencéphale contiennent les neurones nécessaires et suffisants à la genèse du SP (Hobson, 1965 ; Gottesmann, 1988).

- Les neurones des noyaux périlocus α :

Ces neurones se projettent sur le thalamus et l'hypothalamus. Ils sont certainement impliqués dans la désynchronisation corticale, reflet de l'activation corticale (El Mansari, 1990).

D'autre part, il a été montré par des lésions électrolytiques et chimiques bilatérales chez le chat que le noyau périlocus α est le centre pontique responsable de l'atonie musculaire, caractéristique du SP (Henley et Morrison, 1974 ; Sastre et coll., 1979 ; Sakai et coll., 1981 ; Sastre et coll., 1981). Le noyau périlocus α contient des neurones actifs spécifiquement pendant le SP (SP-on) qui chez le chat, projettent sur les noyaux magnocellulaires et parvocellulaires du bulbe, inhibiteurs des motoneurones (Hancock et Fougousse, 1976; Sakai et coll., 1979, 1981).

- Les neurones cholinergiques du tegmentum pontique

Les neurones cholinergiques du tegmentum pontique dorsal projettent directement sur les noyaux intralaminaires et réticulés thalamiques (Hallanger et coll., 1987 ; Smith et coll., 1988 ; Steriade et coll., 1988). L'acétylcholine induit l'hyperpolarisation des neurones réticulés thalamiques et la dépolarisation des neurones thalamocorticaux, phénomènes qui conduisent à la désynchronisation

corticale. Les neurones cholinergiques du tegmentum pontique envoient également des projections au noyau géniculé latéral du thalamus impliqué dans la genèse des ondes PGO (Sakai, 1980 ; Steriade et coll., 1988). Ces résultats suggèrent que les neurones cholinergiques du tegmentum pontique dorsal sont impliqués dans la désynchronisation corticale et dans la genèse des ondes PGO.

- Les neurones gigantocellulaires du bulbe : les noyaux parvocellulaires et magnocellulaires
Ces neurones gigantocellulaires bulbaires présentent une activité tonique et spécifique du SP.

Les neurones des noyaux magnocellulaires projettent sur la formation réticulée mésencéphalique, le tegmentum pontique, l'hypothalamus postérieur et le thalamus (Steriade et coll., 1984 ; Sakai et coll., 1990). Ces données suggèrent leur rôle dans l'activation corticale.

Les neurones des noyaux gigantocellulaires chez le rat se projettent sur les motoneurones crâniens et spinaux (Holstege et Bongers, 1991 ; Rampon et coll., 1996). Ces neurones de nature glycinergique (Rampon et coll., 1996) sont susceptibles d'être responsables de l'inhibition des motoneurones conduisant à l'atonie musculaire chez le rat. De plus, la stimulation du noyau magnocellulaire chez le chat entraîne une hyperpolarisation membranaire des motoneurones spinaux (Soja et coll., 1987).

- *Les neurones de l'hypothalamus postérieur*

Les neurones de l'hypothalamus postérieur, enregistrés en extracellulaire chez le chat présentent une fréquence de décharge augmentée pendant l'éveil et le SP par rapport au SL (Sakai et coll., 1990). Ces données suggèrent qu'ils sont impliqués dans les phénomènes d'activation corticale présents au cours de ces deux états de vigilance.

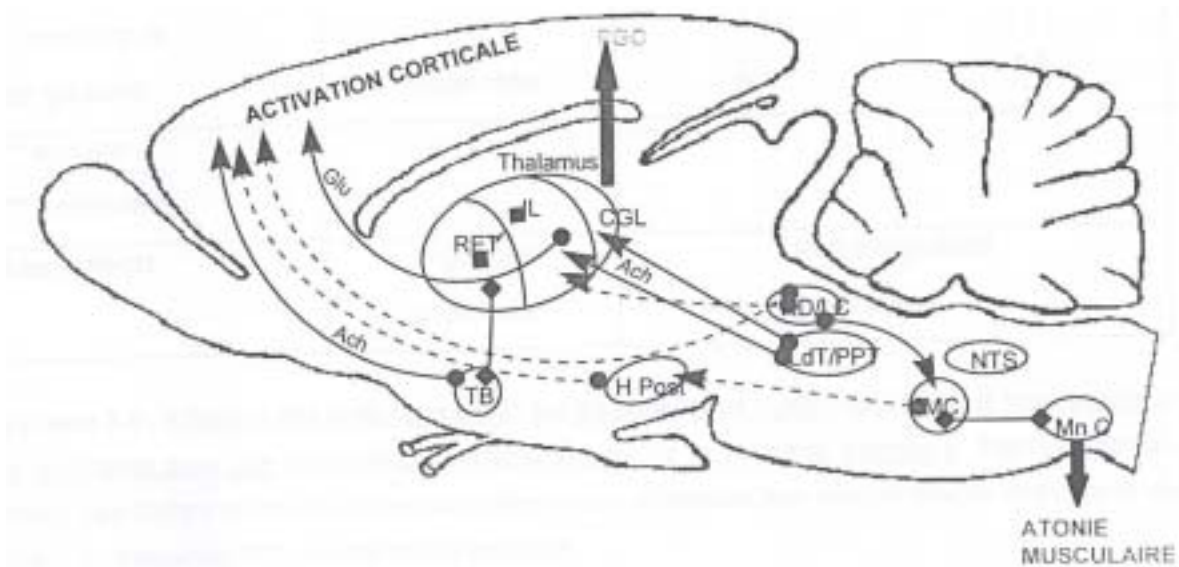


Figure 8: Schémas représentatif des réseaux neuronaux impliqués dans le sommeil paradoxal.

IL : noyau intralaminaire du thalamus ; **RET** : noyau réticulaire du thalamus ; **TB** : télencéphale basal ; **H Post** : hypothalamus postérieur ; **RD** : noyau du raphé dorsal ; **LC** : locus coeruleus ; **LDT/PPT** : noyaux latérodorsal et pédonculopontin du tegmentum pontique ; **MC** : noyau réticulé bulbaire magnocellulaire ; **NTS** : noyau du faisceau solitaire ; **CGL** : corps genouillés latéraux du thalamus ; **MnC** : motoneurones crâniens. **GABA** : acide γ -amino butyrique ; **Glu** : glutamate.

TRAVAIL DE RECHERCHE

3. OBJECTIFS

L'objectif principal de cette étude a été de documenter un modèle rat infecté par *Trypanosoma brucei brucei* dans la perspective de créer une bibliothèque de données de références aussi bien clinique que physiologique dévolu à ce modèle expérimental.

Nous avons voulu centrer notre travail sur une étude clinicophysiological et ainsi faire ressortir des paramètres physiologiques déviants pouvant amener à l'hypothèse de la pénétration du trypanosomose dans le SNC. L'objectif a été de développer une méthode non invasive qui aiderait au diagnostic de l'entrée en phase méningo-encéphalitique.

Nous avons centré notre recherche sur la pertinence de paramètres physiologiques simples, pouvant traduire un dysfonctionnement neuronal, notamment le poids et la prise alimentaire. Nous avons considéré hypothétiquement que des perturbations de poids et de prise alimentaire pourraient être des indices prometteurs prédictifs de la phase neurologique.

L'étude a été complétée d'un test de comportement couramment utilisé, le test d'Open Field, permettant d'apprécier l'activité motrice et exploratoire de l'animal trypanosomé.

Le suivi strictement physiologique a été basé sur la mesure de l'hématocrite au cours de l'infection.

Au travers de cette étude clinique, il s'agissait d'établir un tableau clinique de la trypanosomose expérimentale à *brucei brucei* chez le rat, de déterminer les paramètres physiologiques déviants et secondairement d'analyser la cinétique d'évolution de la maladie.

Par la suite nous avons validé ce modèle par la thérapeutique. A ce titre, la combinaison thérapeutique suramine et mégazol a été mise à l'épreuve chez le rat.

L'administration de drogues uniquement dévolue au traitement de la phase méningo-encéphalitique de la maladie nous a permis d'affiner nos conclusions sur l'intérêt des paramètres déviants à appuyer le début de la phase neurologique.

Un retour à la normale de ces paramètres physiologiques, sous traitement efficace exclusif de la phase neurologique pourrait par la suite conforter la disparition des lésions neurologiques et ainsi objectiver ces critères pour un diagnostic non-invasif de la phase méningo-encéphalitique.

Fort de la robustesse de notre modèle, notre travail s'est focalisé sur l'étude des perturbations circadiennes de l'alternance veille-sommeil caractéristiques de la phase méningo-encéphalitique de la maladie. Nous avons ainsi testé la faculté de notre modèle à reproduire la dysrythmie circadienne veille-sommeil.

Une étude qualitative basée sur la structure interne du sommeil et la morphologie des ondes constituant les différents stades de vigilance a été complétée d'une approche quantitative des tracés électrophysiologiques recueillis. L'étude quantitative s'est focalisée sur l'appréciation des densités de puissance spectrale pour les différents états de vigilance

4. CHAPITRE I : Etude de l'évolution clinique de la THA,
Etablissement d'un modèle expérimental chez le rat
infecté par *T. b. brucei*

CHAPITRE I

4.1. PROBLEMATIQUE

L'évolution de la THA est arbitrairement divisée en deux états successifs, une phase de généralisation ou lymphatico-sanguine et une phase de polarisation cérébrale ou méningo-encéphalitique (Boa et coll., 1988 ; Dumas et Boa, 1988) souvent difficiles à différencier en clinique. Le diagnostic de la phase de polarisation nerveuse est actuellement non spécifique et probablement trop tardif en raison de l'absence de critères clinico-biologiques clairement définis.

En outre, si aujourd'hui beaucoup d'éléments sont réunis pour expliquer les différents troubles pathologiques observés au cours de la phase lymphatico-sanguine, les mécanismes immunologiques et neurologiques responsables des lésions et des troubles neurologiques de la phase de polarisation cérébrale ne sont pas clairement établis (Pentreath, 1989).

Un nombre limité de médicaments est disponible pour le traitement. Ce constat est d'autant plus alarmant que les deux phases de la THA requièrent une thérapeutique différente. En raison du passage du parasite dans le système nerveux central (SNC) de l'hôte infecté et de la protection allouée par la barrière hémato-encéphalitique (BHE), les composés capables d'éliminer le trypanosome dans le système sanguin en phase lymphatico-sanguine s'avèrent inefficaces contre le parasite résident de l'encéphale.

Le traitement de la phase neurologique est délicat, il repose en pratique sur un produit arsenical qui peut induire une encéphalopathie, le plus souvent fatale. Dérivé de l'arsenic trivalent, le mélarsoprol constitue le traitement de référence de la maladie en phase méningo-encéphalitique. Les problèmes majeurs associés à l'utilisation du mélarsoprol restent les effets secondaires, fréquents et souvent graves, les rechutes et le temps d'hospitalisation requis au traitement. L'apparition du syndrome encéphalopathique d'étiologie indéterminée constitue l'effet secondaire le plus dramatique. Ces complications, fatales dans 10 à 70 % des cas s'observent chez 5 à 10 % des patients traités. Face au choix limité des molécules actives et à la toxicité de la majorité d'entre elles, notamment celles dévolues à la phase de polarisation nerveuse, le développement et l'étude préclinique expérimentale de nouvelle molécule restent à l'heure actuelle une priorité (Dumas et Bouteille, 2000 ; Legros et coll., 2002 ; Stich et coll., 2003).

Le rat est un des modèles utilisés dans la recherche expérimentale sur la trypanosomose. Différents modèles animaux ont été proposés chez le rongeur, le chien, le mouton et le singe utilisant des souches variées, en particulier *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* (Van Bogaert,

1962). Ces études se sont focalisées sur la réaction immunopathologique induite par la pénétration du parasite dans le SNC (Losos et Ikede, 1972 ; Fink et Schmidt, 1979 ; Seed et Hall, 1980 ; Poltera et coll., 1982) et/ou sur les altérations résultantes du SNC (Stevens et Moulton, 1977 ; Poltera et coll., 1981 ; Van Marck et coll., 1981a ; Anthoons et coll., 1989). Des modèles animaux présentant une infection chronique ont été développés en phase de polarisation nerveuse de la maladie afin d'étudier *in vivo* l'efficacité de drogues reconnues trypanocides *in vitro* (Jennings, 1988a ; Keita et coll., 1997).

Cependant, peu de données physiologiques et cliniques ont été rapportées, notamment chez le modèle rongeur. Le rat trypanosomé a fait l'objet de rares études cliniques (Philip et coll., 1994 ; Grassi-Zucconi et coll., 1995). Les travaux antérieurs se sont intéressés à certains paramètres physiologiques d'évolution de l'atteinte clinique, en particulier la température, le cycle veille-sommeil et l'activité motrice mais à des dates d'infection ponctuelles et non exhaustives, ne fournissant pas de données en continu des perturbations.

Le but de ce travail a été d'établir en premier lieu un tableau clinique de la trypanosomose expérimentale à *T. b. brucei* chez le rat aidant à la compréhension de la cinétique d'évolution de la maladie et secondairement de déterminer les paramètres physiologiques déviants qui permettraient de diagnostiquer l'entrée en phase méningo-encéphalitique. Ces critères mis en exergue et analysés constitueraient la base de référence nécessaire à l'étude de l'efficacité et de la validité d'une nouvelle thérapeutique.

Il s'agit de mettre au point un modèle expérimental descriptif dont la connaissance approfondie des perturbations cliniques et de leur cinétique d'apparition, servirait d'outil dans une perspective d'étude physiopathologique et thérapeutique.

4.2. METHODES

Dans cette expérience, les animaux infectés seront suivis parallèlement à des animaux contrôles sur la base de la prise pondérale, de la prise alimentaire, de la valeur d'hématocrite et du comportement moteur et exploratoire en Open Field.

Cette étude a reçu l'accord du Comité Consultatif pour l'utilisation d'animaux en recherche expérimentale du CRSSA (Centre de recherches du Service de santé des armées, La Tronche, France).

4.2.1. Trypanosomes

Nous avons utilisé *T. b. brucei* AnTat 1.1E, un clone pléiomorphe dérivé de EATRO (East African Trypanosomiasis Research Organisation) 1125, isolé en 1966 de sang de *Tragelaphus scriptus* en Ouganda et qui nous a été aimablement donné par N. Van Meirvenne et D. Le Ray (Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold, Anvers, Belgique). Les trypanosomes sont conservés sous forme de cryostabilat. Avant infection, les trypanosomes sont décongelés, leur mobilité est vérifiée au microscope optique ; ils sont alors transférés dans une solution de 0,9% de NaCl contenant 1% de glucose.

4.2.2. Animaux et infection

Des rats Sprague-Dawley (IFFA-CREDO, Lyon, France) d'un poids initial de 200 à 230 g sont suivis cliniquement du jour de l'infection jusqu'à leur mort. La série expérimentale comporte 36 animaux : 12 rats contrôles et 24 infectés.

Dès leur arrivée, les rats sont hébergés dans des chambres climatiques, à raison de 3 par cage avec nourriture et boisson *ad libitum*. Ils sont maintenus en température ambiante stable (22°C) et photopériode de type 12h/12h (période diurne de 2h00 à 14h00 avec décalage de phase nécessaire l'optimisation des mesures d'Open Field).

Après infection, les animaux sont placés à raison d'un par cage, dans les mêmes conditions environnementales. Après 2 semaines d'habituation aux conditions de laboratoire et au décalage de phase imposé, l'inoculation est pratiquée. L'infection se fait arbitrairement par une injection intrapéritonéale (IP) de 200 µl d'un cryostabilat de la souche AnTat 1.1E contenant environ 2000 trypanosomes.

La présence de parasites est vérifiée au dixième jour d'infection. Les rats sont alors placés dans une cage d'anesthésie à l'halothane (4%) (Ohmeda, Maurepas, France) aidant à l'anesthésie de l'animal sans que celui-ci ne présente d'effets de contrainte. L'anesthésie acquise, un prélèvement de sang (50 µl) au niveau de la partie terminale de la queue est pratiqué à l'aide d'un scalpel. Après dépôt d'une goutte de sang entre lame et lamelle et observation au microscope. Plusieurs champs microscopiques parcourus objectivent la présence ou l'absence de trypanosomes.

4.2.3. Mesures

4.2.3.1. Poids et prise alimentaire

Les animaux sont pesés tous les jours, à l'aide d'une balance de précision appropriée (Mettler PM3000). La quantité de nourriture en poudre (Usine Alimentation Rationnelle, Sterilisable 113, Epinay-sur-orge, France) consommée est mesurée.

4.2.3.2. Hématocrite

Deux fois par semaine, à heure régulière, un prélèvement de sang à la queue, sous anesthésie à l'halothane® (laboratoire Belamont, Paris, France), est effectué sur chaque animal afin de mesurer l'hématocrite.

Les animaux sont placés dans une cage d'anesthésie à l'halothane (4%) (Ohmeda, Maurepas, France) appropriée aidant à l'anesthésie de l'animal sans que celui-ci ne présente d'effets de contrainte. Pendant le prélèvement, les animaux sont sous ventilation spontanée en halothane à la même concentration.

Le prélèvement de sang (50 µl) est recueilli dans des tubes à hématocrite spécifiques (Haematokrit Kapillaren, Hirschmann Laborgerate) et centrifugé 5 minutes à 12000 tours/minutes. La détermination de l'hématocrite est faite à l'aide d'une plaque de lecture manuelle correspondante (Adams Micro-Hematocrite reader, New York, USA). Après prélèvement, la plaie est nettoyée à la bétadine® (Laboratoire ASTA Médica, Mérignac, France) et l'hémostase est effectuée avec du coalgan® (Les Laboratoires Brothier S.A., Nanterre, France).

4.2.3.3. Test Open Field

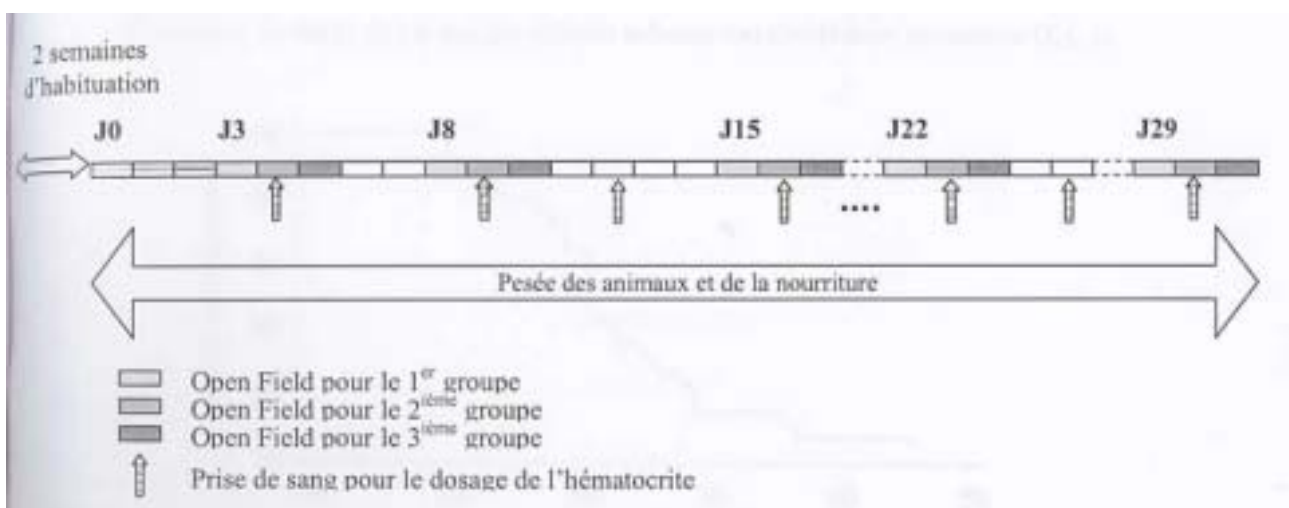
A des temps précis fixés à partir du troisième jour post-infection (J3), J8, J15, J22, J29, J36 et J42 les animaux passent un test d'Open Field d'une durée de 10 minutes.

Ce test permet d'évaluer le comportement moteur et les capacités psychomotrices de l'animal. Le rat est placé au centre d'un carré blanc de 1m sur 1m faiblement éclairé (près de 150 lux), afin de mettre l'animal dans des conditions les moins anxiogènes possibles. Le début du test prend effet lorsque l'animal est en contact avec la zone centrale de l'Open Field. Le rat est filmé, et ses déplacements sont enregistrés sous forme de coordonnées géométriques sur un ordinateur équipé du logiciel d'analyse d'images adéquat (précision en distance de l'ordre de 1 cm et de 0,1s en temps). Le traitement des données a fait appel à la mise au point d'un outil informatique développé au sein de l'Unité par le Dc Queyroy (CRSSA, La Tronche).

La moitié des animaux passe le test d'Open Field durant leur phase d'activité, l'autre moitié durant leur phase de repos. Afin que dans chaque série les animaux subissent le test dans un laps de temps court (afin d'éviter un trop grand décalage de temps entre le premier animal à tester et le dernier), un groupe de 12 rats (6 en phase d'activité, 6 en phase de repos) est testé chaque jour, composé d'un tiers d'animaux contrôles et deux tiers d'animaux infectés.

L'Open Field est formalisé pour le traitement des données : la surface complète d'exploration est divisée en 3 zones : centrale, périphérique et intermédiaire. La zone centrale mesure 20 x 20 cm. La zone périphérique comprend une bande circulaire de 10 cm de largeur à proximité des bords incluant les quatre coins (10 x 10 cm) et les plaques délimitant les bords.

Les variables prises en compte sont : la distance totale parcourue (en m), la latence de déléction de la zone centrale définie comme le temps (en s) mis par le rat pour quitter la zone centrale, et le temps d'occupation des différentes zones (s) et le temps d'occupation des coins (s).



4.2.4. Analyse Histologique

Pour compléter cette étude purement clinique et objectiver la présence du parasite dans le système nerveux central (SNC), nous avons mené une investigation histologique complémentaire.

Six rats Sprague-Dawley de 200 à 250g ont été infectés comme décrit précédemment (injection IP de 200 µl d'un cryostabilat de la souche AnTat 1.1E contenant environ 2000 trypanosomes). La moitié des rats ont été sacrifiés 13 jours post-infection, l'autre moitié 15 jours post-infection.

La parasitémie a été mesurée quotidiennement par prélèvement d'une goutte de sang au niveau de la queue et le comptage a été réalisé au microscope optique.

Une perfusion intracardiaque avec une solution à 4% de paraformaldéhyde a été effectuée sous anesthésie à l'éther. Les encéphales prélevés, ont été placés dans la même solution pendant 48 heures et fixés dans la paraffine. Des sections de 3 à 5 μm d'épaisseur ont été coupées au microtome (Reichert-Jung, Biocut) et colorées avec hématoxyline et éosine.

4.3. RESULTATS

Les rats infectés sont morts en moyenne $15,3 \pm 12,4$ jours après infection ; la mort est survenue du 10^{ième} au 46^{ième} jour post-infection. Aucun des animaux contrôles n'est mort pendant l'expérience. La durée de vie des rats infectés présente une distribution gaussienne (fig. 1).

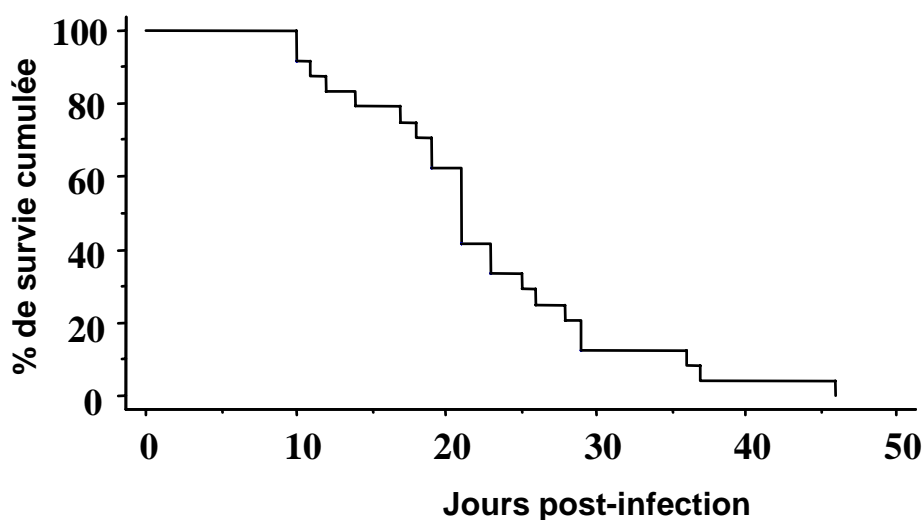


Figure I- 1: Graphe de survie cumulée de Kaplan-meier après invection à T. b. brucei AnTat 1.1E (n = 24 rats infectés).

4.3.1. Poids et prise alimentaire

La prise alimentaire journalière mesurée est de $30,84 \pm 2,22$ g pour les rats contrôles et de $29,98 \pm 6,11$ g jusqu'à 11 jours post-infection (J₁₁) pour les rats infectés. Après J₁₁, la valeur de prise alimentaire pour les rats infectés diminue significativement ($p < 0,05$) (fig. 3). Pour tous les rats infectés, la diminution de prise alimentaire est suivie d'une perte de poids.

Chez les rats contrôles, le poids augmente régulièrement tout au long de l'expérience (fig. 2a) avec un gain moyen journalier de $4,06 \pm 1,23$ g. La valeur de prise pondérale des rats infectés suit une

évolution similaire à celle de la population contrôle durant les premiers jours post-infection. Cependant, la courbe de poids commence à stagner, par la suite elle diminue (fig. 2b), conduisant à une différence significative entre les deux groupes à J₁₄ ($p < 0,034$, fig. 2a).

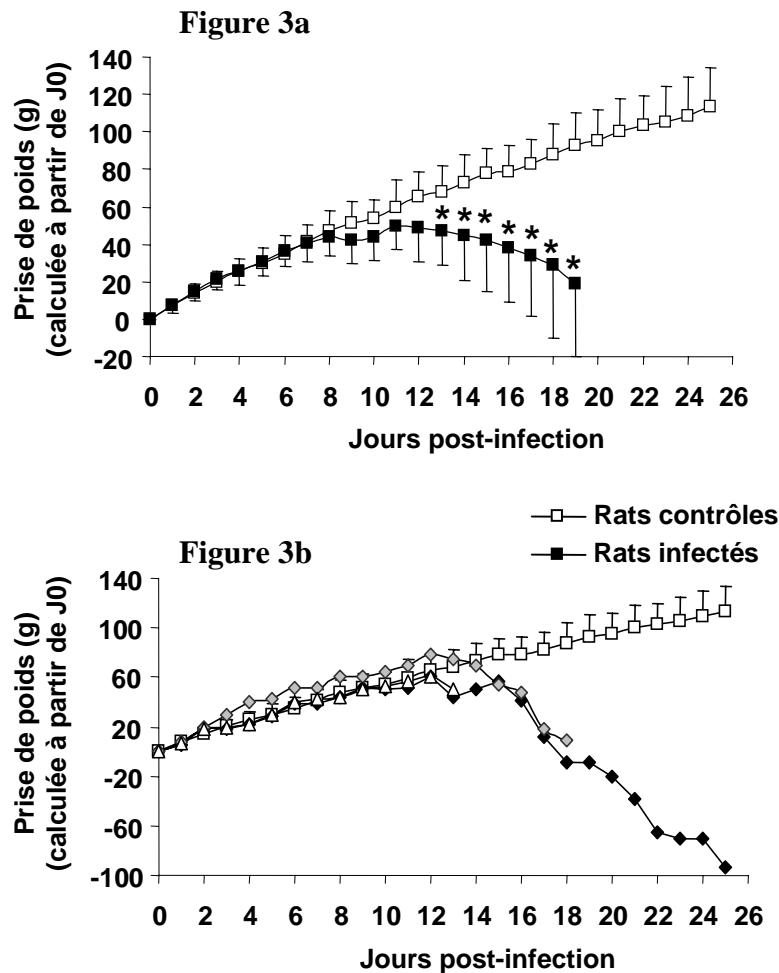


Figure I- 2a : Prise pondérale journalière des rats contrôles (n = 12) et infectés (n = 24). Le gain de poids est calculé par rapport à la valeur mesurée avant infection (J0). Chaque point représente la moyenne \pm écart type. * Significativité valeur du groupe infecté vs valeur respective contrôle (ANOVA, $p < 0,05$).

Figure I- 2b : Prise pondérale journalière de 3 rats infectés avec diminution mesurée à des temps différents post-infection. 1. Exemple de profil d'évolution le plus couramment rencontré (marques grises), 2. Evolution rapide, un seul jour de diminution pondérale mesuré avant décès (marques blanches), 3. Profil d'évolution lent de perte de poids avec cependant un point de rupture marqué

(marques noires). Le gain de poids est calculé par rapport à la valeur mesurée à J_0 . Chaque point représente la moyenne \pm écart type.

Seize des vingt-quatre rats infectés ont montré une courbe de prise pondérale caractéristique, avec une chute brutale et importante de poids (fig. 2b) se situant en moyenne à $J_{13,6 \pm 4,7}$ post-infection. Cette perte de poids journalière a été constante jusqu'à la mort de l'animal, survenant en moyenne $8,7 \pm 4,3$ jours après la mesure du déficit. Trois des huit rats restants sont morts rapidement après la perte de poids. Pour les cinq autres rats, la perte de poids a présenté une courbe moins particulière, avec notamment des paliers irréguliers de reprise suivis de perte pondérale.

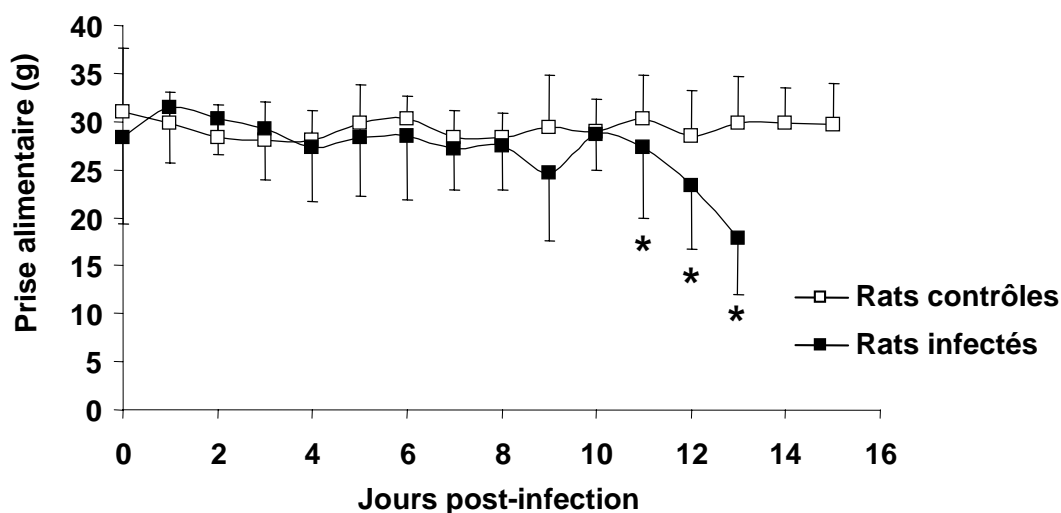


Figure I- 3 : . Prise alimentaire (g) des rats contrôles et infectés. Chaque point représente la moyenne \pm écart type. * Significativité valeur du groupe infecté vs. valeur respective contrôle (ANOVA, $p < 0,05$).

4.3.2. La mesure de l'hématocrite

L'hématocrite des rats contrôles ne présente pas de variations au cours de l'expérience, avec une valeur moyenne de $50,31 \pm 0,81$ %. A J_4 , première mesure post-infection, la valeur d'hématocrite des rats infectés ne diffère pas de celle obtenue pour les rats contrôles ($49,68 \pm 2,03$ pour les rats contrôles, vs. $49,29 \pm 3,37$ % pour les rats infectés). Une forte diminution de l'hématocrite des rats infectés est constatée à la seconde mesure, à J_9 ($51,05 \pm 2,27$ % vs. $40,39 \pm 5,04$ % ; ANOVA, $p < 0,05$) (fig. 4). En raison de la variabilité de survie des rats, l'effectif des rats infectés est progressivement réduit, limitant la prise en compte de la valeur d'hématocrite post-infection

mesurée aux passations suivantes. Les mesures d'hématocrite présentant un nombre suffisant d'animaux, jusqu'à la cinquième mesure post-infection (J₁₉) ne diffèrent pas de la valeur mesurée à J₉. Lorsque les mesures d'hématocrite sont considérées en fonction du jour de la mort (M₀), 1 jour (M₋₁) 2 (M₋₂) ou 3 jours (M₋₃) ante-mortem, une déflexion significative de valeur d'hématocrite est constatée juste avant la mort avec une diminution de $-24,86 \pm 8,04 \%$ à M₀ et M₋₁ vs. $-15,67 \pm 7,41 \%$ à M₋₂ ou M₋₃ comparé à J₄ (ANOVA ; $p < 0,05$).

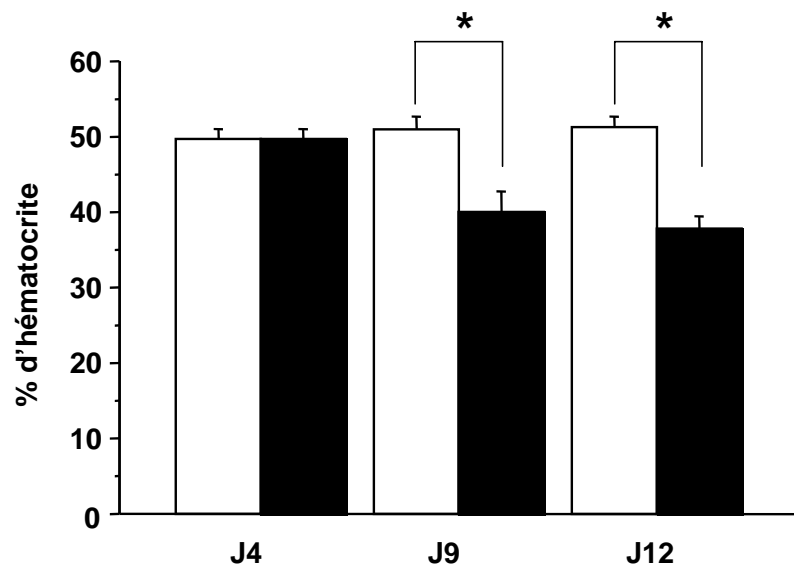


Figure I- 4 : Pourcentage d'hématocrite des rats contrôles (barres blanches) et infectés (barres noires) à la première (4 jours post infection, J4), deuxième (J9), et troisième mesure (J12) post-infection. Chaque point représente la moyenne \pm écart type. *Différences significatives entre groupes (ANOVA ; $p < 0,05$).

4.3.3. Les mesures d'Open Field

Les paramètres d'Open Field mesurés en phase d'activité et en phase de repos ne présentent pas de différence intra-groupe (test t de Student). Les résultats en phase d'activité et de repos ont donc été cumulés pour la population infectée et celle contrôle.

Un effet traitement (contrôles [$n = 6$] vs. infectés [$n = 14$]) et un effet temps ont été observés pour la distance totale parcourue par l'animal (fig. 5) : $57,01 \pm 7,12$ m vs. $50,68 \pm 14,81$ m, $48,67 \pm 8,03$ m vs. $38,24 \pm 13,25$ m, $42,33 \pm 7,04$ m vs. $28,36 \pm 10,51$ m pour les rats contrôles et infectés à J₃, J₈ et J₁₅, respectivement ($F = 5,26$, $p = 0,03$ pour l'effet traitement, et $F = 18,46$, $p < 0,001$ pour l'effet temps). La différence entre les deux groupes n'est cependant significative qu'à J₁₅ ($p < 0,05$, fig. 5).

Pour la variable “temps d’occupation des coins” considérée à J₃, J₈ et J₁₅, un effet temps (95 % CI, d.f. 2, F = 3.26, p = 0,05) a été observé sans effet traitement (F = 0,1, p = 0,75) ou d’interaction (F = 1,22, p = 0,31). Lorsque cette précédente variable ne prend en compte que des rats présentant un temps de survie plus important (n = 6 pour les rats contrôles et n = 8 pour les infectés), une interaction significative entre le traitement et le temps est observée à J₃, J₈, J₁₅ et J₂₂ (p<0,05).

La latence de déléition de la zone centrale (temps mis par le rat pour quitter le centre de l’Open Field au commencement du test) ne présente pas de différence avec le temps pour la population contrôle (1,83 ± 0,98 vs. 1,51 ± 0,55 sec, à J₃ et J₁₅, respectivement, n = 6). Ce paramètre augmente cependant durant les derniers jours de la maladie chez les rats infectés (2,38 ± 1,30 vs. 3,75 ± 1,04 sec à J₃ et J₁₅, respectivement, n = 14) conduisant à une différence significative entre les deux groupes (F = 15.09, p = 0.002). Cette augmentation est exacerbée à J₂₂ (F = 14,71, p = 0,004, n = 6 pour les rats contrôles, n = 8 pour les rats infectés).

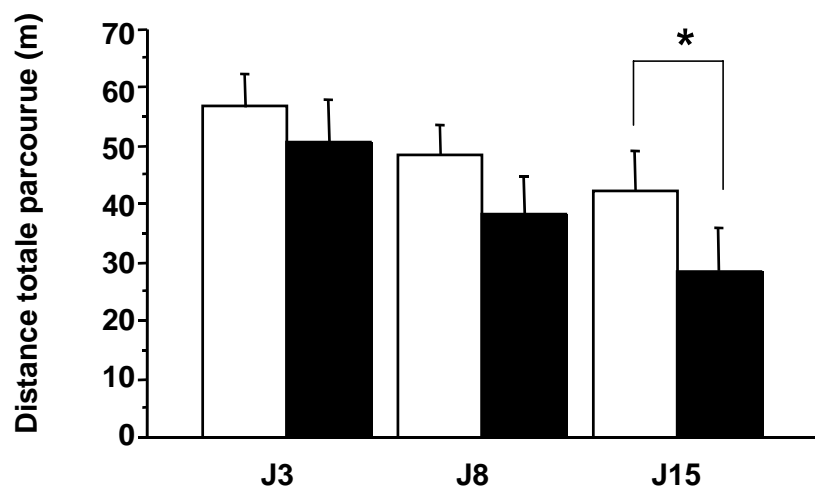


Figure I- 5 : Distance totale parcourue (en cm) des rats contrôles (barres blanches) et infectés (barres noires) pendant les 10 min de session Open Field, pour le premier test d’Open Field (3 jours post infection, J₃), le deuxième (J₈) et le troisième test (J₁₅). Chaque point représente la moyenne ± écart type. * Différences significatives entre groupes (ANOVA, p< 0,05).

4.3.4. Etude histologique

4.3.4.1. Parasitémie

Les trypanosomes ont été observés dans le sang, au cinquième jour post-infection (fig. 6).

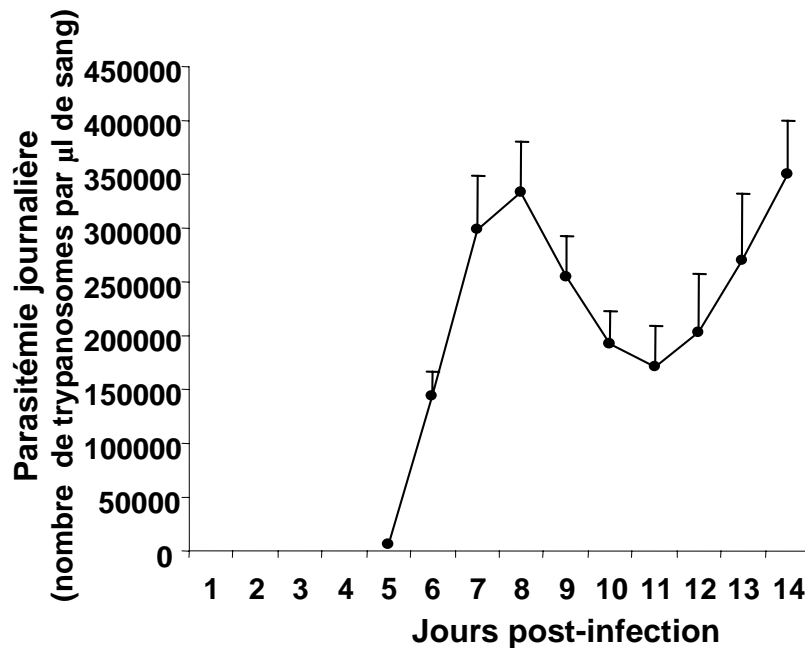


Figure I- 6 : Parasitémie journalière par comptage du nombre de parasites par μl de sang. Chaque point représente la moyenne \pm écart type.

4.3.4.2. Histologie

De nombreux trypanosomes ont été détectés dans les plexus choroïdes (fig. 7) pour les six rats sacrifiés. Des cellules mononucléaires inflammatoires ont été clairement observées dans les plexus choroïdes mais pas dans le parenchyme (fig.7)

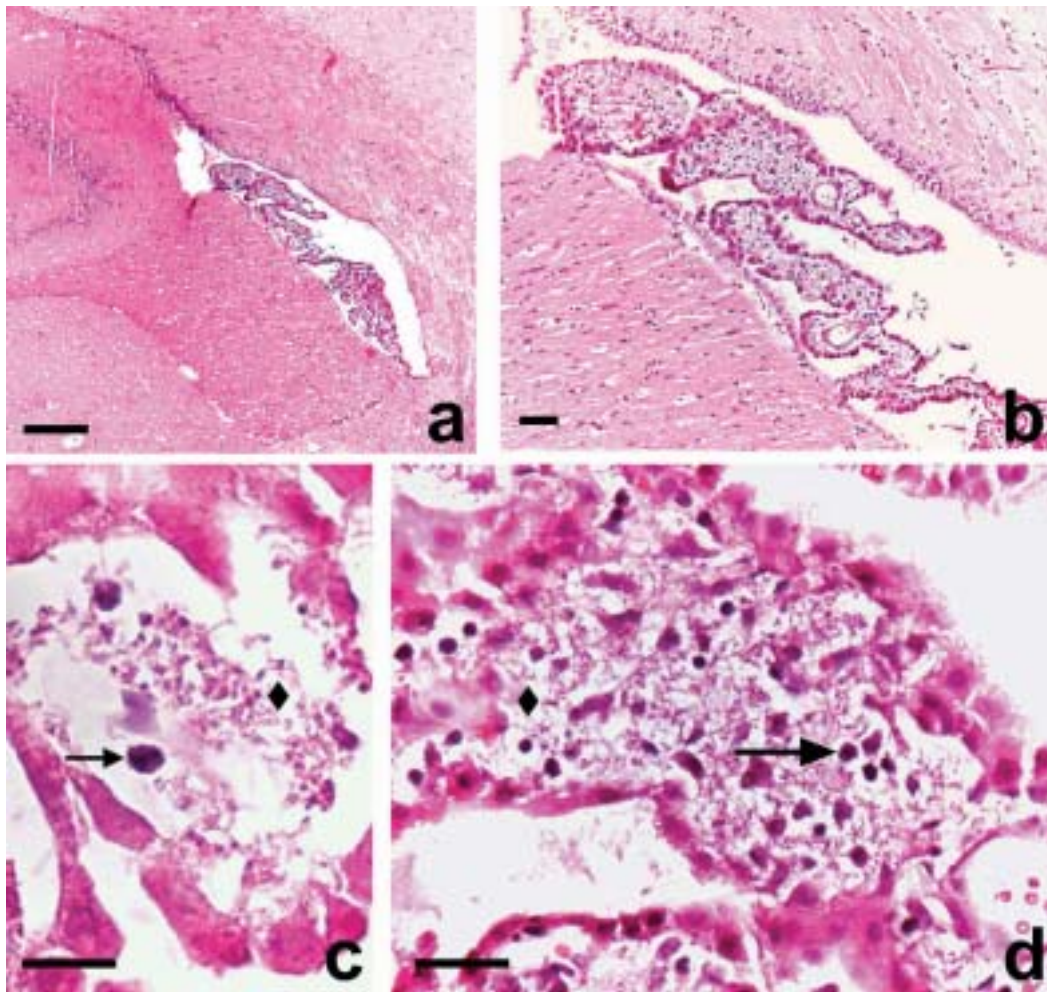


Figure I- 7 : Ventricule latéral d'un rat infecté, 13 jours post-infection (a, barre = 500 μ m et b = 100 μ m). Présence de parasite [\blacklozenge] et de cellules inflammatoires (flèches) dans les espaces interticels des plexus choroïdes d'un même ventricule (c, barre = 25 μ m et d = 50 μ m). Coloration hémateïne-éosine.

4.4. DISCUSSION

Cette étude présente un modèle expérimental chronique de trypanosomose humaine africaine. A notre connaissance, il s'agit de la première étude décrivant les perturbations physiologiques en continu de l'infection jusqu'à la mort de l'animal.

Différents modèles animaux de l'infection à trypanosomose ont été proposés visant à étudier l'efficacité d'une thérapeutique. Les produits actifs pendant la phase méningo-encéphalitique sont hautement toxiques, ceux dévolus à la phase lymphatico-sanguine présentent moins d'effets secondaires nocifs probablement parce qu'ils ne franchissent pas la barrière hémato-encéphalique. C'est pourquoi il est important de disposer d'un modèle qui facilite la connaissance de l'évolution de la maladie, permettant ainsi de différencier la première de la seconde phase de la THA. Le critère de différenciation des stades de la maladie repose sur la neuropathologie qui ne peut être envisagé que dans le cadre d'une étude histologique post-mortem. De plus la caractérisation individuelle de l'atteinte expérimentale est délicate, le point d'entrée en phase méningo-encéphalitique reste problématique dans la mesure où un diagnostic biologique de certitude ante-mortem n'est pas disponible. La prise en compte des différences intra et interindividuelles ne peuvent être négligées.

Les modèles expérimentaux développés dans le but d'étudier l'action thérapeutique de différents produits se sont heurtés à de nombreux obstacles. La difficulté à distinguer les différents stades de la maladie, l'effet restrictif thérapeutique d'un produit à une phase déterminée de la maladie sont autant de limitation au développement expérimental d'un modèle. En outre, ces modèles se heurtent à la détermination de l'entrée en phase méningo-encéphalitique par des critères autre que l'analyse histologique.

Les rongeurs de laboratoire restent le modèle de prédilection parce qu'ils développent généralement une infection qui révèle de fortes similarités avec l'atteinte histopathologique chez l'homme. Ils présentent également l'avantage d'être aisément manipulables. Chez le rat et la souris, les souches *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* sont utilisés pour produire une infection avec une évolution subaiguë ou chronique de la maladie (Beckers et coll., 1981 ; Van Marck et coll., 1981a). Pour exemple, ce type de modèles a été développé pour étudier de nouvelles thérapies pouvant être efficaces sur l'atteinte neurologique de la THA (Jennings et coll., 1977). Plus récemment, les modèles animaux d'infection chronique (Jennings, 1988b) ont servi à l'étude de l'efficacité *in vivo*, en phase méningo-encéphalitique de la maladie, de produits reconnus pour présenter *in vitro* une activité trypanocide.

Pour notre étude, nous avons utilisé *T. b. brucei* AnTat 1.1E, dérivé de EATRO 1125 non pathogène pour l'homme. Le choix de la souche AnTat 1.1 E repose sur sa faculté à développer une infection chronique chez la souris accompagnée des caractéristiques histologiques propres à la phase méningo-encéphalitique. Ce clone pléiomorphe facilite un développement des signes neuro-histopathologiques plus tardifs, ainsi un décours temporel plus lent de 30 jours en moyenne, avec des désordres du SNC évalués en moyenne à 21 jours chez le modèle souris (Bouteille, 1988 ; 1990 ; Keita et coll., 1997). Ce clone induit également chez le rat des anomalies neuropathologiques (infiltrations péri-vasculaires de cellules mononuclées, réactions gliales) évaluées par des études histologiques et électro-microscopiques (Mulenga, 2001 ; Quan et coll., 1999 et 2000).

La perte de poids accrue mesurée à la fin de la deuxième semaine d'infection en relation avec une diminution forte de la consommation alimentaire, les perturbations de l'hématocrite et le changement comportemental au test d'Open Field sont autant d'arguments renforçant la qualité du modèle et la cinétique d'apparition des désordres pathologiques.

Une diminution de poids a été mesurée pour la plupart des rats infectés quelques jours avant la mort, en moyenne quatorze jours post-infection. Ce déficit pondéral a été systématiquement précédé d'une diminution de prise alimentaire, quelque soit le décours temporel et le temps de survie de l'animal. Ce désordre de prise alimentaire est apparu significatif en moyenne 12 jours post-infection. La diminution de prise alimentaire peut être avancée pour expliquer cette perte de poids. La conservation de la relation entre prise pondérale et prise alimentaire sous-entend le fait que la phase terminale de la maladie ne se traduit pas par un phénomène d'hypercatabolisme.

La diminution de poids est largement rapportée dans la littérature chez les animaux domestiques infectés avec une souche de trypanosome autre que *T. b. brucei*. Une perte de poids a été observée chez le lapin après infection avec *T. b. brucei* (Toth et coll., 1994), chez le rat avec la souche AnTat 1.1 E (Kristensson et coll., 1998) et chez le rat infecté par *T. b. gambiense* (Nishimura, 2001). Le décours temporel d'apparition de la chute pondérale n'a cependant pas été étudié.

Une anémie se développe au tout début de l'infection comme le témoignent les données de l'hématocrite. Dans notre modèle, nous observons une diminution significative et systématique de la valeur mesurée à l'hématocrite très précocement après infection. Cette diminution est plus tardivement suivie d'une chute brutale quelques jours avant la mort chez la plupart des rats infectés. Cette manifestation a été précédemment décrite chez le rat infecté par *T. b. brucei* (Igbokwe, 1998) et par *T. b. gambiense* (Nishimura, 2001), mais à notre connaissance le décours temporel de ce phénomène n'a jamais été décrit chez l'animal.

Les modifications physiologiques observées s'accompagnent d'altérations neurologiques comme le montrent les paramètres déviants du test d'Open Field. La latence de déléation de la zone centrale et le temps d'occupation des coins pour les rats infectés augmentent significativement en début de troisième semaine post-infection. La distance totale parcourue diminue à partir de la troisième passation de test (J15 post-infection) et pour les passations suivantes. Les rats infectés perdent leur comportement d'exploration de l'environnement et restent prostrés dans un coin de l'Open Field. Les animaux adoptent un comportement de désintéressement du milieu environnant accompagné d'une attitude d'immobilisme. Ce ralentissement du comportement locomoteur et de la rapidité de réaction à un environnement étranger semblent valider l'atteinte neurologique des animaux.

L'analyse histologique a confirmé la présence de parasites dans les espaces intersticiels des plexus choroïdes ainsi qu'une réaction inflammatoire objectivée par l'observation de cellules inflammatoires mononucléaires, au treizième jour post-infection.

De nombreuses études ont mis en évidence les effets délétères de l'infection parasitaire sur les phénomènes de cognition. Les infections à *Schistosoma mansoni* et à *Toxocara canis* diminuent les performances des rats à des tâches de discrimination diverses, notamment au test de labyrinthe (Dolinsky et coll., 1981 ; Olsen et Rose, 1966). Une diminution du comportement exploratoire et de l'activité locomotrice mesurée à l'Open Field a été observée chez la souris infectée par *S. mansoni* (Fiore et coll., 1997). A notre connaissance, notre étude est la première mettant en exergue la diminution de l'activité locomotrice et exploratoire ainsi que le comportement de prostration d'un modèle animal à *T. brucei*. *Trypanosoma cruzi* responsable Maladie de Chagas a fait l'objet de travaux plus fournis : une récente étude a montré une altération du fonctionnement cérébral, notamment des déficits mnésiques aux tests SAB (spontaneous alternation behavior) (Arankowsky-Sandoval et coll., 2001).

Les données Open Field constituent un argument fort de caractérisation de perturbations centrales caractéristiques de la phase méningo-encéphalitique. Le point essentiel de ces résultats réside dans le fait que les comportements déviants apparaissent dans le courant de la deuxième semaine d'infection, en concomitance avec la perte de poids consécutive de la diminution de prise alimentaire et les anomalies histologiques observées dans les plexus choroïdes.

Les désordres mesurés à l'Open Field ainsi que la diminution de poids et de prise alimentaire peuvent être avancés comme des altérations fonctionnelles induites par l'envahissement du SNC par le trypanosome et ainsi constituer un index robuste de passage à la phase méningo-encéphalitique

de la THA expérimentale. La diminution de la prise pondérale et alimentaire observée pourrait en particulier constituer un paramètre robuste de diagnostic de l'entrée en phase méningo-encéphalitique, à la lumière des mécanismes neuronaux sous-jacents impliqués dans la prise alimentaire. Cette hypothèse sera évaluée au Chapitre II par l'application d'une thérapeutique efficace en phase neurologique de la THA.

PUBLICATION 1

Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine
Exp Biol Med (Maywood).
2003 Dec; 228 (11): 1355-1362.

**Clinical follow-up in the rat experimental model of African trypanosomiasis.
Darsaud A, Bourdon L, Chevrier C, Keita M, Bouteille B, Queyroy A, Canini F, Cespuglio R,
Dumas M, Buguet A.**

Centre de recherches du Service de santé des armées, département des facteurs humains, La
Tronche cedex, France. A_DARSAUD@yahoo.com

Animal models of Human African Trypanosomiasis (HAT) have been developed to understand the pathogenic mechanisms leading to the passage into the neurological phase, most of them referring to histological aspects but not clinical or behavioral data. Our study aimed at defining simple clinical and/or behavioral markers of the passage between the hemolymphatic phase and the meningo-encephalitic stage of the disease. Sprague-Dawley rats (n=24) were infected with *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.1E. Food intake and body weight were measured daily from the day of infection until death. Hematocrit was measured twice a week. Behavioral disturbances were evaluated through an Open-field test. A sudden weight loss occurred on the twelfth day after infection, due to a significant drop of food intake starting two days before. The rats developed an anemic state shown by the hematocrit measurements. The Open-field test showed them to be less active and reactive as soon as the second week after infestation. A complementary histological study observed trypanosomes and inflammatory cells in the choroid plexus at the same period. These results are in favor of central nervous system functional disturbances. The observed weight loss is discussed as being a parameter of the entry in the meningo-encephalitic phase. The rat model reproduces neurological symptoms observed in the human disease and may prove to be useful for further neurohistological and therapeutic studies.

PMID: 14681551 [PubMed - indexed for MEDLINE]

5. CHAPITRE II : Validation du modèle par la thérapeutique

5.1. PROBLEMATIQUE

Dès l'inoculation du trypanosomose, se développe une parasitémie avec envahissement de l'organisme. Il s'agit de la phase lymphatico-sanguine. Un tropisme marqué pour le système nerveux central dans ses structures mésodiencéphaliques prend forme. Progressivement ou brutalement selon la souche pathogène, s'installe une deuxième phase caractérisée par l'augmentation de perméabilité de la barrière hémato-encéphalitique (BHE) et son effraction avec invasion du parenchyme cérébral et réaction microgliale caractéristique. Le tissu nerveux, et tout particulièrement la myéline, entre en contact avec la circulation générale et les cellules immunologiquement compétentes. Ce dernier stade ou phase de polarisation nerveuse évolue en une encéphalopathie démyélinisante.

La thérapeutique de la phase lymphatico-sanguine n'a pas évolué depuis 50 ans : pentamidine pour *T. b. gambiense*, suramine pour *T. b. rhodesiense*. Ces médicaments sont assez bien tolérés et d'une bonne efficacité mais ne peuvent franchir la BHE et ainsi atteindre le trypanosome dans sa localisation nerveuse. Leur emploi est dangereux car il laisse courir le risque de l'évolution de la THA vers le stade neurologique.

La thérapeutique de la phase méningo-encéphalitique repose sur l'emploi de composés arsenicaux trivalents et pentavalents dont le seul utilisé à l'heure actuelle est le mélarsoprol. Depuis son introduction en 1947, le mélarsoprol reste le produit de référence pour le traitement de la phase méningo-encéphalitique. Très toxique, il conduit dans 5 à 10% des patients traités à une encéphalopathie arsenicale toxique, le plus souvent mortelle.

L'urgence d'un traitement adapté et efficace s'impose. Développer un produit actif, facile d'emploi, peu onéreux et non toxique reste une priorité. Les dérivés nitroimidazolés semblent prometteurs, en particulier le mégazol comme le montre un ensemble de travaux expérimentaux menés *in vitro* (Marie-Daragon, 1994) et *in vivo* chez le rongeur (Enanga et coll., 1998) et le singe (Enanga et coll., 2000).

Chez la souris infectée par *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.9 (infection aiguë avec mort de l'animal en 3 à 4 jours), le mégazol à partir d'une dose unique de 20mg/kg administrée par voie IP ou *per os* permet des taux de guérison très élevés atteignant 100 % pour des infections de 12 et 24 heures lorsqu'il est administré par voie IP et pour des infections de 36 heures lorsqu'il est administré *per os*. Le mégazol seul n'est cependant efficace que pour des infections aiguës, son utilisation à différentes doses n'a pas d'effet curatif pour des infections chroniques avec atteinte du SNC.

Chez la souris infectée par *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.1 E (infection chronique avec mort de l'animal en 1 mois environ), les trypanosomes commencent à envahir le système nerveux de l'animal à partir du 21^{ème} jour après inoculation. Lorsque ces souris sont traitées par voie IP avec une dose unique de 20mg/kg de suramine, il se produit une élimination transitoire des parasites du sang périphérique suivie de leur réapparition entre 11 et 43 jours plus tard. Jusqu'à J100, 2 à 4 rechutes surviennent suivies d'autant de traitements à la suramine. L'examen histologique du cerveau montre la présence de lésions inflammatoires croissantes, évoluant vers une méningo-encéphalite (Keita et coll., 1997).

La suramine seule n'est efficace qu'au premier stade lymphatico-sanguin, son inefficacité en phase terminale s'explique par son incapacité à traverser la BHE, à éliminer le parasite dans le SNC, lieu de présence de trypanosomes en phase nerveuse.

Une injection de suramine (20 mg/kg IP) suivie de l'administration IP ou *per os* du mégazol (80mg/kg) pendant 3 jours consécutifs permet de guérir des infections chroniques. Les parasites disparaissent définitivement et les souris ne rechutent pas après une période de suivi de plus de 4 mois (Bouteille et coll., 1995). Seule la combinaison suramine (20mg/kg) et mégazol (80mg/kg) présente un effet thérapeutique avéré chez la souris, avec disparition de la parasitémie et des lésions du SNC (Enanga et coll., 1997).

Le but de notre seconde étude est de valider le modèle expérimental que nous avons développé au Chapitre I par l'utilisation de cette combinaison suramine-mégazol. La validité sera fondée sur la description clinique de certains paramètres prédéfinis, à savoir le poids et la prise alimentaire qui se sont révélés être des indices prometteurs prédictifs de la phase neurologique. Un retour à la normale des critères prédéfinis, sous traitement combiné suramine-mégazol, pourrait conforter la disparition des lésions neurologiques et ainsi objectiver ces critères pour le diagnostic non-invasif de la phase méningo-encéphalitique.

5.2. METHODES

Cette étude a bénéficié de l'accord du comité consultatif pour l'utilisation d'animaux en recherche expérimentale du crssa (la tronche).

5.2.1. Animaux

L'étude a porté sur des rats Sprague-Dawley (IFFA-CREDO, Lyon, France) d'un poids initial de 200 à 230 g. Deux sessions expérimentales ont été menées, chaque session comprenant 30 animaux : 6 rats contrôles, 6 rats infectés non traités et les 18 infectés traités.

Dès leur arrivée, les rats sont hébergés dans des chambres climatiques, à raison de 2 par cage avec nourriture et boisson *ad libitum*. Ils sont maintenus en température ambiante stable (22°C) et photopériode de type 12h/12h (période diurne de 2h00 à 14h00 avec décalage de phase imposé afin de respecter les conditions de la première expérimentation clinique).

5.2.2. Infection

Après 2 semaines d'habituation aux conditions de laboratoire et au décalage de phase imposé, les rats sont infectés par une injection IP d'un cryostabilat de la souche *T. b. brucei* AnTat 1.1E contenant environ 2000 trypanosomes.

Les animaux sont alors stabulés individuellement, dans des enceintes protégées (climatisées et insonorisées) dans les mêmes conditions environnementales que précédemment.

La parasitémie est vérifiée au dixième jour post-infection. Une goutte de sang, prélevée au niveau de la queue de l'animal sous anesthésie à l'halothane (4%) est observée au microscope entre lame et lamelle. Plusieurs champs microscopiques parcourus objectivent la présence ou l'absence de trypanosomes.

5.2.3. Mesures

5.2.3.1. Poids et prise alimentaire

Les animaux sont pesés quotidiennement à l'aide d'une balance de précision appropriée (Mettler PM3000). La quantité de nourriture consommée est mesurée.

5.2.3.2. Hématocrite

Deux fois par semaine, à heure régulière, l'hématocrite est mesurée et la présence de trypanosomes objectivée pour chaque animal.

Une goutte de sang est prélevée au niveau de la partie terminale de la queue sous anesthésie à l'halothane (4%), selon la procédure décrite au chapitre II. Les rats sont placés dans une cage d'anesthésie à l'halothane appropriée aidant à l'anesthésie de l'animal sans que celui-ci ne présente d'effets de contrainte. Pendant le prélèvement, les animaux sont sous ventilation spontanée en halothane à la même concentration. Après prélèvement, la plaie est nettoyée à la bétadine® (Laboratoire ASTA Médica, Mérignac, France) et l'hémostase est effectuée avec du coalgan® (Les Laboratoires Brothier S.A., Nanterre, France).

Le prélèvement de sang (50 µl) est recueilli dans des tubes à hématocrite spécifiques (Haematokrit Kapillaren, Hirschmann Laborgerate) et centrifugé 5 minutes, à 12000 tours/minutes. La détermination de l'hématocrite est faite à l'aide d'une plaque de lecture manuelle correspondante (Adams Micro-Hematocrite reader, New York, USA).

5.2.4. Traitement

Dès l'apparition d'une perte de poids de plus de 5g et d'une diminution de la quantité de nourriture ingérée sur deux jours consécutifs, les rats reçoivent le traitement. Afin d'avoir une randomisation aléatoire des 3 groupes, le traitement se fait en alternance. Le traitement consiste en une injection IP de suramine (20mg/kg), ou une injection de suramine (20mg/kg, IP) suivie de l'administration *per os* du mégazol (80mg/kg) pendant 3 jours consécutifs, ou de l'administration de mégazol seul (80mg /kg x 3 jours, *per os*).

La suramine (Moranyl®, Specia, France) a été injectée en solution aqueuse contenant 0,9 % de NaCl. Le mégazol ou 2-amino-5-[1-méthyl-5-nitro-2-imidazolyl]-1-3-4 thiadiazole synthétisé par G. Chauvière (UMR-CNRS 5068, Université Paul Sabatier, Toulouse) présente la caractéristique d'être insoluble dans l'eau et soluble dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Ce composé a été administré dans de la carboxyméthylcellulose (Merck) à 0,5 % en suspension aqueuse.

5.3. RESULTATS

5.3.1. Temps de survie

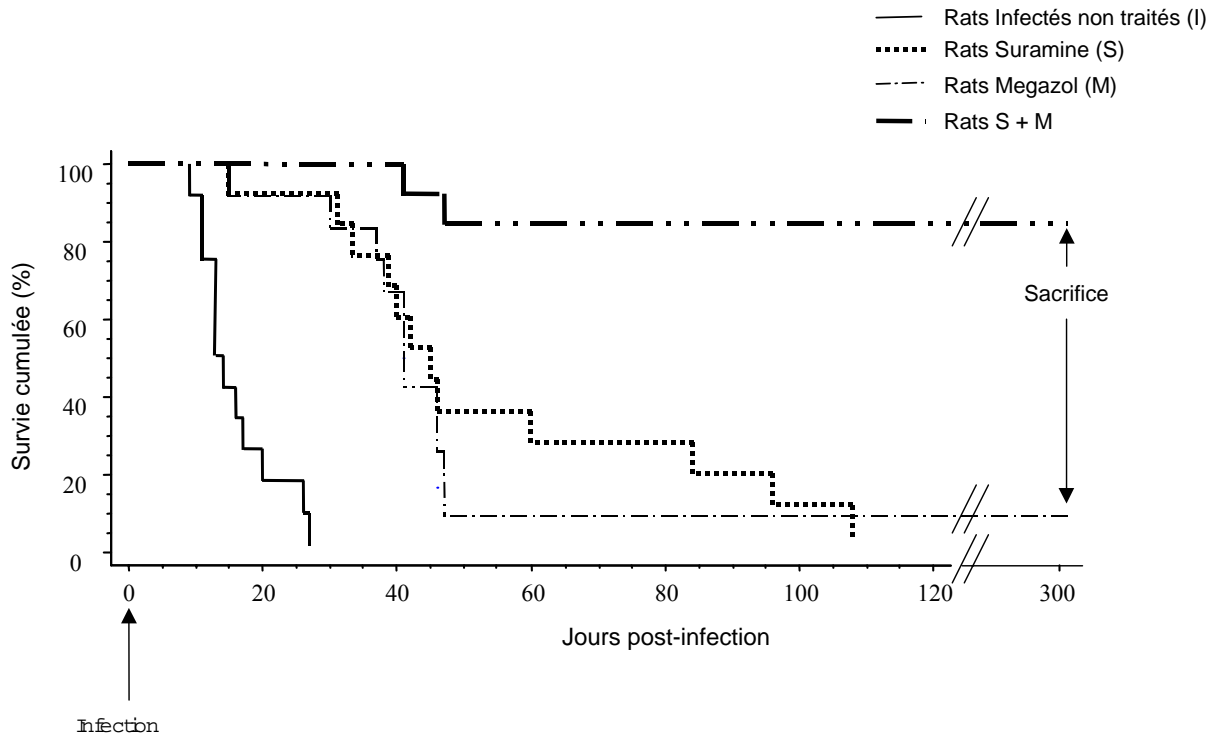


Figure II- 1: Graphe de survie cumulée de Kaplan-Meier pour les rats contrôles (C) et les rats infectés non-traités (I, n = 12 rats), traités avec la suramine (S, n = 12), le mégazol (M, n = 12) ou la combinaison des deux produits (S + M, n = 12).

Les rats infectés non-traités (I) sont morts en moyenne, 15 ± 4 jours après infection avec une durée de vie maximale estimée à 27 jours post-infection (J_{27}). La durée moyenne de vie des rats traités à la suramine, groupe (S) et des rats traités au mégazol, groupe (M) a été respectivement de 40 ± 4 et 41 ± 5 jours post-infection (fig. 1 et tableau 1). Deux des 12 rats de l'effectif du groupe (S+M) sont morts pendant l'expérience, un rat du groupe (M) a survécu.

Les animaux survivants ont été sacrifiés plus de 200 jours après la fin de l'administration du traitement. A cette date, aucun parasite n'a été mis en évidence dans le sang et les rats ont été considérés comme guéris.

5.3.2. Prise de poids

Les rats ne présentent pas de différence significative de poids le jour de l'infection (tableau 1).

Les rats infectés ont présenté une diminution importante de poids du huitième jour au treizième jour post-infection (entre J₈ et J₁₃). Aucune différence de poids au sein des groupes n'a été notée le premier jour d'application du traitement (tableau 1) malgré une administration thérapeutique pratiquée à des jours différents après infection (en fonction de l'apparition d'un déficit pondéral).

Les rats infectés non-traités (I) ont présenté un déficit pondéral en moyenne $11 \pm 2,7$ jours après infection (fig. 2a). La différence de poids avec la population contrôle a été significative au douzième jour post-infection (J₁₂, ANOVA, $p < 0,05$), $4,3 \pm 1,9$ jours ante-mortem.

Une reprise de poids a été observée chez tous les rats traités (fig. 2a), avec un laps de temps différent en fonction du traitement administré (fig. 3a).

Un second épisode de perte de poids est apparu 15 jours après traitement pour les rats ayant reçu une injection de suramine (groupe (S), fig. 2b). Ce déficit a également été observé 23 jours après traitement (table 1) pour 11 des 12 rats du groupe (M) morts durant l'expérience. Deux des 12 rats du groupe (S+ M) ont montré une telle perte de poids 19 et 21 jours post-traitement.

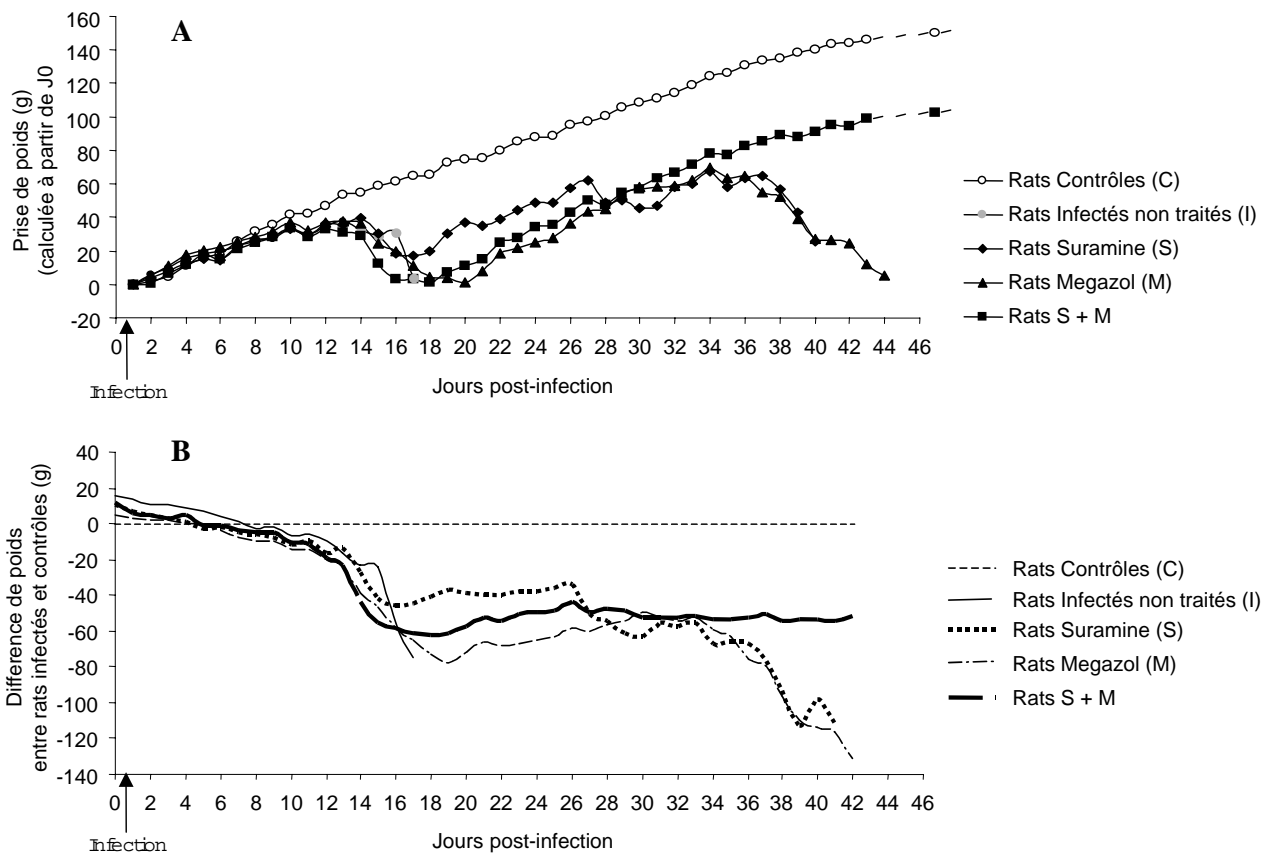
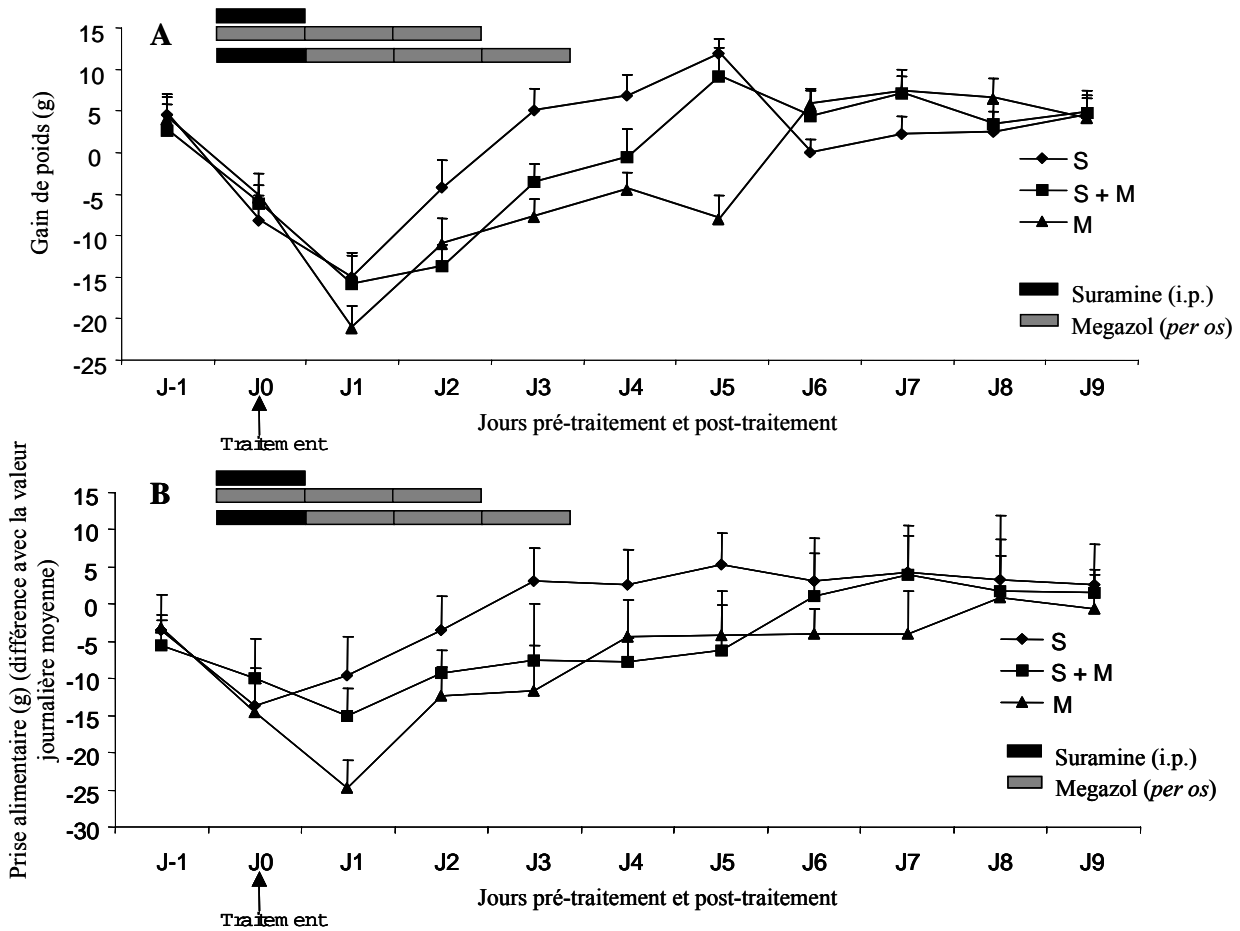


Figure II- 2 : A) Prise pondérale journalière des rats contrôles (C), des rats infectés non-traités (I) et traités avec la suramine (S), le mégazol (M) ou la combinaison des deux (S + M). Cette différence est calculée avec comme référentiel la valeur pré-infection respective de chaque groupe.

B) Gain de poids journalier des rats infectés non-traités (I) et des rats traités avec la suramine (S), le mégazol (M) ou la combinaison des deux (S+M). Cette différence est calculée avec comme référentiel la valeur journalière des rats contrôles.

5.3.3. Prise alimentaire

La consommation alimentaire moyenne journalière des rats contrôles (C) a été estimée à $34,5 \pm 1,9$ g. Les rats infectés ont présenté une consommation journalière similaire jusqu'au dixième jour post-infection (J₁₀). Cette valeur a significativement diminué au onzième jour post-infection (J₁₁) jusqu'en fin de vie (ANOVA, $p < 0,05$). Chez tous les rats infectés, la diminution de prise alimentaire a précédé la perte de poids d'un jour en moyenne.



Fi

gure II- 3 : A) Evolution du poids au cours du traitement (T0) et les jours suivant l'administration de suramine (S), de mégazol (M) ou de la combinaison des deux (S + M).

B) Prise alimentaire journalière pendant et après traitement à la suramine (S), au mégazol (M) ou à la combinaison des deux (S + M). Cette différence est calculée avec comme référentiel la valeur de prise alimentaire consommée pour chaque groupe avant traitement.

Groupe suramine (S, n = 12), groupe mégazol (M, n = 11) et groupe suramine + mégazol (S = M, n = 10). Chaque point représente la moyenne ± écart type.

Les rats traités à la suramine (S), au mégazol (M) et à la combinaison thérapeutique (S + M) ont montré une prise alimentaire journalière similaire jusqu'au jour d'administration du traitement.

Un retour à la valeur de normalité est observé pour les trois groupes traités. La consommation alimentaire journalière a ainsi montré une valeur comparable à la valeur contrôle au quatrième jour

post-traitement (fig. 3b). Cependant, en raison de la différence de modalité et de durée de traitement sous mégazol, le profil d'évolution de la prise alimentaire des groupes (M) et (S + M) a été retardé en comparaison avec celui du groupe (S) (fig. 3b).

Le premier jour d'administration *per os* de mégazol, aucune différence de consommation alimentaire n'est constatée entre les groupes (M) et (S + M) ($20,3 \pm 10,3$ g vs $20,6 \pm 16,2$ g; ANOVA, $p = 0,84$). Cependant, après les trois jours consécutifs de gavage, la diminution de prise alimentaire a été significativement plus importante pour le groupe (M) que pour le groupe (S + M). Le déficit de consommation alimentaire mesurée a été respectivement de $-24,8 \pm 1,7$ vs $-9,3 \pm 5,2$ g après la première administration *per os* de mégazol (ANOVA, $p < 0,05$), $-12,4 \pm 3,9$ vs $-7,5 \pm 3,8$ g après la deuxième (ANOVA, $p < 0,05$), et $-11,6 \pm 3,9$ vs $-7,7 \pm 2,2$ g après la troisième (ANOVA, $p < 0,05$) (fig. 3b).

La consommation alimentaire journalière a présenté une seconde diminution significative (ANOVA, $p < 0,05$), $13 \pm 4,2$ jours après traitement en moyenne pour les rats du groupe (S), $20 \pm 9,4$ jours post-traitement pour 11 des 12 rats du groupe (M) et 17 et 20 jours après traitement pour 2 des 12 rats du groupe (S + M). Cette deuxième diminution de prise alimentaire a précédé le second déficit de poids enregistré.

5.3.4. Hématocrite

Le pourcentage d'hématocrite des rats contrôles, stable tout au long de l'expérience a été mesuré à $50,8 \pm 1,7$ % (fig. 4). Les rats du groupe infecté non traités présentent une diminution de la valeur d'hématocrite dès la deuxième observation (neuvième jour post-infection, J_9 ; $44,9 \pm 2,6$ %) qui se poursuit jusqu'à la dernière (seizième jour post-infection, J_{16} ; $38,5 \pm 3,6$ %).

Le pourcentage d'hématocrite des rats des groupes (S) et (M) est significativement diminué au neuvième jour post-infection (J_9 ; ANOVA, $p < 0,05$). Il connaît une reprise transitoire à J_{15} , pour atteindre à l'observation suivante (J_{18}) une valeur proche de la valeur contrôle (fig. 4). Après une rechute mesurée à J_{22} , la valeur d'hématocrite diminue jusqu'à la mort de l'animal (fig. 4).

Le profil d'évolution de l'hématocrite de 10 des 12 rats du groupe (S + M) est similaire à celui des groupes (S) et (M) jusqu'à la seconde observation post-traitement (J_{18}). Ce pourcentage ne présente alors pas de différence significative avec la valeur contrôle ($48,5 \pm 4,3$ % vs $49,8 \pm 5,0$ %) jusqu'à

la dernière observation (fig. 4). Une rechute à la troisième mesure post-traitement (J₂₂) est observée pour les 2 autres rats de l'effectif du groupe (S + M).

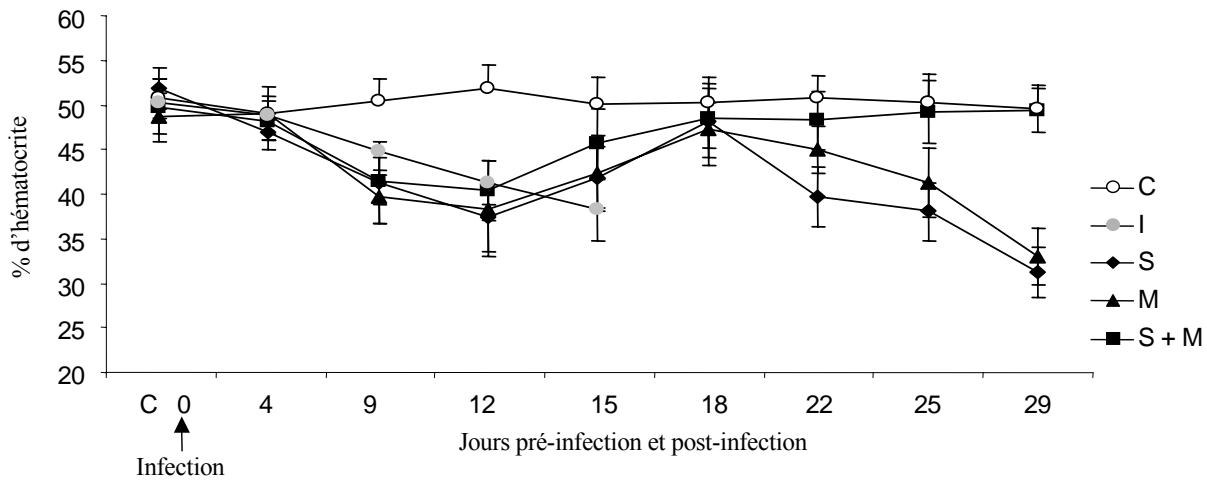


Figure II- 4 : Pourcentage d'hématocrite mesuré des rats contrôles (C), des rats infectés non-traités (I) et traités à la suramine (S), au mégazol (M) ou à la combinaison des deux (S + M). Chaque point représente la moyenne \pm écart type.

5.3.5. Parasitémie

Le trypanosome a été détecté à la première observation de parasitémie (quatrième jour post-infection, J₄) et / ou à la seconde observation (J₉) dans les échantillons sanguins prélevés.

Le traitement a systématiquement induit une disparition du trypanosome dans le sang. La parasitémie est cependant réapparue par la suite pour tous les rats du groupe (S), pour 11 des 12 rats du groupe (M), respectivement $13 \pm 7,2$ et $15 \pm 6,9$ jours après traitement.

Deux des 12 rats de l'effectif du groupe (S + M) présentent une nouvelle parasitémie 21 jours après traitement et meurent 6 et 13 jours après cette réapparition de trypanosomes dans le sang.

Tableau II- 1: Description des caractéristiques cliniques des rats infectés non traités (I) et traités avec la suramine (S) ou le mégazol (M), ou la combinaison des deux drogues (S + M). Valeurs moyennes \pm écart type.

	I (n =12)	S (n =12)	M (n =11)	S+M (n =10)
Poids le jour de l'infection (g)	378,9 \pm 17,5	379,7 \pm 14,3	377,2 \pm 17,5	372,5 \pm 29,2
Administration du traitement (jour post-infection)		13 \pm 2	13 \pm 1	13 \pm 2
Poids le jour précédent le traitement (g)		405,8 \pm 15,9	399 \pm 16,7	409,1 \pm 22,6
Poids à l'administration traitement (g)		397,2 \pm 26,8	393,3 \pm 23,1	402,5 \pm 27,7
Diminution de poids à l'administration du traitement (g)		8,6 \pm 2,2	5,7 \pm 1,8	6,6 \pm 1,5
Apparition de la diminution de poids après traitement (jour post-traitement)		15 \pm 8,3	23 \pm 2,3	
Durée de vie post-infection (jour post-infection)	15 \pm 4	40 \pm 4	41 \pm 5	Sacrifice: 315
Durée de vie post-traitement (jour post-traitement)		27 \pm 4	28 \pm 7	

5.4. DISCUSSION

Le point essentiel révélé par notre étude est l'efficacité exclusive de la combinaison thérapeutique de la suramine et mégazol dans le traitement des rats infectés par *T. b. brucei* lorsque le traitement est administré après diminution de poids et de prise alimentaire. L'effet thérapeutique est inexistant avec l'application exclusive de suramine ou de mégazol.

La suramine est couramment injectée intrapéritonéalement chez la souris, à la dose de 20 mg/kg (Keita et coll., 1997 ; Enanga et coll., 1998) sans manifestation d'effets d'intolérance. Une seule administration de mégazol *per os* à la dose de 1000 mg/kg ou cinq administrations quotidiennes à 200 mg/kg sont bien tolérées chez la souris (Burden et coll., 1968). La méthode orale de traitement induit des concentrations plasmatiques en mégazol plus élevées que l'injection IP (Enanga et coll., 1999). Cette meilleure disponibilité est en accord avec l'efficacité accrue du mégazol administré *per os* pendant quatre jours consécutifs à la dose de 80 mg/kg chez la souris, dans un modèle d'atteinte aiguë d'infection à *T. b. brucei* (Enanga et coll., 1998).

Notre première étude reposait sur la mise au point d'un modèle expérimental non invasif permettant un diagnostic aisé de l'entrée en phase neurologique de la THA. Une diminution de poids et de prise alimentaire a été mise en évidence pour la majorité des rats infectés entre le dixième et le quatorzième jour post-infection. Ce déficit pondéral, systématiquement précédé d'une diminution importante de prise alimentaire était accompagné d'altérations du maintien postural et des activités motrices, ainsi que secondairement d'anormalités comportementales avec en particulier une attitude de prostration caractéristique. Nous avons alors émis l'hypothèse que les diminutions de poids et de prise alimentaire étaient consécutives d'un dysfonctionnement du SNC et pourraient représenter un critère clinique de l'atteinte encéphalique. L'altération de ces paramètres cliniques a déterminé le moment d'administration thérapeutique spécifique de la phase méningo-encéphalitique.

Une diminution de poids et de prise alimentaire a été observée chez tous les rats infectés, en accord avec les résultats de notre première étude. Le traitement a été administré le jour suivant le déficit pondéral, de manière individuelle, indépendamment des caractéristiques de l'échantillon.

Le traitement avec un des deux composés, suramine ou mégazol, exerce un effet bénéfique immédiat avec notamment l'observation d'un état aparasitémique. Une augmentation de poids et de prise alimentaire, ainsi qu'un accroissement du pourcentage d'hématocrite sont constatés durant la semaine qui suit l'administration de la thérapeutique. Cette phase de rémission est cependant de

courte durée. Une réapparition du trypanosome dans le sang périphérique ainsi qu'une nouvelle chute de l'hématocrite apparaissent en fin de deuxième semaine post-traitement.

La combinaison thérapeutique suramine-mégazol s'est montrée fortement efficace dans l'amendement des troubles physiologiques de notre modèle expérimental. La majoration des dysfonctionnements a concerné 10 des 12 rats de l'effectif, ces derniers n'ont pas manifesté de phase de rechute au cours des sept mois d'observation. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le modèle souris (Enanga et coll., 1998) et plus récemment chez le modèle primate infecté par *T. b. gambiense* (Enanga et coll., 2000).

Le mécanisme par lequel les composés suramine et mégazol réagissent conjointement pour éliminer le parasite du compartiment encéphalique n'est pas clairement identifié. Des hypothèses ont été avancées dans la compréhension de l'efficacité exclusive de la combinaison thérapeutique. Spigelman et coll. (1986) a suggéré que la structure de la suramine pourrait perturber les surfaces cellulaires membranaires et modifier les jonctions serrées de la barrière hémato-encéphalitique, facilitant ainsi la pénétration des composés nitroimidazoles. Une étude par spectrométrie UV utilisant des doses croissantes de suramine a montré la formation *in vitro* d'un complexe entre ces deux composés par attirance électrostatique mais également par accrochage mécanique (Rameau et coll., 1996). Ainsi les deux molécules pourraient former *in vivo* une entité à fort pouvoir perturbatoire pour les structures cellulaires. Aussi, il semblerait que la suramine et le mégazol agissent de manière synergique au niveau de la barrière hémato-encéphalitique. De plus, la suramine présente une action antagoniste sur les purinorécepteurs P-2 localisés sur les cellules endothéliales et astrocytaires (King et coll., 1996 ; Centemeri et coll., 1997) qui régulent les échanges sélectifs de substances chimiques entre le tissu cérébral et le sang (Emmick et coll., 1994). La suramine présente la capacité de modifier le passage de certaines molécules, ce qui pourrait être le cas du mégazol en favorisant sa concentration encéphalique (Williams and Jarvis, 2000 ; King et coll., 1996).

Ce phénomène facilitateur pourrait expliquer la raison pour laquelle les paramètres pharmacocinétiques plasmatiques du mégazol sont significativement modifiés chez la souris infectée préalablement traitée à la suramine. Une augmentation du volume apparent de distribution de mégazol ainsi qu'un prolongement de la demi-vie de ce composé ont été décrits chez la souris infectée par *T. b. brucei* (Enanga et coll., 1999). Lorsque la suramine est administrée 24 heures après le mégazol, une diminution prononcée de l'élimination du mégazol est observée (Enanga et coll., 1997). Ces études pharmacocinétiques suggèrent que la suramine est capable d'accroître l'activité trypanocide du mégazol.

Une dose unique de suramine à 20 mg/kg administrée dès l'apparition de la chute pondérale et alimentaire induit une disparition transitoire du parasite dans le sang. Le trypanosome réapparaît cependant chez notre modèle 11 à 43 jours après traitement. Jennings et Gray (1983) ont montré que pendant la période suivant le traitement par la suramine, le parasite persiste dans les plexus choroïdes malgré leur absence dans le sang. L'administration de la suramine seule (Jennings et coll., 1983 ; Raseroka et Ormerod, 1986) ou du mégazol seul (Bouteille et coll., 1995) même à des doses élevées (80 mg/kg x 4 jours i.p.) ne traite pas la phase méningo-encéphalitique de la maladie. Les résultats de notre investigation sont en accord avec ces travaux thérapeutiques antérieurs.

Un autre argument en faveur de cette combinaison suramine-mégazol repose sur l'effet bénéfique immédiat observé en phase d'administration thérapeutique. La normalisation à court terme de la valeur de prise alimentaire après traitement combinée des deux produits demande moins de temps qu'avec l'utilisation seule du mégazol. L'observation est également valable pour la prise de poids, d'autant plus que le déficit pondéral observé est moins prononcé. Ce résultat suggère le fait que l'injection préalable de suramine améliore la tolérance physiologique de l'organisme pour le dérivé nitroimidazolé.

Ces effets bénéfiques de la combinaison thérapeutique pourraient être synergiques ou additifs, facilitant une réduction possible de la durée du traitement de la THA en phase méningo-encéphalitique (Bouteille et coll., 1990; Jennings et coll., 1984 ; Jennings, 1990 ; Jennings et coll., 1996 ; Jennings et coll., 2002).

Indépendamment du développement d'un modèle expérimental animal d'étude de la phase neurologique de la THA, notre travail a fait ressortir une caractéristique clinique importante et jusqu'ici méconnue de l'utilisation combinée de la suramine et du mégazol, la majoration des désordres pondéral et alimentaire.

Les résultats de notre deuxième étude renforcent l'hypothèse selon laquelle une forte diminution de poids et de prise alimentaire pourrait constituer un critère de diagnostic du passage du trypanosome dans le SNC et de l'entrée en phase neurologique de la THA.

PUBLICATION 2

Tropical Medicine and International health (Trop Med Int Health).

2004 Jan; 9 (1): 83-91.

Megazol combined with suramin improves a new diagnosis index of the early meningo-encephalitic phase of experimental African trypanosomiasis.

Darsaud A, Chevrier C, Bourdon L, Dumas M, Buguet A, Bouteille B.

Centre de recherches du Service de santé des armées, La Tronche, France Institut d'épidémiologie neurologique et de neurologie tropicale, Faculty of Medicine, Limoges, France Institut de médecine tropicale du Service de santé des armées - Le Pharo, Marseille, France.

In human African trypanosomiasis (HAT), the parasites invade the central nervous system (CNS), leading to the development of meningo-encephalitis and an irreversible demyelinating process, which kills the patient unless specific treatment is undertaken. Among the experimental trypanocides, the nitroimidazole derivative megazol alone at optimal doses does not cure late-stage disease tested in mouse models, however the combination of suramin and megazol is able to cure infected mice without CNS involvement. We recently developed an experimental model of HAT with a sharp decrease in both the food intake and the body weight which may constitute an effective index of the early meningo-encephalitic phase. Using this model, we tested this hypothesis by the exclusive effectiveness of a megazol and suramin combination treatment to eliminate CNS trypanosomes. Sprague-Dawley rats were infected with *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.1E. Food intake and body weight were measured daily from the day of infection to death. Haematocrite was measured twice a week. Treatment consisted of 20 mg suramin per kg body weight administered intraperitoneally (i.p.) alone, or three daily doses (80 mg/kg) of megazol given *per os*, or suramin (20 mg/kg, i.p.) followed 24 h later by three daily doses (80 mg/kg) of megazol given *per os*. Treatment was followed by an increase in daily body weight and food intake similar to those of the control animals, 2 weeks after treatment. The anaemia developed after infection is also cleared as shown by the haematocrite measurements. The rats treated with megazol alone died about 29 days after treatment and those treated with suramin, after about 26 days. Seven months later, no signs of relapse were seen in 10 of 12 rats treated with the therapeutic combination, indicating that this

chemotherapy regimen was curative. The results support our previous finding, i.e. the decrease in body weight may constitute a diagnosis index of the early meningo-encephalitic phase.

PMID: 14728611 [PubMed - as supplied by publisher]

6. CHAPITRE III : Etude des perturbations de l'alternance veille-sommeil dans notre modèle

CHAPITRE III

6.1. PROBLEMATIQUE

La phase méningo-encéphalitique de la THA se caractérise par une perturbation de la rythmicité circadienne du cycle veille sommeil (Greenwood et Wittle, 1980 ; Molyneux et coll., 1984 ; Dumas et Boa, 1988 ; Buguet et coll., 1989, 1993 et 1994). Les patients présentent une désorganisation de la distribution temporelle de la veille et du sommeil proportionnelle à la sévérité des signes cliniques (Buguet et coll., 1999).

Ce rythme circadien de l'alternance veille sommeil constitue une cible privilégiée du trypanosome, probablement par l'intermédiaire du système immunitaire de l'hôte (Greenwood et Wittle, 1980 ; Adams et coll., 1986) et/ou de l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalitique (BHE) (Schmidt et Bafort, 1987 ; Philip et coll., 1994). L'hypothèse d'une dérégulation de l'horloge biologique, par atteinte du noyau raphé dorsalis (NRD), dans sa composante sérotoninergique qui envoie des projections en direction des noyaux suprachiasmatiques (NSC), semble appuyée par de sérieux arguments (Buguet, 1999). A ce jour, les cibles et réseaux potentiellement atteints ainsi que les processus mis en jeu ne sont pas encore clairement définis.

Notre modèle animal dont la pertinence est fortement appuyée par sa réponse thérapeutique exclusive à la combinaison suramine-mégazol (Chapitre II) pourrait constituer un outil d'étude précieux dans la compréhension des facteurs et mécanismes pathologiques en cause dans l'apparition des troubles circadiens de la THA. Dans ce troisième volet d'étude, nous avons ainsi testé la faculté de notre modèle à reproduire la dysrythmie circadienne veille-sommeil caractéristique de la phase méningo-encéphalitique.

L'intérêt scientifique de l'expérimentation repose sur la création d'un modèle animal d'évolution clinico-biologique similaire à celle rencontrée chez l'homme en ce qui concerne la dérégulation de la rythmicité circadienne. Ce modèle reproduisant l'atteinte du rythme circadien de l'alternance veille sommeil permettrait par la suite de mettre en exergue les effets bénéfiques d'une molécule ou d'une association médicamenteuse donnée (réversibilité des troubles circadiens, concentration du sommeil la nuit).

Le but de notre étude est d'étudier, par un suivi électrophysiologique des états de veille et de sommeil, la dérégulation de l'horloge biologique interne de notre modèle. En outre, l'évolution

temporelle de l'atteinte de la rythmicité circadienne veille-sommeil expérimentale et la cinétique d'apparition des troubles électroencéphalographiques chez le rat ne sont pas définis.

Une fragmentation excessive du sommeil associée à une diminution de la latence d'apparition du Sommeil Paradoxal (SP) et une diminution du pourcentage de Sommeil Lent (SL) a été retrouvée expérimentalement chez le rat (Bentivoglio et coll., 1994a ; Grassi-Zucconi et coll., 1995) et le lapin (Toth et coll., 1994) infectés par *T. b. brucei*.

6.2. METHODES

Cette étude a reçu l'accord du Comité Consultatif pour l'utilisation d'animaux en recherche expérimentale intrinsèque au CRSSA (La Tronche).

6.2.1. Animaux

Dix rats Sprague-Dawley (IFFA-CREDO, Lyon, France) d'un poids initial de 200 à 230 g infectés par *T. b. brucei* AnTat 1.1E ont été enregistrés en polysomnographie en 3 sessions expérimentales.

Dès leur arrivée, les rats sont hébergés dans des enceintes protégées (IFFA CREDO), à raison d'un par cage avec accès à la nourriture et à la boisson *ad libitum*. Ils sont maintenus dans une température ambiante stable (22°C) avec une photopériode naturelle de type 12h/12h (période diurne de 9h00 à 21h00). Les animaux sont manipulés et pesés tous les jours durant la semaine réglementaire d'acclimatation aux conditions de laboratoire ainsi que durant la phase de récupération post-chirurgie.

Durant l'expérimentation, les rats sont hébergés dans des cages individuelles adaptées à l'enregistrement polysomnographique avec boisson et nourriture *ad libitum*, dans les mêmes conditions que précédemment.

6.2.2. Chirurgie d'implantation des électrodes

Le rat est instrumenté pour l'enregistrement de l'électroencéphalogramme (EEG) et de l'électromyogramme (EMG). Cinq électrodes corticales (2 frontales, 2 hippocampiques et 1 occipitale), deux électrodes corticales de référence et trois électrodes musculaires sont implantées (schéma 1).

Les animaux sont anesthésiés par injection intra péritonéale de pentobarbital, à la dose initiale de 100µl /100g de poids corporel. L'anesthésie est ensuite entretenue par réinjections régulières de pentobarbital, toutes les heures avec une dose plus restreinte (25µl / 100g de poids corporel).

La température rectale du rat est maintenue constante ($37,0 \pm 0,5$ °C) durant l'opération, par asservissement d'une couverture homéothermique (Harvard, Edenbridge, Grande Bretagne).

L'animal est placé dans l'appareil de stéréotaxie (ASI instruments, Houston, USA). La zone crâniale d'intérêt est rasée et nettoyée à la Bétadine[®] (Laboratoire ASTA Médica, Mérignac, France).

Le plan cutané est ouvert, les couches musculaires sont réclinées et le calvarium est dégagé puis nettoyé à l'H₂O₂. Après résection des plans cutané et musculaire, des orifices d'implantation sont pratiqués à l'aide d'une fraiseuse.

Cinq électrodes corticales (2 frontales, 2 hippocampiques (AP = -4 mm, ML = ± 2 mm, selon l'atlas de Paxinos et Watson (1997) et 1 occipitale), 2 électrodes corticales de référence et 3 électrodes musculaires sont implantées. Les électrodes corticales sont constituées de vis auxquelles a été ajouté un fil conducteur (1,19 mm de diamètre, PHYMEP, Paris) préalablement recouvert d'une fine couche d'étain. Les vis sont placées au contact de la surface corticale par la perforation de l'os crânien à l'aide d'une micro-perceuse, puis maintenues par un ciment dentaire (Hesadon n°31, IMPORT dentaire, Paris). L'autre extrémité des électrodes est soudée à un connecteur femelle (Sonepar Electronique France, Palaiseau) qui permet de « brancher » l'animal au système collecteur (Air Précision, Le Plessis Robinson, France). La fixation des électrodes nécessite l'utilisation de ciment dentaire (Hesadon n°31, IMPORT dentaire, Paris) qui aide à la formation de l'implant d'enregistrement regroupant l'ensemble des électrodes.

Deux points de suture sont effectués à l'avant et à l'arrière de l'implant d'enregistrement avec un fil non résorbable monobrin Dec. 2.0. L'animal est enlevé du cadre de stéréotaxie et remis dans sa cage. Une prophylaxie antibiotique est assurée par de l'Extenciline[®] (60000 UI.kg⁻¹, i.m) et une couverture analgésique post-opératoire est prodiguée par injection de Finadyne[®] (0,1 ml / 300 g de rat, i.m) toutes les 48 heures durant 4 jours.

Les rats sont laissés 8 jours en récupération avec un suivi quotidien de l'état physiologique et du poids.

6.2.3. Connexion au banc métrologique

Les branchements électrophysiologiques sont réalisés une semaine après implantation.

L'animal est placé dans une cage cylindrique adaptée à l'enregistrement et est connecté au circuit d'enregistrement comprenant un collecteur tournant (Air Précision, Le Plessis Robinson, France) et un enregistreur ambulatoire (Oxford Medilog 9000 II). Le rat est relié au collecteur tournant via une tresse de fils conducteurs insérés dans un ressort souple. Du collecteur tournant partent les différentes voies d'enregistrement allant au Medilog 9000 II (schéma 1).

Les premiers jours de branchement nécessitent une simple connexion sans enregistrement afin d'habituer l'animal au banc métrologique de mesure. Les nyctémères suivant cette phase d'adaptation constituent les enregistrements contrôles : 2 nyctémères consécutifs établissent les valeurs de référence de la rythmicité circadienne expérimentale de l'alternance veille sommeil.

6.2.4. Infection

Après l'obtention d'enregistrements nyctéméraux contrôles, les rats sont infectés avec la souche *T. b. brucei* AnTat 1.1E. Une inoculation est réalisée par injection IP de 200µl d'un cryostabilat contenant 2000 parasites, comme précédemment décrit au chapitre II. Elle porte sur l'ensemble des rats qui constituent la série expérimentale et est réalisé en condition d'enregistrement électrophysiologique.

La parasitémie est vérifiée au dixième jour d'infection. Les animaux sont déconnectés du collecteur tournant puis placés dans une cage d'anesthésie à l'halothane (4%) (Ohmeda, Maurepas, France) aidant à l'anesthésie de l'animal sans que celui-ci ne présente d'effets de contrainte. L'anesthésie acquise, un prélèvement de sang (50 µl) au niveau de la queue est pratiqué à l'aide d'un scalpel. La parasitémie est vérifiée par dépôt d'une goutte de sang entre lame et lamelle et observation au microscope.

Les enregistrements électrophysiologiques sont poursuivis jusqu'à la mort de l'animal.

A la fin de l'expérimentation les animaux sont sacrifiés par surdosage en pentobarbital et décapitation de sécurité. Les implants d'enregistrement sont récupérés, nettoyés et mis en suspension au-dessus d'un bain d'acétone pour dissoudre le ciment dentaire. Les vis et les connecteurs femelles sont récupérés et décontaminés.

6.2.5. Acquisition des données

Les signaux analogiques de l'EEG et de l'EMG sont enregistrés en continu sur cassette par période de 24 heures puis numérisés à l'aide du logiciel Vision (Oxford Instruments, Abington, Grande-Bretagne) et analysés grâce au logiciel PRANA (PhiTools[®], Strasbourg, France) développé au sein du CRSSA.

Les cassettes conventionnelles audio de type C120 sont utilisées pour les besoins de l'enregistrement. Elles doivent être préalablement calibrées (100 μ V à vitesse lente pendant 10 minutes), les rendant compatibles avec les signaux reçus par le Medilog. Le recueil des données se fait avec un défilement à vitesse lente de la bande magnétique de la cassette.

Le traitement des données brutes nécessite la conversion du signal analogique enregistré par le Medilog en signal numérique exigé par l'ordinateur. Les signaux enregistrés et contenus sur les bandes magnétiques sont numérisés a posteriori avec une fréquence d'échantillonnage de 128 Hz à partir du système Vision (Oxford Instruments, Abington, Grande-Bretagne).

Les données sont finalement transférées et archivées sur CD-ROM.

Les mesures se font en bipolaire. Avant le début des enregistrements, chaque voie d'entrée du Medilog est calibrée à 100 μ V de manière similaire aux cassettes.

Le montage réalisé pour l'enregistrement polygraphique est le suivant :

- 2 dérivations bipolaires corticales,
- 1 dérivation bipolaire musculaire,
- 1 dérivation bipolaire de référence (électrode indifférenciée du boîtier Medilog).

6.2.5.1. Etude qualitative des tracés d'enregistrement

L'ensemble de l'enregistrement polygraphique est codé arbitrairement par page de 20 secondes selon une adaptation des prérogatives de Rechtschaffen et Kales, en quatre stades différenciés (Neckelmann et coll., 1993) : éveil (E), sommeil lent léger (SLL), sommeil lent profond (SLP) et sommeil paradoxal (SP). La différenciation du sommeil en SLL et SLP se fait sur la base du pourcentage d'onde delta de la page et la présence de grapho-éléments caractéristiques, en

particulier les fuseaux de sommeil. Une page présentant plus de 50 % d'ondes delta en l'absence de fuseaux de sommeil est scorée en SLP.

Plusieurs variables ont été étudiées en relation avec les perturbations observées en clinique humaine 1) le pourcentage total des différents stades de vigilance, 2) le nombre et la durée moyenne des épisodes de sommeil, 3) l'intervalle entre la fin d'un épisode de SL et le début du suivant, 4), la durée moyenne d'un épisode SL antérieur à un épisode de SP définie comme la latence d'apparition du SP (Grassi-Zucconi et coll., 1995), 5) le nombre moyen de changements de stades par 24h, 6) le nombre d'endormissement direct en SP, SOREMP (sleep onset rapid eye movement periods). Ce paramètre est défini comme le nombre d'épisodes de SP qui suivent deux époques de 20 s ou plus d'éveil sans épisode de SL intermédiaire.

Les variables sont moyennées sur une période de 12 h correspondant à la dichotomie des conditions, lumière et obscurité.

6.2.5.2. Etude qualitative

La transformation de Fourier affine la dénomination du stade de sommeil de la page et permet d'obtenir une analyse fine de la catégorisation des ondes constituant le tracé.

L'analyse spectrale, calculée sur des plages de deux secondes, est faite dans des bandes de fréquences allant de 0,5 et 32 Hz avec une résolution de 0,5 Hz.

Les spectres obtenus sur deux secondes et exprimés en unité de puissance absolue ($\mu V^2/Hz$) ou de puissance relative (%) sont moyennés par périodes de 20 secondes pour s'adapter à la résolution temporelle des états de vigilance déterminés visuellement.

La délimitation des bandes de fréquence d'intérêt a été fixée au regard des études antérieures existant chez le rat : Delta (0,5Hz à 4,5 Hz inclus), Thêta (4,5 à 9 Hz inclus), Alpha (9 à 13 Hz inclus), Bêta 1 (13 à 18 Hz inclus) et Bêta 2 (18 à 32 Hz inclus).

Schéma III- 1: Localisation des électrodes et des vis de soutien.

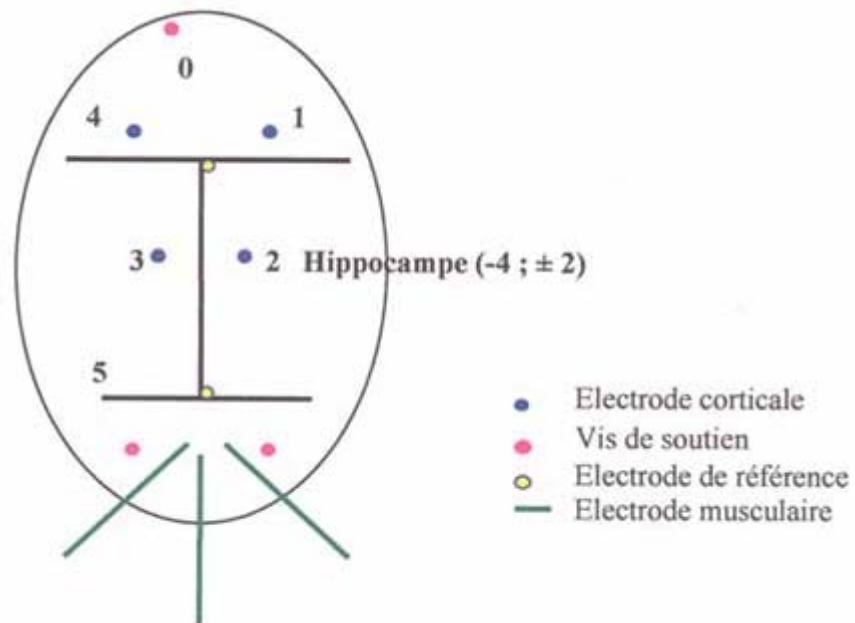
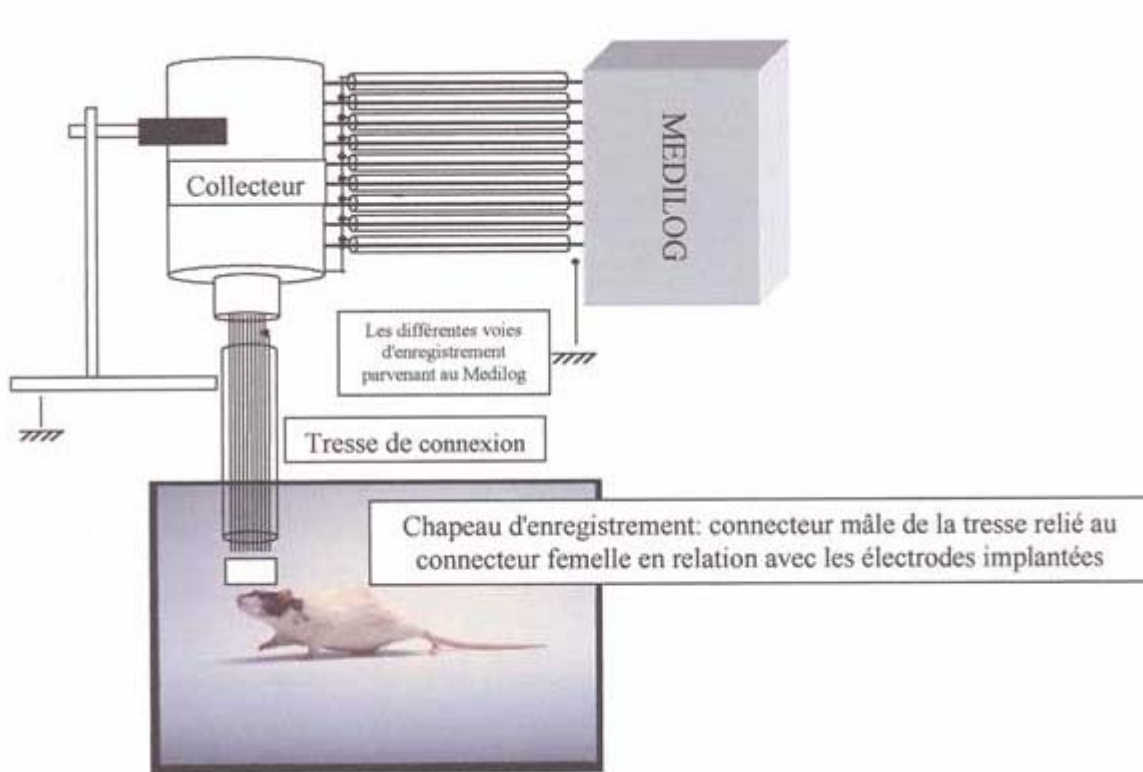


Schéma III- 2 : Banc métrologique nécessaire à l'enregistrement.



6.3. RESULTATS

6.3.1. ETUDE QUALITATIVE

Les rats sont morts $18 \pm 2,8$ jours post-infection.

La distribution de la veille et du sommeil est formalisée à l'aide d'un hypnogramme (fig. 1). En enregistrement contrôle, le rat dort essentiellement en condition lumière et est principalement éveillé en condition nocturne : $39,9 \pm 3,6$ et $60,1 \pm 4,5$ % respectivement pour la veille et le sommeil durant le jour vs. $52,5 \pm 4,5$ et $47,5 \pm 3,6$ % durant la nuit (ANOVA, $p < 0,05$).

La proportion des différents stades de vigilance ne présente pas de différence significative par rapport à la valeur contrôle mesurée au cours des 2 nycthémères de la période baseline dans le décours temporel post-infection, quelle que soit la durée de vie de l'animal considéré. Cette répartition respective de la veille et du sommeil est cependant modifiée deux jours ante-mortem aussi bien en phase nocturne que diurne. Le pourcentage de sommeil lent (SL) augmente alors au détriment d'un accroissement inversement proportionnel de l'éveil (tableau 1 et fig. 2). Ces changements s'observent aussi bien le jour que la nuit. Contrairement aux modifications objectivées de l'éveil et du SL, la proportion de sommeil paradoxal (SP) ne varie pas jusqu'à très tardivement dans l'évolution (tableau 1).

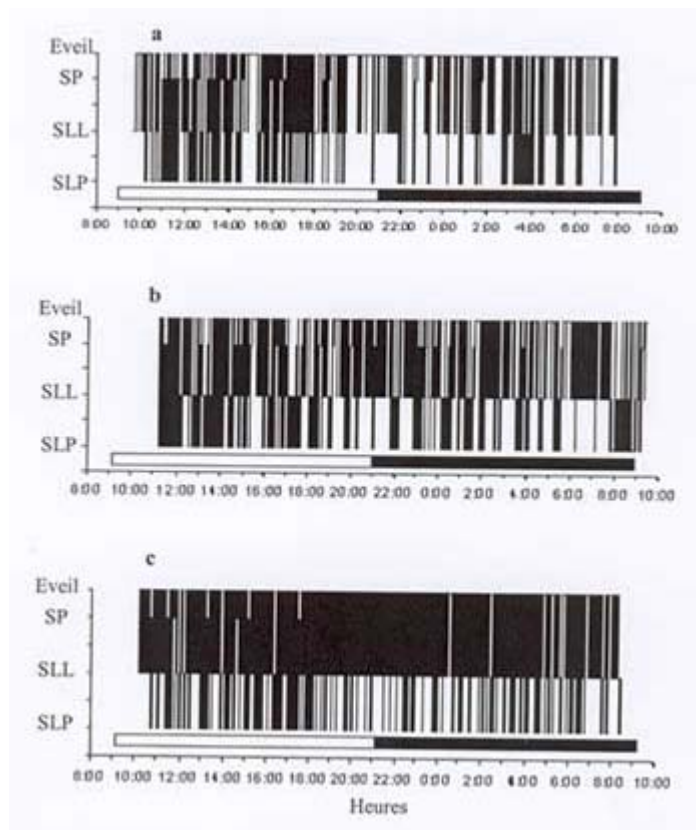


Figure III- 1 : Hypnogramme d'un rat montrant une distribution de la veille (E), du sommeil lent léger (SLL), lent profond (SLP), et du sommeil paradoxal (SP) en enregistrement contrôle (a), au quatorzième jour post-infection (J14) (b), et le jour précédent la mort de l'animal (J₂₁) (c). Après infection, l'éveil et le sommeil lent apparaissent être distribués de manière égale sur l'ensemble du nyctémère aussi bien en condition lumière (barre blanche en-dessous de l'hypnogramme) qu'obscurité (barre noire).

Tableau III- 1 : Pourcentage d'éveil (E), de sommeil lent (SLL et SLP) et de sommeil paradoxal (SP) en condition lumière (lum) et obscurité (obsc) en enregistrement contrôle (C), au douzième jour d'infection (J12), et deux jours ante-mortem (J-2). Résultats exprimés en moyenne \pm écart type.

	C (n = 10)		J ₁₂ (n = 10)		J ₋₂ (n = 10)	
	Lum	Obsc	Lum	Obsc	Lum	Obsc
E	39,9 \pm 3,6	52,5 \pm 4,5	38,4 \pm 3,1	51,7 \pm 4,6	20,4 \pm 2,5	35,9 \pm 3,9
SL	49,4 \pm 3,4	40,7 \pm 3,1	51,4 \pm 3,6	41,8 \pm 3,7	70,4 \pm 5,4	58,3 \pm 5,1
SLL	31,5 \pm 2,8	28,4 \pm 2,6	33,8 \pm 2,3	28,7 \pm 2,5	44,9 \pm 4,4	38,5 \pm 4,7
SLP	17,9 \pm 2,3	12,4 \pm 1,9	17,6 \pm 2,1	13,1 \pm 1,5	25,5 \pm 2,8	19,7 \pm 2,6
SP	10,6 \pm 1,2	6,7 \pm 0,97	10,2 \pm 1,1	6,5 \pm 0,7	9,1 \pm 1,4	5,9 \pm 1,1

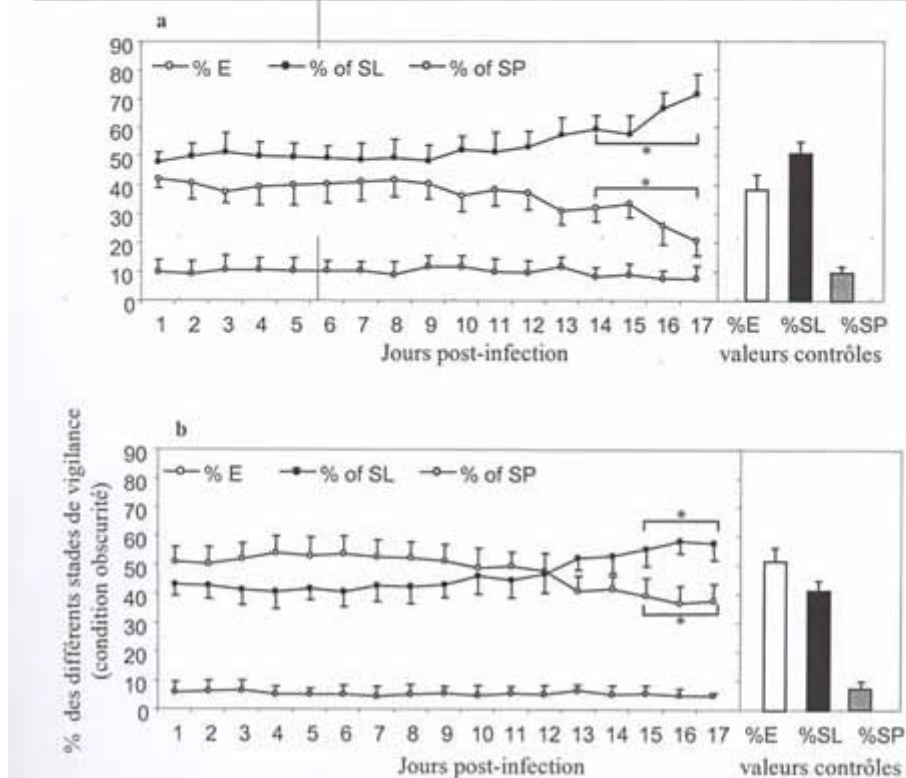


Figure III- 2 : Pourcentage respectif d'éveil (E), de sommeil lent (SLL et SLP), et de sommeil paradoxal (SP) avant (histogramme) et après infection, en condition lumière (a) et obscurité (b). * différence significative par rapport aux valeurs contrôles à $p < 0.001$ (test de Student). Moyenne \pm écart type.

La proportion de sommeil lent léger (SLL) en SL augmente au profit du sommeil lent profond (SLP) en fonction de la durée post-infection (tableau 1 et fig. 3).

La durée moyenne des épisodes de veille diminue (fig. 4) en comparaison avec la valeur contrôle à J₁₅ en condition obscurité (ANOVA, $p < 0,01$) et à J₁₄ en condition lumière (ANOVA, $p < 0,01$) alors que le nombre moyen des épisodes de veille augmente principalement en condition obscurité ($p < 0,001$ dès J₁₄ post-infection, pour les deux conditions).

Le nombre des épisodes de SL augmentent à J₁₅ en phase nocturne et J₁₄ en phase diurne, aussi bien en SLL qu'en SLP (ANOVA, $p < 0,01$ dans tous les cas) ; la durée moyenne des épisodes de SL est cependant diminuée à J₁₅ ($p < 0,001$ en condition lumière et obscurité).

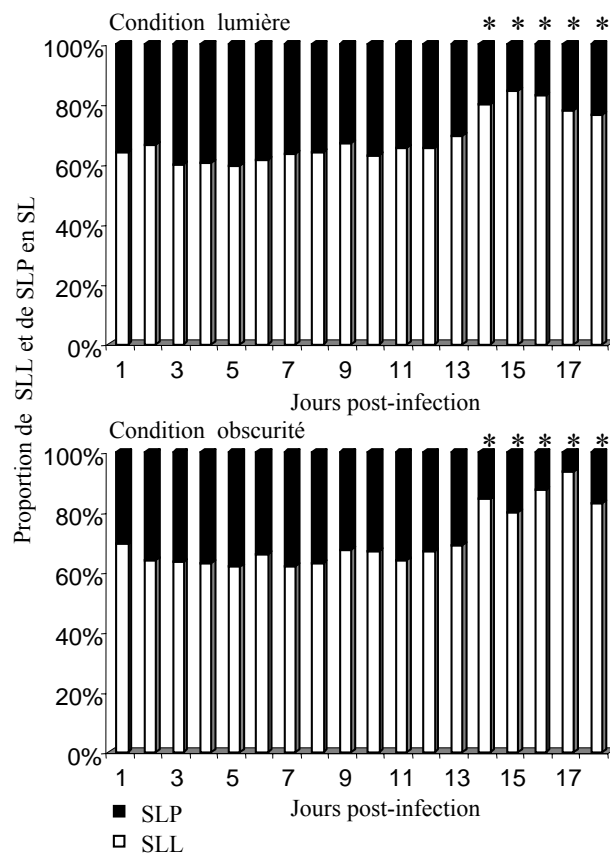


Figure III- 3 : Proportion respective de sommeil lent léger (SLL) et de sommeil lent profond (SLP) en sommeil lent (SL) après infection, en condition lumière et obscurité. * différence significative par rapport aux valeurs contrôles à $p < 0,001$ (test t de Student). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type.

En conséquence, les intervalles entre épisodes de SL diminuent à partir de J₁₅ (ANOVA, $p < 0,01$; $3,82 \pm 0,23$ mn vs $5,26 \pm 0,19$ mn en enregistrement contrôle). La latence moyenne du SP est significativement réduite dès J₁₄ (ANOVA, $p < 0,001$; $3,96 \pm 0,24$ mn vs $6,68 \pm 0,37$ mn en valeur contrôle). Ces changements dans la structure interne du sommeil synchronisé sont facilement appréciables. Les hypnogrammes des animaux infectés présentent un pattern de SL fragmenté (fig. 1). Cette fragmentation excessive croissante du cycle veille sommeil est également démontrée par l'augmentation du nombre de changements de stades de vigilance à la fin de la seconde semaine post-infection (fig. 5).

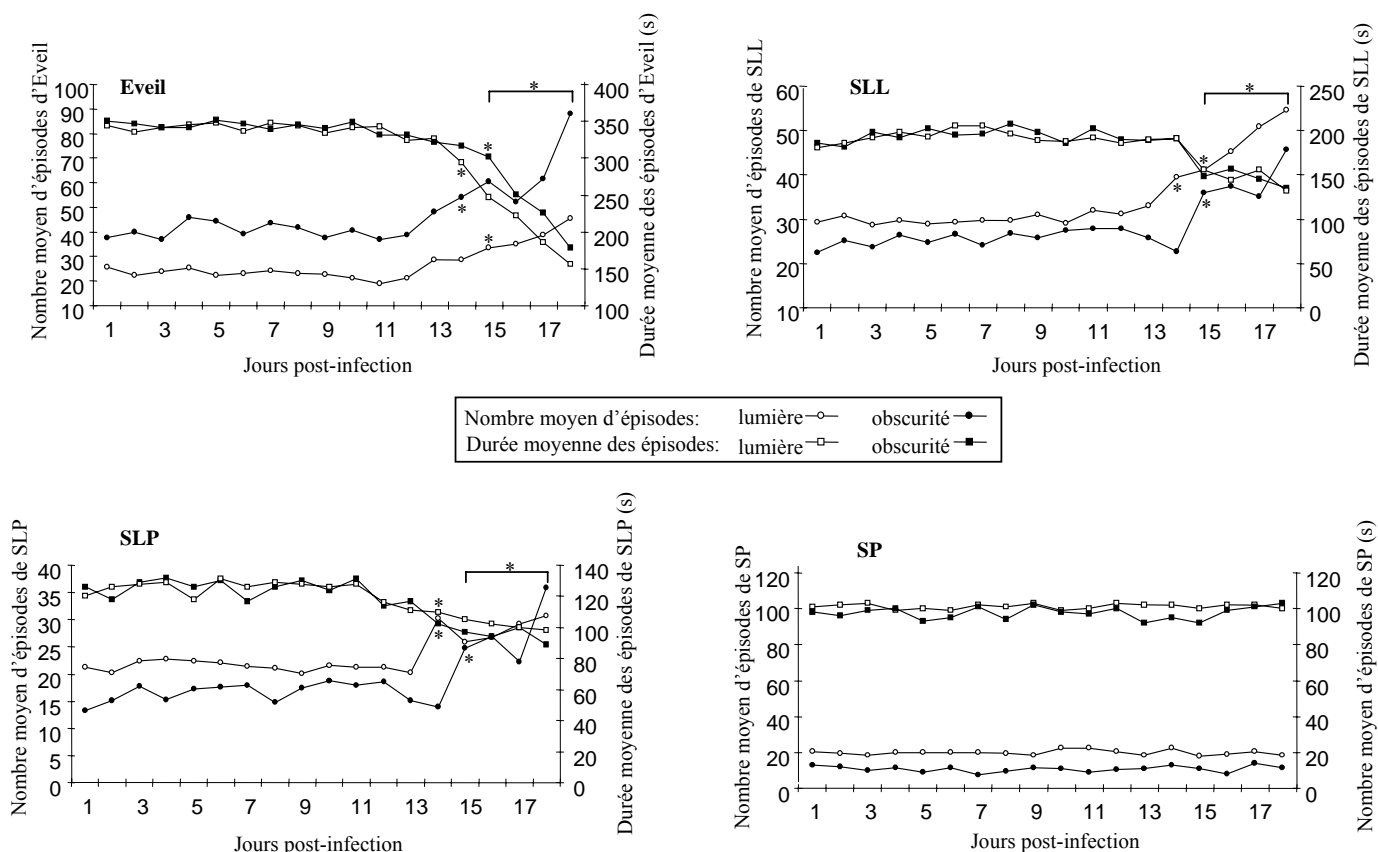


Figure III- 4 : Nombres et durées moyennes des épisodes d'éveil (E), de sommeil lent léger (SLL) et lent profond (SLP), et de sommeil paradoxal (SP) après infection, en condition lumière (symboles vides) et obscurité (symboles remplis). * différence significative par rapport aux valeurs contrôles à $p < 0,001$. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type.

Le pourcentage de SP (table 1), aussi bien que le nombre et la durée moyenne des épisodes de SP ne présentent pas de différence significative dans la progression de la maladie (fig. 4).

En plus de la diminution de rythmicité circadienne dans la distribution de la veille et du sommeil, la structure interne du sommeil est désorganisée, avec l'apparition de transitions anormales, en particulier des endormissements directs en SP (SOREMP, Sleep onset rapid eye movement periods) après le quatorzième jour post-infection (J₁₄; fig. 5).

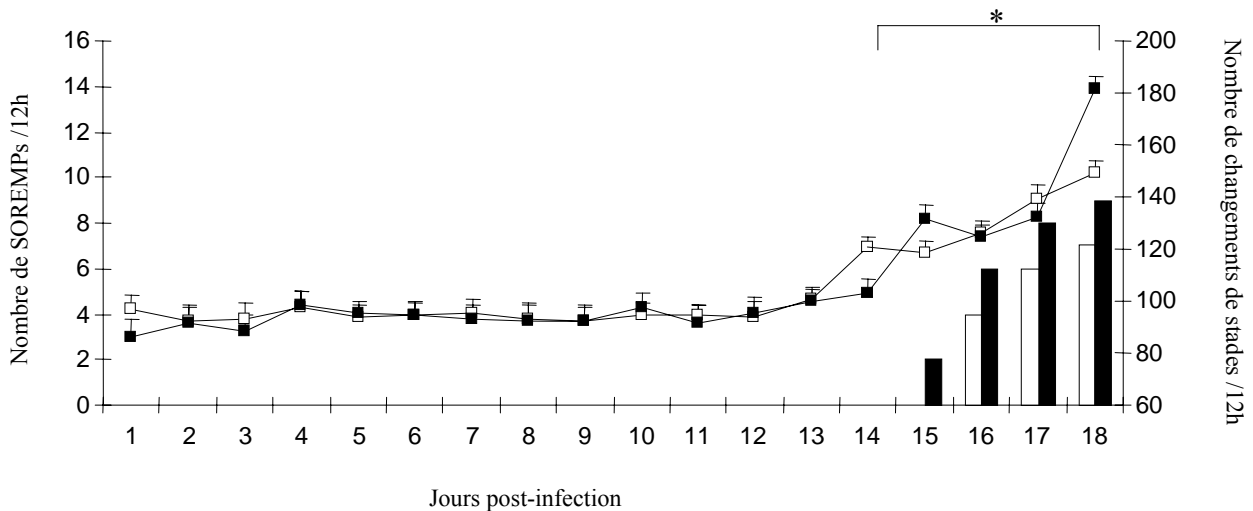


Figure III- 5 : Nombre de changements de stades de vigilance et nombre d'épisodes d'endormissement direct en sommeil paradoxal (SOREMP, Sleep onset rapid eye movement periods) pendant l'infection avec une différenciation 12-h lumière et 12-h obscurité. * différence significative par rapport aux valeurs contrôles à $p < 0,001$ (test t de Student). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type.

L'aspect morphologique des enregistrements EEG est également perturbé durant le sommeil lent (SL) : des ondes lentes hypersynchrones apparaissent 3- 4 jours avant la mort (fig. 6) et envahissent progressivement le tracé EcoG, 24h avant la mort. Les spindles (ou fuseaux de sommeil), caractéristiques du SL, diminuent progressivement jusqu'à disparaître le jour précédent la mort ; le tracé devient alors monotone et les stades de vigilance sont difficilement discernables.

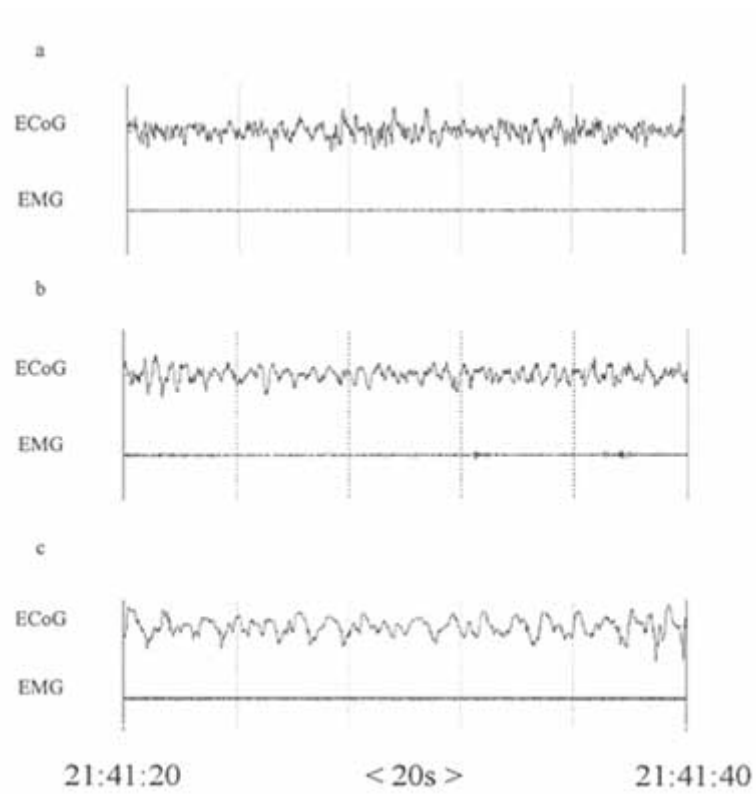


Figure III- 6 : Altération de la morphologie des tracés électrocorticaux (ECoG) en sommeil lent (SL). Tracé en SL pendant la période d'enregistrements contrôles (a), 14 jours après infection (b) et 1 jour ante-mortem pour un rat mort au 21ième jour post-infection (c).

EMG: Electromyogramme.

6.3.1.1. ETUDE QUANTITATIVE

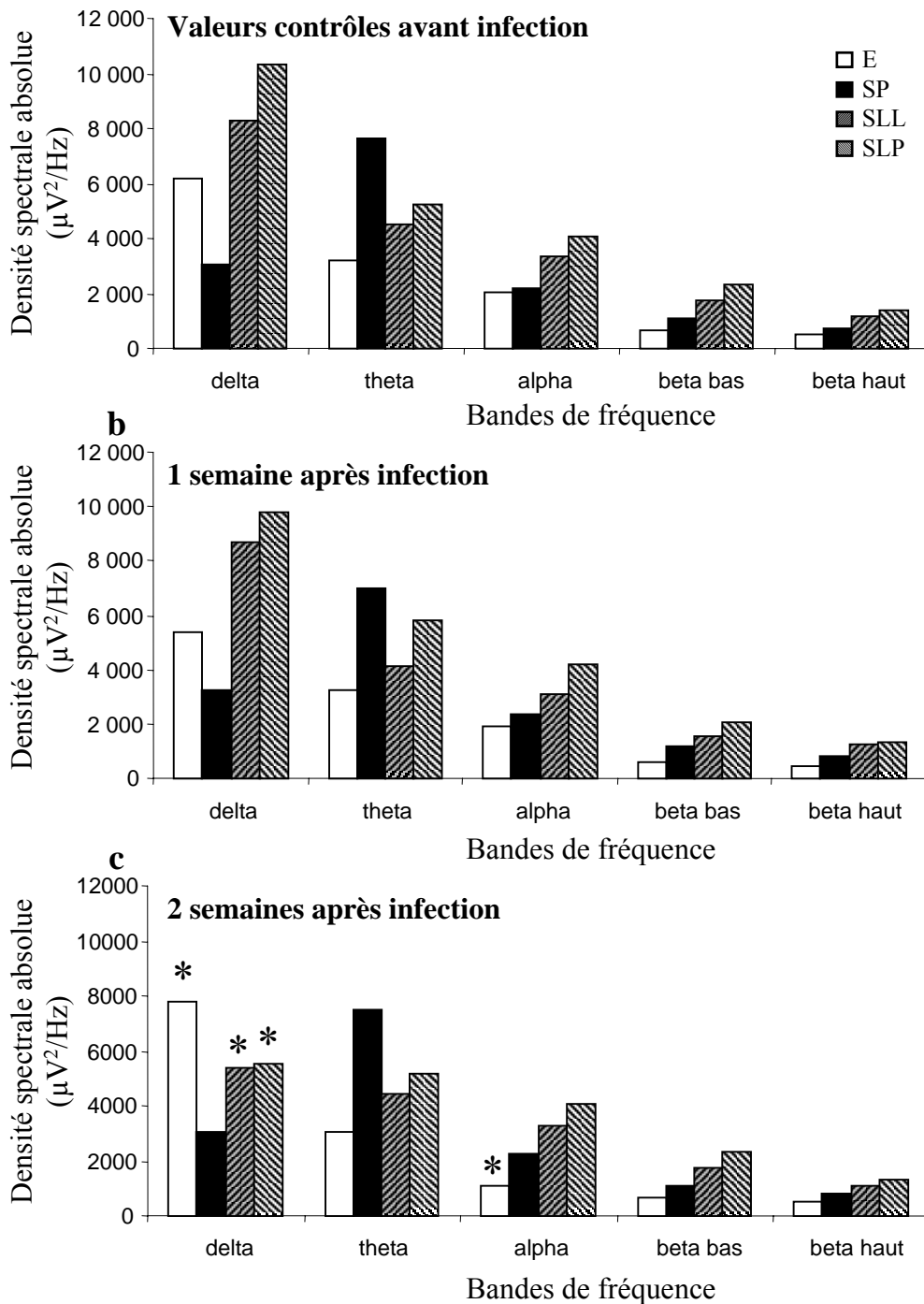


Figure IV- 1 : Densité de puissance spectrale absolue ($\mu V^2 / Hz$) pour les cinq bandes de fréquence prédéfinies (delta, thêta, alpha, bêta bas ou I et bêta haut ou II) en éveil (E), sommeil lent léger (SLL), sommeil lent profond (SLP) et sommeil paradoxal (SP) en condition contrôle (a), une semaine (b) et deux semaines (c) après infection.

* différence significative par rapport aux valeurs contrôles à $p < 0,001$.

La puissance EEG de chaque bande de fréquence considérée pour un stade de vigilance donné n'a pas présenté de différence significative entre les conditions lumière et obscurité. Les résultats observés en phase nocturne et diurne n'ont donc pas été différenciés.

En enregistrements contrôles, les densités spectrales mesurées en veille sont significativement plus basses que celles obtenues en sommeil lent léger (SLL) et lent profond (SLP) pour l'ensemble du spectre de puissance (ANOVA, $p < 0,001$; 0,5- 32,0 Hz), alors qu'en comparaison avec le sommeil paradoxal (SP), les densités spectrales d'éveil sont significativement plus importantes pour la bande delta (ANOVA, $p < 0,001$) et plus basses pour toutes les autres bandes de fréquence ($p < 0,001$; 5,5- 32,0 Hz) (fig. 1a).

Les puissances spectrales en SLL sont significativement moins importantes qu'en SLP pour toutes les bandes de fréquence considérées ($p < 0,001$; 0,5- 32 Hz). Les densités de puissance en SLL sont significativement plus importantes qu'en SP pour les bandes delta ($p < 0,001$), alpha ($p < 0,001$), bêta I et bêta II ($p < 0,001$) et significativement plus basses pour la bande thêta ($p < 0,001$) (fig. 1a). En comparaison avec le SP, les densités de puissance en SLP sont significativement plus importantes en delta ($p < 0,001$) aussi bien qu'en alpha, bêta I et bêta II ($p < 0,001$), mais significativement plus basses en thêta ($p < 0,001$) (fig. 1a).

Une semaine après infection, les paramètres spectraux ne montrent pas de différence avec les deux nyctémères d'enregistrement contrôle (fig.1b). Les densités de puissance en SLL et SLP sont significativement plus importantes qu'en veille ($p < 0,001$). Le sommeil lent profond (SLP) montre des densités de puissance significativement plus importantes qu'en SLL pour toutes les bandes de fréquence ($p < 0,001$; 0,5- 32 Hz). Les densités de puissance en SP sont significativement plus importantes pour la bande thêta ($p < 0,001$) et significativement plus basses qu'en SLL pour les bandes delta ($p < 0,001$), alpha ($p < 0,001$), bêta I et bêta II ($p < 0,001$). En comparaison avec le SP, les densités de puissance de veille sont significativement plus importantes pour la bande delta ($p < 0,001$) mais plus basses pour les autres bandes ($p < 0,001$). Les puissances spectrales en SLP sont plus basses pour la bande thêta ($p < 0,001$) et plus importantes pour les bandes delta ($p < 0,001$), alpha ($p < 0,001$), bêta I et bêta II ($p < 0,001$) par rapport aux puissances mesurées en SP.

Neuf jours après infection, l'EEG désynchronisé d'éveil présente une activité significativement plus élevée en delta ($p < 0,005$) et une diminution de la bande de fréquence alpha vs. les valeurs contrôles respectives ($p < 0,05$) (fig. 2a).

Les valeurs de puissances spectrales en SLL et SLP sont supérieures à celles mesurées en SP, exceptées dans la bande de fréquence thêta, deux semaines après infection (fig. 1c). La prédominance d'un EEG synchronisé en SL est marquée avec un pic de puissance dans la bande de fréquence delta. La valeur de puissance spectrale en SLL pour le delta est cependant considérablement réduite par rapport à la valeur mesurée pendant la période contrôle ($p < 0,001$), dix jours après infection (fig. 2b). Cette réduction de la puissance spectrale delta est également mesurée en SLP ($p < 0,001$), neuf jours après infection (fig. 2c).

Le SP est caractérisé par une valeur de puissance spectrale en thêta très élevée, basse pour les activités EEG lentes et rapides (fig. 1a). Deux semaines après infection, la puissance spectrale EEG en delta en SP était similaire à celle mesurée pendant la période contrôle et une semaine après infection (fig. 1c). La puissance spectrale EEG en SP pendant la période d'infection est similaire à celle mesurée pour la période contrôle : aucune différence significative n'est révélée dans la bande de fréquence delta, thêta, alpha, bêta I et bêta II jusqu'à J17 post infection (fig. 2d).

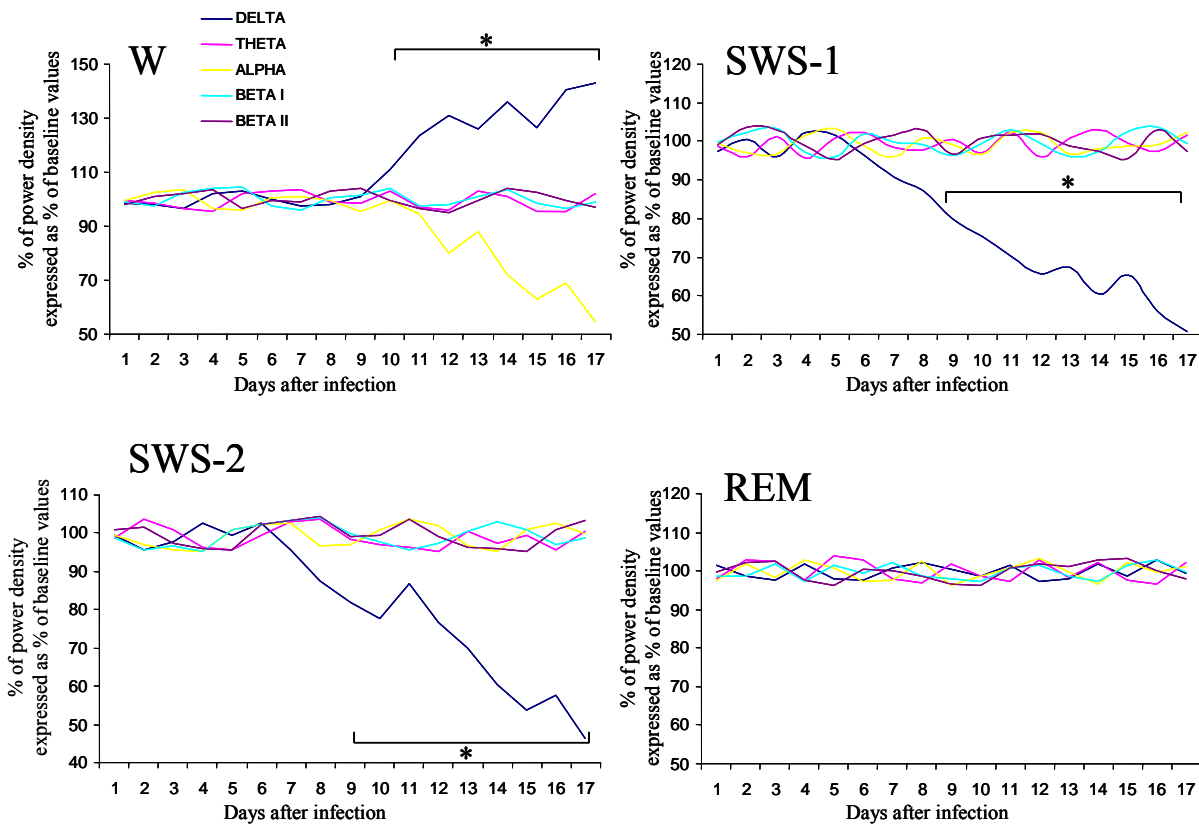


Figure IV- 2: Densité spectrale post-infection pour chaque bande de fréquences prédéfinies exprimée en pourcentage de densité spectrale absolue ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$) mesurée pendant la période contrôle. Les valeurs sont représentées par stades de vigilance considérés : éveil (E), sommeil lent léger (SLL), lent profond (SLP) et sommeil paradoxal (SP)

* différence significative par rapport aux valeurs contrôles à $p < 0,001$.

6.4. DISCUSSION

Cette étude basée sur des enregistrements polysomnographiques en continue démontre que l'infection de notre modèle rat par *T. b. brucei* AnTat 1.1E conduit au développement d'une dysrythmie circadienne de l'alternance veille sommeil, deux semaines après inoculation du parasite. En outre, notre étude a permis d'affiner la caractérisation de la cinétique d'évolution des troubles veille-sommeil aussi bien sur un plan qualitatif (architecture globale de rythmicité veille-sommeil) que quantitatif (densité spectrale des différents stades de vigilance). Cette dérégulation du rythme circadien de la veille et du sommeil s'accompagne d'anormalités du tracé EEG caractérisées par l'invasion progressive et récurrente d'ondes lentes pathologiques. D'autres phénomènes singuliers se rajoutent au tableau neuroclinique en particulier une altération de la structure interne du sommeil avec notamment la survenue d'endormissements directs en sommeil paradoxal (SOREMP) et l'augmentation brutale du nombre de changements de stades de vigilance.

Le cycle veille-sommeil des rongeurs est polyphasique avec des séquences d'épisodes de veille, de sommeil lent et de sommeil paradoxal qui se répètent tout au long du nycthémère, avec cependant une prévalence plus importante de périodes de sommeil en phase lumineuse et un nombre supérieur d'épisodes d'éveil en condition obscure (Timo-Iaria et coll., 1970 ; Rusak & Zucker, 1979 ; Van Gool & Mirmiran, 1983). Les rats de notre expérimentation présentent une remarquable stabilité dans la proportion des différents stades de vigilance jusqu'à tardivement dans l'évolution de la trypanosomose expérimentale. Les derniers nycthémères d'enregistrement ante-mortem se caractérisent par une hypersomnie qui se traduit par une augmentation exclusive du sommeil synchronisé. Cette dernière observation est en accord avec l'élévation de sommeil lent décrite au cours des épisodes fébriles chez le lapin infecté par *T. b. brucei* (Toth et coll., 1994). L'analyse détaillée de la structure du sommeil spontanée de rats trypanosomés à *T. b. brucei* (Grassi-Zucconi et coll., 1995 et 1996) met cependant en évidence une proportion de veille augmentée en relation avec une diminution concomitante du pourcentage de sommeil synchronisé, trois semaines après inoculation du parasite. Cette diminution de sommeil lent en rapport direct avec l'élévation du pourcentage de veille n'est restrictivement observée qu'en condition lumineuse. La comparaison des résultats de notre étude et de celle menée antérieurement par Grassi-Zucconi et coll. (1995) est délicate en raison d'une discordance dans les conditions d'expérimentations. Les disparités observées concernent d'une part la période d'enregistrement et d'autre part la pathogénicité de la souche de parasites utilisée, en témoigne la différence de décours temporel de l'atteinte électrophysiologiques, avec des variations significatives de durée de vie. Les enregistrements

électrophysiologiques limités, de courte durée, pratiqués en fin de troisième semaine d'infection constituent très probablement l'élément déterminant dans la compréhension de ces manifestations électroencéphalographiques contradictoires.

Le nombre et la durée moyenne des épisodes des différents stades de vigilance ne présentent pas de différence significative en rapport avec la valeur mesurée en période contrôle, jusqu'au début de la seconde semaine post-infection. En fin de deuxième semaine post-infection, une perturbation importante de ces paramètres est alors observée, constituant un point de rupture fort dans l'évolution de la pathologie neuroclinique. Le nombre des épisodes de veille et de sommeil lent augmente de manière brutale aussi bien en condition de lumière que d'obscurité. Cette observation est en accord avec une étude préliminaire conduite au CRSSA, au sein du laboratoire par Montmayeur et Buguet (1994).

L'augmentation drastique du nombre d'épisodes de sommeil lent (SL) s'accompagne d'une diminution limitée mais néanmoins significative de la durée moyenne de ces épisodes de SL. Contrairement au sommeil, la diminution de la durée moyenne des épisodes de veille est forte. La persistance de l'apparition d'épisodes de veille ainsi que le caractère de gravité de la diminution de la durée de ces épisodes suggèrent fortement que les rats infectés présentent une capacité de déclenchement de l'état de veille préservée malgré une difficulté à maintenir durablement un épisode de veille. Les réseaux neuronaux responsables de la genèse de l'état de veille pourraient être déficients.

L'augmentation importante de sommeil lent (SL) observée en phase terminale de la maladie s'explique principalement par la recrudescence du nombre d'épisodes de SL puisque la durée moyenne de ces épisodes n'est que faiblement diminuée. Cette observation peut s'expliquer par une optimisation des processus en rapport avec le déclenchement du sommeil.

Des études complémentaires permettraient de préciser si les perturbations observées sont dues à un système de maintien de l'état de veille défaillant malgré un processus de déclenchement de l'éveil efficace et/ou un effet facilitateur sur le système de déclenchement du sommeil à ondes lentes, par action directe sur les réseaux neuronaux concernés ou indirectement au travers des processus médiés par les cytokines.

Une diminution du sommeil lent léger au profit du sommeil lent profond est observée au quinzième jour post-infection aussi bien en condition de lumière que d'obscurité. Ce résultat est d'une importance capitale puisqu'il objective, dans une trypanosomose expérimentale, un appauvrissement de la qualité du sommeil proportionnel à la sévérité des signes cliniques. En outre

cette anomalie est concomitante de l'apparition des perturbations concernant le nombre et de la durée moyenne des épisodes de veille et de sommeil lent.

Le fait que les intervalles entre les épisodes de sommeil lent diminuent de façon importante, met en évidence une fragmentation excessive du sommeil durant l'évolution de la trypanosomose expérimentale ; phénomène précédemment décrit chez le rat infecté par *T. b. brucei* (Montmayeur et Buguet, 1994) et objectivé par la proportion grandissante de SLL au détriment du SLP observée chez notre modèle expérimental. Notre étude révèle des altérations importantes qui concernent spécifiquement les séquences de sommeil lent-sommeil paradoxal (SL-SP). Une forte réduction de la latence d'apparition du sommeil paradoxal, définie comme la durée de l'épisode de sommeil lent qui précède l'apparition de SP est observée quatorze jours après infection, simultanément à l'avènement des troubles précédemment décrits. Cette diminution de latence SP renforce l'argument selon lequel la capacité de maintien du sommeil synchronisé est altérée, comme il a déjà été rapporté dans une précédente expérimentation conduite chez le rat infecté par *T. b. brucei* (Grassi-Zucconi et coll., 1995 ; Bentivoglio et coll., 1994a).

Les paramètres mesurés en sommeil paradoxal (SP) restent inchangés au cours de l'évolution de la maladie. Cette constance singulière souligne le fait que les mécanismes sous-tendant le SP ne sont pas altérés. Ainsi, les réseaux neuronaux responsables du maintien et du déclenchement des épisodes de SP semblent préservés indépendamment du caractère défaillant de l'éveil.

La perturbation de la structure interne du sommeil trouve aussi son expression dans la présence de transitions anormales, en particulier l'apparition d'endormissements directs en SP (SOREMP, Sleep onset REM periods). Ces transitions sont apparues au quinzième jour post-infection en concomitance avec les perturbations architecturales de la veille et du sommeil déjà abordées. L'étude électroencéphalographique que nous avons menée avec notre modèle est la première à mettre en évidence en trypanosomose expérimentale de tels troubles qui sont une caractéristique récurrente tardive de la phase méningo-encéphalitique de patients trypanosomés (Buguet et coll., 1989). Cette observation conforte l'intérêt de notre modèle.

Les changements quantitatifs de l'activité veille-sommeil s'accompagnent également d'importantes altérations qualitatives des tracés EEG. La première d'entre elles est l'apparition de paroxysmes d'ondes lentes hypersynchrones anormales en SL et la diminution concomitante des spindles, dès la seconde semaine post-infection, phénomènes qui s'accroissent avec le temps.

En plus de la caractérisation des diverses anomalies, notre étude a permis d'améliorer la connaissance de la cinétique d'apparitions des perturbations. La force de notre modèle repose

notamment sur la simultanéité de manifestation des altérations en fin de deuxième semaine post-infection qui renforce l'hypothèse de la détermination temporelle de l'entrée en phase neurologique de la maladie. En effet, la diminution de poids et de prise alimentaire définie comme critère de début de phase méningo-encéphalitique a également été observée en fin de deuxième semaine post-infection.

L'analyse spectrale par transformée de Fourier a mis en évidence des perturbations spécifiques intéressant la veille et le sommeil lent dans notre modèle expérimental. La veille présente un profil de répartition spectrale perturbé avec un renforcement des activités dans les bandes de fréquences lentes et une relative diminution d'activités pour les bandes de fréquences rapides. Ainsi, une densité de puissance spectrale plus importante dans la bande de fréquence delta et une diminution concomitante en alpha est observée en rapport avec les valeurs mesurées en période contrôle pré-infection. Cette observation souligne le fait que le sommeil fragmenté, comme l'a montré l'étude qualitative des tracés est interrompu par de la veille « calme » présentant une prévalence pour les fréquences lentes et une incidence moins marquée pour les fréquences rapides. Ce changement de profil spectral en veille est en accord avec l'étude de Grassi-Zucconi et coll. (1995) chez le rat infecté par *T. b. brucei*, entreprise en fin de troisième semaine post-infection avec des enregistrements d'une durée de quatre à six heures respectivement en phase nocturne et diurne. L'analyse spectrale en continu de notre modèle expérimental révèle cependant un changement beaucoup plus précoce, neuf jours après infection et proportionnel à la sévérité de la maladie.

L'analyse spectrale menée avec notre modèle animal objective également une diminution de la densité de puissance spectrale en sommeil lent (SL) qui concerne la bande de fréquence delta, dix jours après infection. Il s'agit de la première démonstration d'un déclin de puissance EEG delta intéressant exclusivement le SL dans l'évolution d'une trypanosomose expérimentale.

L'analyse quantitative de l'EEG exhibe des anomalies du tracé veille-sommeil beaucoup plus précocement qu'avec l'analyse qualitative classique pour notre modèle animal de rats trypanosomés. Il semblerait que l'altération des densités de puissance spectrale soit antérieure à la destructuration du cycle veille-sommeil et à l'apparition d'anomalies de l'architecture interne du sommeil. Ce dernier point n'est cependant pas certain dans la mesure où l'analyse spectrale est une méthode beaucoup plus sensible que l'interprétation visuelle classique des tracés.

Les perturbations observées à l'analyse spectrale pourraient constituer une indication précoce de l'initiation de la phase méningo-encéphalitique et l'analyse spectrale une méthode de choix pour le diagnostic des prémices de l'atteinte veille-sommeil.

Publication 3

Sleep. 2004 Feb; 27(1): 42-46.

Twenty-Four–Hour Disruption of the Sleep-Wake Cycle and Sleep-Onset REM-Like Episodes in a Rat Model of African Trypanosomiasis.

Annabelle Darsaud, Ph.D.^{1,2}; Lionel Bourdon, M.D., Ph.D.¹; Sarah Mercier, Ph.D.¹; Florian Chapotot, Ph.D.¹; Bernard Bouteille, Ph.D.²; Raymond Cespuglio, Ph.D.³; Alain Buguet, M.D., Ph.D.^{1,4}

¹Centre de recherches du Service de santé des armées, département des facteurs humains, B.P. 87, F-38702 La Tronche cedex, France; ²Institut d'épidémiologie neurologique et de neurologie tropicale, UPRES EA3174, Faculté de médecine, 2, rue du Docteur-Marcland, F-87025 Limoges cedex, France; ³Unité INSERM U480, Université de Lyon I, 8 avenue Rockefeller, F-69373 Lyon cedex 08, France; ⁴Institut de médecine tropicale du service de santé des armées – Le Pharo, B.P. 46, F-13998 Marseille Armées, France

Study Objectives: Patients with human African trypanosomiasis (sleeping sickness) due to the inoculation of *Trypanosoma brucei gambiense* or *rhodesiense* show a major disruption of the 24-hour sleep-wake distribution, accompanied by the occurrence of sleep-onset rapid-eye-movement (REM) sleep episodes, proportional to the severity of the illness. Although animal models of human African trypanosomiasis have been developed to understand the pathogenic mechanisms leading to immune alterations, the development of an animal model featuring the alterations of endogenous biologic rhythms remains a necessity.

Animals: Sprague-Dawley rats (N = 10) entrained to a 12:12-hour dark-light regimen.

Interventions: Rats were infected with *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.1E and instrumented with electrocorticographic and electromyographic electrodes. Polysomnography was recorded continuously from 2 days before infection until the animal's death.

Measurements and Results: The analysis of the spontaneous sleep-wake architecture revealed an increased proportion of slow-wave sleep (SWS) and a decreased amount of wakefulness 2 days before death. Considerable sleep fragmentation was observed in the infected rats, with numerous

changes in sleep-wake stages and an increased number of episodes of wakefulness and SWS. Infected rats presented a fragmented pattern of SWS and a marked reduction in the mean paradoxical-sleep (PS) latency, resulting in a considerable disruption of the PS-SWS sequences. Abnormal transitions, particularly the appearance of sleep-onset REM episodes, marked the disruption of the internal sleep structure. The electrocorticogram traces were modified during SWS, with the occurrence of abnormal hypersynchronous slow waves and a disappearance of spindles.

Conclusion: The *Trypanosoma brucei brucei*-infected rat is a good model of the syndrome seen in human African trypanosomiasis, ie, the 24-hour disruption of the sleep-wake cycle and the occurrence of sleep-onset REM-like sleep episodes.

PUBLICATION 4

Soumis à Neurosciences

Time-related changes in spectral analysis of the EEG in freely moving rats infected with *Trypanosoma brucei brucei*.

A. Darsaud^{1,2}, L. Bourdon¹, S. Mercier¹, F. Chapotot¹, B. Bouteille², M. Dumas² and A. Buguet³

¹Centre de recherches du Service de santé des armées, département des facteurs humains, B.P. 87, F-38702 La Tronche cedex, ²France Institut d'épidémiologie neurologique et de neurologie tropicale, UPRES EA3174, Faculté de médecine, 2, rue du Docteur-Marcland, F-87025 Limoges cedex, ³France Institut de médecine tropicale du service de santé des armées – Le Pharo, B.P. 46, F-13998 Marseille Armées, France

DISCUSSION

7. Les perturbations ramenées à la mécanistique globale des réseaux en rapport avec l'activité veille-sommeil

Ce paragraphe ne se veut pas exhaustif mais souligne les possibles relations entre les réseaux neuronaux impliqués dans l'activité veille-sommeil et les perturbations décrites dans notre modèle expérimental.

Pour comprendre les perturbations que nous avons mises en évidence après infection à *T. b. brucei*, intéressons-nous à la trame de réseaux neuronaux qui interviennent dans la genèse et la régulation des états de vigilance. Il s'agit d'un ensemble de régulations complexes mettant en jeu un nombre important de réseaux neuronaux très diversifiés. Cet ensemble peut être subdivisé en divers sous-groupes neuronaux relativement bien individualisés, avec cependant des éléments communs en interface.

7.1. Atteinte du réseau de déclenchement et de maintien de l'éveil

L'analyse qualitative des tracés met l'accent sur une perturbation touchant le stade d'éveil. Le nombre d'épisodes d'éveil augmente, alors que la durée moyenne de ces épisodes diminue de manière importante, aussi bien en condition de lumière que d'obscurité. Les rats infectés présentent une difficulté à maintenir durablement un épisode d'éveil, cependant le processus de déclenchement de l'éveil reste efficient. Il semblerait donc que les réseaux neuronaux responsables de la genèse de l'état de veille soient préservés et ceux impliqués dans le maintien de l'éveil altérés.

Au cours de l'éveil, l'EEG se caractérise par une activité électrique dite désynchronisée, de bas voltage (environ 5 μ V) et de haute fréquence. Elle est essentiellement constituée d'ondes rapides de 15 à 60 Hz, incluant les ondes β et γ (autour de 40 Hz). L'analyse spectrale des tracés EEG par la méthode de transformée de Fourier met en évidence un changement de profil de l'éveil avec une diminution de densités de puissance spectrale pour les bandes de fréquences rapides et une augmentation pour les bandes de fréquences lentes.

La persistance des puissances spectrales de l'éveil après infection à *T. b. brucei* est en faveur de la préservation des structures à l'origine des rythmes corticaux rapides avec cependant un dérèglement en relation avec une activité spectrale diminuée en bandes de fréquences rapides et augmentée en fréquences lentes.

Les ondes β et γ caractéristiques de l'éveil attentif sont recueillies et générées au moins en partie au niveau du néocortex (Freeman et Van Dijk, 1987 ; Bouyer et coll. 1987 ; Ahissar et Vaadia, 1990 ; Bressler, 1990). Llinas et coll. (1991) ont en effet rapporté que les neurones de la couche IV corticale possèdent la propriété intrinsèque d'engendrer des potentiels d'action rythmiques de fréquence comprise entre 10 et 50 Hz. Des neurones spécifiques de cette couche, «neurones à 40 Hz», GABAergiques, oscillant dans les bandes β et γ pourraient coordonner les populations locales de neurones pyramidaux et engendrer le rythme rapide détecté par l'EEG. Des neurones thalamo-corticaux et réticulaires thalamiques présentent également une fréquence de décharge voisine de 40 Hz et pourraient contribuer à la genèse des ondes β et γ (Pinault et Deschênes, 1992). Enfin, d'autres structures impliquées dans l'éveil pourraient déclencher ou moduler ces oscillations rythmiques. Le télencéphale basal, l'hypothalamus postérieur, les systèmes cholinergiques mésopontins, noradrénergiques du locus coeruleus, sérotoninergiques du raphé et la formation réticulée mésencéphalique pourraient également contribuer à la genèse des rythmes rapides puisque des enregistrements électrophysiologiques *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'oscillation à 40 Hz au niveau du thalamus peut être modulée par des afférences ascendantes cholinergiques et aminergiques (Pinault et Deschênes, 1992). La diversité des structures et réseaux impliquée dans l'apparition des rythmes corticaux de veille ne permet pas de caractériser une zone définie d'atteinte en rapport avec le changement de profil spectral de veille.

Les neurones cholinergiques du télencéphale basal envoient des projections diffuses au cortex et aux noyaux thalamiques (Mesulam et coll. 1983 ; Woolf et Butcher, 1986 ; Levey et coll. 1987). La stimulation électrique de ces neurones cholinergiques est éveillante et sa lésion par l'acide iboténique entraîne l'apparition d'ondes lentes chez le rat (Buzsaki et coll. 1988). L'enregistrement de l'activité unitaire des neurones de cette structure a révélé qu'une majorité de neurones sont actifs pendant l'éveil. La lésion des réseaux neuronaux cholinergiques du télencéphale basal pourrait expliquer les troubles de l'éveil observés et constituer une hypothèse de travail.

La stimulation électrique de l'hypothalamus postérieur augmente l'éveil. Sa lésion chimique ou électrolytique est responsable de l'apparition d'une hypersomnie accompagnée d'ondes lentes chez le chat (Sallanon et coll. 1988 ; Denoyer et coll. 1991). Cette structure synthétise l'histamine, que de nombreuses données pharmacologiques désignent comme un neurotransmetteur capable de stimuler

l'éveil (Lin et al. 1986 ; 1988 ; 1990 ; McCormick et Williamson, 1989 ; McCormick, 1992). Ce neurotransmetteur dépolarise les neurones relais au niveau du thalamus favorisant ainsi la transmission des informations sensorielles vers le cortex (McCormick et Williamson, 1991). Enfin, certains neurones enregistrés dans l'hypothalamus postérieur et possédant les mêmes caractéristiques électrophysiologiques que les neurones histaminergiques, présentent une activité tonique pendant l'éveil qui diminue au cours du sommeil (Vanni-Mercier et coll. 1984). L'hypothèse d'une atteinte de l'hypothalamus postérieur au travers du réseau de libération et de projection de l'histamine peut être avancée. A notre connaissance aucune étude n'a porté sur l'histologie des neurones synthétisant l'histamine et le dosage éventuelle de cette substance.

L'atteinte de la formation réticulée mésencéphalique (FRM) et de ces projections sur les neurones thalamo-corticaux pourrait également être avancée. Les neurones se projettent massivement sur les noyaux thalamiques mais pas directement sur le cortex chez le chat et le rat (Jones et Yang, 1985 ; Satoh et Fibiger, 1986 ; Smith et coll. 1988 ; Steriade et coll. 1988). La stimulation des neurones de la FRM déclenche un éveil prolongé, probablement par une action excitatrice sur les neurones thalamo-corticaux (Steriade et Glenn, 1982). Le ou les neurotransmetteurs responsables ne sont pas identifiés formellement.

Les neurones des noyaux raphé dorsal et médian en majorité sérotoninergiques, projettent sur l'ensemble du cerveau antérieur, en particulier sur le cortex, le thalamus et l'hypothalamus (Bobillier et coll. 1976 ; Vertes, 1991). Leur activité unitaire régulière de type métronome (pacemaker) pendant l'éveil, diminue pendant le SL, et s'arrête pendant le SP (McGinty et Harper, 1976 ; Trulson et Jacobs, 1979). La concentration extracellulaire de sérotonine, évaluée par microdialyse au niveau du noyau raphé dorsal et de la FRM, est maximale pendant l'éveil, diminue pendant le SL et devient minimale pendant le SP (Iwakiri et coll. 1993 ; Portas et Mccarley, 1994). Le profil de concentration mesurée par voltamétrie différentielle est équivalent pour l'acide 5 hydroxyindolacétique (5-HIAA) (Cespuglio et coll. 1990 ; Houdouin et coll. 1991). *In vitro*, ce neurotransmetteur est capable de moduler l'excitabilité des neurones corticaux et thalamiques par différentes modalités d'action en fonction du type de cellule et des récepteurs 5-HT considérés (excitation/inhibition simple ou facilitation voltage-dépendante). Cet ensemble très complexe de modulations semblerait aboutir à une augmentation du rapport « signal sur bruit » des neurones relais, susceptible d'améliorer le traitement des informations corticales pendant l'éveil (McCormick, 1992). Les noyaux du raphé pourraient avoir un effet neuromodulateur pendant l'éveil, en cela leur atteinte pourrait expliquer les troubles de l'éveil des rats infectés.

L'atteinte des neurones mésopontins cholinergiques peut également constituer une piste de recherche. Les neurones cholinergiques du tegmentum latérodorsal de Castaldi et du tegmentum pédonculopontin se projettent sur les différents noyaux thalamiques chez le chat et le rat (Woolf et Butcher, 1986; Hallanger et coll. 1987 ; Paré et coll. 1988 ; Smith et coll. 1988 ; Steriade et coll. 1988). L'acétylcholine favoriserait la désynchronisation corticale et inhiberait l'apparition des fuseaux par deux actions complémentaires : un effet nicotinique dépolarisant les neurones relais thalamo-corticaux (McCormick et Prince, 1987), et un effet muscarinique inhibiteur sur les neurones du noyau réticulé thalamique à l'origine des fuseaux (McCormick et Prince, 1986). Enfin, chez le chat, la concentration extracellulaire d'acétylcholine évaluée par microdialyse dans le cortex et l'hippocampe, augmente pendant l'éveil et le SP par rapport au SL, et confirme le rôle de ce neurotransmetteur dans la désynchronisation corticale (Marrosu et coll. 1995).

Le noyau du locus coeruleus est constitué essentiellement de neurones noradrénergiques qui envoient des projections diffuses dans l'ensemble du SNC et en particulier vers le cortex et le thalamus (Jones, 1985). La déplétion de la noradrénaline par l' α -méthyl-para-tyrosine entraîne une diminution de la désynchronisation corticale (King et Jewette, 1971). Enfin, l'enregistrement de l'activité unitaire des neurones présumés noradrénergiques contenus dans cette zone, révèle qu'ils déchargent de façon lente et régulière pendant l'éveil calme, et que leur fréquence de décharge augmente sous l'influence des stimuli extérieurs. En revanche, leur activité diminue au cours de l'endormissement et du SL pour s'arrêter complètement pendant le SP (McCarley et Hobson, 1975 ; Aston-Jones et Bloom, 1981 ; Foote et coll. 1983 ; Jacobs, 1985). La noradrénaline induit une dépolarisation des neurones corticaux et une inhibition des noyaux réticulés thalamiques, facilitant ainsi le transfert des informations vers le cortex cérébral (McCormick et Prince, 1988 ; McCormick et Williamson, 1989). Le réseau noradrénergique du locus coeruleus peut également avoir des répercussions sur l'éveil et expliquer les troubles observés dans notre étude.

7.2. Atteinte du sommeil lent

L'augmentation drastique du nombre d'épisodes de sommeil lent s'accompagne d'une diminution limitée mais néanmoins significative de la durée moyenne de ces épisodes. Cette observation peut s'expliquer par une optimisation des processus en rapport avec le déclenchement du sommeil. L'augmentation importante de SL observée en phase terminale de la maladie est principalement due à l'augmentation du nombre d'épisodes de SL puisque la diminution de la durée moyenne de ces épisodes bien que significative, apparaît modérée.

Le sommeil lent se caractérise par une activité corticale dite synchronisée. Au cours du SL, l'EEG est de basse fréquence et de haut voltage (de l'ordre de 10 μ V). Les ondes δ (0.4 à 2.5 Hz) prédominent, entrecoupées de fuseaux (ondes de 7 à 14 Hz d'une durée de quelques secondes).

L'enregistrement des fuseaux dans les noyaux intralaminaires du thalamus chez le chat ayant subi une décortication bilatérale et une section au niveau de la partie rostrale du tronc cérébral a démontré la genèse thalamique de ces ondes (Morison et Bassett, 1945). Les fuseaux observés au cours du SL sont engendrés au niveau du thalamus puis transmis vers le cortex. L'ablation totale du cortex laisse apparaître des fuseaux intacts dans le thalamus, tandis qu'à l'inverse, la lésion du thalamus supprime ce rythme dans le cortex (Morrison et Bassett, 1945 ; Villablanca, 1974). Plus précisément, le générateur des fuseaux semble être le noyau réticulé thalamique, puisque ce noyau isolé *in vivo* présente toujours des oscillations à 7-14 Hz (Steriade et coll. 1987), tandis que sa destruction supprime les fuseaux corticaux (Steriade et coll. 1985). Cette oscillation rythmique pourrait provenir de l'activité intrinsèque "pacemaker" des neurones réticulés thalamiques GABAergiques, probablement grâce à l'activation d'un courant calcique à bas seuil, qui se propagerait aux neurones relais thalamo-corticaux puis au cortex (Steriade et Llinas, 1988 ; Steriade, 1992 ; 1993). Ces cellules imposeraient ainsi aux neurones thalamocorticaux, via des PPSI (potentiels post-synaptiques inhibiteurs) une inhibition rythmique bloquant le transit des informations sensorielles vers le cortex (Steriade, 1990).

L'origine exacte des ondes δ n'est pas clairement définie. Il a été suggéré que cette activité lente résulterait de l'addition des EPSP et des IPSP des neurones corticaux (Rappelsberger et coll. 1982), parmi lesquels des neurones de la couche V qui pourraient décharger en bouffées de potentiels d'action à une fréquence proche du rythme δ (Agmon et Connors, 1989 ; Chagnac-Amitai et coll. 1990 ; Silva et coll., 1991). Les ondes lentes, également détectées dans les structures subcorticales, apparaissent être générées dans le néocortex puisqu'elles persistent après lésions bilatérales du thalamus et disparaissent après néodécortication (Jouvet, 1962 ; Stériade et coll., 1988 et 1993). Cependant, d'autres structures sous corticales sont mises à contribution. L'apparition du SL et des ondes lentes nécessite l'arrêt des systèmes activateurs ascendants situés dans la formation réticulée mésencéphalique, et dépend de l'intégrité du système sérotoninergique des noyaux du raphé dorsal et médian ainsi que des neurones de l'aire préoptique.

L'apparition d'ondes lentes hypersynchrones anormales et la diminution concomitante des fuseaux de sommeil des rats infectés peuvent s'expliquer par la perturbation des réseaux neuronaux qui contribuent à la génération et à la régulation du SL, en particulier le groupe constitué du cortex et du noyau réticulé du thalamus. Des études complémentaires préciseraient si les changements

qualitatifs observés sont en relation avec des lésions fonctionnelles des réseaux thalamo-corticaux et/ou une altération de l'intégrité du noyau réticulé thalamique. La diminution de densité de puissance spectrale observée dans notre modèle spécifiquement en sommeil lent appuie cette hypothèse d'atteinte des connexions et/ou des structures thalamo-corticales.

La perturbation de la structure du sommeil lent (SL) intéressant le nombre et la durée des épisodes SL et la disparition des grapho-éléments spécifiques de cet état s'accompagnent d'une hypersomnie tardive observée en phase terminale de la maladie. Les structures et réseaux impliqués dans la régulation du SL pourraient faire l'objet de dommages aggravés en fin de vie.

La 5-HT serait impliquée dans les mécanismes d'apparition du SL. Il a été montré que les fibres 5-HT de l'hypothalamus proviennent des noyaux antérieurs du raphé (Bobillier et coll., 1976 ; Vertès, 1991 ; Sakai et coll., 1990). L'administration de 5-hydroxytryptophane (5-HTP), le précurseur immédiat de la sérotonine, diminue la latence d'apparition du SL et du SP (Wojcik et coll. 1980). L'injection intratissulaire de 5-HTP, précurseur de la sérotonine, dans l'hypothalamus antérieur induit l'apparition du SL et du SP chez l'animal prétraité à la p-CPA (para-chlorophénylalanine) (Denoyer et coll., 1989). La facilitation du SL par la sérotonine pourrait s'exprimer au niveau de l'aire préoptique puisque dans le modèle du chat rendu insomniaque par la pCPA, l'administration locale de 5 HTP dans cette structure rétablit le sommeil (Denoyer et coll. 1989). La sérotonine libérée pendant l'éveil stimulerait la synthèse de peptides facilitant le sommeil, comme le corticotropin-like-intermediate-lobe peptide (CLIP), la dimethyl- α -melanocyte-stimulating hormone (des- α -MSH) ou le vasoactive intestinal peptide (VIP) (Chastrette et coll. 1990 ; El Kafi et coll. 1994). Le lien entre ces différents peptides, leurs actions spécifiques et les cibles potentielles restent encore à établir, cependant le noyau raphé et la sérotonine peuvent expliquer les perturbations rencontrées, notamment l'augmentation de la proportion de SL et l'apparition d'endormissement direct en SP (SOREMP). Ainsi, l'atteinte du raphé dorsal dans sa composante sérotoninergique pourrait apporter une explication à la favorisation du SL et des SOREMP des rats infectés. Ce point sera abordé ultérieurement dans la discussion.

L'aire préoptique est une structure impliquée dans l'apparition du sommeil lent. La stimulation électrique de la région préoptique engendre des ondes lentes corticales accompagnées d'un comportement de sommeil (Serman et Clemente, 1962). Le neurotransmetteur impliqué dans la facilitation du SL par les neurones de l'aire préoptique, pourrait être le GABA (Lin et coll., 1989 ; Kitahama et coll., 1989 ; Gritti et coll. 1994). La stimulation électrique ou chimique par des agonistes cholinergiques, de l'aire préoptique et de la bande diagonale de Broca engendre du SL accompagné d'ondes lentes corticales (Serman et Clemente, 1962 ; Hernandez-Peon et Ibarra,

1963). De plus, la lésion chimique ou électrolytique bilatérale de la région préoptique supprime le sommeil pendant environ trois semaines chez le chat (McGinty et Serman, 1968 ; McGinty, 1969 ; Szymusiak et McGinty, 1986 ; Sallanon et coll. 1989 ; Szymusiak et Satinoff, 1985) et augmente fortement la quantité d'éveil (Szymusiak et Satinoff, 1985). Cette dernière caractéristique est en faveur de l'intégrité de la région préoptique des rats infectés au cours de la trypanosome expérimentale.

7.3. Perturbations intéressant les mécanismes de déclenchement du SP

Les tracés enregistrés en SP ne présentent pas de perturbation aussi bien à l'étude qualitative que quantitative. Seul le déclenchement du SP apparaît perturbé avec l'apparition de transition directe Eveil- SP.

Le SP se caractérise par une activité électrique corticale constituée de fréquences rapides et de bas voltage, presque identique à celle de l'éveil, et par des ondes θ hippocampiques. Les données expérimentales de transections complètes avec éviction des structures rostrales au pont, ont montré que les structures essentielles à la genèse des phénomènes phasiques et toniques du SP sont localisées dans le tronc cérébral inférieur (Jouvet, 1962, 1965). En effet, la destruction de l'ensemble des structures rostrales au pont n'affecte pas l'expression des mouvements oculaires, de l'atonie musculaire et des pointes PGO caractéristiques du SP (Jouvet et Michel, 1959 ; Jouvet, 1962). Les structures exécutives du SP sont ainsi localisées dans le tronc cérébral à l'exception de l'hypothalamus postérieur qui semblerait être impliqué dans les phénomènes d'activation corticale. Par la suite, des neurones spécifiquement actifs (SP-on) ou inactifs (SP-off) pendant le SP ont été identifiés. Les neurones SP-off, présents dans les noyaux monoaminergiques du tronc cérébral et de l'hypothalamus, représentent les systèmes permissifs alors que les neurones SP-on sont liés aux systèmes exécutifs et sont localisés au niveau du tegmentum pontique dorsal (McGinty et coll. 1974 ; Sakai, 1985 ; 1985 ; 1989). L'apparition du SP est interprétée comme la conséquence de l'interaction de ces deux réseaux, soit par une inhibition réciproque des systèmes SP-on et SP-off (Sakai, 1985 ; 1985 ; 1989), soit par une action inhibitrice directe des neurones SP-off sur les neurones SP-on, lesquels agiraient progressivement en retour sur les neurones SP-off au cours du SP, jusqu'au retour de l'éveil (Hobson et coll. 1974 ; 1975).

Le SP apparaît lorsque les systèmes permissifs sérotoninergiques sont complètement silencieux (Fornal et Jacobs, 1988) et que l'activité des neurones noradrénergiques situés dans le tronc cérébral inférieur est réduite (Jacobs, 1985).

Les neurones de la partie ventrolatérale et dorsolatérale de l'hypothalamus postérieur présentent une fréquence de décharge augmentée pendant l'éveil et le SP par rapport au SL (Vanni-Mercier et coll. 1984 ; Sakai, 1991) et pourraient donc jouer un rôle dans la désynchronisation corticale observée pendant le SP. L'hypothalamus postérieur pourrait être une cible potentielle expliquant les perturbations du système de déclenchement du SP.

La lésion électrolytique bilatérale de la substance grise périaqueducale (PAG) et d'une partie de la formation réticulée pontomésencéphalique est responsable d'une hypersomnie en SP et en SL pendant près d'une semaine (Petitjean et coll. 1975). De plus, l'injection de muscimol dans la partie ventrolatérale de la PAG induit une augmentation importante de SP qui indique que cette structure pourrait exercer une influence inhibitrice vis à vis de cet état de sommeil (Sastre et coll., 1996). La facilitation du SP anormale dans notre étude pourrait être en faveur d'une atteinte de la PAG.

Les neurones cholinergiques du tegmentum pontique, impliqués dans la désynchronisation corticale pendant l'éveil, pourraient aussi jouer un rôle actif pendant le SP. En particulier, des neurones spécifiques du tegmentum pontique possèdent une décharge tonique rapide pendant l'éveil, qui ralentit pendant le SL et s'accélère à nouveau pendant le SP (neurones de type 1 rapide ou type 1-R), d'autres possèdent un profil de décharge similaire, avec cependant des fréquences plus lentes (neurones de type 1 lent). Enfin, une autre population de neurones baptisée « PGO-on », située dans cette région, possède une activité électrique corrélée aux décharges d'ondes PGO (Sakai, 1985). Les neurones de type 1-R et PGO-on possèdent les caractéristiques électrophysiologiques des neurones cholinergiques (El Mansari et coll. 1989 ; 1990). Les neurones cholinergiques du tegmentum pontique au travers d'une perturbation des populations neuronales existantes au sein de cette structure pourrait expliquer l'apparition abusive anormale de SP. Le trypanosome et /ou les agents de la réponse immunitaire pourrait mettre à mal l'intégrité de ces neurones ainsi que leurs réseaux de connexions et d'interrelations.

Les neurones du complexe coerulein se projettent sur le thalamus et l'hypothalamus (El Mansari et coll. 1990) et pourraient participer aux mécanismes de désynchronisation corticale observés pendant le SP. De plus, la lésion du noyau périlocus α supprime l'atonie musculaire caractéristique du SP (Jouvet et Delorme, 1965 ; Henley et Morrison, 1974 ; Sastre et Jouvet, 1979 ; 1981 ; Sakai et coll. 1981). Ce noyau contient des neurones SP-on qui pourraient, chez le chat, projeter sur les noyaux magnocellulaires et parvocellulaires bulbaires inhibiteurs des motoneurones (Sakai et coll. 1979 ; 1981 ; Hancock et Fougousse, 1976). La microscopie électronique a par ailleurs permis d'observer des contacts synaptiques entre les neurones du périlocus α et les neurones réticulospinaux de la formation réticulée ponto bulbaire, responsables de l'atonie musculaire chez le chat (Nakamura et

coll. 1990). La facilitation du SP au cours de la trypanosome expérimentale pourrait venir d'une activité accrue anormale des neurones SP-on des noyaux périlocus α et subcoeruleus.

Les noyaux réticulés parvocellulaire et magnocellulaire bulbaires projettent sur la formation réticulée mésencéphalique, l'hypothalamus postérieur et le thalamus (Steriade et coll. 1984 ; Sakai et coll. 1990), ainsi que sur les motoneurones crâniens (Fort et coll. 1989, 1990) chez le chat. Chez le rat, les neurones glycinergiques des noyaux gigantocellulaires, structure équivalente au noyau magnocellulaire du chat se projettent sur les motoneurones crâniens et spinaux (Holstege et Bongers, 1991 ; Rampon et coll. 1996). Ces neurones pourraient être responsables de l'atonie musculaire pendant le SP car la stimulation du noyau magnocellulaire chez le chat, entraîne une hyperpolarisation des motoneurones spinaux (Soja et coll. 1991). De plus, ce noyau contient des neurones de type 1-R et d'autres, présentant une décharge lente régulière pendant l'éveil, qui s'accélère pendant le SL et surtout pendant le SP (type II) (Steriade et coll. 1984 ; Sakai, 1991). Le processus de déclenchement du SP défaillant au cours de l'infection pourrait également provenir d'une perturbation des noyaux réticulés parvocellulaires et gigantocellulaires.

Des études complémentaires sur notre modèle permettraient de conclure si les perturbations observées sont dues à un système de maintien de l'état de veille défaillant et/ou un effet facilitateur sur le système de déclenchement du sommeil à ondes lentes, par action directe sur les neurones concernés ou indirectement au travers des processus médiés par les cytokines. L'étude de l'intégrité des neurones SP-on et SP-off des structures SP-on et SP-off préciserait l'origine du processus anormal facilitateur de déclenchement du SP.

8. Hypotheses avancées dans la compréhension des troubles observés

La diminution de la prise alimentaire et les perturbations du cycle veille-sommeil peuvent présenter de multiples causes liées d'une part à la présence du parasite dans le SNC et d'autre part à l'action des agents immunitaires formés au cours de l'infection. Ainsi chaque acteur du réseau régissant le

comportement de prise alimentaire et l'alternance veille-sommeil peut constituer une cible potentielle d'atteintes perturbatrice ou lésionnelle. En raison de la multiplicité des intervenants inhérents à chaque système physiologique aboutissant à la réponse comportementale (prise alimentaire et sommeil), la perturbation des résultats de l'étude sera discutée à la lumière des données neuropathologiques et histologiques expérimentales et cliniques de la THA.

8.1. Les cibles potentielles du SNC

8.1.1. Arguments en faveur de l'atteinte de l'hypothalamus

Chez la majorité des mammifères, les rythmes circadiens sont imposés par un système complexe : l'horloge biologique interne (Murphy et Campbell, 1996 ; Mick et Jouvet, 1993 ; Moore, 1993). L'élément central est un petit groupe de quelques milliers de neurones situé dans l'hypothalamus antérieur, en arrière du chiasma optique, formant le noyau suprachiasmatique (NSC) (Meijer & Rietveld, 1989). Sa destruction provoque une disparition irréversible des rythmes circadiens de l'alternance veille sommeil, de l'activité locomotrice (Refinetti et coll., 1994) ou de la rythmicité endocrinienne. Ce noyau agit à la manière d'un pacemaker qui par son activité propre et via ses connexions, entraîne les différents rythmes. Jouant un rôle prédominant en tant que principal générateur des rythmes circadiens (Moore, 1983), le NSC est synchronisé par la lumière au travers d'afférences directes provenant de la rétine (Meijer et Rietveld, 1989). L'alternance lumière obscurité est transmise au NSC par des fibres nerveuses rétino-hypothalamiques, issues de neurones rétiniens spécifiques. Les afférences géniculo-hypothalamiques jouent également un rôle très similaire mais d'une importance moindre. Dans certaines pathologies avec destruction de la rétine, cette faculté de se recaler sur l'alternance jour-nuit disparaît déterminant une évolution en libre cours des rythmes circadiens. La mélatonine sécrétée par l'épiphyse joue également un rôle régulateur (Cassone et coll., 1993). Le NSC est actuellement considéré comme un chef d'orchestre dirigeant plusieurs oscillateurs qui calqueraient leurs activités sur la sienne. Des études conduites de lésions spécifiques ont indiqué que le NSC est impliqué dans la régulation du cycle veille-sommeil chez le rat (Ibuka et coll., 1977), et que l'action du NSC pourrait être altérée au cours de la trypanosomose (Lundkvist et coll., 1998).

L'implication d'un dysfonctionnement hypothalamique, en particulier du NSC pourrait expliquer la dysrythmie circadienne de l'alternance veille-sommeil mise en évidence dans notre étude. Un autre

argument vient appuyer l'hypothèse de l'atteinte spécifique du NSC. La réduction de la densité de puissance spectrale dans la bande de fréquence delta exclusivement en sommeil lent observée dans notre modèle est en faveur de la lésion de ce noyau. En effet, une étude de l'analyse spectrale des tracés EEG après lésion spécifique du NSC montre une réduction significative de la puissance EEG delta intéressant uniquement le sommeil lent, constituant la caractéristique majeure de la lésion du NSC (Bergmann et coll., 1987).

Chez les rongeurs, il a été montré que le trypanosome envahit les organes circumventriculaires précocement durant l'infection et est détecté dans l'éminence médiane de l'hypothalamus (Schultzberg et coll., 1988). L'antigène de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité est produit durant l'infection dans les noyaux paraventriculaires et supraoptiques hypothalamiques (Schultzberg et coll., 1989). En plus de cette caractéristique pathologique, l'expression du gène précoce *c-fos* est dérégulée pendant le cycle veille-sommeil dans le noyau suprachiasmatique (NSC) de l'hypothalamus chez les rats trypanosomés (Bentivoglio et coll., 1994). Ce facteur régulateur de la transcription est activé chez l'animal sain par la stimulation lumineuse au cours de la phase d'activité de l'animal, surtout dans la partie ventrolatérale du NSC qui reçoit l'essentiel des fibres rétino-hypothalamiques (Earnest et Olschowska, 1993). Le mécanisme physiopathologique de ce dérèglement n'est pas clairement défini. La prédominance des lésions inflammatoires à la base du crâne et la présence de trypanosomes proche de l'hypophyse peuvent être évoquées. Il a été récemment démontré que l'activité post-synaptique spontanée du NSC est fortement diminuée en fréquence chez des rats infectés par *T. b. brucei* (Lundkvist et coll., 2002) ce qui suggère une altération sélective de la transmission synaptique glutamatergique.

L'hypothalamus joue un rôle clé dans la régulation de la prise alimentaire. Bien que l'hypothalamus n'opère pas de façon autonome dans le contrôle de la prise alimentaire, il joue un rôle primordial en effectuant des ajustements quantitatifs et qualitatifs appropriés de la prise alimentaire et des appétits spécifiques en réponse aux informations sensorielles et métaboliques complexes qu'il reçoit et qui sont fonction de l'état nutritionnel de l'organisme. Il intègre les informations nerveuses provenant des structures limbiques ou du tronc cérébral et les informations humorales par des récepteurs à différentes hormones et métabolites. Les aires hypothalamiques ventromédianes (VMH), latérales (LHA) et le noyau paraventriculaire (PVN) sont plus particulièrement impliquées. Des lésions du PVN augmentent la prise de nourriture (Leibowitz et coll., 1981) et l'injection de peptides anorexigènes dans cette structure inhibe la prise de nourriture (Morley, 1987). Le VMH et le LHA contiennent des neurones qui sont sensibles à des variations de certains facteurs métaboliques, comme la glycémie, et qui participent à la régulation de la prise de nourriture et au maintien de l'équilibre énergétique (Oomura, 1988). Les neurones sensibles au glucose de l'hypothalamus latéral

diminuent leur activité après une application électrophorétique de glucose, contrairement aux neurones glucorécepteurs de l'hypothalamus ventromédian qui ont une activité accrue dans les mêmes conditions. Ces deux types de neurones hypothalamiques sont également sensibles à une grande variété de facteurs solubles dont le taux plasmatique peut varier au cours de l'infection : acides gras libres, acides aminés, intermédiaires métaboliques (corps cétoniques), peptides et hormones (Oomura, 1983). Ils répondent en particulier à l'insuline, le glucagon, la calcitonine, la sérotonine et les opioïdes (Morley, 1987 ; Plata-Salaman et coll., 1986).

L'atteinte de l'hypothalamus, de ses voies de communication ou des informations sensorielles et métaboliques qu'il reçoit pourrait expliquer la dysrythmie circadienne de la veille et du sommeil ainsi que la diminution de prise alimentaire qui prend effet à des dates post-infection comparables.

8.1.2. Atteinte du noyau raphé dorsal

Le rat infecté par *T. b. brucei* présente un dérèglement de l'activité du proto-oncogène *c-fos* dans le NSC (Peng et coll., 1994 ; Bentivoglio et coll., 1994b) et une altération d'activité synaptique glutamatergique de ce noyau (Lundkvist et coll., 2002).

Une lésion spécifique du NSC est en fait responsable de la perturbation de l'alternance veille-sommeil de 24h (Mouret et coll., 1978; Rusak et Bina, 1990) et de la perte de sa rythmicité circadienne (Ibuka et Kawamura, 1975). Cependant, les patients atteints de la maladie du sommeil présentent une réversibilité de leur perturbation des rythmes circadiens après traitement, ce qui implique une absence de perte neuronale au moins au stade avancé de l'infection (Buguet et coll., 1989). Une telle réversibilité de l'atteinte des rythmes circadiens de l'alternance veille-sommeil a été démontrée chez le rat après lésion du noyau raphé dorsal (Coindet et coll., 1979). L'implication du raphé dorsal dans la THA est fortement appuyée par les travaux de Okomo-Assoumou et coll. (1995), qui ont mis en évidence une dégénération des fibres sérotoninergiques périventriculaires chez le rat infecté après injection intracérébroventriculaire d'anticorps antitryptophane-like circulants de patients trypanosomés.

Les caractéristiques électrophysiologiques de patients trypanosomés en phase méningo-encéphalitique ont facilité une approche explicative mécanistique des dysfonctionnements. Le fait que les troubles du sommeil s'amendent après traitement n'est pas en faveur d'une destruction de l'horloge biologique, mais d'une altération de son fonctionnement par un mécanisme encore inconnu. Aussi, l'apparition systématique de phases d'endormissement en sommeil paradoxal est en

faveur d'une atteinte du raphé dorsal, probablement dans sa composante sérotoninergique qui possède des projections vers les neurones à Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) du NSC. L'existence d'anticorps anti-tryptophane-like, capables de provoquer une dégénérescence des fibres sérotoninergiques lorsqu'ils sont injectés dans les ventricules latéraux chez le rat (Okomo-Assoumou et coll., 1995), vient étayer cette hypothèse.

La présence d'endormissement direct en sommeil paradoxal (SOREMP) chez notre population de rats trypanosomés pourrait également s'expliquer par la perturbation du noyau raphé dorsal sérotoninergique. Au travers de l'inhibition des neurones sérotoninergiques (Cespuglio et coll., 1981a) ou de la diminution de la libération de sérotonine (Cespuglio et coll., 1990; Houdouin et coll., 1991), le noyau raphé dorsal est largement impliqué dans le déclenchement du SP (El-Kafi et coll., 1994). Le VIP (vasoactive intestinal peptide) des neurones du NSC reçoit des projections directes de cette structure sérotoninergique (Aghajanian et coll., 1969; Bosler et Beaudet, 1985). Cette observation renforce l'hypothèse récente de l'implication du système sérotoninergique ou de ces voies de communication avec le NSC dans la physiopathologie de la THA (Buguet, 1999).

8.1.3. Anomalies métaboliques

Les neurotransmetteurs catécholaminergiques ou indolaminergiques intervenant dans les mécanismes du sommeil sont synthétisés à partir d'acides aminés précurseurs, le tryptophane pour la sérotonine et la tyrosine pour la dopamine (DA), la L-dopa et la noradrénaline (NA).

Les trypanosomoses expérimentales s'accompagnent de modifications dans le métabolisme des acides aminés aromatiques. Les campagnols infectés avec *T. b. brucei* présentent une diminution importante de la tyrosine et du tryptophane sériques alors que les taux des acides aminés alanine et proline sont augmentés (Newport et coll., 1977). Des modifications dans le contenu des acides aminés ont été constatées dans le cerveau (tyrosine), le foie (tyrosine) et le muscle squelettique (thréonine, glutamate, valine, tyrosine) des campagnols infectés par *T. b. gambiense* (Newport et Page, 1977).

Ces modifications représenteraient une réponse de l'hôte à l'infection parasitaire et/ou seraient liées au métabolisme particulier du trypanosome, en particulier l'absence de mitochondrie fonctionnelle au stade trypomastigote. Elles pourraient retentir sur la synthèse de certains neurotransmetteurs impliqués notamment dans les voies du sommeil.

8.1.3.1. Perturbation de la sérotonine

Le rôle important des indolamines dans les mécanismes du sommeil chez les mammifères a conduit à l'étude des voies métaboliques du tryptophane et de la sérotonine au cours des trypanosomes. Les parasites sont capables de métaboliser le tryptophane en deux métabolites : le tryptophol (indole-3-éthanol) et l'indole-3-lactate (Stibbs et Seed, 1973). Il a été suggéré que le tryptophol produit par les parasites localisés dans le SNC pourrait être responsable du syndrome comportemental observé dans la maladie du sommeil (Tizard et coll., 1978).

Une baisse importante de la sérotonine a été observée dans le tronc cérébral, le thalamus et l'hypothalamus (Stibbs, 1984, Stibbs et Curtis, 1987). Cependant, l'acide hydroxyindole acétique (HIAA), catabolite de la sérotonine ne présente pas d'augmentation dans les régions considérées. Une altération du transport neuronal de la sérotonine peut être envisagée. Le catabolisme de la sérotonine en hydroxytryptophol peut également expliquer l'absence d'augmentation de HIAA dans la région concernée. Le métabolisme du tryptophane par le parasite qui le transforme en tryptophol et en indole-3-acétate et de l'hydroxytryptophane en hydroxytryptophol peuvent également contribuer à la baisse de la synthèse de sérotonine. L'ensemble de ces données montre que le métabolisme du tryptophane est perturbé dans les trypanosomoses africaines (Vincendeau et coll., 1999).

Une étude réalisée par Ormerod et Hussein (1986) a montré que l'infection par les trypanosomes peut aboutir à une destruction des plexus supraépendymaires. De plus, l'infection par les trypanosomes conduit à une diminution significative de la sérotonine dans la région constituée par le cerveau moyen, le thalamus et l'hypothalamus (Amole et coll., 1989) et à l'expression d'Ag de classe 1 du CMH au niveau des noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus, favorisant l'implication de ce dernier dans cette affection. Ces données suggèrent qu'une perturbation peut se manifester en amont de la voie de la neurotransmission sérotoninergique, notamment au niveau du pool libre du tryptophane ou de la transmission du signal sérotoninergique à l'hypothalamus. Ces perturbations peuvent ainsi avoir une incidence sur la synthèse des facteurs hypnogènes dont l'induction est sous le contrôle de l'innervation sérotoninergique.

Les perturbations de la sécrétion de sérotonine peuvent être à l'origine des altérations de la veille et du sommeil observées dans notre modèle. Chez le rat, le traitement avec de la p-CPA, antagoniste spécifique de la sérotonine réduit la densité spectrale dans la bande de fréquence delta (1.25- 4 Hz) en sommeil lent (Tobler et Borbely, 1982). L'analyse spectrale menée lors de notre étude a montré une diminution de la puissance EEG delta intéressant le sommeil lent. La diminution de sérotonine

cérébrale retrouvée dans les trypanosomoses expérimentales pourrait expliquer cette réduction de puissance delta spécifique (Stibbs, 1984).

L'identification d'Ac anti-tryptophane-like au stade tardif des trypanosomoses souligne la présence de perturbations antigéniques dans les voies de neurotransmission sérotoninergique (Okomo-Assoumou et coll., 1995a). La nature exacte des lésions tissulaires et l'incidence de la présence d'Ac anti-tryptophane-like traduisant le mécanisme d'altération du soi ne sont pas clairement identifiés.

Dans le système nerveux central de mammifères, le système sérotoninergique occupe une localisation anatomique stratégique. La majorité des neurones sont localisés dans les noyaux du raphé du tronc cérébral lesquels envoient des terminaisons nerveuses à travers les zones hypothalamiques. Plusieurs travaux (Leibowitz, 1978 ; Leibowitz et coll., 1981 ; Eiden et Brownstein, 1981) ont proposé les noyaux paraventriculaires comme site d'action spécifique des systèmes aminergiques sur les régulations de la prise alimentaire. La technique de microinjection intrahypothalamique des agents sérotoninergiques (Leibowitz et coll., 1988) à des rats ayant des canules chroniques révèlent les effets puissants et sélectifs de la stimulation sérotoninergique centrale sur les séquences alimentaires et le choix des aliments à des doses plus faibles que celles utilisées en injection intrapéritonéale ou intraventriculaire. L'hypothalamus reçoit et intègre des afférences venant des différentes sources reflétant l'état nutritionnel de l'organisme. Des études récentes démontrent le rôle régulateur de la sérotonine en suggérant qu'elle est responsable de la réponse alimentaire à des facteurs liés au rythme circadien (Leibowitz et coll. 1989), à l'exercice (Chaouloff et coll. 1989), à la cholécystokinine (Stallone et coll. 1989) et au contrôle du poids corporel (Gardier et coll., 1989 ; Collin et coll., 2002).

De nombreuses investigations pharmacologiques faisant appel à des agonistes ou antagonistes (Shor-Posner et coll. 1985 ; 1986 ; Weiss et coll. 1990 ; 1991 ; Leibowitz et coll. 1988 ; 1990 ; 1993) permettent de penser que la sérotonine peut jouer un rôle modulateur de l'appétit, en produisant des effets toniques plutôt que des changements brusques et rapides. Ainsi, la diminution spécifique de la sérotonine au cours de la trypanosomose pourrait constituer un argument fort expliquant non seulement les désordres de l'alternance veille-sommeil mais également la diminution de prise alimentaire en deuxième semaine post-infection.

8.1.3.2. Autres perturbations

La fonction dopaminergique a également fait l'objet d'un nombre restreint de recherche faisant appel à différents modèles animaux. Les résultats obtenus sont pour la plupart contradictoires. Dans le noyau caudé de rats infectés par *T. b. gambiense*, une augmentation de la dopamine (DA) et une diminution de 3, 4-dihydroxyphenylacetic (DOPAC), métabolite de DA sont observées (Stibbs, 1984a). Ces constatations suggèrent fortement une dépression du turnover de dopamine. Cependant, une étude complémentaire menée chez le lapin avec *T. b. gambiense* révèle une élévation des taux de DA et de DOPAC au niveau de la région pontique et médullaire, appuyant l'hypothèse d'une synthèse et d'un métabolisme accrus du système dopaminergique (Stibbs, 1984b). Chez la souris infectée par *T. b. gambiense*, les taux de DA et d'acide homovanillique (HVA), métabolite majeur de DA sont augmentés dans de nombreuses structures cérébrales, en particulier le striatum, indiquant une libération importante de DA (Amole et coll., 1989). Le niveau élevé de HVA pourrait être en relation avec une activation non-spécifique de monoamine oxydase (MAO) par le parasite et/ou un de ces composés produits.

La perturbation de la fonction dopaminergique peut également être en cause dans les troubles observés dans notre modèle, cependant le nombre limité d'études et la contradiction de certains résultats ne permettent pas d'affiner la compréhension des mécanismes mis en jeu.

8.2. Mécanismes mis en jeu

8.2.1. Rupture de la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est constituée d'un réseau très spécialisé de cellules endothéliales vasculaires reliées entre elles par des jonctions serrées, unissant les parois latérales de ces cellules vasculaires spécifiques. La BHE au niveau capillaire est composée d'une monocouche de cellules endothéliales, la membrane basale vasculaire, et du prolongement des astrocytes. Ces derniers qui ont une forte capacité de phagocytose jouent le rôle de seconde ligne de défense en association avec la membrane basale.

Les cellules endothéliales de la BHE constituent les interfaces sang/parenchyme cérébral, parenchyme cérébral /LCR, et LCR/sang. La protection du SNC est assurée par la présence des

jonctions serrées à forte résistance, l'absence de pores et l'existence d'enzymes et de systèmes de transport sélectifs qui garantissent l'intégrité et la spécificité des échanges.

Au cours de la THA, la perméabilité capillaire augmente, associée à une fragilité des vaisseaux. (Goodwin et Hook, 1968 ; Goodwin, 1971 ; Schmidt et Bafort, 1987 ; Philip et coll., 1994). Les mécanismes menant à l'altération de la BHE ne sont pas clairement définis. Les conséquences de la libération massive de certains facteurs inflammatoires et de leurs probables interactions avec la THA pourraient aboutir à des modifications intracellulaires des cellules nerveuses ou conduire à des mécanismes de toxicité cellulaire, pouvant expliquer les lésions observées caractéristiques de la pathologie du SNC au cours de la THA. L'altération de la BHE pourrait avoir pour origine la perte des cellules endothéliales ou la modification de leurs caractéristiques de surface et ainsi faciliter l'entrée de molécules néfastes à l'intégrité des neurones et de leur fonctionnement.

Le parasite, par l'intermédiaire des facteurs qu'il sécrète (Tizard et coll., 1978) ou de la pression mécanique qu'il peut exercer par mouvements perturbateurs associés à sa mobilité pourrait rendre compte de la rupture de la BHE. Par ailleurs, il a été montré que *T. congolense* peut adhérer à la surface des cellules endothéliales par des composants localisés à la surface de son flagelle. Une interaction directe du trypanosome et des composants cellulaires de la BHE, en particulier les cellules endothéliales peut influencer sur leur état physiologique, stimuler leur prolifération (Hemphill et coll., 1994) et être à l'origine de l'altération de la BHE. Cette propriété n'est cependant pas partagée pour l'ensemble des espèces de trypanosomes (Hemphill et Ross, 1995).

Un second mécanisme de perturbations de la BHE au cours de la THA peut être envisagé via l'interaction des leucocytes et des cellules endothéliales. De nombreuses pathologies neurologiques s'accompagnent d'une infiltration de leucocytes dans le SNC : lymphocytes dans l'encéphalite autoimmune expérimentale (Hickey et coll., 1991), polynucléaires neutrophiles dans l'ischémie et les traumatismes cérébraux (Feuerstein et coll., 1994). Le passage de ces cellules peut entraîner une atteinte de la BHE et une augmentation concomitante de la perméabilité (Westland et coll., 1999). Le recrutement des lymphocytes intracérébraux nécessite la coopération entre l'endothélium vasculaire central et le lymphocyte par l'intermédiaire de molécules d'adhésion et de cytokines (Couraud, 1994 ; Fabry et coll., 1994). Ainsi, sous l'action de divers stimuli tels que l'IL-1 β , TNF- α et IFN- γ et/ ou de l'interaction directe avec les leucocytes, les cellules endothéliales sont activées. Ces cellules sont alors en mesure d'acquérir des molécules d'adhésion, les molécules du CMH de classe I et II (Bourdoulous et coll., 1993) ou d'augmenter leur expression (Wong et Dorovini-Zis, 1992) mais également de sécréter des cytokines (Fabry et coll., 1994). Cette modification phénotypique et métabolique des cellules endothéliales permet aux lymphocytes activés d'adhérer à

la paroi de l'endothélium qui facilite leur passage trans-endothélial. Les lymphocytes activés peuvent ainsi migrer, interagir avec les cellules du SNC et sécréter des cytokines *in situ*. Les cellules endothéliales cérébrales activées par le même mécanisme agissent sur l'activité des astrocytes périvasculaires et des cellules microgliales (Couraud, 1994).

L'hypothèse la plus probable à la rupture de la BHE repose sur l'effet préjudiciable de médiateurs libérés au cours de l'inflammation (Cerami et Beutler, 1988). L'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α produits au niveau central et périphérique (De Vries et coll., 1996), ainsi que les prostaglandines produites dans le SNC (Alafiatayo et coll., 1994b) peuvent également avoir des effets néfastes sur les cellules endothéliales. La production de prostaglandines D2 dans le LCR ou de cytokines comme le TNF- α est particulièrement élevée au cours de la THA et peut participer à l'altération des cellules endothéliales, et ainsi à la rupture de la BHE (Alafiatayo et coll., 1994).

D'autres médiateurs sécrétés par le trypanosome dont la synthèse est perturbée au cours de la THA, peuvent intervenir. Protéases, acides aminés aromatiques, acides gras saturés (Hambrey et coll., 1981) présentent une forte pathogénéicité. Une activité endotoxinique a également été associée à la présence du parasite (Alafiatayo et coll., 1993 ; Pentreath et coll., 1994). Les LPS sont en effet potentiellement actifs sur les cellules endothéliales, comme ceci a été montré au cours de méningites bactériennes accompagnées de la rupture de la BHE (Dascombe et Milton, 1979 ; Tunkel et coll., 1991).

8.2.2. Passage du parasite dans le SNC

La première explication envisageable de nos résultats repose sur le franchissement de la barrière hémato-encéphalitique par le parasite et/ou par les agents immunocompétents produits au cours de l'infection. Il a été proposé que l'évènement majeur impliqué dans la pathologie de l'infection à *T. brucei* reposait sur la lésion des plexus choroïdes, avec infiltration du trypanosome dans l'espace stromal et l'altération possible de l'épithélium (Pentreath, 1994). Ces perturbations ont été décrites dans différentes études après infection par *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* chez le rongeur et le primate (Van Marck et coll., 1981b ; Rudin et coll., 1983 ; Schmidt, 1983), et avec *T. b. brucei* chez la souris (Keita et coll. 1997). Le parasite a de cette manière accès au LCR et ainsi, au travers de l'espace sous-arachnoïdien, aux extensions périvasculaires (espaces de Virchow Robin) qui s'étendent dans le cerveau. Le trypanosome pourrait ainsi pénétrer dans le parenchyme cérébral. Pour le modèle rongeur, le parasite entre sélectivement dans les zones qui présentent une BHE réduite tels que l'area postrema et les organes circumventriculaires très précocement après infection

(Schultzberg et coll., 1988). Mulenga et coll. (2001) ont récemment observé chez le rat infecté par *T. b. brucei* AnTat 1.1 E la présence de parasites dans le parenchyme cérébral dès le douzième jour post-infection, la majorité de ces parasites étant confinés dans les vaisseaux sanguins cérébraux.

Au niveau du système nerveux central, la pathogénie de la maladie est encore mal cernée. Chez l'homme, il n'a jamais été mis en évidence de parasites dans le parenchyme cérébral, ni de lésions neuronales. Des lésions non spécifiques sont rapportées : infiltrations de cellules inflammatoires dans l'arachnoïde et autour des vaisseaux dans le parenchyme cérébral péri-ventriculaire, présence de cellules de Mott caractéristiques de l'atteinte trypanosomale. Une démyélinisation peut être observée dans les formes les plus évoluées. Ces observations sont issues de pièces d'autopsies provenant de patients morts en phase tardive de la maladie à l'occasion d'une infection intercurrente, ou de patients décédés suite au traitement arsenical.

Aucune observation n'ayant été décrite en phase précoce de la maladie, seules les trypanosomoses expérimentales peuvent fournir des éléments histologiques aidant à la compréhension des mécanismes d'atteinte du SNC (Chirimwami et coll., 1988a). Les parasites sont retrouvés dans le SNC dès les premiers jours après infection de la souris par *T. b. rhodesiense*, essentiellement dans la substance blanche (corps calleux, fornix, commissure antérieure), plus rarement dans la substance grise (hippocampe, noyaux sous-corticaux) rarement dans le cortex. La population parasitaire diminue régulièrement à partir de la première semaine pour se résumer à quelques formes dégénérées après 3 à 4 semaines. Aucune réaction gliale ou mésenchymateuse n'est retrouvée (Schmidt et Bafort, 1987).

Les expérimentations menées avec *T. b. gambiense* et *T. b. brucei*, dont la pathogénie est proche de la forme Ouest africaine de la THA, présentent de fortes similitudes. Dans un modèle murin infecté à *T. b. gambiense* (Van Marck et coll., 1983), les parasites sont constamment retrouvés dans les plexus choroïdes, accompagnés d'une infiltration de cellules inflammatoires, de dépôts d'immunoglobulines, en particulier IgG et IgM et d'une accumulation de fraction C3 du complément. Des formes intracellulaires dans les cellules épendymaires de l'épithélium des plexus choroïdes sont décrites en microscopie électronique chez la souris infectée par *T. b. brucei* (Rudin et coll., 1983 ; Abolarin et coll., 1986). Dans le modèle murin infecté par *T. b. brucei*, ce dernier est retrouvé dans les plexus choroïdes, mais également dans différentes structures où la BHE est absente.

Des rapprochements ont été opérés faisant le lien entre les différentes localisations observées et les manifestations cliniques de la maladie : dysesthésie et hyperesthésie pour les ganglions de la corne postérieure de la moelle, céphalées et nausées pour l'area postrema, perturbations endocriniennes

pour l'hypophyse et l'hypothalamus (Schultzberg et coll., 1988). Il est cependant difficile d'extrapoler ces liens structure-fonction à l'homme quant à la pénétration du parasite dans le SNC, étant donné la diversité des observations faites dans les différents modèles murins. Des lésions de la BHE, objectivées par le passage d'un colorant ainsi que l'apparition d'un œdème vasogénique, ont été décrites dans un modèle similaire (Philip et coll., 1994). Des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I) ont été observés à la surface de neurones hypothalamiques impliquant un contact de ces neurones et des cellules immunitaires ayant probablement bénéficiées de la lésion de la BHE.

Chez le rat infecté par *T. b. gambiense*, l'invasion du SNC est décrite comme une atteinte précoce de la dure-mère puis de l'hypophyse suivie de la rupture de l'arachnoïde par les phénomènes inflammatoires. Ces altérations sont suivies de l'invasion du parenchyme à partir des espaces sous arachnoïdiens via les espaces périvasculaires du tronc cérébral et du mésencéphale (Chirimwami et coll., 1988b). Dans ce modèle d'infection chronique, l'invasion se fait sans véritable rupture de la BHE, mais par lésion de l'arachnoïde et passage dans la neurohypophyse. Les altérations des plexus choroïdes sont rares et tardives, leurs invasions pourraient dépendre de la valeur de parasitémie, plus limitée dans ce modèle. L'inflammation est représentée par une infiltration de cellules inflammatoires et des lésions de type méningite parfois diffuses mais plus précoces et prédominantes à la base du crâne comme cela a été décrit chez l'homme. Une gliose apparaît pour des stades plus évolués de la trypanosomose expérimentale.

8.3. Facteurs mis en jeu

8.3.1. Produits libérés par le Système Immunitaire

La THA s'accompagne d'une production excessive de cytokines révélée au sein même du SNC. Une importante astrogliose est observée au cours de la phase nerveuse de la THA chez l'homme (Adams et coll., 1986) et chez l'animal (Anthoons et coll., 1989 ; Keita et coll., 1997, 2000). Chez des souris infectées par *T. b. brucei*, les astrocytes sont activés et les transcrits de cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL-6, l'IFN- γ , TNF- α sont produits (Hunter et coll., 1991 ; 1992b), conduisant aux réactions inflammatoires décrites au niveau cérébral. En raison de leurs propriétés les apparentant aux macrophages (Fontana et coll., 1984 ; Hellendal et coll., 1997), les cellules microgliales sont impliqués dans de nombreux processus inflammatoires du SNC (Hayes et coll., 1987). Les

astrocytes pourraient ainsi être responsables des lésions inflammatoires observées, par l'intermédiaire de la synthèse de cytokines.

Astrocytes et microglie stimulent la réponse lymphocytaire T helper d'une façon différente. Les cellules microgliales activent aussi bien Th1 que Th2, alors que les astrocytes semblent plus actifs sur les cellules Th2 (Aloisi et coll., 1998). Elles réagissent à la présence de LPS et d'IL-1 (Lee et coll., 1993). De plus, les cellules astrocytaires et microgliales peuvent exprimer la NOSi et produire du NO chez la souris. Chez l'homme, la production de NO n'est détectée que dans les astrocytes stimulés par l'IL-1 et l'IFN- γ (Simmons et Murphy, 1992 ; Lee et coll., 1993 ; Peterson et coll., 1994 ; Liu et coll., 1996).

En présence de *T. b. brucei* ou de ses facteurs solubles, les astrocytes et fibroblastes en culture produisent des prostaglandines, en particulier PGE2 et PGD2 (Alafiatayo et coll., 1994). La production de PGE2 par les astrocytes en présence d'IL-1 souligne l'intervention de ces cellules dans les mécanismes menant à l'altération de la BHE.

Des composants du trypanosome peuvent induire *in vitro* une astrogliose (Pentreath et coll., 1994). Il a été récemment montré que le TLTF induit également l'expression d'IFN- γ dans les cellules gliales de rat (Eltayeb et coll., 2000).

8.3.1.1. Les cytokines

Les cytokines périphériques sont capables d'agir sur différentes structures cérébrales de façon directe ou indirecte par l'intermédiaire d'un second messenger. Elles peuvent par conséquent avoir des effets biologiques qui concourent au maintien de l'homéostasie et à la défense du SNC. Par ailleurs, la présence des cytokines au sein du SNC à l'état basal ou après divers stimuli renforce leurs rôles possibles dans le SNC. Et, bien que les fonctions de ce pool central ne soient pas complètement comprises, les cytokines d'origine cérébrale pourraient participer à différentes réponses lors de perturbations spécifiques du SNC notamment dans les traumatismes crâniens ou les stress physiques en plus de répondre aux signaux provenant du système immunitaire (SI) périphérique.

Le premier des rôles biologiques des cytokines est la défense de l'organisme en plus de la communication intercellulaire. Elles participent également à la modulation de systèmes neuroendocriniens tels que l'axe hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien ou l'axe gonadique, au contrôle de fonctions neurovégétatives autonomes comme la fièvre ou la régulation de la pression artérielle, et à des motivations comme la prise de nourriture, le sommeil ou l'activité d'exploration.

Au niveau cellulaire, les cytokines peuvent agir comme médiateurs trophiques et/ou toxiques, et modifier directement les fonctions spécifiques des cellules nerveuses, aussi bien leur activité électrique que leur capacité à libérer des neurotransmetteurs. Nous aborderons certains de ces points avec une attention particulière sur le rôle direct des cytokines sur la prise alimentaire et l'activité veille-sommeil.

8.3.1.1.1. Dysrégulation du réseau des cytokines dans la THA

Au sein du SNC, les astrocytes ont un rôle immunitaire qui a été largement démontré dans les trypanosomoses expérimentales. Chez la souris infectée par *T. b. rhodesiense* ou *T. b. gambiense*, l'activation précoce des astrocytes précède l'apparition des cellules inflammatoires (Hunter et coll., 1992). De nombreuses cytokines ont été détectées dans le SNC, telles que l'IL-1 α , le Macrophage Inflammatory Protein-1 (MIP-1), le TNF- α , l'IFN- γ , l'IL-6 (Hunter et coll., 1991, 1992). Leurs effets centraux sont variés : agitation ou confusion pour l'IL-1, fièvre, asthénie, nausée pour l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α (Schobitz et coll., 1994). Certaines ont une activité somnogénique propre (IL-1, TNF- α , IFN- γ) (Krueger et Majde, 1995 ; Krueger et coll., 1995 ; Sri Kantha, 1994). Une augmentation importante de l'expression des récepteurs CMH I et II à la surface des astrocytes activés en culture par des composants de *T. b. brucei* a également été détectée (Pentreath et coll., 1994). Le rôle des complexes immuns retrouvés à des taux élevés dans le THA, en particulier dans le LCR, n'est pas clairement défini. Ils pourraient participer aux dépôts d'Ig et de C3 observés dans le cerveau d'animaux infectés, par fixation de ces complexes et activation du complément (Poltera, 1980). Leur contribution à la pathogénie de la maladie est difficile à évaluer. De même, des taux élevés d'endotoxines d'origine parasitaire ou bactérienne sont retrouvés (Alafiatayo et coll., 1993 ; Pentreath, 1994). Leur capacité à stimuler la sécrétion de diverses cytokines, en particulier proinflammatoires, en fait des acteurs probables des troubles observés dans l'affection.

Au cours de la THA, des macrophages périphériques, des lymphocytes, d'autres types de cellules inflammatoires recrutées dans le SNC durant l'inflammation, et des cellules endogènes phagocytaires du SNC peuvent produire de l'IL-1 et d'autres cytokines, spécifiquement en réponse à l'atteinte du SNC (Fontana et coll., 1982). *T. b. brucei* est connu pour être un inducteur potentiel de nombreuses cytokines au propriété anorexigène, par l'intermédiaire de l'activation des macrophages. L'interleukine IL-1 β des macrophages activés (Askonas, 1984), l'interféron IFN- α/β et l'IFN- γ sont précocement libérés dans le sérum au cours de l'infection (Bancroft et coll., 1983). Des transcrits ARN pour le TNF- α (Tumor Necrosis Factor), l'IL-1 et l'IL-4 ont été observés dans les astrocytes pendant l'infection (Hunter, 1992).

Au niveau du SNC où il est normalement absent, le TNF- α ou cachectine peut provoquer de la fièvre, une asthénie ainsi qu'une confusion mentale à forte dose (Schobitz et coll., 1994). En culture, des anticorps anti-TNF- α favorisent la multiplication des trypanosomes (Okomo-Assoumou, 1995b). Le TNF- α présente également des effets délétères, comme cela a été montré dans le choc endotoxinique ou le neuropaludisme où son taux sérique est corrélé à la mortalité. Le TNF- α est présent à des taux sériques élevés chez l'homme trypanosomé, et il existe une corrélation entre le taux sérique de TNF- α et la sévérité clinique de la maladie (Okomo-Assoumou et coll., 1995b). Ce taux diminue rapidement après traitement trypanocide.

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire sécrétée par les macrophages, les cellules B et les cellules Th2, en réponse à la présence de TNF- α . Son rôle est de contrebalancer les effets néfastes de l'inflammation, en diminuant la production de TNF- α et d'IFN- γ . Des taux élevés d'IL-10 sont retrouvés dans la THA, ils diminuent rapidement après le traitement (Rhind et coll., 1997).

Dans la trypanosomose expérimentale, l'administration de lysats solubles de trypanosomes induit la sécrétion de TNF- α murin. Ce TNF- α est responsable de la trypanolyse directe et/ou de l'inhibition de la croissance du parasite (Kongshavin et Ghadirian, 1988). En opposition, l'effet anti-parasitaire est aboli par le co-traitement avec des anticorps neutralisant anti-TNF- α (Magez, 1993).

Les souris développant une méningo-encéphalite secondaire à l'inoculation de *T. b. brucei* présentent une activation astrocytaire qui est corrélée à l'augmentation d'ARNm pour l'IL-1 et le TNF- α dans des homogénats de cerveau (Hunter et coll., 1991 et 1992).

8.3.1.1.2. Effet des cytokines inflammatoires sur le comportement alimentaire

Alors que ces résultats mettent en exergue un rôle positif du TNF- α dans le contrôle du trypanosome, une sévère anémie et une cachexie sont les causes majeures de mort dans la trypanosomose bovine. Toutes deux sont liés à la production excessive de TNF- α (Cerami et coll., 1992). De plus, la perte de poids de rats infectés par *T. b. brucei* AnTat 1.1 E est corrélée avec l'expression en ARNm de cytokines pro-inflammatoires IL1- β et TNF- α (Quan et coll., 1999).

Dans ce cadre, il est tentant d'attribuer au TNF- α un rôle dans la perte de poids prononcée que nous observons. Dans la THA, les concentrations en TNF- α circulant sont significativement augmentées chez les patients infectés par *T. b. gambiense* (Reincke et coll., 1994 et 1998). Okomo-Assoumou

et coll. (1995b) ont rapporté une élévation du TNF- α plasmatique chez des patients infectés par *T. b. gambiense*, augmentation corrélée avec la sévérité de l'atteinte clinique. Pour autre argument, Rhind et coll. (1997) ont observé une élévation chronique du taux de TNF- α circulant chez les patients à un stade avancé de l'atteinte en phase méningo-encéphalitique à *T. b. gambiense*.

Il est maintenant connu que l'IL1- β , l'IFN- γ et le TNF- α diminuent la prise alimentaire par une action au niveau de l'hypothalamus (Plata-Salaman, 1988 ; 1989). Ce phénomène pourrait être lié à un effet direct sur les neurones glucose-sensitifs (Plata-Salaman et coll., 1988) ou indirecte au travers de la stimulation de la synthèse des prostaglandines E2 hypothalamiques (Dinarello et coll., 1986) qui pourraient en retour stimuler la libération de CRF (Corticotropin Releasing Factor) hypothalamique, un neuropeptide endogène anorexigène (Uehara et coll., 1989a). Une étude électrophysiologique suggère fortement que la diminution de prise alimentaire dépendrait d'une action inhibitrice sur les neurones glucose-sensitifs de l'aire hypothalamique latérale et d'une stimulation de cette même population neuronale dans l'hypothalamus ventromédial (Plata-Salaman, 1995).

La perte de poids des animaux domestiques infectés par des trypanosomes, quelle que soit la souche rencontrée est bien connue. Bien que cette caractéristique ait été rapportée chez le rat infecté par *T. b. brucei* Antat 1.1 E (Kristensson et coll., 1998) ou par *T. b. gambiense* (Nishimura, 2001) et le lapin infecté par *T. b. brucei* (Toth et coll., 1994), la rapidité et la brutalité du changement de poids et de prise alimentaire que nous avons observées, n'ont jamais été décrites.

Les maladies infectieuses et inflammatoires sont accompagnées de profondes modifications de l'état métabolique de l'hôte et d'une diminution de la prise alimentaire. Cette anorexie peut aboutir à une cachexie et, dans les cas les plus extrêmes, provoquer la mort par déficit énergétique. Les cytokines sont des médiateurs endogènes importants de l'anorexie développée par les animaux malades. Comme la fièvre, l'hypophagie peut être bénéfique au moins à court terme puisque la recherche de nourriture et la digestion des aliments ingérés nécessitent de l'énergie et comportent le risque d'augmenter les concentrations plasmatiques de certains éléments ou métabolites indispensables à la croissance bactérienne, comme le zinc et le fer. Elle permettrait ainsi de réduire la mortalité due à la présence d'agents pathogènes (Hart, 1988). Il a été démontré que forcer des souris infectées avec *Listeria monocytogenes* à ingérer la même quantité de nourriture que des souris saines entraîne une augmentation de mortalité (Murray et Murray, 1979).

Les effets anorexiques des cytokines ont été mis en évidence dès l'obtention de ces molécules sous forme recombinante. L'administration d'un pyrogène exogène, le LPS, diminue la prise alimentaire (Cerami et coll., 1985 ; McCarthy et coll., 1984 ; Kent et coll., 1992a ; Langhans et coll., 1993 ;

Plata-Salaman et Borkoski, 1993). L'IL1- α et l'IL1- β sont également anorexigènes, qu'ils soient administrés par voie périphérique ou centrale, de manière unique ou répétée (McCarthy et coll., 1985 et 1986 ; Plata-Salaman et coll., 1988 ; Uehara et coll., 1989b ; Hellerstein et coll., 1989 ; Crestani et coll., 1991 ; Kent et coll., 1992b, 1996 et 1994 ; McCarthy et Daun, 1992 ; Shimomura et coll., 1992 ; Langhans et coll., 1993 ; Plata-Salaman, 1994). Il en va de même pour le TNF- α (Plata-Salaman et coll., 1988 ; Socher et coll., 1988 ; Fantino et Wieteska, 1993) et l'IL-6 (Plata-Salaman, 1988). Il a été proposé que les cytokines agissent directement sur le SNC pour induire leurs effets anorexiques en se fondant sur le fait que des doses efficaces par voie intracérébroventriculaire n'ont aucun effet lorsqu'elles sont injectées en périphérie (Plata-Salaman et Borkoski, 1993 ; Plata-Salaman et coll., 1988 ; Plata-Salaman, 1992). Ce critère n'est pas suffisant pour assigner un effet exclusivement central aux cytokines, les deux compartiments n'ayant pas la même capacité d'absorption de solutés exogènes. De plus, les effets anorexiques de l'IL-1 administrée en périphérie ne sont que partiellement bloqués par l'administration centrale de l'antagoniste endogène de l'IL-1, l'IL-1ra, alors que les effets de cette cytokine sur l'exploration sociale sont entièrement bloqués (Kent et coll., 1992c). Ceci démontre que les cytokines inflammatoires libérées en périphérie, du moins l'IL-1, ont des cibles centrales et systémiques pour induire leurs effets anorexiques.

Les cytokines présentent également des effets anorexiques en administration chronique bien qu'un phénomène de tolérance soit observé dans la plupart des cas. L'administration répétée à des souris d'IL1- α recombinante murine, pendant 5 jours, provoque une inhibition marquée de la prise de nourriture, surtout au cours de la phase nocturne (Ottmess et coll., 1988). Les effets sur la prise alimentaire s'atténuent à partir du 4^{ème} jour. Une tolérance a également été observée chez le rat ayant reçu de l'IL1- β recombinante humaine en perfusion continue (Mrosovsky et coll., 1989 ; Weingarten et coll., 1992 ; Busbridge et coll., 1993 ; Jhala et Baly, 1994). Le TNF- α provoque l'apparition rapide d'une tolérance en administration répétée ou continue (Fraker et coll., 1988 ; Socher et coll., 1988), malgré l'ambiguïté des résultats (Tracey et coll., 1988) et la méconnaissance des facteurs responsables de ces divergences. Par ailleurs, un effet dose spécifique d'une cytokine donné est mis en évidence. Ainsi, l'IL1- β recombinante humaine agit à des doses beaucoup plus faibles que l'IL-6 recombinante humaine pour inhiber la prise de nourriture après une injection intracérébroventriculaire (icv) (Plata-Salaman, 1988).

De nombreuses observations permettent de penser que les effets des cytokines sur le comportement alimentaire sont spécifiques. Ainsi, la prise de nourriture est atténuée surtout pendant la phase nocturne qui est la phase d'hyperphagie physiologique (Ottmess et coll., 1988 ; Plata-salaman, 1988). Chez le rat, l'IL-1 voit ses effets anorexiques atténués par la restriction alimentaire

(Mrosovsky et coll., 1989). Ceci suggère que l'IL-1 abaisse le point de consigne de la masse corporelle, à l'inverse de son action sur la température corporelle. De plus, une dissociation évidente entre fièvre et anorexie dues aux cytokines a été démontrée. Chez la souris, l'IL-1 inhibe la prise de nourriture à des doses dix fois plus faibles que celles qui sont nécessaires pour induire une fièvre (Moldawer et coll., 1988). D'autre part, l'injection centrale d'un supernageant monocytaire humain contenant de l'IL-1 ou l'administration de LPS entraîne une fièvre sans bloquer la prise de nourriture chez des rats préalablement privés (McCarthy et coll., 1985). De plus, chez le rat, l'administration d'antipyrétiques n'élimine pas l'anorexie induite par l'injection périphérique de LPS (McCarthy et coll., 1984). D'autre part, la baisse de l'activité locomotrice induite par l'IL-1 n'est pas un facteur essentiel pour expliquer les effets anorexiques de cette cytokine (Ottemess et coll., 1988). La réponse anorexique de l'animal aux cytokines semble être une «réponse physiologique» puisque les effets des cytokines sur la prise alimentaire sont plus marqués chez les animaux jeunes ou adultes par rapport aux animaux âgés (Hellerstein et coll., 1989).

L'effet des cytokines sur le comportement alimentaire semble donc être un phénomène spécifique, bien défini et organisé. La compréhension de cette action passe par la connaissance des cibles et intermédiaires tissulaires, cellulaires et moléculaires des cytokines inflammatoires.

Les cibles centrales des effets anorexiques des cytokines restent encore mal connues. Les cytokines agissent sur les structures cérébrales impliquées dans la régulation du comportement alimentaire, et plus particulièrement sur l'aire ventro-médiane et latérale de l'hypothalamus. Les cytokines modulent l'activité électrique des neurones ventromédians de la même manière que le glucose, cependant elles agiraient sur d'autres neurones non impliqués dans la régulation de la prise de nourriture (Oomura, 1988 ; Kuriyama et coll., 1990). La fréquence de décharge des neurones gluco-sensibles de l'hypothalamus latéral qui chute sous l'effet du glucose est diminuée spécifiquement par l'application électrophorétique d'IL1- β et de TNF- α (Oomura, 1988 ; Plata-Salaman et coll., 1988). Ceci suggère l'existence de sites spécifiques de l'action du TNF- α et de l'IL-1 dans cette région du cerveau. L'IL-1 pourrait être interprétée comme un signal de satiété par le cerveau. Actuellement, bien que des neurones chémo-sensibles aient été décrits, notamment dans les noyaux dorso-médian et paraventriculaire de l'hypothalamus (Fukada et coll., 1984 ; Shiraishi, 1987), les effets des cytokines sur ces neurones restent inconnus. Les microinjections d'IL1- β à une dose très faible dans l'aire hypothalamique ventro-médiane suppriment la prise de nourriture avec un laps de temps comparable à une injection icv (Kent et coll., 1994 et 1996). Ceci suggère que cette structure est un site d'action central pour les effets anorexiques des cytokines.

Un ensemble réduit de cytokines inflammatoires, les chemokines médient les phénomènes inflammatoires qui apparaissent suite à une activation immunitaire. Leur production, sous contrôle des cytokines pro-inflammatoires (Sticherling et coll., 1995) est précocement abondante dans le déroulement des THA expérimentales (Sharafeldin et coll., 2000). Ces composés pourraient participer à la diminution de prise alimentaire en partenariat avec l'IL-1, le TNF- α et l'IFN- γ .

8.3.1.1.3. Effets sur le comportement d'exploration et sur l'activité locomotrice

L'animal malade montre un désintérêt pour tout ce qui l'entoure, aussi bien pour les autres individus que pour le milieu de vie en général. Cette perte d'intérêt fait partie des réponses adaptatives à l'infection (Hart, 1988).

La diminution de l'activité locomotrice des rats infectés de notre étude pourrait s'expliquer par la libération massive de cytokines pro-inflammatoires observée pendant la phase terminale de la maladie. En effet le TNF- α et l'IL-1 sont reconnus pour diminuer l'activité locomotrice spontanée (Bianchi et coll., 1992 ; Fiore et coll., 1998). De plus, l'injection intrapéritonéale de TNF- α affecte l'exploration sociale, directement ou par l'intermédiaire de la libération d'autres cytokines (Bluthé et coll., 1994).

L'IL-1 et le LPS inhibent le comportement d'exploration sociale (Crestabi et coll., 1991 ; Bluthé et coll., 1991a, 1991b, 1992a). L'IL-1 agirait au niveau du système nerveux central pour induire ces effets. Les doses d'IL-1 β efficaces en administration centrale sont 1000 fois plus faibles que celles utilisées par injection systémique pour obtenir un effet comparable (Bluthé et coll., 1991b). D'autre part, les effets d'une injection périphérique d'IL-1 sont totalement bloqués par l'administration icv de l'antagoniste IL-1ra (Kent et coll., 1992a). Les effets de l'IL-1 sur ce comportement sont dépendants des prostaglandines puisqu'ils sont bloqués par l'injection d'indométhacine (Crestani et coll., 1991).

La réduction du comportement exploratoire face à un environnement nouveau peut être reproduite par l'administration de cytokines inflammatoires, comme l'IL-1 α (Spadaro et Dunn, 1990). La même étude montre que l'activité locomotrice de l'animal n'est pas complètement abolie par le traitement. De façon intéressante, on observe aussi que l'inhibition de l'activité locomotrice chez la souris semble indépendante de la baisse de la prise de nourriture après l'administration d'IL-1 : la baisse de l'activité locomotrice est observée même pendant la période de tolérance pour les effets anorexiques (Oterness et coll., 1988). De façon générale, les cytokines ont de forts effets inhibiteurs sur l'activité locomotrice spontanée de l'animal (Bianchi et coll., 1992).

8.3.1.1.4. Influence des cytokines sur l'activité veille-sommeil

L'activité veille-sommeil peut être modifiée lors de pathologies. La somnolence et l'augmentation de la durée du sommeil à ondes lentes sont souvent observées lors des maladies infectieuses (Kent et coll., 1988 ; Toth et Krueger, 1988). L'infection induit le sommeil chez l'hôte, essentiellement caractérisé par du sommeil lent (SL). Ainsi, l'administration de LPS augmente la durée du SL (Krueger et coll., 1986). Les cytokines produites en quantité pendant ces états infectieux peuvent être à l'origine de variations de la vigilance et contribuer aux modifications du sommeil décrites au cours de la pathologie. Les cytokines peuvent perturber le sommeil après injections périphérique et centrale (Krueger et coll., 1984 ; Shoham et coll., 1987 ; Borbely et Tobler, 1989)

Les exacerbations cliniques aiguës sont associées à une augmentation du sommeil similaire à celle observée durant les atteintes microbiennes aiguës induites par différents organismes. Les altérations du sommeil en relation avec l'infection et la réponse immunitaire pourraient refléter la production et la libération des modulateurs immuns endogènes somnogènes comme l'IL-1, l'interféron, et le TNF- α , qui sont connus pour leur effet somnogène chez le rat et d'autres espèces (Smedley et coll., 1983 ; Kapas et coll., 1992).

Les premières données concernant les effets des cytokines sur le sommeil proviennent des études dans lesquelles des lapins recevaient des extraits d'exsudats péritonéaux de lapins stimulés (Krueger et coll., 1984). Ces préparations pyrogènes endogènes et contenant de l'IL-1 et d'autres cytokines, injectées en intraveineux ou en intracérébroventriculaire induisaient l'augmentation du SL accompagnée de fièvre. Des études ultérieures ont montré que l'IL1- β et l'IL1- α recombinantes humaines présentaient des effets similaires. Les propriétés somnogènes de l'IL-1 ont été confirmées chez le rat (Opp et coll., 1991 ; Tobler et coll., 1984), le chat (Susic et Totic, 1989), le singe (Friedman et coll., 1995) et chez l'homme (Dinarello, 1991). Des expérimentations plus récentes indiquent que l'IL-1 est également impliquée dans la régulation physiologique du sommeil chez les animaux sains (Opp et coll., 1992b). Les mécanismes impliqués dans l'action somnogène de l'IL-1 ne sont pas complètement établis.

La fièvre par elle-même, n'affecte pas la vigilance. L'indépendance de ces deux effets est démontrée par l'administration d'inhibiteurs de la cyclooxygénase (Kapas et coll., 1991) et de la synthèse protéique (Krueger et coll., 1984) qui suppriment la fièvre induite par l'IL-1 mais pas le sommeil. De plus, l'injection d'IL-6 qui induit la fièvre n'induit pas le sommeil et des doses faibles d'IL-1 induisent le sommeil mais pas la fièvre chez le lapin (Opp et coll., 1989).

L'hypothalamus postérieur et les structures du tronc cérébral ne semblent pas jouer un rôle dans l'action de l'IL-1 sur le sommeil. De plus, l'action de l'IL-1 sur le sommeil semble indépendante de molécules comme les prostaglandines (Kapas et coll., 1991), les opioïdes (Kapas et coll., 1993) ou l'insuline (Kapas et coll., 1991). L'inhibition de la GHRH, hormone induisant le sommeil la mieux caractérisée (Steiger et coll., 1992) diminue l'effet de l'IL-1 sur le sommeil. Au contraire, l'injection de CRF et de LHRH supprime l'induction du sommeil par l'IL-1. Chez le rat normal, de faibles doses d'IL-1 induisent le sommeil et de fortes doses le suppriment. La destruction néonatale des neurones à CRH et α MSH du noyau arqué entraîne une forte augmentation de sommeil par l'IL-1. Ces observations suggèrent que des doses importantes d'IL-1 induisent à la fois des mécanismes de suppression et de promotion. Le CRH et le α MSH pourraient être des facteurs de régulation du sommeil favorisant une boucle de rétrocontrôle négative sur l'action de l'IL-1.

Les propriétés somnogéniques du TNF- α recombinant humain ont été mesurées chez le lapin et apparaissent identiques à celles de l'IL-1. L'injection de TNF- α augmente les quantités et l'intensité du sommeil lent (Shoham et coll., 1987). La réponse induite par le TNF- β est similaire à celle du TNF- α . L'immunoneutralisation du TNF par l'injection d'anticorps chez le rat ou de protéines solubles liant le TNF chez le lapin, supprime l'effet du TNF sur le sommeil. Ceci montre le rôle possible du TNF endogène sur le sommeil spontané. Les mécanismes responsables ne sont pas totalement compris à ce jour. Mais le TNF pourrait avoir un effet direct sur les neurones de l'hypothalamus (Opp et coll., 1992a). Cependant, un décalage d'une heure entre l'administration de TNF et le début de ses effets souligne le fait que d'autres facteurs ou mécanismes pourraient contribuer à l'effet somnogène du TNF. Des boucles autocrines incluant l'IL-1 et le TNF lui-même pourraient promouvoir l'effet somnogénique du TNF exogène (Opp et coll., 1992a).

Des niveaux élevés de modulateurs immunitaires endogènes comme l'IL-1 et le TNF- α contribuent probablement aux mécanismes de défense de l'hôte pendant la trypanosomose et pourraient secondairement médier les manifestations somnogènes tardives de la maladie. De surcroît, l'augmentation de SL induite par les cytokines connues pour être somnogènes et pyrogènes, comme l'IL-1- β et le TNF- α est maintenant bien décrite (Kapas et coll., 1992). Nous pouvons donc avancer l'hypothèse d'une augmentation de SL en rapport avec la production de cytokines due à l'infection par *T. b. brucei* au dernier stade de la maladie.

Au cours de la THA, des études ont montré que les concentrations circulantes de TNF- α sont significativement augmentées chez les patients infectés par *T. b. gambiense* et que ce dérèglement du réseau des cytokines est intimement lié aux changements décrits dans les rythmes circadiens neuroendocriniens (Radomski et coll., 1994 ; Reincke et coll., 1998). Okomo-Assoumou et coll.

(1995b) ont rapporté que l'augmentation substantielle du TNF- α dans le sérum de patients infectés à *T. b. gambiense* est corrélée à la sévérité de l'atteinte.

Parmi les anomalies clinicopathologiques rencontrées, il faut noter une concentration en prostaglandine D2 élevée dans le LCR (Pentreath et coll., 1990), les prostaglandines étant connues pour promouvoir le sommeil chez le rat (Ueno et coll., 1983). D'autre part le NO astrocytaire produit lors de l'infection est capable de stimuler la cyclo-oxygénase conduisant à une production de prostaglandines (Molina-Holgado et coll., 1995).

8.3.1.2. Les Auto-Anticorps

Les mécanismes pathogéniques de l'atteinte neurologique de la THA restent mal connus. Ils pourraient relever d'une composante autoimmune (Poltera, 1980) comme dans le cas de la maladie de Chagas causée par *Trypanosoma cruzi*.

La présence d'autoAc pourrait contribuer à la pathogenèse de l'encéphalite de la trypanosomose. Leur apparition au cours de la THA pourrait être due à une réactivité croisée entre des déterminants antigéniques exprimés par le trypanosome et des constituants du SNC pouvant être l'origine d'une rupture de la tolérance au soi et induire l'apparition de ces autoAc (Rocken et coll., 1992). De tels mécanismes ont été décrits au cours de la maladie de Chagas (réactivité croisée avec les Ag des neurones et des astrocytes) (Petry et coll., 1987). Des phénomènes de cytotoxicité (action directe du parasite ou formation de complexes immuns et activation du complément) entraînant la libération d'autoantigènes (autoAg) dont le passage bidirectionnel à travers la barrière hématoencéphalique altérée aboutirait à la mise en présence de ces autoAg et des effecteurs de la réponse immunitaire (Pentreath, 1989). La stimulation polyclonale non spécifique des lymphocytes B, induite par le parasite, amplifierait cette production d'autoAc. La présence de ces autoAc pourrait également s'expliquer par une réaction dirigée contre des Ag du trypanosome localisés sur les cellules cérébrales et responsables de l'induction d'une réponse Ac dirigée contre ces cellules (Rifkin et Landsberger, 1990). Un mécanisme voisin pourrait être représenté par la fixation d'Ag sur la surface de cellules cérébrales entraînant leur reconnaissance ultérieure (Rifkin et Landsberger, 1990).

Des AC anti-tryptophane (Okomo-Assoumou et coll., 1995a), précurseur de la sérotonine, ont également été décrits. Ormerod et Hussein (1986) ont montré qu'un stade intracellulaire de *Trypanosoma brucei rhodesiense* cause la destruction des cellules épendymaires bordant les

ventricules cérébraux. Les cellules épendymaires ventriculaires sont intimement associées aux plexus nerveux qui réagissent spécifiquement avec les anticorps monoclonaux dirigés contre la sérotonine. De plus, dans les zones où l'épendyme est atteint, le plexus supra-épendymaire présente également des destructions et une dégénération rétrograde des neurones sérotoninergiques provenant du noyau raphé dorsal.

Ces résultats suggèrent fortement que certains changements neurophysiologiques observés au cours de la trypanosomose pourraient résulter de la présence de ces autoAc, en particulier les désordres de prise alimentaire, d'activité locomotrice et exploratoire ainsi que les perturbations de l'alternance veille-sommeil.

8.3.1.3. Le NO

8.3.1.3.1. Perturbation du NO dans la THA

Dans les trypanosomoses, le NO, à la fois acteur important de la réponse immunitaire et de la neurotransmission au niveau cérébral, joue un rôle souvent controversé dans l'évolution complexe de la maladie.

Les macrophages activés exercent un effet parasiticide puissant sur le trypanosome via la production de NO. *In vitro*, des macrophages de souris stimulés par des LPS bactériens et de l'IFN- γ ou provenant de souris infectées par le BCG, inhibent la croissance de *T. b. brucei* et de *T. b. gambiense* en culture. Cet effet inhibiteur est annulé par adjonction de N-monométhyl-L-arginine, inhibiteur spécifique de l'activité des NOS. Enfin, il a été montré que la croissance des parasites exposés à du NO sous forme gazeuse est également inhibée (Vincendeau et coll., 1992). Cet effet peut être modulé, voire supprimé par l'adjonction de fer en excès, capable de piéger la molécule de NO.

L'origine macrophagique de la production de NO a été confirmée dans des cultures de macrophages péritonéaux issus de souris infectées par *T. b. brucei* (Bouteille et coll., 1997). Des ARN messagers codants pour la iNOS dans 95% à 100% des macrophages ont été mis en évidence par RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) après 12 jours de culture. Le marquage immunohistochimique des cultures par des anticorps anti-iNOS a confirmé la présence de iNOS dans les macrophages, au niveau cytosolique. La mesure directe par voltamétrie montrait pour sa part des taux de NO significativement inférieurs à ceux des cultures de cellules issues d'animaux sains. Ces résultats sont concordants avec la diminution significative du taux de NO sanguin mesuré

chez le rat (Buguet et coll., 1996) et la souris (Bouteille et coll., 1997) infectés par *T. b. brucei* (70% de la valeur témoin) avec la même méthode de mesure. Enfin, dans un modèle de trypanosomose bovine (infection à par *T. vivax* ou *T. congolense*), Taylor et coll. (1996) ont montré que les macrophages de bovins infectés produisent significativement moins de NO. Ces résultats viennent confirmer les travaux de Buguet et coll. (1996) et de Bouteille et coll. (1997).

L'inhibition de la synthèse de NO, *in vivo*, conduit à un contrôle de la parasitémie chez les souris infectées par *T. b. brucei* (Sternberg et coll., 1994). *In vitro*, le NO est un agent trypanostatique (Vincendeau et coll., 1992), mais des études ont montré son inefficacité à éliminer les trypanosomes circulants *in vivo* (Mabbott et coll., 1994).

Les trypanosomes présents dans le flux sanguin semblent protégés de l'effet parasiticide du NO (Mabbott et coll., 1994). Il a été suggéré que l'hémoglobine capture le NO par l'intermédiaire de ses noyaux fer, protégeant ainsi le parasite.

Une importante production de NO a été montrée dans le sérum et dans le LCR de primates infectés par *T. b. gambiense* (Sternberg et coll., 1998).

Des mesures du NO cérébral ont été réalisées dans un modèle animal de THA, chez le rat et chez la souris infectés par *T. b. brucei* (Buguet et coll., 1996 ; Bouteille et coll., 1997). La concentration de NO cérébral, mesurée au niveau du cortex et au niveau du ventricule latéral, est plus importante chez les animaux infectés (130% de la valeur témoin après 15 jours d'infection, 220% après 21 jours). Des résultats comparables ont été obtenus chez la souris (Bouteille et coll., 1997). Il est établi que les cellules gliales sont capables de sécréter du NO (Boje et Arora, 1992 ; Okuda et coll., 1995). En coculture avec des trypanosomes et de l'IFN- γ , des cellules microgliales humaines CMH5 sécrètent du NO. Cependant, l'immunomarquage montre que la iNOS n'est exprimée que de façon transitoire. L'étude histochimique du cerveau avec marquage à la NADPH-diaphorase ne montre aucune différence de répartition des cellules produisant du NO entre les animaux malades et les témoins (Buguet et coll., 1996). En particulier, les cellules gliales ou endothéliales ne sont pas marquées. Cependant cette technique ne permet pas de savoir s'il y a ou non-activation des iNOS sous l'effet de la maladie. La iNOS a récemment été mise en évidence au niveau des macrophages dans les infiltrats périvasculaires cérébraux de souris infectées par *T. b. brucei* (Keita et coll., 2000).

Enfin, une augmentation de la concentration sérique en nitrate, produit final de l'oxydation du NO, a été observée chez les patients infectés par *T. b. rhodesiense* (Sternberg, 1996). Une étude voltamétrique a cependant montré une diminution du NO dans le sang des patients infectés par *T. b. gambiense* (Banzet, 1997).

8.3.1.3.2. Action dans le comportement de prise alimentaire

Le monoxyde d'azote constitue un intermédiaire potentiellement important de l'effet des cytokines dont la production au niveau des motoneurones, des neurones du système nerveux entérique ou des macrophages présents dans les parois du tube digestif pourrait être stimulée par les cytokines (Bredt et coll., 1990). Bien que les effets inducteurs des cytokines sur la production de NO soient connus (Moncada et coll., 1991), l'intervention éventuelle de ce médiateur dans leur action sur le comportement alimentaire n'est pas clairement identifiée. En ce qui concerne l'action propre du NO, la stimulation de sa synthèse par l'administration de l-arginine se traduit par une augmentation de la prise de nourriture, alors que son inhibition par la l-nitro-arginine présente l'effet inverse. Dans les deux cas, les effets durent au minimum une demi-heure après administration (Morley et Flood, 1991). Des données préliminaires suggèrent que l'inhibition de la synthèse de NO, par le N-nitro-L-arginine methyl ester, un inhibiteur sélectif de la NO synthase du cerveau et des cellules endothéliales, par voie périphérique ou centrale, potentialise considérablement les effets anorexiques de l'IL1- β . Ces résultats confirment des travaux sur les effets comportementaux de l'IL1- β dans le test d'exploration sociale (Bluthé et coll., 1992b).

8.3.1.3.3. Action sur l'activité veille-sommeil

Le NO agit comme modulateur de différentes fonctions diencephaliques. Il intervient dans la synchronisation des rythmes circadiens par la lumière transmise aux noyaux suprachiasmatiques via les fibres rétino-hypothalamiques (Watanabe et coll., 1994 ; Decker et Reuss, 1994). Le NO est associé à différents neurotransmetteurs dans les structures impliquées dans la régulation du sommeil, comme le noyau raphé dorsal (Wotherspenn et coll., 1994). Cependant son rôle n'est pas clairement établi, et des résultats contradictoires sont rapportés. Chez le lapin et le rat, l'inhibition de sa synthèse provoque une disparition du sommeil lent et paradoxal (Kapas et coll., 1994a et 1994b), alors que des donneurs de NO ont l'effet inverse (Kapas et Krueger, 1996). Pour d'autres l'inhibition des NOS diminue la veille (Dzolic et De Vries, 1994). Mesurée *in vivo* par voltamétrie au niveau cortical, la concentration de NO diminue au cours du sommeil lent et du sommeil paradoxal (Cespuglio et coll., 1996). Des enregistrements voltamétriques complémentaires en conditions chroniques combinés à la polygraphie ont permis d'entrevoir l'existence d'une modalité de libération circadienne du NO dans le noyau raphé dorsal caractérisé par une libération de NO plus importante pendant la période d'éclaircissement (Burllet et coll., 1999). Cette variation circadienne

du taux de NO du NRD pourrait signifier que le NO est préférentiellement produit pendant les phases de SL et/ou de SP majoritaires pendant la phase d'éclairement. Une telle phénoménologie est en accord avec les variations du signal 5-hydroxy-indole mesurées par voltamétrie dans ce noyau (Houdouin et coll., 1991 ; Cespuglio et coll., 1992).

La composante NO-ergique du NRD serait impliquée spécifiquement dans le déclenchement et le maintien du SP (Burlet et coll., 1997). Le NO contenu dans ce noyau pourrait jouer le rôle de médiateur paracrine dans cette régulation. Toutefois, s'il apparaît relativement clair qu'une augmentation du NO au sein du NRD favorise l'apparition du SP, le mode d'action de ce composé dans ce mécanisme reste inconnu. Dans ce sens, une influence du NO sur le contenu sérotoninergique du NRD peut être envisagée. En effet, en plus de la coexistence anatomique de ces deux composés dans les corps cellulaires du NRD (Johnson et Ma, 1993 ; Léger et coll., 1998a), différentes études ont montré l'existence d'interrelations plus fonctionnelles. Ainsi, le NO pourrait favoriser la sécrétion de 5-HT (Lorrain et Hull, 1993) ou inhiber sa recapture (Pogun et Kuhar, 1994). De même, l'inhibition de la NOS semble diminuer le turnover de la 5-HT (Yamada et coll., 1995). Il n'est donc pas exclu qu'une augmentation de NO dans le NRD puisse potentialiser le taux de 5-HT extracellulaire et favoriser l'inhibition des neurones à 5-HT. Une telle inhibition est nécessaire à la mise en place du SP (Cespuglio et coll., 1992). Au contraire, l'inhibition de la NOS pourrait s'accompagner d'une diminution de la 5-HT et conduire à une situation favorable à l'activation des neurones 5-HT. Une telle situation est systématiquement rencontrée pendant l'éveil (McGinty et Harper, 1976 ; Puizillout et coll., 1979 ; Cespuglio et coll., 1981b).

Le NO est non seulement présent dans le NRD mais également dans d'autres réseaux neuronaux connus pour leur implication dans la régulation de l'éveil et du sommeil, en particulier les neurones cholinergiques des noyaux latéro-dorsaux tegmenti et pédonculopontins. Les mécanismes d'action et les répercussions physiologiques sur l'activité veille-sommeil restent à définir. L'action de la composante NO-ergique du NRD sur la synchronisation des rythmes circadiens et son implication dans le déclenchement et le maintien du SP pourraient expliquer les troubles veille-sommeil rencontrés dans notre modèle.

8.3.1.4. Produit libéré par le parasite

L'augmentation du temps de sommeil synchronisé peut être rapprochée des investigations précédentes qui soulignent le fait que la réponse immunitaire durant l'infection contribue à l'élévation du sommeil (Toth et Krueger, 1990). Les facteurs libérés par le trypanosome ou en

réponse de l'hôte à l'infection, pourraient expliquer ces altérations. Le TLTF (trypanosome-derived lymphocyte triggering factor) libéré par le parasite (Bakhiet et coll., 1993), stimule les cellules T de phénotype CD8⁺ à produire de l'IFN- γ , qui en retour pourrait promouvoir la croissance du trypanosome. Les désordres de l'activité veille-sommeil observés dans cette étude pourraient être dus à l'action sur les structures nerveuses de l'IFN- γ et/ ou du TLTF seul ou en combinaison avec d'autres cytokines, en particulier l'IL-1 et le TNF- α relargués au cours de l'infection (Hunter et coll., 1991).

8.4. PERTINENCE DU MODELE

8.4.1. Diminution de l'hématocrite

La diminution initiale d'hématocrite est présente pendant la première semaine post-infection et il s'agit du premier signe d'infection observé. Elle pourrait être liée aux processus immuno-inflammatoires induits par la propagation de *T. b. brucei* pendant la phase lymphatico-sanguine et par conséquent pourrait être considérée comme un index de la première phase de la THA. La diminution tardive est observée pour tous les rats pendant l'aggravation de l'état physiologique général juste avant la mort, quelques jours après le début de la phase méningo-encéphalitique.

Chez l'homme, la légère chute de l'hématocrite fait également partie du tableau clinique de la phase lymphatico-sanguine de la THA à *T. b. gambiense* et à *T. b. rhodesiense* (Dumas et Boa, 1988). Cependant l'anémie sévère ne se rencontre qu'en phase terminale de la THA.

La diminution initiale enregistrée dès les premiers jours post-infection souligne la rapidité d'évolution de la phase lymphatico-sanguine. La deuxième diminution marque l'aggravation de l'état général et les prémices de la forte anémie observée en phase terminale. La mesure de l'hématocrite semble être un bon outil d'évaluation de l'atteinte pathologique et du pronostic. Cette évolution en deux paliers successifs dans notre étude est à rapprocher de celle observée dans la THA.

8.4.2. Prise pondérale et alimentaire

Les modifications de poids et de prise alimentaire observées peuvent être rapprochées des caractéristiques physiopathologiques des patients en phase méningo-encéphalitique, infectés par *T. b. gambiense* ou *T. b. rhodesiense* (Dumas & Boa, 1988). Bien que la phase lymphatico-sanguine puisse s'accompagner d'une légère diminution de poids, une importante perte de poids évoluant en une cachexie sévère est observée en phase terminale de la THA (Molyneux et coll., 1996). Des troubles du comportement alimentaire ont été décrits chez l'homme ; il s'agit dans de rares cas de boulimie mais le plus souvent d'anorexie (Dumas & Boa 1988).

8.4.3. Troubles comportementaux

La diminution de poids et de prise alimentaire observée chez notre modèle expérimental s'accompagne d'altérations comportementales faites de troubles moteurs avec mouvements incontrôlés et de désorientations.

Les rats infectés perdent leur comportement d'exploration de l'environnement et restent prostrés dans un coin de l'Open Field. Ce phénomène peut être mis en parallèle avec le comportement léthargique des patients en phase méningo-encéphalitique de la THA. Chez l'homme, des désordres du tonus et de la mobilité, ainsi que l'apparition de mouvements anormaux sont des caractéristiques souvent observées au cours de la maladie. En phase méningo-encéphalitique, le tableau clinique classique repose sur un désintérêt de l'environnement, une indifférence aux événements extérieurs et une apathie (Dumas & Boa, 1988). Des perturbations de l'attention et un comportement d'indifférence face aux événements externes sont des caractéristiques également décrites chez les patients en phase avancée de la maladie (Antoine, 1977). Toutes ces manifestations cliniques sont autant d'arguments qui soulignent la pertinence de notre modèle d'étude.

8.4.4. Activité veille-sommeil

La THA se caractérise par une dysrythmie circadienne de l'alternance veille-sommeil avec des épisodes de sommeil qui se répartissent indifféremment sur l'ensemble du nycthémère (Buguet et coll., 1989). L'alternance veille-sommeil survient en cycle d'autants plus courts et nombreux que les patients sont plus gravement atteints (Buguet et coll., 1993 et 1994). Des épisodes narcoleptiques apparaissent, proportionnels à la sévérité de l'atteinte clinique. Les ondes lentes

anormales en SL ont été observées durant le sommeil de patients trypanosomés en phase terminale de la maladie, notamment l'occurrence d'évènements hypersynchrones paroxystiques hypnopompiques (Schwartz et Escande, 1970 ; Tapie et coll., 1996), ainsi que la disparition des spindles (Bert et coll., 1965).

Notre modèle expérimental présente une altération de la distribution de la veille et du sommeil qui s'accompagne de changements structuraux et morphologiques comparables à ceux rencontrés au cours de la THA. La fragmentation excessive du sommeil caractérisée par une augmentation du nombre d'épisodes et une diminution concomitante de leur durée, la disparition des spindles, l'apparition de tracés anormaux en SL ainsi que la présence de SOREMP concourent à l'intérêt de notre modèle expérimental.

Les changements de l'aspect qualitatif des tracés électrophysiologiques et de la structure interne du sommeil des rats infectés par *T. b. brucei* se produisent en fin de deuxième semaine post-inoculation du parasite. L'altération de l'activité veille-sommeil survient de manière concomitante avec les perturbations de la prise alimentaire. Ce résultat suggère un mécanisme commun d'atteinte ou un processus complémentaire concomitant, aussi bien mécanistique qu'anatomique.

Lorsque l'analyse des tracés est conduite avec une méthode plus fine telle que la transformée de Fourier, les perturbations observées, le changement de profil de l'éveil et la diminution de la puissance spectrale delta en SL, apparaissent plus précocement. Il semblerait que le réseau à l'origine de la prise alimentaire soit plus tardivement sensible à la maladie que celui responsable de l'alternance veille-sommeil. Cette hypothèse est à prendre avec prudence, une analyse ultradienne de la prise alimentaire plus poussée permettrait d'affiner ce point de vue.

CONCLUSION ET **PERSPECTIVES**

L'étude clinique menée chez le rat infecté par *T. brucei brucei* An Tat 1.1E nous a permis de caractériser des altérations physiologiques, facilement quantifiables et observées de manière constante. Une diminution de poids consécutive à une diminution alimentaire, accompagnée d'un ralentissement de la capacité exploratoire et motrice de l'animal ont été mis en évidence deux semaines après infection. Une analyse histologique complémentaire a objectivé la présence de parasites et de cellules inflammatoires dans les plexus choroïdes treize jours post-infection. En raison de la concomitance des perturbations observées, nous avons émis l'hypothèse de l'entrée du parasite dans le système nerveux central au moment de l'apparition des troubles et ainsi considéré la diminution de poids comme un critère d'entrée en phase méningo-encéphalitique de la THA. Cette hypothèse de travail a été testée avec la combinaison thérapeutique suramine-mégazol exclusivement dévolue à la phase neuronale de l'atteinte. Seuls les rats ayant reçu le traitement combiné ont survécu. En outre, la diminution de poids suite à l'administration thérapeutique combinée a été réduite par rapport à l'utilisation exclusive du mégazol, ce qui renforce le caractère bénéfique du traitement combiné. De surcroît, cette validité par la thérapeutique renforce la pertinence de notre modèle animal et apporte un argument supplémentaire au développement pré-clinique expérimental du mégazol.

Fort de la robustesse de ce modèle, notre travail s'est focalisé sur l'étude des perturbations circadiennes de l'alternance veille-sommeil. Une étude qualitative basée sur la structure interne du sommeil et la morphologie des ondes constituant les différents stades de vigilance a été complétée d'une approche quantitative des tracés électrophysiologiques recueillis. Une perturbation de la rythmicité circadienne de la veille et du sommeil, accompagnée d'une déstructuration de l'architecture interne du sommeil (diminution du nombre d'épisodes de sommeil et augmentation concomitante de leur durée moyenne) ainsi qu'un appauvrissement de la qualité du sommeil (progression de la proportion de sommeil lent léger au profit du sommeil lent profond) ont été objectivés. Cette altération de la structure interne du sommeil s'est également traduite par une aggravation des altérations du cycle veille sommeil et l'apparition de transitions anormales, en particulier des endormissements directs en sommeil paradoxal (sleep onset rapid eye movements episodes, SOREMPs). Des ondes lentes hypersynchrones anormales sont apparues en sommeil lent en fin de vie. L'étude quantitative a révélé une diminution de la densité de la puissance spectrale de la bande delta en sommeil lent. A cette perturbation propre au sommeil lent, s'ajoute un changement du profil spectral de la veille avec un renforcement des activités dans les bandes de fréquences lentes et une relative diminution d'activités pour les bandes de fréquences rapides.

Notre modèle expérimental développé dans cette étude sur le rat présente des caractéristiques majeures de la phase méningo-encéphalitique de la THA. Ainsi, les perturbations du cycle veille-

sommeil et de la structure du sommeil, de l'activité locomotrice et les capacités exploratoires observées au test d'Open Field test démontrent qu'il est possible de répliquer dans un modèle animal les principales altérations fonctionnelles du SNC observées en clinique humaine.

L'argument fort de notre modèle reste la concomitance des troubles physiologiques observés. Les comportements altérés au test de l'Open Field ainsi que la dysrythmie circadienne apparaissent à la fin de la seconde semaine suivant l'infection, quand se produit une perte de poids consécutive d'une diminution de prise alimentaire. Ces désordres physiologiques quantifiables en fin de seconde semaine post-infection pourraient constituer un critère robuste et non équivoque du début de la phase méningo-encéphalitique. L'administration d'une thérapeutique combinée suramine-mégazol, efficace en phase nerveuse de la THA, vient renforcer cet argument. Les caractéristiques inflammatoires des plexus choroïdes et la caractérisation de la présence du parasite dans les espaces interstitiels étayent la pertinence de cet index d'entrée en phase méningo-encéphalitique de la maladie.

Une étude histopathologique complémentaire des zones régulatrices hypothalamiques serait nécessaire pour vérifier l'hypothèse émise.

La capacité de notre modèle expérimental à répliquer la majeure partie des troubles observés en phase méningo-encéphalitique, le prédispose pour des essais précliniques. Il constitue dans ce sens un outil novateur pour l'étude de l'efficacité des nouvelles thérapies. Enfin, sur le plan circadien, les données que nous avons obtenues par la mise en œuvre de ce modèle renforcent l'hypothèse d'un dysfonctionnement au sein des réseaux neuronaux régulant l'alternance lumière-obscurité de l'éveil et du sommeil.

Cependant, l'évolution aiguë de l'atteinte reste un facteur limitatif. Les rats meurent en moyenne trois à quatre semaines suite à l'infection ce qui réduit le champ d'investigation de souches à évolution chronique, en particulier *T. b. gambiense*. Le choix d'une souche moins virulente que *T. b. brucei* AnTat 1.1E pourrait palier à cette carence.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abolarin MO, Stamford SA, Ormerod WE. Interaction between *Trypanosoma brucei* and the ependymal cell of the choroid plexus. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* (1986) 80: 618-625.

Adams JH, Haller L, Boa FY, Doua F, Dago H, Konian K. Human African *Trypanosomiasis* (*T. b. gambiense*): a study of fatal cases of sleeping sickness with some observations on acute reactive arsenical encephalopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* (1986) 12: 81-94.

Aerts D, Truc P, Penchenier L, Claes Y, Le Ray D. A kit for in vitro isolation of trypanosomes in the field: first trial with sleeping sickness patients in the Congo Republic. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* (1992) 86: 394-395.

Aghajanian GK, Bloom FE, Sheard MH. Electron microscopy of degeneration within the serotonin pathway of rat brain. *Brain Res* (1969) 13: 266-273.

Agmon A, Connors BW. Repetitive burst-firing neurons in the deep layers of mouse somatosensory cortex. *Neurosci Lett* (1989) 99: 137-141.

Ahissar E, Vaadia E. Oscillatory activity of single units in a somatosensory cortex of an awake monkey and their possible role in texture analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) 87: 8935-8939.

Alafiatayo RA, Crawley B, Oppenheim BA, Pentreath VW. Endotoxins and the pathogenesis of *Trypanosoma brucei brucei* infection in mice. *Parasitology* (1993) 107: 49-53.

Alafiatayo RA, Cookson MR, Pentreath VW. Production of prostaglandins D2 and E2 by mouse fibroblasts and astrocytes in culture caused by *Trypanosoma brucei brucei* products and endotoxin. *Parasitol Res* (1994) 80: 223-229.

Aloisi F, Ria F, Penna G, Adorini L. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in TH1 but not TH2 cell activation. *J Immunol* (1998) 160: 4671-4680.

Amevigbe M, Jauberteau-Marchan MO, Bouteille B, Doua F, Breton JC, Nicolas JA, Dumas M. Human african trypanosomiasis. Presence of antibodies to galactocerebroside. *Am J Trop Med Hyg* (1992) 47: 652-662.

Amole B, Sharpless N, Wittner M, Tanowitz HB. Neurochemical measurements in the brains of mice infected with *Trypanosoma brucei brucei* (TREU 667). *Ann Trop Med Parasitol* (1989) 83 : 225-232.

Anthoons J, Van Marck EAE, Gigase PLJ. Autoantibodies to intermediate filaments in experimental infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *J Parasitol* (1986) 72: 443-452.

- Anthoons J, Van Marck EAE, Gigase PLJ, Stevens WJ. Immunohistochemical characterization of the mononuclear cells in the brain of the rat with an experimental chronic *Trypanosoma brucei gambiense* infection. *Parasitol Res* (1989) 75: 251-256.
- Antoine P. Neurological and psychological studies of patients with sleeping sickness and their course. *Ann Soc Belg Med Trop* (1977) 57: 227-248.
- Arankowsky-Sandoval G, Mut-Martin M, Solis-Rodriguez F, Gongora-Alfaro JL, Barrera-Perez M. Sleep and memory deficits in the rat produced by experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Neurosci Lett* (2001) 306: 65-68.
- Ash C. Macrophages at the centre of infection. *Parasitol Today* (1991) 7: 2-3.
- Askonas BA. Interference in general immune function by parasite infections; African trypanosomiasis as a model system. *Parasitology* (1984) 88: 633-638.
- Askonas BA, Bancroft G.J. Interaction of African trypanosomes with the immune system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond* (1984) 307: 41-50.
- Asongyani T, Lando G, Ngu JL. Serum antibodies against human brain myelin proteins in gambian trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* (1989) 69: 213-221.
- Aston-Jones G, Bloom FE. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* (1981) 1: 876-886.
- Auregan G, Duvallet G. Un foyer de trypanosomiase humaine africaine sans glossines. *Med Trop* (1980) 40: 367-371.
- Ayed Z, Brindel I, Bouteille B, Van Meirvenne N, Doua F, Houinato D, Dumas M, Jauberteau MO. Detection and characterization of antibodies directed against neurofilament proteins in human african trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* (1997) 57: 1-6.
- Bado JP. De l'observation du sommeil à la découverte du trypanosome et de la glossine. *Med. Trop* (1993) 53: 149-157.
- Baker JR. The subspecific taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *Parasite* (1995) 2: 3-12.
- Bailey JW, Smith DH. The use of the acridine orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1992) 86: 630.

- Bakhiet M, Olsson T, Edlund C, Hojeberg B, Holmberg K, Lorentzen J, Kristensson K. A *Trypanosoma b. brucei* derived factor that triggers CD8+ lymphocytes to interferon- γ secretion: purification, characterization and protective effects *in vivo* by treatment with a monoclonal antibody against the factor. Scand J Immunol (1993) 37 : 165-178.
- Bakhiet M, Jansson L, Büscher P, Holmdahl R, Kristensson K, Olsson T. Control of parasitemia and survival during *Trypanosoma brucei brucei* infection is related to strain-dependent ability to produce IL-4. J Immunol (1996a) 157: 3518-3526.
- Bakhiet M, Olsson T, Ljungdahl A, Hojeberg B, Van der Veide PH, Kristensson K. Induction of interferon- γ , transforming growth factor beta, and interleukin-4 in mouse strain with different susceptibilities to *Trypanosoma brucei brucei*. J Interferon Cytokine Res. (1996b) 16: 427-433.
- Bakhiet M, Olsson T, Mhlanga J, Büscher P, Lycke N, Van der Meide PH, Kristensson K. Human and rodent interferon- γ as a growth factor for *Trypanosoma brucei*. Eur J Immunol (1996c) 26 : 1359-1364.
- Bancroft GJ, Sutton CJ, Morris AG, Askonas BA. Production of interferons during experimental African trypanosomiasis. Clin Exp Immunol (1983) 52: 135-143.
- Banzet S. Monoxyde d'azote et maladie du sommeil. Thèse de Doctorat en Médecine : Lyon I (1997).
- Bawin SM, Satmary WM, Adey WR. Nitric oxide modulates rhythmic slow activity in rat hippocampal slices. Neuroreport (1994) 5: 1869-1872.
- 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.
- Bentivoglio M, Grassi-Zucconi G, Peng Z, Kristensson K. Sleep and timekeeping changes, and dysregulation of the biological clock in experimental trypanosomiasis. Bull Soc Pathol Exot (1994a) 87: 372-375.
- Bentivoglio M, Grassi-Zucconi G, Peng Z, Bassetti A, Edlund E, Kristensson K. Trypanosomes cause dysregulation of c-fos expression in the rat suprachiasmatic nucleus. NeuroReport (1994b) 5: 712-714.

- Bergmann BM, Mistlberger RE, Rechtschaffen A. Period-amplitude analysis of rat electroencephalogram: stage and diurnal variations and effects of suprachiasmatic nuclei lesions. *Sleep* (1987) 10 : 523-536.
- Bert J, Collomb H, Fressy J, Gastaut H. Le sommeil de nuit normal et pathologique, études électroencéphalographiques. Paris: Masson (Ed) (1965).
- Bertrand E, Lévy S, Lafay V, Dreuilhe JL. Trypanosomiase humaine africaine et myocardite. Traitement par difluorométhylornithine. *Med Mal Infect* (1995) 25: 540-542.
- Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin / TNF- α primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* (1989) 7: 625-655.
- Williams M, Jarvis MF. Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets. *Biochem Pharmacol* (2000) 59: 1173-1185.
- Bianchi M, Sacerdote P, Ricciardi-Castagnoli P, Mantegazza P, Panerai AE. Central effects of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha on nociceptive thresholds and spontaneous locomotor activity. *Neurosci Lett* (1992) 148: 76-80.
- Bisser S, Ayed Z, Bouteille B, Stanghellini A, Breton JC, Dumas M, Jauberteau MO. Central nervous system involvement in African trypanosomiasis: presence of anti-galactocerebroside antibodies in patients' cerebrospinal fluid. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2000) 94: 225-226
- Blackwell JM, Alexander J. The macrophage and parasitic protozoa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1983) 5 : 636-645.
- Bluthé RM, Dantzer R, Kelley KW. Dissociation entre les composantes périphériques et centrales de la tolérance aux effets comportementaux de l' interleukine-1 chez le rat. *C R Acad Sci Paris* (1991a) 312: 698-694.
- Bluthé RM, Pamet P, Dantzer R, Kelley KW. Interleukin-1 receptor antagonist blocks effects of IL-1 α and IL-1 β on social behavior and body weight in mice. *Neurosci. Res. Comm.* (1991b) 9: 151-158.
- Bluthé RM, Dantzer R, Kelley KW. Effect of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. *Brain Res.* (1992a) 573: 318-320.
- Bluthé RM, Sparber S, Dantzer R. Modulation of the behavioural effects of interleukin-1 in mice by nitric oxide. *Neuroreport* (1992b) 3: 207-209.

Bluthé RM, Pawlowski M, Suarez S, Parnet P, Pittman Q, Kelley KW, Dantzer R. Synergy between TNF α and IL-1 in the induction of sickness behavior in mice. *Psychoneuroendocrinology* (1994) 19: 197- 207.

Boa YF, Traoré MA, Doua F, Kouassi-traoré MT, Kouassi RE, Giordano C. Les différents tableaux cliniques actuels de la trypanosomiase humaine africaine à *T. b. gambiense*. Analyse de 300 dossiers du foyer de Daloa, Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot* (1988) 81: 427-444.

Bobillier P, Seguin S, Petitjean F, Salvert D, Touret M, Jouvet M. The raphe nuclei of the cat brain stem: a topographical atlas of their efferent projections as revealed by autoradiography. *Brain Res* (1976) 113: 449-486.

BOHME GA, BON C, STUTZMANN J.M, DOBLE A, BLANCHARD JC. POSSIBLE INVOLVMENT OF NITRIC OXIDE IN LONG-TERM POTENTIATION. *EUR J PHARMACOL* (1991) 199 : 379-381.

Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal death. *Brain Res* (1992) 587: 250-256.

Borbely AA, Tobler I. Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation. *Physiol Rev.* (1989) 69: 605-670.

Borst P, Rudenko G. Antigenic variation in african trypanosomes. *Science* (1994) 264: 1872-1873.

Bosler O, Beaudet A. VIP neurons as prime synaptic targets for serotonin afferents in rat suprachiasmatic nucleus: a combined radioautographic and immunocytochemical study. *J Neurocytol.* (1985) 14: 749-763.

Bourdoulous S, Durieu-Trautmann O, Strosberg AD, Couraud PO. Catecholamines stimulate MHC class I, class II, and invariant chain gene expression in brain endothelium through different mechanisms. *J Immunol* (1993) 150: 1486-195.

Bouteille B, Dardé ML, Pestre-Alexandre M. Action des médicaments testés en milieu acellulaire et chez la souris infectée par *Trypanosoma brucei brucei*. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* (1988) 81: 533-542.

Bouteille B, Dardé ML, Pestre-Alexandre M. Trypanosomose à *Trypanosoma brucei brucei* : traitement par des associations. *Bull Soc Fr Parasitol* (1990) 6: 15- 20.

- Bouteille B, Marie-Daragon A, Chauvière G, De Albuquerque C, Enanga B, Dardé ML, Vallat JM, Périé J, Dumas M. Effect of megalin on *Trypanosoma brucei brucei* acute and subacute infections in Swiss mice. *Acta Trop* (1995) 60 : 204-206.
- Bouteille B, Dumas M, Buguet A, Cespuglio R et Vincendeau P. Modalités d'implication du monoxyde d'azote (NO) dans la trypanosomose africaine. *Rapport DRET* (1997) 94-167.
- Bouteille, B, Chauvière G. Implication du mégazol dans la chimiothérapie des trypanosomoses. *Med Trop* (1999) 59: 321-330.
- Bouteille B, Dumas M. La trypanosomose humaine africaine: les défis à relever pour une maladie réémergente. *Med Trop* (1999) 59: 20-24.
- Bouyer JJ, Montaron MF, Vahnee JM, Albert MP, Rougeul A. Anatomical localization of cortical beta rhythms in cat. *Neuroscience* (1987) 22: 863-869.
- Bowlin TL, Bitonti AJ, McKown BJ. Decreased interleukin-2 responsiveness in leukocytes from *Trypanosoma brucei*-infected mice. *Cell Immunol* (1988) 112: 437-441.
- BRANDENBERGER G, BUGUET A, SPIEGEL K, STANGHELLINI A, MOUANGA G, BOGUI P, MONTMAYEUR A, DUMAS M. MAINTIEN DES RELATIONS ENTRE LA SECRETION PULSATILE DES HORMONES ET LA STRUCTURE INTERNE DU SOMMEIL DANS LA TRYPANOSOMIASE HUMAINE AFRICAINE. *BULL SOC PATHOL EXOT* (1994) 87: 383-389.
- Brandenberger G, Buguet A, Spiegel K, Stanghellini A, Mouanga G, Bogui P, Dumas M. Disruption of endocrine rhythms in sleeping sickness with preserved relationship between hormone pulsatility and REM-NREM sleep cycles. *J Biol Rhythms* (1996) 11: 258-267.
- BRETT OS, HWANG PM, SNYDER SH. LOCALIZATION OF NITRIC OXIDE SYNTHASE INDICATING A NEURAL FOIE FOR NITRIC OXIDE. *NATURE* (1990) 347: 768-770.
- Brett OS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann Rev Bioch* (1994) 63: 175-195.
- Bressler SL. The gamma wave: a cortical information carrier? *Trends Neurosci.* (1990) 13: 161-162.
- Bromidge T, Gibson W, Hudson K, Dukes P. Identification of *Trypanosoma brucei gambiense* by PCR amplification of variant surface glycoprotein genes. *Acta Trop* (1993) 53: 107-119.

- Brumpt, Wurtz. Essais de traitement de la maladie du sommeil expérimentale (note préliminaire). C R Soc Biol Paris (1904) 756-758.
- Buguet A, Gati R, Sevre JP, Oeveloux M, Bogui P, Lonsdorfer J. 24 hour polysomnographic evaluation in a patient with sleeping sickness. *Electroenc Clin Neurophysiol* (1989) 72: 471-478.
- Buguet A, Bert J, Tapie P, Tabaraud F, Doua F, Lonsdorfer J, Bogui P, Dumas M. Sleep-wake cycle in human african trypanosomiasis. *J Clin Neurophysiol* (1993) 10: 190-196.
- Buguet A, Bert J, Tapie P, Bogui P, Doua F, Mouanga G, Stanghellini A, Sarda J, Tabaraud F, Gati R, Montmayer A, Chauffard F, Lonsdorfer J, Dumas M. Distribution du sommeil et de la veille dans la trypanosomose humaine africaine. *Bull Soc Pathol Exot* (1994) 87: 362-367.
- Buguet A, Burlet S, Auzelle F, Montmayer A, Jouvet M, Cespuglio R. Dualité d'action du monoxyde d'azote (NO) dans la trypanosomose africaine expérimentale. *C R Acad Sciences Paris* (1996) 319: 201-207.
- Buguet A. Is sleeping sickness a circadian disorder? The serotonergic hypothesis. *Chronobiol. Int* (1999) 16: 477-489.
- Buguet A, Tapie P, Bert J. Reversal of the sleep/wake cycle disorder of sleeping sickness after trypanosomicide treatment. *J Sleep Res* (1999) 8: 225-235.
- Buguet A, Bourdon L, Bouteille B, Cespuglio R, Vincendeau P, Radomski MW, Dumas M. The duality of sleeping sickness: focusing on sleep. *Sleep Med Rev* (2001) 5: 139-153.
- Buguet A, Tapie P, Bisser S, Chapotot F, Doua F, Cespuglio R. Sleep in sleeping sickness patients under ambulatory monitoring. *J Sleep Res* (2002) 11: 29-30.
- Burden EJ, Schumacher E and Kelly M. 2-Amino-5-(1-Methyl-5-Nitro-2-Imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial agent. VII. Action against subcutaneous *Trichomonas vaginalis* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemotherapy* (1968) 7: 538-540.
- Burlet S, Leger L, Cespuglio R. Nitric oxide and sleep in the rat: a puzzling relationship. *Neuroscience* (1999) 92: 627-639.
- Burlet S, Cespuglio R. Voltammetric detection of nitric oxide (NO) in the rat brain: its variations throughout the sleep-wake cycle. *Neurosci Lett* (1997) 226: 131-135.

Busbridge NJ, Dascombe MJ, Rothwell NJ. Chronic effects of interleukin-1 β on fever, oxygen consumption and food intake in the rat. *Horm Metab Res* (1993) 25: 222-227.

Büscher P. Actualités diagnostic. Communication à la table ronde : Etat actuel de la Trypanosomose Humaine Africaine. Second congrès européen de Médecine Tropicale. Liverpool (1998).

Büscher P, Lejon V, Magnus E, Van Meirvenne N. Improved latex agglutination test for detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense* infected patients. *Acta Trop* (1999) 73: 11-20.

Buzsaki G, Bickford TG, Pnomareff G, Thal LJ, Mandel RJ, Gage FH. Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *J Neurosci* (1988) 26 : 735-744.

Carrié J. Coloration vitale fluorescente du trypanosome. Procédé rapide de détection du parasite dans le sang. XVI^{ième} réunion du conseil scientifique international pour la recherche et la lutte contre les trypanosomes. Yaoundé, Cameroun (1979).

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Gren S, Fiore N, Williamson B. An endotoxininduced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* (1975) 72: 3666-3670.

Cassone VM. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci* (1990) 13: 457-464.

Cassone VM, Warren WS, Brooks OS, Lu J. Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *J Biol Rhythms* (1993) 8: S73-S81.

Cattand P. Trypanosomiase humaine africaine: situation épidémiologique actuelle, une recrudescence alarmante de la maladie. *Bull Soc Pathol Exot* (1994) 87: 307-310.

Cattand P, Miezán BT, de Raadt P. Human African trypanosomiasis: use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *Bull World Health Organ* (1988) 66: 83-86.

Centemeri C, Bolego C, Abbracchio MP, Cattabeni F, Puglisi L, Burnstock G, Nicosia S. Characterization of the Ca²⁺ responses evoked by ATP and other nucleotides in mammalian brain astrocytes. *Br J Pharmacol* (1997) 121: 1700-1706.

Cerami A, Ikeda Y, Le Trang N, Hotez PJ, Beutler B. Weight loss associated with an endotoxin-induced mediator from peritoneal macrophages: the role of cachectin (tumor necrosis factor). *Immunol Lett* (1985) 11: 173-177.

Cerami A, Beutler B. The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. *Immunol Today* (1988) 9: 28-31.

Cerami A. Inflammatory cytokines. *Clin Immunol Immunopathol* (1992) 62: S3-S10.

Cespuglio R, Faradji H, Riou F, Buda M, Gonon F, Pujol JF, Jouvét M. Differential pulse voltammetry in brain tissue. II. Detection of 5-hydroxyindoleacetic acid in the rat striatum. *Brain Res* (1981a) 223: 299-311.

Cespuglio R, Faradji H, Gomez ME, Jouvét M. Single unit recordings in the nuclei raphe dorsalis and magnus during the sleep-waking cycle of semi-chronic prepared cats. *Neurosci Lett* (1981b) 24: 133-138.

Cespuglio R, Sarda N, Gharib A, Chastrette N, Houdouin F, Rampin C, Jouvét M. Voltammetric detection of the release of 5-hydroxyindole compounds throughout the sleep-waking cycle of the rat. *Exp Brain Res* (1990) 80: 121-128.

Cespuglio R, Houdouin F, Oulerich M, Jouvét M. Axonal and somatodendritic modalities of serotonin release: their involvement in sleep preparation, triggering and maintenance. *J. Sleep Res* (1992) 1 : 150-156.

Cespuglio R, Burlet S, Marinesco S, Robert F, Jouvét M. Détection voltamétrique du NO cérébral chez le rat. Variations du signal à travers le cycle veille-sommeil. *C R Acad Sciences Paris* (1996) 319 : 191-200.

Chagnac-Amitai Y, Luhmann HJ, Prince DA. Burst generating and regular spiking layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex have different morphological features. *J Comp Neurol* (1990) 296: 598-613.

Chaouloff F, Laude D, Elghozi JL. Physical exercise: evidence for differential consequences of tryptophan on 5-HT synthesis and metabolism in central serotonergic cell bodies and terminaisons. *J Neurol Transm* (1989) 78: 121-130.

Chastrette N, Cespuglio R, Lin JS, Jouvét M. Proopiomelanocortin (POMC)-derived peptides and sleep in the rat. Part II-Aminergic regulatory processes. *Neuropeptides* (1990) 15: 75-88.

Chauvière G, Bouteille B, Enanga B, de Albuquerque C, Croft S, Dumas M, Périé J. Synthesis and biological activity of nitro heterocycles analogous of megazol, a trypanocidal Lead. *J Med Chem* (2003) 46: 427-440.

- Chirimwami B, Van Marck EAE, Brocher JM, Wéry M, Gigase PLJ. Progression of central nervous system lesions in the rat infected with *Trypanosoma brucei gambiense*. A light microscopic study. *Ann Soc Belge Med Trop* (1988a) 65 : 205-218.
- Chirimwami B, Van Marck EAE, Brocher JM, Mulumba P, Wéry M, Gigase PLJ. Light microscopic neuropathology of long-term experimental *Trypanosoma brucei gambiense* infection in the rat. *Ann Soc Belge Med Trop* (1988b) 66 : 195-203.
- Claustrat B, Buguet A, Geoffriau M, Bogui P, Mouanga G, Stanghellini A, Dumas M. Plasma melatonin rhythm is maintained in human African trypanosomiasis. *Neuroendocrinology* (1998) 68: 64-70.
- Coindet J, Debilly G, Jouvet M. Role of the raphe nuclei : II. On sleep circadian organization in the rat. *Third European Neuroscience Meeting, Rome* (1979).
- Collin M, Backberg M, Onnestam K, Meister B. 5-HT_{1A} receptor immunoreactivity in hypothalamic neurons involved in body weight control. *Neuroreport* (2002) 13: 945-951.
- Collomb H. Trypanosomiase. Cours de pathologie exotique EACIRSSTC, Pharo, Marseille (1958).
- Collomb H, Bert J, Zwingelstein J. Intérêt de l'examen électroencéphalographique dans la trypanosomiase humaine africaine. *Segundo Congresso argentino de neurologia e primera reunion internacional de neurologia tropical, Buenos Aires* (1961).
- Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, Barrett TV, Carrara N, Degraive W, Campbell DA. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1996) 90: 278-279.
- Couraud PO Interactions between lymphocytes, macrophages, and central nervous system cells. *J Leukoc Biol* (1994) 56: 407-415.
- Crestani F, Seguy F, Dantzer R. Behavioural effects of peripherally injected interleukin-1: role of prostaglandins. *Brain Res* (1991) 542: 330-335.
- Cross GAM. Identification and properties of clone specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* (1975) 71: 393-417.
- Darji A, Sileghem M, Heremans H, Brys L, de Baetselier P. Inhibition of T-cell responsiveness during experimental infections with *Trypanosoma brucei*: active involvement of gamma interferon. *Infect Immun* (1993) 61: 3098-3102.

- Dascombe MJ, Milton AS. Study of the possible entry of bacterial endotoxin and prostaglandins E2 into the central nervous system from the blood. *Br J Pharmacol* (1979) 66 : 565-572.
- Daulouède S, Okomo-Assoumou MC, Labassa M, Fouquet C, Vincendeau P. Mécanisme de défense au cours des trypanosomoses. *Bull Soc Pathol Exot* (1994) 87: 330-332.
- Daulouède S, Bouteille B, Moynet D, de Baetselier P, Courtois P, Lemesre JL, Buguet A, Cespuglio R, Vincendeau P. Human macrophage tumor necrosis factor (TNF)- α production induced by *Trypanosoma brucei gambiense* and the role of TNF- α in parasite control. *J Infect Dis* (2001) 183: 988- 991.
- De Raadt P. Congenital Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Arch Fr Pediatr* (1985) 42: 925-927.
- Dechambre A. *Gazette Hebdomadaire de Médecine et de Chirurgie* (1861) 36 : 572-573.
- Decker K, Reuss S. Nitric oxide-synthesizing neurons in the hamster suprachiasmatic nucleus: a combined NOS and NADPH-staining and retinohypothalamic tract tracing study. *Brain Res* (1994) 666: 284-288.
- De Groof D, Bruneel H, Musumari TS, Ruppel JF. Traitement de la maladie du sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense* avec le DL-Alpha-Difluorométhylornithine dans un hôpital rural au Zaïre. *Med Trop* (1992) 52: 369-375.
- Denoyer M, Sallanon M, Kitahama K, Aubert C, Jouvet M. Reversibility of parachlorophenylalanine-induced insomnia by intrahypothalamic microinjection of L-5-hydroxytryptophan. *Neuroscience* (1989) 28: 83-94.
- Denoyer M, Sallanon M, Buda C, Kitahama K, Jouvet M. Neurotoxic lesion of the mesencephalic reticular formation and/or the posterior hypothalamus does not alter waking in the rat. *Brain Res* (1991) 539: 287-303.
- De Vries HE, Blom-Roosemalen MC, Van Oosten M, de Boer AG, Van Berkel TJ, Breimer DD, Kuiper J. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol* (1996) 64: 37-43.
- Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA, O'Connor JV. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *J Exp Med* (1986) 163: 1433-1450.
- Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* (1991) 77: 1627-1652.

- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* (1988) 141: 2407-2412.
- Dolinsky ZS, Burright RG, Donovan PJ, Glickman LT, Babish J, Summers B, Cypess RH. Behavioral effects of lead and *Toxocara canis* in mice. *Science* (1981) 213: 1142-1144.
- Dumas M, Boa FY. Human African trypanosomiasis. *Handbook of clinical neurology*. The Science Publishing CO. INC. New York: Harris AA (Ed), vol. 8, pp.339-344 (1988).
- Dumas M, Bouteille B. Trypanosomose Humaine Africaine. *C R Soc Biol* (1996) 190: 395-408.
- Dumas M. La maladie du sommeil, maladie réémergente. *Bull Acad Natl Med* (2000) 184: 1867-1882.
- Dumas M, Bouteille B. Treatment of human African trypanosomiasis. *Bull World Health Organ* (2000) 78: 1474.
- Dzolic MR, De Vries R. Nitric oxide Synthase inhibition reduces wakefulness. *Neuropharmacol* (1994) 33: 1505-1509.
- Earnest DJ, Olschowka JA. Circadian regulation of *c-fos* expression in the suprachiasmatic pacemaker by light. *J Biol Rhythms* (1993) 8: S65-S71.
- Eiden LE, Brownstein MJ. Extrahypothalamic distributions and functions of hypothalamic peptide hormones. *Fed Proc* (1981) 40: 2553-2559.
- Eissa NT, Strauss AJ, Haggerty CM, Choo EK, Chu SC, Moss J. Alternative splicing of human inducible nitric oxide synthase mRNA. Tissue-specific and induction by cytokines. *J Biol Chem* (1996) 271: 27184-27187.
- Eltayeb R, Sharafeldin A, Jaster R, Bittorf T, Mix E, Bakhiet M. *Trypanosoma brucei brucei* induces interferon-gamma expression in rat dorsal root ganglia cells via a tyrosine kinase-dependent pathway. *J Infect Dis* (2000) 181: 400-404.
- El Kafî B, Cespuglio R, Léger L, Marinesco S, Jouvet M. Is the nucleus raphe dorsalis a target for the peptides possessing hypnogenic properties? *Brain Res* (1994) 637: 211-221.
- El Mansari M, Sakai K, Jouvet M. Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Exp Brain Res* (1989) 76: 519-529.

El Mansari M, Sakai K, Jouvét M. Responses of presumed cholinergic mesopontine tegmental neurons to carbachol microinjections in freely moving cats. *Exp Brain Res* (1990) 83: 115-123.

El Mansari M. Les neurones cholinergiques du tegmentum mésopontique dorsal: leur rôle dans la désynchronisation corticale. Thèse de Doctorat en Sciences : Lyon (1990).

Emmick JT, Kwon S, Bidasee KR, Besch KT, Besch HR. Dual effect of suramin on calcium fluxes across sarcoplasmic reticulum vesicle membranes. *J Pharmacol Exp Ther* (1994) 269: 717-724.

Enanga B, Labat C, Boudra H, Chauvière G, Keita M, Bouteille B, Dumas M, Houin G. Simple high-performance liquid chromatographic method to analyse megazol in human and rat plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (1997) 696: 261-266.

Enanga B, Keita M, Chauvière G, Dumas M, Bouteille B. Megazol combined with suramin: a chemotherapy regimen which reversed the CNS pathology in a model of human African trypanosomiasis in mice. *Trop Med Int Health* (1998) 3: 736-741.

Enanga B, Boudra H, Chauvière G, Labat C, Bouteille B, Dumas M, Houin G. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol, a new potent trypanocidal drug in animals. *Arzneimittelforschung* (1999) 49: 441-447.

Enanga B, Ndong JM, Boudra H, Debrauwer L, Dubreuil G, Bouteille B, Chauvière G, Labat C, Dumas M, Périé J, Houin G. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol in a *Trypanosoma brucei gambiense* primate model of human African trypanosomiasis. Preliminary study. *Arzneimittelforschung* (2000) 50: 158-162.

Eouzan JP, Louis EJ. La trypanosomiase humaine africaine dans les états de l'OCEAC. Les vecteurs et les possibilités de leur contrôle. *Bull OCEAC* (1994) 27: 85-91.

Eozenou P, Zitsamale-Cody R. Essai thérapeutique de la DFMO (éflornithine) sur 14 malades, résultats préliminaires. *Bull OCEAC* (1989) 87: 15-17.

Fabry Z, Raine CS, Hart MN. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol Today* (1994) 15: 218-224.

Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* (1985) 227: 1485-1487.

- Fairlamb AH. Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis. 1. Novel approaches to the chemotherapy of trypanosomiasis. *Trans Roy Trop Med Hyg* (1990) 84: 613-617.
- Fantino M, Wieteska L. Evidence for a direct central anorectic effect of tumornecrosis-factor-alpha in the rat. *Physiol Behav* (1993) 53: 477-484.
- Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* (1994) 6: 341-360.
- Fink E, Schmidt H. Meningo encephalitis in chronic *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection of white mouse. *Trop Med Parasitol* (1979) 30: 206-211.
- Fiore M, Moroni R, Aloe L. Removal of the submaxillary salivary glands and infection with the trematode *Schistosoma mansoni* alters exploratory behavior and pain thresholds in female mice. *Physiol Behav* (1997) 62: 399-406.
- Fiore M, Alleva E, Probert L, Kollias G, Angelucci F, Aloe L. Exploratory and displacement behavior in transgenic mice expressing high levels of brain TNF α . *Physiol Behav* (1998) 63: 571-576.
- Fisher C, Gross J, Zuch J. Cycle of penile erection synchronous with dreaming (REM) sleep. *Arch Gen Psychiat* (1965) 12: 25-54.
- Fontana A, Kristensen F, Dubs R, Gemsa D, Weber E. Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. *J Immunol* (1982) 129: 2413-2419.
- Fontana A, Fierz W, Wekerle H. Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature* (1984) 307: 273-276.
- Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G. Nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* (1983) 63: 844-914.
- Fornal CA, Jacobs BL. Physiological and behavioral correlates of serotonergic single unit activity. Neuronal serotonin. New York: Osborne NN and Hamon M. (Eds) (1988) pp. 305-345.
- Fort P, Sakai K, Luppi PH, Salvert D, Jouvet M. Monoaminergic, peptidergic and cholinergic afferents to the caudal facial nucleus as evidenced by a double immunostaining method with unconjugated cholera toxin as a retro grade tracer. *J Comp Neurol* (1989) 283: 285-302.

- Fort P, Luppi PH, Sakai K, Salvetti D, Jouvet M. Nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat trigeminal motor nucleus: a double-labeling study with cholera-toxin as a retrograde tracer. *J Comp Neurol* (1990) 301: 262-275.
- Fraker DL, Stovroff MC, Merino MJ, Norton JA. Tolerance to tumor necrosis factor in rats and the relationship to endotoxin tolerance toxicity. *J Exp Med* (1988) 168: 95-106.
- Freeman WJ, Van Dijk BW. Spatial patterns of visual cortical fast EEG during conditioned reflex in a rhesus monkey. *Brain Res* (1987) 422: 267-276.
- Frezil JL, Coulm J, Alary JC. Evolution après traitement des suspects immunologiques de trypanosomiase non confirmés parasitologiquement. *Med Trop* (1979) 39: 53-56.
- Friedman L, Brooks JO, Bliwise DL, Yesavage JA, Wicks DS. Perceptions of life stress and chronic insomnia in older adults. *Psychol Aging* (1995) 10: 352-357.
- Fukuda M, Ono T, Nishino H, Sasaki K. Independent glucose effects on rat hypothalamic neurons: an in vitro study. *J Auton Nerv Syst* (1984) 10: 373-81.
- Fukuto JM, Chaudhuri G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1995) 35: 165-194.
- Gallais P. Etude électroencéphalographique de la trypanosomiase humaine. *Rev Neurol* (1951) 85 : 95-104.
- Gallais P. Etudes sur la trypanosomiase humaine africaine. *Med. Trop. Numéro spécial de décembre* (1953), 799-858.
- Gardier AM, Trouvin JH, Orosco M, Nicolaidis S, Jacquot C. Effects of food intake and body weight on a serotonergic turn-over index in rat hypothalamus. *Brain Res Bull* (1989) 22: 531-535.
- Girard M, Ayed Z, Preux PM, Bouteille B, Preud'homme JL, Dumas M, Jauberteau MO. *In vitro* induction of nitric oxide synthase in astrocytes and microglia by *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasite Immunol* (2000) 22: 7-12.
- Giulian D, Baker TJ, Shih LC, Lachman LB. Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia.. *J Exp Med* (1986) 164: 594-604.
- Glenn LL, Steriade M. Discharge rate and excitability of cortically projecting intralaminar thalamic neurons during waking and sleep states. *J Neurosci* (1982) 10: 1387-1404.

- Gobert AP, Daulouède S, Lepoivre M, Boucher JL, Bouteille B, Buguet A, Cespuglio R, Veyret B, Vincendeau P. L-arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect Immun* (2000) 68: 4653-4657.
- Goodwin LG, Hook SVM. Vascular lesions in rabbits infected *Trypanosoma brucei*. *Br J Pharmacol Chemother* (1968) 32: 305-312.
- Goodwin LG. Pathological of *Trypanosoma brucei* on small blood vessels in rabbit ear-chambers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1971) 65 : 82-88.
- Grosskinsky CM, Ezekowitz RAB, Berton G, Gordon S, Askonas BA. Macrophage activation in murine African trypanosomiasis. *Infect Immun* (1983) 39: 1080-1086.
- Gottesmann C. Detection of seven sleep-waking stages in rat. *Neurosci Biobehav Rev* (1992) 16: 31-38.
- Gouteux JP, Noireau F, Malonga JR, Frezil JL. «Effet de case» et «contamination familiale» dans la maladie du sommeil: essai d'interprétation du phénomène. Exemple de trois foyers congolais. *Ann Parasitol Hum Comp* (1988) 63: 315-333.
- Grassi-Zucconi G, Harris JA, Mohammed AH, Ambrosini MV, Kristensson K, Bentivoglio M. Sleep fragmentation, and changes in locomotor activity and body temperature in trypanosome-infected rats. *Brain Res Bull* (1995) 37: 123-129.
- Grassi-Zucconi G, Semprevivo M, Mocaer E, Kristensson K, Bentivoglio M. Melatonin and its new agonist S-20098 restore synchronized sleep fragmented by experimental trypanosome infection in the rat. *Brain Res Bull* (1996) 39: 63-68.
- Greenwood BM, Whittle HC. The pathogenesis of sleeping sickness. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1980) 74 : 716-723.
- Gritti I, Mainville L, Jones BE. Projections of GABAergic and cholinergic basal forebrain and GABAergic preoptic-anterior hypothalamic neurons to the posterior lateral hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol* (1994) 339: 251-268.
- Gurruchaga JM, Ollat H, Peschanski M. Neuroanatomie fonctionnelle. De la cellule aux comportements. ANPP (Ed) Vol. 4 : Les astrocytes (1996).
- Haas HL, Reiner PB. Membrane properties of histaminergic tuberomammillary neurones of the rat hypothalamus *in vitro*. *J Physiol* (1988) 399: 633-646.

- Hallanger A, Levey AI, Lee HJ, Rye DB, Wainer BW. The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* (1987) 62: 105-124.
- Hamadien M, Bakhiet M, Harris RA. Interferon-gamma induces secretion of trypanosome lymphocyte triggering factor via tyrosine protein kinases. *Parasitology* (2000) 120: 281-287.
- Hambrey PN, Mellors A, Tizard IR. The phospholipases of pathogenic and non-pathogenic *Trypanosoma* species. *Mol Biochem Parasitol.* (1981) 2: 177-186.
- Hancock MB, Fougousse CL. Spinal projections from the nucleus locus coeruleus and nucleus subcoeruleus in the cat and monkey as demonstrated by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *Brain Res Bull* (1976) 1: 229-234.
- Harries AD, Wirima JJ. African trypanosomiasis in a Caucasian associated with anaphylactic shock. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1988) 82: 578.
- Hart BL. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* (1988) 12: 123-137.
- Hayes GM, Woodroffe MN, Cuzner ML. Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. *J Neurol Sci* (1987) 80: 25-37.
- Hellendal RP, Ting JPY. Differential regulation of cytokine-induced major histocompatibility complex class II expression and nitric oxide release in rat microglia and astrocytes by effectors of tyrosine kinase, protein kinase C, and cAMP. *J Neuroimmunol* (1997) 74: 19-29.
- Hellerstein MK, Meydani SN., Meydani M., Wu K, Dinarello CA. Interleukin-1-induced anorexia in the rat. *J Clin Invest* (1989) 84: 228-235.
- Hernandez-Peon R, Ibarra GC. Sleep induced by electrical or chemical stimulation of the forebrain. In the physiological bases of mental activity. *Electroencephal Clin Neurophysiol* (1963) 24: 188-198.
- Hemphill A, Frame I, Ross CA. The interaction of *Trypanosoma congolense* with endothelial cells. *Parasitology* (1994) 109: 631-641.
- Hemphill A, Ross CA. Flagellum-mediated adhesion of *Trypanosoma congolense* to bovine aorta endothelial cells. *Parasitol Res* (1995) 81: 412-420.

Hendry SHC, Jones EG, Graham J. Thalamic relay nuclei for cerebellar and certain related fiber systems in the rat. *J Comp Neurol* (1979) 185: 679-714.

Henley K, Morrison R. A re-evaluation of the effects of lesions on the pontine tegmentum and locus coeruleus and phenomena of paradoxical sleep in the rat *Acta Neurobiol Exp* (1974) 34: 215-232.

Herbert WJ, Parratt D, Van Meirvenne N, Lennox B. An accidental laboratory infection with trypanosomes of a defined stock. II. Studies on serological response of the patient and the identity of the infecting organism. *J Infect* (1980) 2: 113-124.

Hertz L, Mac Ferlin DE, Waksman BH. Astrocytes: auxiliary cells for immune responses in the central nervous system? *Immunol Today* (1990) 11: 265-268.

Hibbs JB, Vavrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* (1987) 138: 550-565.

Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* (1991) 28: 254-260.

Hobson JA. The effect of chronic brain stem lesions on cortical and muscular activity during sleep and waking in the cat. *Electroencephal Clin Neurophysiol* (1965) 19: 41-62.

Hobson JA, McCarley RW, Pivik RT, Freedman R. Selective firing by cat pontine brain stem neurons in desynchronized sleep. *J Neurophysiol* (1974) 37: 497-511.

Hobson JA, Mccarley RW, Wyzinski PW. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal group. *Science* (1975) 89: 55-58.

Holstege JC, Bongers CM. A glycinergic projection from the ventromedial lower brainstem to spinal motoneurons. An ultrastructural double labeling study in rat. *Brain Res* (1991) 566: 308-315.

Houdouin F, Cespuaglio R, Jouvet M. Effects induced by the electrical stimulation of the nucleus raphe dorsalis upon hypothalamic release of 5-hydroxyindole compounds and sleep parameters in the rat. *Brain Res* (1991) 565: 48-56.

Hublart M, Lagouche L, Racadot A, Boersma A, Degand P, Noireau F, Lemesre JL, Toudic A. Fonction endocrine et trypanosomiase africaine. Bilan de 79 cas. *Bull Soc Pathol Exot* (1988) 81: 468-476.

- Hunter CA, Gow JW, Kennedy PGE, Jennings FW, Murray M. Immunopathology of experimental african sleeping sickness: detection of cytokine mRNA in the brains of *Trypanosoma brucei brucei* infected mice. *Infect Immun* (1991) 59: 4636-4640.
- Hunter CA, Jennings FW, Tierney JF, Murray M, Kennedy PGE. Correlation of autoantibody titres with central nervous system pathology in experimental African trypanosomiasis. *J Neuroimmunol* (1992a) 41: 143-148.
- Hunter CA, Jennings FW, Adams JH, Murray M, Kennedy PGE. Subcurative chemotherapy and fatal post-treatment reactive encephalopathies in african trypanosomiasis. *Lancet* (1992b) 339: 956-958.
- Hunter CA, Kennedy PG. Immunopathology in central nervous system human African trypanosomiasis. *J Neuroimmunol* (1992) 36: 91-95.
- Iadecola C, Xu X, Zhang F, el Fakahany EE, Ross ME. Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* (1995) 15: 52-59.
- Ibuka N, Kawamura H. Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions. *Brain Res* (1975) 96: 76-81.
- Ibuka N, Inouye ST, Kawamura H. Analysis of sleep-wakefulness rhythms in male rats after suprachiasmatic nucleus lesion and ocular enucleation. *Brain Res* (1977) 122: 33-47.
- Igbokwe IO, Isa S, Aliyu UK, Hamza HG, Egbe-Nwiyi T. Increased severity of acute *Trypanosoma brucei brucei* infection in rats with alloxan-induced diabetes. *Vet Res* (1998) 29: 573-578.
- Inoue N, Inoue M, Kuriki K, Yamaguchi H, Nagasawa H, Mikami T, Fujisaki K, Suzuki N, Hirumi H. Interleukin 4 is a crucial cytokine in controlling *Trypanosoma brucei gambiense* infection in mice. *Vet Parasitol* (1999) 86: 173-184.
- Iten M, Matovu E, Brun R, Kaminsky R. Innate lack of susceptibility of Ugandan *Trypanosoma brucei rhodesiense* to DL-alpha-difluoromethylornithine (DFMO). *Trop Med Parasitol* (1995) 46: 190-194.
- Itoh K, Mizuno N. Topographical arrangement of thalamocortical neurons in the centrolateral nucleus (CL) of the cat, with special reference to a spino-thalamo-motor cortical path through the CL. *Exp Brain Res* (1977) 30: 471-480.

Iwakiri H, Matsuyama K, Mori S. Extracellular levels of serotonin in the medial pontine reticular formation in relation to sleep-wake cycle in cats: a microdialysis study. *Neurosci Res* (1993) 18: 157-170.

Jacobs BL Overview of the activity of brain monoaminergic neurons across the sleep-wake cycle. *Sleep: neurotransmitters and neuromodulators*. Wauquier A, Gaillard JM, Monti JM, Radulovacki M (Eds), Raven Press, New York (1985) pp. 1-14.

Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM. Nitric oxide expression in the spleen, but not in the liver, correlates with resistance to blood stage malaria in mice. *J Immunol* (1995) 155: 5306-5313.

James SL, Hibbs JB. The role of nitrogen oxides as effector molecules of parasite killing. *Parasitol Today* (1990) 6: 303-305.

Jannin J, Eozenou P, Ngampo S, Chabrier J, Beuzit Y, Zitsamale-Cody R. Place de la DFMO dans le traitement de la THA: l'expérience congolaise. *Bull OCEAC* (1990) 93 : 27-30.

Jannin J, Moulia-Pelat JP, Chanfreau B, Penchenier L, Louis JP, Nzaba P, de La Baume FE, Eozenou P, Cattand P. African human trypanosomiasis: study of a scoring system of presumptive diagnosis in the Congo. *Bull World Health Organ* (1993) 71: 215-222.

Jauberteau MO, Ben Younes-Chennoufi A, Amevigbe M, Bouteille B, Dumas M, Breton JC, Baumann N. Galactocerebrosides are antigens for immunoglobulins in sera of an experimental model of trypanosomiasis in sheep. *J Neurol Sci* (1991) 101: 82-86.

Jauberteau MO, Bisser S, Ayed Z, Brindel I, Bouteille B, Stanghellini A, Gampo S, Doua F, Breton JC, Dumas M. Détection d'autoanticorps anti-galactocérébroside au cours de la trypanosomose humaine africaine. *Bull Soc Path Ex* (1994) 87 : 333-336.

Jeannerod M. Organisation de l'activité phasique du sommeil paradoxal. Etude électrophysiologique et neuropharmacologique. Thèse de Doctorat en Médecine : Lyon (1965).

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.

Jennings FW, Urquhart GM, Murray PK, Miller BM. Treatment with suramin and 2-substituted 5-nitroimidazoles of chronic *Trypanosoma brucei* infections with central nervous system involvement. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1983) 77 : 693-698.

Jennings FW, Gray GD. Relapsed parasitaemia following chemotherapy of chronic *Trypanosoma brucei* in mice and its relation to cerebral trypanosomoses. *Cont Microbiol Immunol* (1983) 7 : 147-154.

Jennings FW, Urquhart GM, Murray PK, Miller BM. The use of 2-substituted 5-nitroimidazoles in the treatment of chronic murine *Trypanosoma brucei* infections with central nervous system involvement. *Z Parasitenkd* (1984) 70: 691-697.

Jennings FW. The potentiation of arsenicals with difluoromethylornithine (DFMO): experimental studies in murine trypanosomiasis. *Bull Soc Pathol Exot* (1988a) 81: 595- 607.

Jennings FW. Chemotherapy of trypanosomiasis: the potentiation of melarsoprol by concurrent difluoromethylornithine (DFMO) treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1988b) 82: 572-573.

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.

Jennings FW, Chauviere G, Viode C, Murray M. Topical chemotherapy for experimental African trypanosomiasis with cerebral involvement: the use of melarsoprol combined with the 5-nitroimidazole, megalol. *Trop Med Int Health* (1996) 3: 363-366.

Jennings FW, Rodgers J, Bradley B, Gettinby G, Kennedy PGE, Murray M. Human African trypanosomiasis: Potential therapeutic benefits of an alternative suramin and melarsoprol regimen. *Parasitol Int* (2002) 51: 381-388.

Jhala U, Baly DL. Effect of chronic IL-1 beta infusion on glucose homeostasis and pancreatic insulin secretion. *Life Sci* (1994) 54: 413-422.

Jones EG, Leavitt RY. Retrograde axonal transport and the demonstration of non-specific projections to the cerebral cortex and striatum from thalamic intralaminar nuclei in the rat, cat and monkey. *J Comp Neurol* (1974) 154: 349-377.

Jones BE. *The thalamus*. Plenum Press, New York (1985).

Jones BE, Yang T. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol* (1985) 252: 56-92.

Johnson MD, Ma PM. Localization of NADPH diaphorase activity in monoaminergic neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* (1993) 332: 391-406.

- Jouvet M, Michel F, Courjon J. Sur un stade d'activité électrique rapide au cours du sommeil physiologique. C R Soc Biol (1959) 53: 1024-1028.
- Jouvet M, Michel F. Corrélations électromyographiques du sommeil chez le chat décortiqué mésencéphalique chronique. C R Soc Biol (1959) 53: 422-425.
- Jouvet M. Recherche sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique. Arch Ital Biol (1962) 100: 125-206.
- Jouvet M. Paradoxical sleep: a study of its nature and mechanisms. Prog in Brain Res: Sleep mechanisms. Amsterdam: Elsevier. Akert K, Bally C, Schade JP (Eds) (1965) pp. 20-62.
- Jouvet M, Delorme J. Locus coeruleus et sommeil paradoxal. C R Soc Biol Paris (1965) 159: 895-899.
- Kabiri M, Franco JR, Simarro PP, Ruiz JA, Sarsa M, Steverding D. Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7. Trop Med Int Health (1999) 4: 658-661.
- Kaitin IK. Preoptic area unit activity during sleep and wakefulness in the cat. Exp Neurol (1984) 83: 347-357.
- Kaminsky R, Mäser P, Matovu E, Enyaru J, Studer P, Kralli N. Drug resistance in trypanosomes pathogenic to humans. Communication au congrès international Sleeping Sickness rediscovered. Session VIII: Drug resistance. (1998) Anvers, Belgique.
- Kapas L, Opp M, Kimura T, Akeuchi M, Krueger JM. Peripheral prostaglandins do not mediate the hypnogenic effects of interleukin-1. Sleep Res (1991) 20, 35-39.
- Kapas L, Hong L, Cady AB, Opp MR, Postlethwaite AE, Seyer JM, Krueger JM. Somnogenic, pyrogenic, and anorectic activities of tumor necrosis factor-alpha and TNF-alpha fragments. Am J Physiol (1992) 263: R708-R715.
- Kapas L, Obal F, Krueger JM. Humoral regulation of sleep. Int Rev Neurobiol (1993) 35: 131-160.
- Kapas L, Fang J, Krueger JM. Inhibition of nitric oxide synthesis inhibits rat sleep. Brain Res. (1994a) 664: 189-196.
- Kapas L, Shibata M, Kimura M, Krueger JM. Inhibition of nitric oxide synthesis suppresses sleep in rabbits. Am J Physiol. (1994b) 266: R151-R157.

- Kapas L, Krueger JM. Nitric oxide donors SIN-1 and SNAP promote non rapid-eye-movement sleep in rats. *Brain Res Bull* (1996) 41: 293-298.
- Kazyumba L, Wery M, Ruppel JF. Congenital transmission of *Trypanosoma gambiense*. *Ann Soc Belge Med Trop* (1978) 58 : 65-66.
- Kazyumba G, Berney M, Brighthouse G, Cruchaud A, Lambert PH. Expression of the cell repertoire and autoantibodies in human african trypanosomiasis. *Clin Exp Immunol* (1986) 65 : 10-18.
- Keita M, Bouteille B, Enanga B, Vallat J.M, 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.
- Keita M, Vincendeau P, Buguet A, Cespuglio R, Vallat JM, Dumas M, Bouteille B. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in the central nervous system of mice chronically infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp Parasitol* (2000) 95: 19-27.
- Kennedy H, Baleyrier C. Direct projections from thalamic intralaminar nuclei to visual cortex in the cat traced with horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* (1977) 28: 133-139.
- Kent S, Price M, Satinoff E. Fever alters characteristics of sleep in rats. *Physiol Behav* (1988) 44: 709-715.
- Kent S, Kelley KW, Dantzer R. Effects of lipopolysaccharide on food-motivated behavior in the rat are not blocked by an interleukin-1 receptor antagonist. *Neurosci Lett* (1992a) 145: 83-86.
- Kent S, Bluthé RM, Kelley KW, Dantzer R. Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci* (1992b) 13: 24-28.
- Kent S, Bluthé RM, Dantzer R, Hardwick AJ, Kelley KW, Rothwell NJ, Vannice JL. Different receptor mechanisms mediate the pyrogenic and behavioral effects of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992c) 89: 9117-9120.
- Kent S, Rodriguez F, Kelley KW, Dantzer R. Reduction in food and water intake induced by microinjection of interleukin-1 beta in the ventromedial hypothalamus of the rat. *Physiol Behav* (1994) 56: 1031-1036.
- Kent S, Bret-Dibat JL, Kelley KW, Dantzer R. Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. *Neurosci Biobehav Rev* (1996) 20: 171-175.

- Kerandel J. Un cas de trypanosomiase chez un médecin (auto-observation). Bull Soc Pathol Exot (1910) 642-662.
- Kherl JH, Miller A, Fauci AS. Effect of tumor necrosis factor- α on mitogen-activated human B cells. J Exp Med (1987) 166: 786-791.
- Kierszenbaum F, Muthukkumar S, Beltz LA, Szein MB. Suppression by *Trypanosoma brucei rhodesiense* of the capacities of human T lymphocytes to express interleukin-2 receptors and proliferate after mitogenic stimulation. Infect Immun (1991) 59: 3518-3522.
- Kitahama K, Sallanon M, Okamura H, Geffard M, Jouvet M. Cells presenting GABA immunoreactivity in the hypothalamus of the cat. C R Acad Sci III (1989) 308: 507-511.
- Khonde N, Pépin J, Mpia B. A seven day course of eflornithine for relapsing *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. Trans R Soc Trop Med Hyg (1997) 91: 212-213.
- King CD, Jewett RE. The effect of alpha-methyl-para-tyrosine on sleep and brain norepinephrine in cats. J Pharmacol Exp Ther (1971) 177: 188-195.
- King BF, Neary JT, Zhu Q, Wang S, Norenberg MD, Burnstock G. P-2 purinoreceptors in rat cortical astrocytes: expression, calcium-imaging and signalling studies. Neuroscience (1996) 74: 1187-1196.
- Kleitman N. Basic rest-activity cycle in relation to sleep and wakefulness. Sleep physiology and pathology. Lippincott, Philadelphia. Kleitman N (ed) (1969) pp. 39-52.
- Kmjevic K, Pumain R, Renaud L. The mechanism of excitation of acetylcholine in the cerebral cortex. J Physiol (1971) 215: 447-465.
- Kobayakawa T, Louis J, Izui S, Lambert P. Autoimmune response to DNA, red blood cells, and thymocyte antigens in association with polyclonal antibody synthesis during experimental African trypanosomiasis. J Immunol (1979) 122: 296-301.
- Kongshavin PA, Ghadirian E. Enhancing and suppressive effects of tumor necrosis factor/cachectin on growth of *Trypanosoma musculi*. Parasite Immunol (1998) 10: 581-588.
- Kremsner PG, Winkler S, Wildling E, Prada J, Bienzle U, Graninger W, Nussler AK. High plasma levels of nitrogen oxides are associated with severe disease and correlate with rapid parasitological and clinical cure in *Plasmodium falciparum* malaria. Trans Roy Soc Trop Med Hyg (1996) 90: 44-47.

- Kristensson K, Claustrat B, Mhlanga JD, Moller M. African trypanosomiasis in the rat alters melatonin secretion and melatonin receptor binding in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Bull* (1998) 47: 265-269.
- Krueger JM, Walter J, Dinarello CA, Wolff SM, Chedid L. Sleep-promoting effects of endogenous pyrogen (interleukin-1). *Am J Physiol* (1984) 246: R994-R999.
- Krueger JM, Kubillus S, Shoham S, Davenne D. Enhancement of slow-wave sleep by endotoxin and lipid A. *Am J Physiol* (1986) 251: R591-R597.
- Krueger JM, Majde JA. Cytokines and sleep. *Int Arch Allergy Immunol* (1995) 106: 97-100.
- Krueger JM, Takahashi S, Kapas L, Bredow S, Roky R, Fang J, Floyd R, Renegar KB, Guha-Thakurta N, Novitsky S, et coll. Cytokines in sleep regulation. *Adv Neuroimmunol.* (1995) 5: 171-188.
- Kuriyama K, Hori T, Mori T, Nakashima T. Actions of interferon- α and interleukin-1 β on the glucose-responsive neurons in the ventromedial hypothalamus. *Brain Res Bull* (1990) 24: 803-810.
- Kuzoe FAS. Current situation of African trypanosomiasis. *Acta Trop* (1993) 54: 153-162.
- Langhans W, Savoldelli D, Weingarten S. Comparison of the feeding responses to bacterial lipopolysaccharide and interleukin-1 beta. *Physiol Behav* (1993) 53: 643-649.
- Laquieze, Bemy. Note sur onze observations de trypanosomés atteints de frigidity génitale. *Annales de Médecine et de Pharmacie Coloniales* (1933a) 96-100.
- Laquieze, Berny. Note sur l'arrêt des menstruations chez les trypanosomées. *Annales Médecine et de Pharmacie Coloniales* (1933b) 100-101.
- Leak SGA. Tsetse biology and ecology. Their role in the epidemiology and control of trypanosomiasis. Nairobi, Cabi (ed.) (1998) pp. 228-278.
- Leclerc C, Ronco J. New approaches in vaccine development. *Immunol Today* (1998) 19: 300-302.
- Lee SC, Dickson DW, Brosnan CF, Casadevall A. Human astrocytes inhibit *Cryptococcus neoformans* growth by a nitric oxide-mediated mechanism. *J Exp Med* (1994) 180 : 365-369.

- Léger L, Charnay Y, Burlet S, Gay N, Schaad N, Bouras C, Cespuglio R. Comparative distribution of nitric oxide synthase and serotonin containing neurons in the raphe nuclei of four mammalian species. *Histochem Cell Biol* (1998) 110: 517-525.
- Legros D, Ollivier G, Gastellu-Etchegorry M, Paquet C, Burri C, Jannin J, Buscher P. Treatment of human African trypanosomiasis: present situation and needs for research and development. *Lancet Infect Dis* (2002) 2: 437-440.
- Leibowitz SF. Paraventricular nucleus: a primary site mediating adrenergic stimulation of feeding and drinking. *Pharmacol Biochem Behav* (1978) 8: 163-175.
- Leibowitz SF, Hammer NJ, Chang K. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol Behav* (1981) 27: 1031-1040.
- Leibowitz SF, Weiss GF, Shor-Posner G. Hypothalamic serotonin: pharmacological, biochemical, and behavioral analyses of its feeding-suppressive action. *Clin Neuropharmacol* (1988) 11: S51-71.
- Leibowitz SF; Weiss GF; Walsh UA; Viswanath D. Medial hypothalamic serotonin: role in circadian patterns of feeding and macronutrient selection. *Brain Res* (1989) 503: 132-140.
- Leibowitz SF. The role of serotonin in eating disorders. *Drugs* (1990) 9: 33-48.
- Leibowitz SF, Alexander JT, Cheung WK, Weiss GF. Effects of serotonin and the serotonin blocker metergoline on meal patterns and macronutrient selection. *Pharmacol Biochem Behav* (1993) 45: 185-194.
- Lejon V, Büscher P, Sema NH, Magnus E, Van-Meirvenne N. Human African trypanosomiasis: a latex agglutination field test for quantifying IgM in cerebrospinal fluid. *Bull World Health Organ* (1998) 76: 553-558.
- Levey AI, Hallanger AE, Wainer BH. Choline acetyltransferase immunoreactivity in the rat thalamus. *J Comp Neurol* (1987) 257: 317-332.
- Liew FY. Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide. *Curr Opin Immunol* (1995) 7: 396-399.
- Lin JS, Sakai K, Jouvet M. Role of hypothalamic histaminergic systems in the regulation of the states of vigilance in the cat. *C R Acad Sci Paris* (1986) 303: 469-474.

- Lin JS, Sakai K, Jouvet M. Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cat. *Neuropharmacol* (1988) 27: 111-122.
- Lin JS, Sakai K, Vanni-Mercier G, Jouvet M. A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats. *Brain Res* (1989) 479: 225-240.
- Lin JS, Sakai K, Vanni-Mercier G, Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC, Jouvet M. Involvement of histaminergic neurons in arousal mechanisms demonstrated with H3-receptor ligands in the cat. *Brain Res* (1990) 523, 325-330.
- Liu MK, Pearson TW. Detection of circulating trypanosomal antigens by double antibody ELISA using antibodies to procyclic trypanosomes. *Parasitology* (1987) 95: 277-290.
- Liu MK, Cattand P, Gardiner IC, Pearson TW. Immunodiagnosis of sleeping sickness due to *Trypanosoma brucei gambiense* by detection of antipro-cyclic antibodies and trypanosome antigens in patients' sera. *Acta Trop* (1989) 46: 257-266.
- Liu J, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC. Expression of type II nitric oxide synthase in primary human astrocytes and microglia: role of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* (1996) 157: 3569-3576.
- Liu Y, Ragaa E, Li Z, Nuortio L, Mustafa A, Bakhiet M. Interferon-gamma and interleukin-12 genes are preferentially expressed during early experimental African trypanosomiasis and suppressed by denervation of the spleen. *Scand J Immunol* (1999) 50: 485-491.
- Llinas RR, Drace AA, Yarom Y. *In vitro* neurons in cortical layers IV exhibit intrinsic oscillatory activity in the 10 to 50 Hz frequency range. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) 88: 897-901.
- Lorrain DS, Hull EM. Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. *NeuroReport* (1993) 5: 87-89.
- Losos GJ, Ikede BO. Pathology of experimental trypanosomiasis in the albino rat, rabbit, goat and sheep. A preliminary report. *Can J Comp Med* (1970) 34: 209-212.
- Lubega GW, Byarugaba-Karuhize D, Ocholla DO, Prichard RK. Targeting tubulin for vaccine development: immunisation with tubulin from *Trypanosoma brucei* protects mice from infection. *South African J Sci* (1998) 94: 284-285.

- Lucas EA, Serman MB. Effect of a forebrain lesion on the polycyclic sleep wake patterns in the cat. *Exp Neurol* (1975) 46: 368-388.
- Lucas R, Heirwegh K, Neiryneck A, Remels L, Van Heuverswyn H, De Baetselier P. Generation and characterization of a neutralizing rat anti-rmTNF-alpha monoclonal antibody. *Immunology* (1990) 71: 218-223.
- Lucas R, Magez S, Sanga B, Darji A, Hamers R, de Baetselier P. A role of TNF during African trypanosomiasis: involvement in parasite control, immunosuppression and pathology. *Res Immunol* (1993) 144: 370-376.
- Lumsden WH, Kimber CD, Evans DA, Doig SJ. *Trypanosoma brucei*: Miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: Adaptation for field use. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1979) 73 : 312-317.
- Lundkvist GB, Christenson J, ElTayeb RA, Peng ZC, Grillner P, Mhlanga J, Bentivoglio M, Kristensson K. Altered neuronal activity rhythm and glutamate receptor expression in the suprachiasmatic nuclei of *Trypanosoma brucei*-infected rats. *J Neuropathol Exp Neurol* (1998) 57: 21-29.
- Lundkvist GB, Hill RH, Kristensson K. Disruption of circadian rhythms in synaptic activity of the suprachiasmatic nuclei by African trypanosomes and cytokines. *Neurobiol Dis* (2002) 11: 20-27.
- Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M. Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *Neuroscience* (1995) 65: 119-160.
- Mabbott NA, Sutherland IA, Sternberg JM. *Trypanosoma brucei* is protected from the cytostatic effects of nitric oxide under in vivo conditions. *Parasitol Res* (1994) 80: 687-690.
- Mabbott NA, Sutherland IA, Sternberg JM. Suppressor macrophages in *Trypanosoma brucei* infection: nitric oxide is related to both suppressive activity and lifespan *in vivo*. *Parasite Immunol* (1995) 17: 143-150.
- Mabbott NA, Sternberg J. The bone marrow nitric production and development of anemia in *Trypanosoma brucei*-infected mice. *Infect Immun* (1995) 63: 1563-1566.

- Macaskill JA, Holmes PH, Whitelaw DD, McConnell I, Jennings FW, Urquhart GM. Immunological clearance of ⁷⁵Se-labelled *Trypanosoma brucei* in mice. II. Mechanisms in immune animals. *Immunology* (1980) 40: 629-635.
- Macchi G, Bentivoglio M. The thalamic intralaminar nuclei and the cerebral cortex. *Cerebral Cortex*. New York, Plenum Press. Jones EG, Peters A (eds) (1985) pp 355-401.
- McGinty DJ, Harper RM. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res* (1976) 101: 569-575.
- Mackensie S. La maladie du sommeil en Afrique. *Le mercredi médical* (1890) 47 : 597-598.
- Magez S, Lucas R, Darji A, Songa EB, Hamers R, de Baetselier P. Murine tumor necrosis factor plays a protective role during the initial phase of the experimental infection with *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasite Immunol* (1993) 15: 635-641.
- Magez S, Geuskens M, Beschin A, del Favero H, Verschueren H, Lucas R, Pays E, de Baetselier P. Specific uptake of tumor necrosis factor-alpha is involved in growth control of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* (1997) 137: 715-727.
- Magez S, Radwanska M, Beschin A, Sekikawa K, De Baetselier P. Tumor necrosis factor alpha is a key mediator in the regulation of experimental *Trypanosoma brucei* infections. *Infect Immun* (1999) 67: 3128-3132.
- Magnus E, Vervoort T, Van-Meirvenne N. A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* (1978) 58: 169-176.
- Manson-Bahr P. Manson's tropical diseases. A manual of diseases of warm climates. Cassel, London (1942).
- Marie-Daragon A, Rouillard MC, Bouteille B, Bisser S, Albuquerque C, Chauvière G, Périé J, Dumas M. Essais d'efficacité sur *Trypanosoma brucei brucei* de molécules franchissant la barrière hémato-méningée et du Mégazol. *Bull Soc Pathol Exot* (1994) 87: 347-352.
- Marrosu F, Portas C, Mascia MS, Casu MA, Fa M, Giagheddu M, Imperato A, Gessa GL. Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res* (1995) 671 : 329-332.

- Martin G, Leboeuf, Roubaud. Rapport de la mission d'étude de la maladie du sommeil au Congo français 1906-1908. Paris : Masson (Ed) (1909).
- Martin G, Ringenbach. Troubles psychiques dans la maladie du sommeil. *L'encéphale* (1910) 6: 625-671.
- Maser P, Sutterlin C, Kralli A, Kaminsky R. A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance. *Science* (1999) 285: 242-244.
- Mattern P. Etat actuel et résultats des techniques immunologiques utilisées à l'Institut Pasteur de Dakar pour le diagnostic et l'étude de la trypanosomose humaine. *Bull World Health Organ* (1968) 38: 1-15.
- Mattern P, Mayer G, Felici M. Existence of amastigote forms of *Trypanosoma gambiense* in the choroidal plexal tissue of experimentally infected mice. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* (1972) 274: 1513-1515.
- Mauerhoff T, Pugol-Borell R, Mirakian R, Bottazzo GF. Differential expression of major histocompatibility complex (MHC) products in neural and glial cells of the human foetal brain. *J Neuroimmunol* (1988) 18: 271-289.
- McCarley RW, Hobson JA. Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science* (1975) 189: 58-60.
- McCarthy DO, Kluger MJ, Vander AJ. The role of fever in appetite suppression iller endotoxin administration. *Am J Clin Nutr* (1984) 40: 310-316.
- McCarthy DO, Kluger MJ, Vander AJ. Suppression of food intake during infection: is interleukin-1 involved? *Am J Clin Nutr* (1985) 42: 1179-1182.
- McCarthy DO, Kluger MJ, Vander AJ. Effect of centrally administered interleukin-1 and endotoxin on food intake of fasted rats. *Physiol Behav* (1986) 36: 745-749.
- McCarthy DO, Daun JM. The role of prostaglandins in interleukin-1 induced gastroparesis. *Physiol Behav* (1992) 52: 351-353.
- McCormick DA, Prince DA. Acetylcholine induces burst firing in thalamic reticular neurons by activating a potassium conductance. *Nature* (1986) 319: 402-405.

- McCormick DA, Prince DA. Actions of acetylcholine in the guinea-pig and cat medial and lateral geniculate nuclei *in vitro*. *J Physiol* (1987) 392: 147-167.
- McCormick DA, Prince DA. Noradrenergic modulation of firing pattern in guinea pig and cat thalamic neurons, *in vitro*. *J Neurophysiol* (1988) 59: 978-996.
- McCormick DA, Williamson A. Convergence and divergence of neurotransmitter action in the human cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 86: 8098-8102.
- McCormick DA, Williamson A. Modulation of neuronal firing mode in cat and guinea pig LGNd by histamine: possible cellular mechanisms of histaminergic control of arousal. *J Neurosci* (1991) 11: 3188-3199.
- McCormick DA. Cellular mechanisms of cholinergic control of neocortical and thalamic neuronal excitability. *Brain cholinergic systems*. New York: Oxford University Press. Steriade M, Biesold D (Eds) (1990) pp. 236-264.
- McCormick DA. Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog Neurobiol* (1992) 39: 337-388.
- McGinty DJ, Stermann MB. Sleep suppression after basal forebrain lesions in the cat. *Science* (1968) 160: 1253-1255.
- McGinty DJ. Somnolence, recovery and hyposomnia following ventromedial diencephalic lesions in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* (1969) 126 : 70-79.
- McGinty DJ, Harper RM, Fairbancks MK. Neuronal unit activity and the control of sleep states. *Advances in sleep research*. Spectrum, New York. Weitzman ED (Ed) (1974) pp 173-216.
- McGinty DJ, Harper R M. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res* (1976) 101: 569-575.
- McKenzie AR, Boreham PFL. Autoimmunity in trypanosomes infections. 1. Tissue autoantibodies in *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei* infections of the rabbit. *Immunol* (1974) 26 : 1225-1238.
- Meda HA, Bosompem KM, Doua F. Evaluation multicentrique de la spécificité du CIATT dans le diagnostic sur le terrain de la maladie du sommeil à *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* en zones non endémiques. XXV^{ième} réunion du conseil scientifique international pour la recherche et la lutte contre les trypanosomoses. Monbasa, Kenya (1999).

- Meijer JH, Rietveld WJ. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev* (1989) 69: 671-707.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Levey A, Wainer BH. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata) and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* (1983) 214: 170-197.
- Mick G, Jouvet M. Rythmes circadiens: leurs bases anatomiques, fonctionnelles et moléculaires. *Med Sci* (1995) II: 52-61.
- Miezan T, Doua F, Cattand P, de Raadt P. Evaluation of Testryp CATT applied to blood samples on filter paper and on diluted blood in a focus of trypanosomiasis due to *Trypanosoma brucei gambiense* in the Ivory Coast. *Bull World Health Organ* (1991) 69: 603-606.
- Mikiten T, Niebyl P, Hendley C. EEG desynchronization during behavioral sleep associated with spike discharges from the thalamus of the cat. *Fed Proc* (1961) 20: 237.
- Milord F, Pépin J, Loko L, Ethier L, Mpia B. Efficacy and toxicity of eflornithine for treatment of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *The Lancet* (1992) 340: 652-655.
- Mnaimneh S, Geffard M, Veyret B, Vincendeau P. Albumin nitrosylated by activated macrophages passes antiparasitic effects neutralized by anti-NO-acetylated-cysteine antibodies. *J Immunol* (1997) 158: 308-314.
- Moldawer LL, Andersson C, Gelin J, Lundholm KG. Regulation of food intake and hepatic protein synthesis by recombinant-derived cytokines. *Am J Physiol* (1988) 254: G450-G456.
- Molina-Holgado F, Ueda A, Guaza C. Evidence for cyclooxygenase activation by nitric oxide in astrocytes. *Glia* (1995) 15: 167-172.
- Molinari M, Bentivoglio M, Minciacchi D, Granato A, Macchi G. Spinal afferents and cortical efferents of the anterior intralaminar nuclei: an anterograde-retrograde tracing study. *Neurosci Lett* (1986) 72: 258-264.
- Molyneux DH, De Raadt P, Seed JR. African human trypanosomiasis. Recent advances in Tropical Medicine 1. Churchill Livingstone Edinburgh, London. Gilles HM (Ed) (1984) pp. 39-62.
- Molyneux DH, Pentreath VW, Doua F. African trypanosomiasis in man. Manson's Tropical Diseases. WB Saunders Compagny LTD. Cook GC (Ed) (1996) pp. 1171-1196.

- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* (1991) 43: 109-142.
- Montmayeur A, Buguet A. Time-related changes in the sleep-wake cycle of rats infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Neurosci Lett* (1994) 168 : 172-174.
- Moore RY. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed Proc* (1983) 42: 2783-2789.
- Moore RY. Organisation of the primate circadian system. *J Biol Rhythms* (1993) 8: S3-S9.
- Morison RS, Bassett DL. Electrical activity of the thalamus and basal ganglia in decorticate cats. *J Neurophysiol* (1945) 309-314.
- Morley JE. Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocr Rev* (1987) 8: 256-287.
- Morley JE, Flood JF. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sci* (1991) 49: 707-711.
- Mossalayi MD. Mise en évidence du rôle du monoxyde d'azote (NO) dans l'activité leishmanicide des macrophages humains : implication des IgE et du Fce RII/CD 23. *Eurobiologiste* (1995) 215: 13-21.
- Mouret J, Coindet J, Debilly G, Chouvet G. Suprachiasmatic nuclei lesions in the rat: alterations in sleep circadian rhythms. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* (1978) 45: 402-408.
- Mrosovsky N, Molony LA, Conn CA, Kluger MJ. Anorexic effects of interleukin 1 in the rat. *Am J Physiol* (1989) 257: R1315-R1321.
- Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett* (1992) 33: 35-40.
- Mulenga C, Mhlanga JD, Kristensson K, Robertson B. *Trypanosoma brucei brucei* crosses the blood-brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat chronic disease model. *Neuropathol Appl Neurobiol* (2001) 27: 77-85.
- Müller N, Imboden M, Detmer E, Mansfield JM, Seebeck T. Cytoskeleton-associated antigens from African trypanosomes are recognized by self-reactive antibodies of uninfected mice. *Parasitology* (1993) 107: 411-417.

- Murray MJ, Murray AB. Anorexia of infection as a mechanism of host defense. *Am J Clin Nutr* (1979) 32: 593-596.
- Murphy PJ, Campbell SS. Physiology of the circadian system in animals and humans. *J Clin Neurophysiol* (1996) 13: 2-16.
- Mutomba MC, Li F, Gottesdiener KM, Wang CC. A *Trypanosoma brucei* bloodstream form mutant deficient in ornithine decarboxylase can protect against wild-type infection in mice. *Exp Parasitol* (1999) 91: 176-184.
- Nakamura Y, Kudo M, Tokuno H. Monosynaptic projection from the pedunculopontine tegmental nuclear region to the reticulo-spinal neurons of the medulla oblongata: an electron microscope study in the cat. *Brain Res* (1990) 524: 353-356.
- Nantulya VM. TrypTect CIATT: a card indirect agglutination trypanosomiasis test for diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and *T. b. rhodesiense* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1997) 91: 551-553.
- Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* (1991) 3: 65-70.
- Newport GR, Page CR, Ashman PU, Stibbs H, Seed JR. Alteration of free serum amino acids in voles infected with *Trypanosoma brucei gambiense*. *J Parasitol* (1977) 63 : 15-24.
- Newport GR, Page RC. Free amino acids in brain, liver, and skeletal muscle tissue of voles infected with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Parasitol* (1977) 63 : 1060-1065.
- Nielly M. *Maladie du sommeil. Eléments de pathologie exotique*. Paris. Delahaye A, Lecrosnier E (Eds) (1881).
- Nishimura K, Araki N, Ohnishi Y, Kozaki S. Effects of dietary polyamine deficiency on *Trypanosoma gambiense* infection in rats. *Exp Parasitol* (2001) 97: 95-101.
- Nkanga NG, Kazadi K, Kazyumbz GL, Dechef G. Signes cliniques de la trypanosomiase humaine africaine au stade méningo encéphalitique (à propos de 23 cas). *Bull Soc Pathol Exot* (1988) 81: 449-458.
- Noireau F, Apembet JO, Frezil JL. Revue clinique des troubles endocriniens observés chez l'adulte trypanosomé. *Bull Soc Pathol Exot* (1988) 81: 464-467.

Okomo-Assoumou MC, Geffard M, Daulouede S, Chaugier C, Lemesre JL, Vincendeau P. Circulating antibodies directed against tryptophane-like epitopes in sera of patients with human african trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* (1995a) 52: 461-467.

Okomo-Assoumou MC, Daulouede S, Lemesre JL, N'Sila-Mouanda A, Vincendeau P. Correlation of high levels of tumor necrosis factor- α with disease severity in human African trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* (1995b) 53: 539-543.

Okuda Y, Nakatsuji Y, Fujimura H, Esumi H, Ogura T, Yanagihara T, Sakoda S. Expression of inducible isoform of nitric oxide synthase in the central nervous system of mice correlate with the severity of actively induced experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* (1995) 62: 103-112.

Olsen LJ, Rose JE. Effects of *Toxocara canis* infection on the ability of white rats to solve maze problems. *Exp Parasitol* (1966) 19: 77-84.

Olsson T, Bakhiet M, Edlund C, Hojeberg B, Van Der Meide PH, Kristensson K Bi-directional activating signal between *Trypanosoma brucei* and CD8⁺ T cells: a trypanosomes-released factor triggers interferon- γ production that stimulates parasite growth. *Eur J Immunol* (1991) 21 : 2447-2454.

Olsson T, Bakhiet MM, Kristensson K. Interactions between *Trypanosoma brucei* and CD8⁺ T cells. *Parasitol Today* (1992) 8: 237-239.

Olsson T, Bakhiet M, Hojeberg B, Ljungdahl A, Edlund C, Andersson G, Ekre HP, Fug-Leung WP, Mak T, Wigzell H, Fiszer U, Kristensson K. CD8 is critically involved in lymphocyte activation by a *T. brucei* released molecule. *Cell* (1993) 72: 715-727.

OMS. Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. WHO technical Report Series, n°881(1998).

OMS. Maladies transmissibles. Principales activités en 1999 et grands défis pour l'avenir. *Doc WHO.CDS* (2000) 1: 29-31.

Oomura Y. Glucose as a regulator of neuronal activity. *Adv Metab Disord* (1983) 10: 31-65.

Oomura Y. Chemical and neuronal control of feeding motivation. *Physiol Behav* (1988) 44: 555-560.

Opp M, Obal F, Krueger JM. Corticotropin-releasing factor attenuates interleukin 1-induced sleep and fever in rabbits. *Am J Physiol* (1989) 257: R528-R535.

Opp MR, Obal F, Krueger JM. Interleukin 1 alters rat sleep: temporal and dose-related effects. *Am J Physiol* (1991) 260: R52-R58.

Opp MR, Kapas L, Toth LA. Cytokine involvement in the regulation of sleep. *Proc Soc Exp Biol Med* (1992a) 201: 16-27.

Opp MR, Postlethwaite AE, Seyer JM, Krueger JM. Interleukin 1 receptor antagonist blocks somnogenic and pyrogenic responses to an interleukin 1 fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992b) 89: 3726-3730.

Opperdoes MR. Conception rationnelle de nouveaux médicaments contre la maladie du sommeil. *Med Sci* (1995) 11: 1305-1313.

Ormerod WE, Venkatesan S. Amastigotes of the sleeping sickness trypanosomes found in the choroid plexus and their transformation to trypomastigotes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1971) 65 : 14.

Ormerod WE, Hussein MSA. The ventricular ependyma of mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1986) 80 : 626-633.

Otterness IG, Seymour PA, Golden HW, Reynolds JA, Daumy GO. The effects of continuous administration of murine interleukin-1 alpha in the rat. *Physiol Behav* (1988) 43: 797-804.

Ottersen OP, Fisher BO, Storm-Mathisen J. Retrograde transport of D-H3-aspartate in thalamocortical neurons. *Neurosci Lett* (1983) 42: 19-24.

Overath P, Chaudhri M, Steverding D, Ziegelbauer K. Invariant surface proteins in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today* (1994) 10: 51-58.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* (1987) 327: 524-526.

Paquet C, Castilla J, Mbulamberi D, Beaulieu MF, Gastellu-Etchegorry MG, Moren A. Trypanosomiasis from *Trypanosoma brucei gambiense* in the center of north-west Uganda. Evaluation of 5 years of control (1987-1991). *Bull Soc Pathol Exot* (1995) 88: 38-41.

- Paré D, Smith Y, Parent A, Steriade M. Projections of brainstem core cholinergic and non-cholinergic neurons of cat to intralaminar and reticular thalamic nuclei. *Neurosci* (1988) 25 : 69-86.
- Pays E. L'expression des gènes d'antigène variable chez les trypanosomes africains. *Med Sci* (1990) 6: 510-516.
- Pays E, Berberof M. Antigènes variables et non variables des trypanosomes africains. *Med Sci* (1995) 11 : 261-267.
- Peceny J, Cuzin-Ferrand L, Marchou B, Auvergnat JC. Méningo-encéphalite à *Trypanosoma b. gambiense* traitée par l'éflornithine. *Med Mal Infect* (1995) 25: 542-544.
- Peng ZC, Kristensson K, Bentivoglio M. Dysregulation of photic induction of Fos related protein in the biological dock during experimental trypanosomiasis. *Neurosci Lett* (1994) 182: 104-106.
- Pentreath VW. Neurobiology of sleeping sickness. *Parasitol Today* (1989) 5: 215-218.
- Pentreath VW, Rees K, Owolabi OA, Philip KA, Doua F. The somnogenic T lymphocyte suppressor prostaglandin D2 is selectively elevated in cerebrospinal fluid of advanced sleeping sickness patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1990) 84 : 795-799.
- Pentreath VW, Owolabi OA, Doua F. Survival of *Trypanosoma brucei brucei* in cerebrospinal fluid. *Ann Trop Med Parasitol* (1992) 86: 29-34.
- Pentreath VM, Baugh PJ, Lavin DR. Sleeping sickness and central nervous system. *Onderstepoort J Vet Res* (1994) 61: 369- 377.
- Pentreath VW, Cookson MR, Ingram GA, Mead C, Alafiatayo RA *Trypanosoma brucei* products activate components of the reactive response in astrocytes in vitro. *Bull Soc Path Ex* (1994) 87: 323-329.
- Pépin J, Milord F, Guern C, Schechter PJ. Difluoromethylornithine for arsenoresistant *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *The Lancet* (1987) 1431-1433.
- Pépin J, Milord F, Guern C, Mpia B, Ethier L, Mansinsa D. Trial of prednisolone for prevention of melarsoprol-induced encephalopathy in gambiense sleeping sickness. *The Lancet* (1989) 1246-1249.
- Pereira-Chioccola VL, Costa F, Ribeirao M, Soares IS, Arena F, Schenkman S, Rodrigues MM. Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection

elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. *Parasite Immunol* (1999) 21: 103-110.

Périé J, Albuquerque C, Blonski C, Chauvière G, Gefflaut T, Page P, Trinquier M, Willson M. Conception rationnelle et étude de molécules actives contre les différentes trypanosomiasés. *Bull Soc Pathol Exot* (1994) 87: 353-361.

Peterson PK, Hu S, Anderson R, Chao CC. Nitric oxide production and neurotoxicity mediated by activated microglia from human versus mouse brain. *J Infect Dis* (1994) 170: 457-460.

Petitjean F, Sakai K, Blondaux C, Jouvet M. Hypersomnia by isthmic lesion in cat. II. Neurophysiological and pharmacological study. *Brain Res* (1975) 88: 439-453.

Petry K, Voisin P, Baltz T, Labouesse J. Epitopes common to trypanosomes *T. cruzi*, *T. dionisi* and *T. vespertiliois* “schizotypanum” astrocytes and neurons. *J. Neuroimmunol* (1987) 16: 237-252.

Philip KA, Dascombe MJ, Fraser PA, Pentreath VW. Blood-brain barrier damage in experimental african trypanosomiasis. *Ann Trop Med Parasitol* (1994) 88: 607-616.

Pinault D, Deschênes M. Voltage-dependent 40 Hz oscillations in rat reticular thalamic neurons *in vivo*. *Neuroscience* (1992) 51: 245-258.

Plata-Salaman CR, Oomura Y, Shimizu N. Dependence of food intake on acute and chronic ventricular administration of insulin. *Physiol Behav* (1986) 37: 717-734.

Plata-Salaman CR. Food intake suppression by immunomodulators. *Neurosci Res Commun* (1988) 3 : 159-165.

Plata-Salaman CR, Oomura Y, Kai Y. Tumor necrosis factor and interleukin-1 β : suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Res* (1988) 448: 106- 114.

Plata-Salaman CR. Immunomodulators and feeding regulation: a humoral link between the immune and nervous systems. *Brain Behav Immun* (1989) 3: 193-213.

Plata-Salaman-CR. Interferons and central regulation of feeding. *Am J Physiol* (1992) 263: R1222-R1227.

Plata-Salaman CR, Borkoski JP. Centrally administered bacterial lipopolysaccharide depresses feeding in rats. *Pharmacol Biochem Behav* (1993) 46: 787-791.

- Plata-Salaman CR. Meal patterns in response to the intracerebroventricular administration of interleukin-1 beta in rats. *Physiol Behav* (1994) 55: 727-733.
- Plata-Salaman CR. Cytokines and feeding suppression: an integrative view from neurologic to molecular levels. *Nutrition* (1995) 11: 674-677.
- Pogun S, Kuhar MJ. Regulation of neurotransmitter reuptake by nitric oxide. *Ann N Y Acad. Sci.* (1994) 738, 305-315.
- Poltera AA. Immunopathological and chemotherapeutic studies in experimental trypanosomiasis with special reference to heart and brain. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* (1980) 74: 706-715.
- 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.
- Poltera AA, Hochman A, Lambert PH. *Trypanosoma b. gambiense*, cerebral immunopathology in mice. *Acta Trop* (1982) 39, 205-218.
- Poltera AA. Pathology of human African trypanosomiasis with reference to experimental African trypanosomiasis and infections of the central nervous system. *Br Med Bull* (1985) 41: 169-174.
- Portas CM, McCarley RW. Behavioral state-related changes of extracellular serotonin concentration in the dorsal raphe nucleus: a microdialysis study in the freely moving cat. *Brain Res* (1994) 648: 306-312.
- Puizillout JJ, Gaudin-Chazal G, Daszuta A, Beyfritz N, Ternaux JP. Release of endogenous serotonin from « encéphale isolé » cats. II. Correlation with raphe neuronal activity and sleep and wakefulness. *J Physiol Paris* (1979) 75 : 531-538.
- Quan N, Mhlanga JD, Whiteside MB, McCoy AN, Kristensson K, Herkenham M. Chronic over expression of proinflammatory cytokines and histopathology in the brains of rats infected with *Trypanosoma brucei*. *J Comp Neurol* (1999) 414: 114-130.
- Quan N, Mhlanga JD, Whiteside MB, Kristensson K, Herkenham M. Chronic sodium salicylate treatment exacerbates brain neurodegeneration in rats infected with *Trypanosoma brucei*. *Neuroscience* (2000) 96: 181-194.

Radermecker J. Corrélations électrocliniques dans la trypanosomiase humaine africaine et dans la trypanosomiase employée comme thérapeutique des affections psychiatriques graves. *Acta Neurol Psychiat Belg* (1955) 55 : 179-218.

Radermecker J. Systématique et électroencéphalographie des enéphalites et encéphalopathies. Paris : Masson (ed.) (1956).

Radomski MW, Buguet A, Bogui P, Doua F, Lonsdorfer A, Tapie P, Dumas M. Disruptions in the secretion of cortisol, prolactin, and certain cytokines in human African trypanosomiasis patients. *Bull Soc Path Ex* (1994) 87: 376-379.

Radomski MW, Buguet A, Montmayeur A, Bogui P, Bourdon L, Doua F, Lonsdorfer A, Tapie P, Dumas M. Twenty-four-hours plasma cortisol and prolactin in human african trypanosomiasis patients, and healthy african controls. *Am J Trop Med Hyg* (1995) 52: 281-286.

Radomski M.W., Buguet A., Doua F., Bogui P. et Tapie P. Relationship of plasma Growth Hormone to slow-wave sleep in african sleeping sickness. *Neuroendocrinology*, 63: 393-396, 1996.

Rameau JP, Devillers J, Declercq JP, Chauvière G, Périé J. Molecular structure of Megazol the 2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,2,4-thiadiazol. A concerted study by X-Ray crystallography and molecular mechanic. *Struct Chem* (1996) 7: 187-204.

Rampon C, Luppi PH, Fort P, Peyron C, Jouvet M. Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience* (1996) 75: 737-755.

Rappelsberger P, Pockberger H, Petsche H. The contribution of the cortical layers to the generation of the EEG: field potential and current source density analyses in the rabbit's visual cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* (1982) 53: 254-269.

Raseroka BH, Ormerod WE. The trypanocidal effect of drugs in different parts of the brain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1986) 80: 634-641.

REBESKI, DE, WINGER EM, VAN-ROOIJ EM, SCHOCHL R, SCHULLER W, DWINGER RH, CROWTHER JR, WRIGHT P. PITFALLS IN THE APPLICATION OF ENZYME-LINKED IMMUNOASSAYS FOR THE DETECTION OF CIRCULATING TRYPANOSOMAL ANTIGENS IN SERUM SAMPLES. *PARASITOL RES* (1999) 85: 550-556.

Receveur MC, Le Bras M, Vincendeau P. Laboratory acquired Gambian trypanosomiasis. *N Engl J Med* (1993) 329: 209-210.

- Rechtschaffen A, Kales A. A manual of standardized terminology, technics and scoring system for sleep stages of human subjects. Washington DC. Public Health Service. US Government Printing Office (1968).
- Refinetti R, Kaufman CM, Menaker M. Complete suprachiasmatic lesions eliminate circadian rhythmicity of body temperature and locomotor activity in golden hamsters. *J Comp Physiol* (1994) 175: 223-232.
- Reincke M, Heppner C, Petzke F, Allolio B, Arlt W, Mbulamberi D, Siekmamm L, Vollmer D, Winkelmann W, Chrousos GP. Impairment of adrenocortical function associated with increased plasma tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 concentrations in African trypanosomiasis. *Neuroimmunomodulation* (1994) 1: 14-22.
- Reincke M, Arlt W, Heppner C, Petzke F, Chrousos GP, Allolio B. Neuroendocrine dysfunction in African trypanosomiasis. The role of cytokines. *Ann N Y Acad Sci* (1998) 840: 809-821.
- Reinitz DM, Mansfield JM. T-cell-independent and T-cell-dependent B-cell responses to exposed variant surface glycoprotein epitopes in trypanosome-infected mice. *Infect Immun* (1990) 58: 2337-2342.
- Rhind SG, Sabiston BH, Sheck PN, Buguet A, Muanga G, Stanghellini A, Dumas M, Radomski MW. Effect of melarsoprol treatment on circulating IL-10 and TNF-alpha levels in human african trypanosomiasis. *Clin Immunol Immunopathol* (1997) 83: 185-189.
- Rifkin MR, Landsberger FR. Trypanosome variant surface glycoprotein transfer to target membranes: a model for the pathogenesis of trypanosomiasis. *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) 87: 801-805.
- Robertson DH, Pickens S, Lawson JH, Lennox B. An accidental laboratory infection with African trypanosomes of a defined stock. I. The clinical course of the infection. *J Infect* (1980) 2: 105-112.
- Robbin DS, Shirazi Y, Drysdale BE, Lieberman A, Shin HS, Shin ML. Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. *J Immunol* (1987) 139: 2593-2597.
- Rocken M, Urban JF, Shevach EM. Infection breaks T-cell tolerance. *Nature* (1992) 359: 79-82
- Rudin W, Poltera AA, Jenni L. An EM study on cerebral trypanosomiasis in rodents and primates. *Contrib Microbiol Immunol* (1983) 7: 165- 172.
- Rusak B, Zucker I. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev* (1979) 59: 449-526.

Rusak B, Bina KG. Neurotransmitters in the mammalian circadian system. *Ann Rev Neurosci* (1990) 13: 387-401.

Sacco RE, Hagen M, Donelson JE, Lynch RG. B lymphocytes of mice display an aberrant activation phenotype and are cell cycle arrested in G/G1A during acute infection with *Trypanosoma brucei*. *J Immunol* (1994) 153: 1714-1723.

Saida K, Saida T, Brown MJ, Silberberg DH. *In vivo* demyelination induced by intraneural injection of anti-galactocerebroside serum: a morphologic study. *Am J Pathol* (1979) 95: 99-116.

Sakai K, Sastre JP, Salvert D, Touret M, Tohyama M, Jouvet M. Tegmentoreticular projections with special reference to the muscular atonia during paradoxical sleep in the cat: an HRP study. *Brain Res* (1979) 176: 233-254.

Sakai K. Some anatomical and physiological properties of ponto-mesencephalic-tegmental neurons with special reference to PGO waves and postural atonia during paradoxical sleep in the cat. *The Reticular Formation Revisited*. J Raven Press, New York. Hobson A, Brazier MB (Eds) (1980) pp 427-447.

Sakai K, Sastre JP, Kanamori N, Jouvet M. State specific neurons in the ponto-medullary reticular formation with special reference to the postural atonia during paradoxical sleep in the cat. *Brain Mechanisms of Perceptual Awareness and Purposeful Behavior*. New York: Raven Press. Ajmone-Marsan C, Pompeiano O (Eds) (1981) pp. 405-429.

SAKAI K. NEURONS RESPONSIBLE FOR PARADOXICAL SLEEP. *SLEEP: NEUROTRANSMITTERS AND NEUROMODULATORS*. NEW YORK: RAVEN PRESS. WAUQUIER A (ED) (1985) PP. 29-42.

Sakai K. Mécanismes cholinergiques : veille et sommeil. *Etats de veille et de sommeil*. Paris : Masson. Meyer P, Elghozi JL, Salva AQ (Eds) (1989) pp. 13-24.

Sakai K, Yoshimoto Y, Luppi PH, Fort P, El Mansari M, Salvert D, Jouvet M. Lower brainstem afferents to the cat posterior hypothalamus: a double-labeling study. *Brain Res Bull* (1990) 4: 437-455.

Sakai K. Physiological properties and afferent connections of the locus coeruleus and adjacent tegmental neurons involved in the generation of paradoxical sleep in the cat. *Neurobiology of the locus coeruleus*. Amsterdam: Elsevier. Barnes CD, Pompeiano O. (Eds) (1991) pp.31-45.

Sallanon M, Buda C, Janin M, Denoyer M, Kitahama K, Jouvet, M. Hypophysectomy does not disturb the sleep waking cycle in the cat. *Neurosci Lett* (1988) 88: 173-178.

Sallanon M, Denoyer M, Kitahama K, Aubert C, Gay N, Jouvet M. Long-lasting insomnia induced by preoptic neuron lesions and its transient reversal by muscimol injection into the posterior hypothalamus in the cat. *Neuroscience* (1989) 32 : 669-683.

Sastre JP, Sakai K, Jouvet M. Persistence du sommeil paradoxal chez le chat après destruction de l'aire gigantocellulaire du tegmentum pontique par l'acide kainique. *C R Acad Sci Paris* (1979) 289: 959-964.

Sastre JP, Sakai K, Jouvet M. Are the gigantocellular tegmental field neurons responsible for paradoxical sleep? *Brain Res* (1981) 229: 147-161.

Sastre JP, Jouvet M. Oneiric behavior in cats. *Physiol Behav* (1979) 22: 979-989.

Sastre JP, Buda C, Kitahama K, Jouvet M. Importance of the ventrolateral region of the periaqueductal gray and adjacent tegmentum in the control of paradoxical sleep as studied by muscimol microinjections in the cat. *Neuroscience* (1996) 74: 415-426.

Satoh K, Fibiger HC. Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: efferent and afferent connections. *J Comp Neurol* (1986) 253: 277-302.

Schleifer KW, Filutowicz H, Schopf LR, Mansfield JM. Characterization of T helper cell responses to the trypanosome variant surface glycoprotein. *J Immunol* (1993) 150: 2910-2919.

Schleifer KW, Mansfield JM. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis: inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *J Immunol* (1993) 151: 5492-5503.

Schmidt H. The pathogenesis of trypanosomiasis of the CNS. Studies on parasitological and neurohistological findings in *Trypanosoma rhodesiense* infected vervet monkeys. *Virchows Arch A* (1983) 399: 333-343.

Schmidt H, Bafort JM. African trypanosomiasis: haematogenic brain parasitism early in experimental infection through bypassing the blood-brain barrier, with considerations on brain trypanosomiasis in man. *Parasitol Res* (1987) 73: 15-21.

Schmidt MH, Valatx JL, Schmidt HS, Wauquier A, Jouvet M. Experimental evidence of penile erections during paradoxical sleep in the rat. *Neuroreport* (1994) 5: 561-564.

- Schobitz B, De Kloet ER, Hoisboer F. Gene expression and function of interleukin 1, interleukin 6, and tumor necrosis factor in the brain. *Prog Neurobiol* (1994) 44: 397-432.
- Schultzberg M, Ambatsis M, Samuelsson EB, Kristensson K, Van Meirvenne N. Spread of *Trypanosoma brucei* to the nervous system: early attack on circumventricular organs and sensory ganglia. *J Neurosci Res* (1988) 21 : 56-61.
- Schultzberg M, Olsson T, Samuelsson EB, Maehlen J, Kristensson K. Early major histocompatibility complex (CMH) class 1 antigen induction in hypothalamus supraoptic and paraventricular nuclei in trypanosomes-infected rats. *J Neuroimmunol* (1989) 24: 105-112.
- Schwartz BA, Escande C. Sleeping sickness: sleep study of a case. *Electroencephal Clin Neurophysiol* (1970) 29: 83-87.
- Seed JR, Hall JE. A review on the use of *Microtus montanus* as an applicable experimental model for the study of African trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* (1980) 60: 341-348.
- Sharafeldin A, Eltayeb R, Pashenkov M, Bakhiet M. Chemokines are produced in the brain early during the course of experimental African trypanosomiasis. *J Neuroimmunol* (2000) 103: 165-170.
- Shellito JE, Kolls JK, Olariu R, Beck JM. Nitric oxide and host defense against *Pneumocystis carinii* infection in a mouse model. *J Infect Dis* (1996) 173: 432-439.
- Shimomura Y, Inukai T, Kuwabara S, Shimizu H, Takahashi M, Sato N, Uehara Y, Tanaka Y, Kobayashi I. Both cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitor partially restore the anorexia by interleukin-1 beta. *Life Sci* (1992) 51: 1419-1426.
- Shiraishi T. Gastric related properties of rat paraventricular neurons. *Brain Res Bull* (1987) 18: 315-323.
- Shoham S, Davenne D, Cady AB, Dinarello CA, Krueger JM. Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 enhance slow-wave sleep. *Am J Physiol* (1987) 253: R142-R149.
- Shor-Posner G, Grinker JA, Marinescu C, Leibowitz SF. Role of hypothalamic norepinephrine in control of meal patterns. *Physiol Behav* (1985) 35: 209-214.
- Shor-Posner G, Grinker JA, Marinescu C, Brown O, Leibowitz SF. Hypothalamic serotonin in the control of meal patterns and macronutrient selection. *Brain Res Bull* (1986) 17: 663-671.

- Sileghem M, Hamers R, de Baetselier P. Experimental *Trypanosoma brucei* infections selectively suppress both interleukin 2 production and interleukin 2 receptor expression. *Eur J Immunol* (1987) 17: 1417-1421
- Silva LR, Amitai Y, Connors BW. Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. *Science* (1991) 251: 432-435.
- Simmons ML, Murphy S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem* (1992) 59: 897-905.
- Sina GC, Testa G, Triolo N, Trova P, Cramet B. Quelques nouvelles observations de trypanosomiase humaine africaine congénitale à *Trypanosoma gambiense*. *Med Trop* (1979) 39: 58-63.
- Smedley H, Katrak M, Sikora K, Wheeler T. Neurological effects of recombinant human interferon. *Br Med J Clin Res* (1983) 286: 262-264.
- Smith Y, Paré D, Deschênes M, Parent A, Steriade M. Cholinergic and noncholinergic projections from the upper brainstem core to the visual thalamus in the cat. *Exp Brain Res* (1988) 70: 166-180.
- Socher SH, Friedman A, Martinez D. Recombinant human tumor necrosis factor induces acute reductions in food intake and body weight in mice. *J Exp Med* (1988) 167: 1957-1962.
- Soja PJ, Morales FR, Baranyi A, Chase MH. Effect of inhibitory amino acid antagonists on IPSPs induced in lumbar motoneurons upon stimulation of the nucleus reticularis gigantocellularis during active sleep. *Brain Res* (1987) 423: 353-358.
- Soja PJ, Lopez-Rodriguez F, Morales FR, Chase MH. The postsynaptic inhibitory control of lumbar motoneurons during the atonia of active sleep: effect of strychnine on motoneuron properties. *J Neurosci* (1991) 11: 2804-2811.
- Sonan T, Giordano C, Boa F, Dumas M. Hemiplegic forms of human African trypanosomiasis. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* (1988) 81: 459-463.
- Spadaro F, Dunn AJ. Intracerebroventricular administration of interleukin-1 to mice alters investigation of stimuli in a novel environment. *Brain Behav Immun* (1990) 4: 308-322.
- Spigelman MK, Zappulla RA, Strauchen JA, Feuer EJ, Johnson J, Goldsmith SJ, Malis LI, Holland JF. Etoposide induced blood-brain barrier disruption in rats: duration of opening and histological sequelae. *Cancer Res* (1986) 46: 1453-1457.

- Sri Kantha S. Histamine-interleukin-prostaglandin pathway: a hypothesis for biochemical cycle regulating sleep and wakefulness. *Med Hyp* (1994) 42 : 335-339.
- Stallone D, Nicolaidis S, Gibbs J. Cholecystokinin-induced anorexia depends on serotonergic function. *Am J Physiol* (1989) 256: R1138-R1141.
- Steiger A, Guldner J, Hemmeter U, Rothe B, Wiedemann K, Holsboer F. Effects of growth hormone-releasing hormone and somatostatin on sleep EEG and nocturnal hormone secretion in male controls. *Neuroendocrinology* (1992) 56: 566-573.
- Steriade M, Apostol V, Oakson G. Control of unitary activities in cerebellothalamic pathway during wakefulness and synchronised sleep. *J Neurophysiol* (1971) 34: 384-413.
- Steriade M, Glenn LL. Neocortical and caudale projections of intralaminar thalamic neurons and their synaptic excitation nom midbrain reticular core. *J Neurophysiol* (1982) 48,352-371.
- Steriade M, Sakai K, Jouvet M. Bulbo-thalamic neurons related to thalamocortical activation processes during paradoxical sleep. *Exp Brain Res* (1984) 54: 463-475.
- Steriade M, Deschênes M, Domich L, Mull C. Abolition of spindle oscillations in thalamic neurons disconnected from nucleus reticularis thalami. *J Neurophysiol* (1985) 54: 1473-1497.
- Steriade M., Domich L, Oakson G, Deschênes M. The deafferented reticular thalamic nucleus generates spindle rhythmicity. *J Neurophysiol* (1987) 57: 260-273.
- Steriade M, Paré D, Parent A, Smith Y. Projections of cholinergic and noncholinergic Demons of the brainstem core to relay and associational thalamic nuclei in the cat and macaque monkey. *Neurosci* (1988) 25: 47-67.
- Steriade M, Llinas RR. The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiol Rev* (1988) 68: 649-742.
- Steriade, M. Contrôle cholinergique des opérations thalamiques. *Arch Int Physiol Bioch* (1990) 98: A11-A46.
- Steriade M. Basic mechanisms of sleep generation. *Neurology* (1992) 42 : 9-18.
- Steriade M. Oscillations in interacting thalamic and neocortical neurons. *News Pharmacol Sci* (1993) 8: 111-116.

- Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* (1993) 262: 679-685.
- Serman MB, Clemente CD. Forebrain inhibitory mechanisms, sleep pattern induced by basal forebrain stimulation in behaving cat. *Exp Neurol* (1962) 6: 103-117.
- Stevens DR, Moulton JE. Experimental meningoencephalitis in *Trypanosoma brucei* infection of deer mice (*Peromyscus maniculatus*). A light, immunofluorescent, and electron microscopic study. *Acta Neuropathol Berl* (1977) 38: 173-180.
- Sternberg JM, Mabbott NA, Sutherland I, Liew EY. Inhibition of nitric oxide synthesis leads to reduce parasitemia in murine *Trypanosoma brucei* infection. *Infect Immun* (1994) 62: 2135-2137.
- Sternberg JM. Elevated serum nitrate in *Trypanosoma brucei rhodesiense* infections: evidence for inducible nitric oxide synthesis in trypanosomiasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* (1996) 90: 395-397.
- Sternberg JM, Mabbott NA. Nitric oxide-mediated suppression of T cell responses during *Trypanosoma brucei* infection: soluble trypanosome products and interferon-gamma are synergistic inducers of nitric oxide synthase. *Eur J Immunol* (1996) 26 : 539-543.
- Sternberg JM, Njogu Maina N, Gickhuki CW, Ndung'u JM. Nitric oxide production in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) infected with *T. brucei*. *Parasite Immunol* (1998) 20: 395-397.
- Stibbs HH, Seed JR. Chromatographic evidence for the synthesis of possible sleep-mediators in *Trypanosoma brucei gambiense*. *Experientia* (1973) 29: 1563-1565.
- Stibbs HH. Effects of African trypanosomiasis on brain levels of dopamine, serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, and homovanillic acid in the rabbit. *J Neurochem* (1984a) 43: 1253-1256.
- Stibbs HH. Neurochemical and activity changes in rats infected with *Trypanosoma brucei gambiense*. *J Parasitol* (1984b) 70: 428-432.
- Stibbs RR, Curtis DA. Neurochemical changes in experimental African trypanosomiasis in voles and mice. *Ann Trop Med Parasitol* (1987) 81: 673-679.
- Stich A, Barrett MP, Krishna S. Waking up to sleeping sickness. *Trends Parasitol* (2003) 19: 195-197.

- Sticherling M, Kupper M, Koltrowitz F, Bornscheuer E, Kulke R, Klinger M, Wilhelm D, Kameyoshi Y, Christophers E, Schroder JM. Detection of the chemokine RANTES in cytokine-stimulated human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* (1995) 105: 585-591.
- Susic V, Totic S. "Recovery" function of sleep: effects of purified human interleukin-1 on the sleep and febrile response of cats. *Metab Brain Dis* (1989) 4: 73-80.
- Sztejn MB, Kierszenbaum F. A soluble factor from *Trypanosoma brucei rhodesiense* that prevents progression of activated human T lymphocytes through the cell cycle. *Immunology* (1991) 73: 180-185.
- Szymusiak R, Satinoff E. Thermal influence on the basal forebrain hypnogenic mechanisms. *Strain mechanisms of sleep*. New York: Raven Press. McGinty DJ, Drucker-Colin R, Morrison A, Pannegiani PL (Eds) (1985) pp. 301-318.
- Szymusiak R, McGinty DJ. Sleep suppression following kainic acid induced lesions of the basal forebrain. *Exp Neurol* (1986a) 94: 598-614.
- Szymusiak R, McGinty D.J. Sleep-related neuronal discharge in the basal forebrain of cats. *Brain Res* (1986b) 370: 82-92.
- Tapie P, Buguet A, Tabaraud F, Bogui P, Doua F, Bert J. Electroencephalographic and polygraphic features of 24-hour recordings in sleeping sickness and healthy African subjects. *J Clin Neurophysiol* (1996) 13: 339-344.
- Tardieu M, Peudenier S, Sébire G. Les macrophages du cerveau humain : de la coloration argentique au SIDA. *Med Sci* (1991) 7: 775-781.
- Taylor K, Lutje V, Mertens B. Nitric oxide is depressed in *Bos indicus* cattle infected with *Trypanosoma vivax* and does not mediate T-cell suppression. *Infect Immun* (1996) 64: 4115-4122.
- Timo-Iaria C, Negrao N, Schmidek WR, Hoshino KWR, Menezes CE, Da Rocha TL. Phases and states of sleep in the rat. *Physiol Behav* (1970) 5: 1057-1062.
- Tizard I, Nielsen KH, Seed JR, Hall JE. Biologically active products from African trypanosomes. *Microbiol Rev* (1978) 42: 661-681.
- Tobler I, Borbely AA. Sleep regulation after reduction of brain serotonin: effect of p-chlorophenylalanine combined with sleep deprivation in the rat. *Sleep* (1982) 5: 145-153.

Tobler I, Borbely AA, Schwyzer M, Fontana A. Interleukin-1 derived from astrocytes enhances slow wave activity in sleep EEG of the rat. *Eur J Pharmacol* (1984) 104: 191-192.

Tolson DL, Jardin A, Schnur LF, Stebeck C, Tuckez C, Beecraft RB, Teb HS, Olafson RW, Pearson TW. The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosome is a potent stimulator of T lymphocytes proliferation. *Infect Immun* (1994) 62: 4893-4899.

Toth LA, Krueger JM. Alteration of sleep in rabbits by *Staphylococcus aureus* infection. *Infect Immun* (1988) 56: 1785-1791.

Toth LA, Krueger JM. Infectious disease, cytokines, and sleep. *The Diencephalon and Sleep*. New York: Raven Press. Mancina M, Marini G (Eds) (1990) pp. 331-341.

Toth LA, Tolley EA, Broady R, Blakely B, Krueger JM. Sleep during experimental trypanosomiasis in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med* (1994) 205: 174-181.

Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med* (1988) 167: 1211-1227.

Truc P, Bailey JW, Doua F, Lavessière C, Godfrey DG. A comparison of parasitological methods for the diagnosis of Gambian trypanosomiasis in an area of low endemicity in Côte d'Ivoire. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* (1994) 88: 419-421.

Truc P, Cuny G. Répartition et propagation de la Trypanosomiase Humaine Africaine : Intérêt de l'identification génétique des trypanosomes. *Med Trop* (2001) 61: 433-436.

Trulson ME, Jacobs BL. Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res* (1979) 163: 135-150.

Tunkel AR, Rosser SW, Hansen EJ, Scheld WM. Blood-brain barrier alterations in bacterial meningitis: development of an *in vitro* model and observations on the effects of lipopolysaccharide. *In Vitro Cell Dev Biol* (1991) 27A: 113-120.

Uehara A, Sekiya C, Takasugi Y, Namiki M, Arimura A. Anorexia induced by interleukin-1: involvement of corticotropin-releasing factor. *Am J Physiol* (1989a) 257: R613- R617.

Uehara A, Ishikawa Y, Okumura T, Okamura K, Sekiya C, Takasugi Y, Namiki M. Indomethacin blocks the anorexic action of interleukin-1. *Eur J Pharmacol*. (1989) 170: 257-60.

Ueno R, Honda K, Inoue S, Hayaishi O. Prostaglandin D₂, a cerebral sleep-inducing substance in rats. Proc Natl Acad Sci USA (1983) 80: 1735-1737.

Uzonna JE, Kaushik RS, Gordon JR, Tabel H (1998) Experimental murine *Trypanosoma congolense* infections. I. Administration of anti-IFN gamma antibodies alters trypanosome-susceptible mice to a resistant-like phenotype. J. Immunol. 161: 5507-5515.

VACHON F, KATLAMA C, CATINAUD C. TRYPANOSOMIASE HUMAINE AFRICAINE. SEMIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE DE LA PHASE PRECOCE. A PROPOS DE 8 CAS EUROPEENS CONTRACTES EN AFRIQUE FRANCOPHONE. MED MAL INFECT (1986) 4: 206-211.

Valatx JL, Roussel B, Curé M. Sommeil et température cérébrale du rat au cours de l'exposition chronique en ambiance chaude. Brain Res (1973) 55: 107-122.

Van Betteray JN, Vossen JM, Coenen AM. Behavioral characteristics of sleep in rats under different light dark conditions. Physiol Behav (1991) 50: 79-82.

Van Bogaert L. Experimental trypanosomal encephalitis. Comparative Neuropathology. New York and London: Academic Press. Innes JTM, Saunders LZ (Eds) (1962) 465- 481.

Van der Ploeg LH, Gottesdiener K, Lee MG. Antigenic variation in African trypanosomes. Trends Genet (1992) 8: 452-457.

Van Gool WA, Mirmiran M. Age-related changes in the sleep pattern of male adult rats. Brain Res (1983) 279: 394-398.

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 (1981a) 64:187-193.

Van Marck EAE, Le Ray D, Beckers A, Jacob W, Wery M, Gigase PLJ. Light and electron microscope studies on extravascular *Trypanosoma brucei gambiense* in the brain of chronically infected rodents. Ann Soc Belg Med Trop (1981b) 61: 57-78.

Van Marck EAE, Mulumba P, Beckers A, Gigase PLJ, Wéry M. Studies of choroid plexus involvement in chronic infection of mice with *Trypanosoma brucei gambiense*. Cont Microbiol Immunol (1983) 7 : 173-182.

Van Meirvenne N, Janssen PG, Magnus E, Lumsden WH, Herbert WJ. Antigenic variation in passaged populations of *Trypanosoma (Trypanosoon) brucei*. II. Comparative studies on two antigenic-type collections. *Ann Soc Belge Med Trop* (1975) 55 : 25-30.

Van Meirvenne N, Le Ray D. Diagnosis of African and American trypanosomiasis. *Br Med Bull* (1985) 41: 156-161.

Van Nieuwenhove S. Current Sleeping Sickness situation and control strategies. Communication au Congrès International Sleeping Sickness rediscovered. Session I: Introduction. Anvers, Belgique (1998).

Vanni-Mercier G, Sakai K, Lin JS, Jouvet M. "Waking-state specific" neurons in the caudal hypothalamus of the cat. *C R Acad Sci Paris* (1984) 298: 195-200.

Verlinde CLMJ, Callens M, Van Calenbergh S, Van Aerschot A, Herdewun P, Hannaert V, Michels PAM, Opperdoes ER, Hoi WGJ. Selective inhibition of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein structure-based design: toward new drugs for the treatment of sleeping sickness. *J Med Chem* (1994) 37: 3605-3613.

Vertes RPA. PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* (1991) 313: 643-668.

Vickerman K. The fine structure of *Trypanosoma congolense* in its bloodstream phase. *J Protozool* (1969) 16: 54-69.

Vickerman K. The mode of attachment of *Trypanosoma vivax* in the proboscis of the tsetse fly *Glossina fuscipes*: an ultrastructural study on the epimastigote stage of the trypanosome. *J Protozool* (1973) 20: 394-404.

Vickerman K, Tetley L, Hendry KA, Turner CM. Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. *Biol Cell* (1988) 64: 109-119.

Vickerman K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br Med Bull* (1985) 41: 105-114.

Villablanca J. Role of the thalamus in sleep control: sleep-wakefulness in chronic diencephalic and athalamic cats. Basic sleep mechanisms. Academic Press, New York. Petre-Quadens O, Schlag JD (Eds) (1974) pp. 51-78.

Villanueva MS. Trypanosomiasis of the central nervous system. *Semin Neurol* (1993) 13: 209-218.

Vincendeau P, Caristan A, Pautrizel R. Macrophage function during *Trypanosoma musculi* infection in mice. *Infect Immun* (1981) 34: 376-381.

Vincendeau P, Daulouede S, Veyret B, Dardé ML, Bouteille B, Lemesre JL. Nitric oxide-mediated cytostatic activity on *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp Parasitol* (1992) 75: 353-360.

Vincendeau P, Lesthelle S, Bertazzo A, Okomo-Assoumou MC, Allegri G, Costa CV. Importance of L-tryptophan metabolism in trypanosomiasis. *Adv Exp Med Biol* (1999) 467: 525-531.

Watanabe A, Hamada T, Shibata S, Watanabe S. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on N-methyl-D-aspartate-induced phase delay of circadian rhythm of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus *in vitro*. *Brain Res* (1994) 646: 161-164.

Webster P, Russel DG. The flagellar pocket of typanosomatids. *Parasitol Today* (1993) 9: 201-206.

Weingarten S, Savoldelli D, Langhans W. Enhancement or loss of the hypophagic effect of interleukin-1 upon chronic administration. *Physiol Behav* (1992) 52: 831-837.

Weiss GF, Rogacki N, Fueg A, Buchen D, Leibowitz SF. Impact of hypothalamic d-norfenfluramine and peripheral d-fenfluramine injection on macronutrient intake in the rat. *Brain Res Bull* (1990) 25: 849-859.

Weiss GF, Rogacki N, Fueg A, Buchen D, Suh JS, Wong DT, Leibowitz SF. Effect of hypothalamic and peripheral fluoxetine injection on natural patterns of macronutrient intake in the rat. *Psychopharmacology Berl* (1991) 105: 467-476.

Westland KW, Pollard JD, Sander S, Bonner JG, Linington C, McLeod JG. Activated non-neural specific T cells open the blood-brain barrier to circulating antibodies. *Brain* (1999) 122: 1283-1291.

Wojcik WJ, Fornal C, Radulovacki M. Effect of tryptophane on sleep in the rat. *Neuropharmacol* (1980) 9: 163-167.

Wolga JI, Ribeiro CD, Gaillat J, Stahl JP, Micoud M, Gentilini M. Autoantibodies in human african trypanosomiasis (smooth muscle antibodies during a *Trypanosoma gambiense* disease) *Bull Soc Pathol Exot Filiales* (1981) 74: 676-684.

Woodrooffe MN, Sarna GS, Wadhwa M, Hayes GM, Loughlin AJ, Tinker A, Cuzner ML. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by *in vivo*

microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. *J Neuroimmunol* (1991) 33: 227-236.

Woolf NJ, Butcher L. Cholinergic system in the rat brain. III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia and basal forebrain. *Brain Res Bull* (1986) 16: 603-637.

Wong D, Dorovini-Zis K. Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* (1992) 39: 11-21.

Wotherspoon G, Albert M, Rattray M, Priestley JV. Serotonin and NADPH diaphorase in the dorsal raphe nucleus of the adult rat. *Neurosci Lett* (1994) 173 : 31-36.

Wu W, Li Y, Schinco FP. Expression of *c-jun* and neuronal nitric oxide in rat spinal motoneurons following axonal injury. *Neurosci Lett* (1994) 179: 157-161.

Yamada K, Noda Y, Nakayama S, Komori Y, Sugihara H, Hasegawa T, Nabeshima T. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br J Pharmacol* (1995) 115: 852-858.

Zhang J, Snyder SH. Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1995) 35: 213-233.

ETUDE DE LA DYSRYTHMIE CIRCADIENNE DE L'ALTERNANCE VEILLE-SOMMEIL, SUIVI CLINIQUE ET VALIDATION THERAPEUTIQUE DANS UN MODELE EXPERIMENTAL DE TRYPANOSOMOSE AFRICAINE.

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA), due à un protozoaire flagellé de type *Trypanosoma brucei* transmis par piqûre de glossine, est une maladie grave qui revêt un caractère d'urgence en Afrique puisqu'elle y est en nette recrudescence et que les médications disponibles ont peu évolué et sont donc rares et dangereuses.

La THA comporte deux phases successives difficiles à distinguer chez l'homme ; la première est celle du développement du parasite dans le système lymphatico-sanguin, elle est suivie d'une phase d'atteinte neurologique durant laquelle le trypanosome envahit le système nerveux central (SNC). Cette seconde phase, dite méningo-encéphalitique, est caractérisée par l'émergence de troubles neurologiques au premier rang desquels une perturbation de la rythmicité circadienne du cycle veille-sommeil. Le diagnostic de cette phase est actuellement tardif et non spécifique en raison de l'absence de critères clinico-biologiques surs. L'objectif premier de ce travail a été de développer une méthode non invasive visant à identifier le passage en phase méningo-encéphalitique.

Dans un premier temps, nous avons conduit une étude médico-physiologique qui nous a permis de mettre en évidence des paramètres physiologiques déviants pouvant constituer des critères sérieux de pénétration du trypanosome dans le SNC. Une diminution de poids consécutive d'une diminution de prise alimentaire, une diminution de distance totale parcourue et du comportement d'exploration ainsi qu'une attitude de prostration à un test d'open-field deux semaines après infection sont autant d'index en faveur de l'entrée en phase de polarisation nerveuse. Une étude histologique complémentaire révélant la présence de parasite treize jours post-infection nous a permis de renforcer cette hypothèse.

L'administration de la combinaison suramine-mégazol, traitement efficace de la THA en phase méningo-encéphalitique, nous a permis d'affiner ces conclusions. En effet, seuls les rats traités avec

la combinaison thérapeutique au moment de la diminution de poids ont survécu. En outre, la diminution de poids sous traitement combiné a été réduite par rapport à l'utilisation du mégazol seul ce qui renforce le caractère bénéfique de la combinaison thérapeutique.

Notre travail s'est alors focalisé sur l'étude des perturbations circadiennes de l'alternance veille-sommeil. Une étude qualitative fondée sur la structure interne du sommeil et la morphologie des ondes constituant les différents stades de vigilance a été complétée d'une approche quantitative des tracés électro-physiologiques recueillis sur 10 animaux. Une perturbation de la rythmicité circadienne de la veille et du sommeil a été objectivée, accompagnée d'une destruction de l'architecture interne du sommeil (augmentation du nombre d'épisodes de sommeil et diminution concomitante de leur durée moyenne) ainsi qu'un appauvrissement de la qualité du sommeil (progression de la proportion de sommeil lent léger au profit du sommeil lent profond). Cette altération de la structure interne du sommeil s'est également traduite par l'augmentation des changements de stades de vigilance et l'apparition de transitions anormales, en particulier des endormissements directs en sommeil paradoxal (sleep onset rapid eye movements episodes, SOREMPs). Des ondes lentes hypersynchrones anormales sont apparues en sommeil lent en fin de vie. L'étude quantitative a révélé une diminution de la densité de puissance spectrale de la bande delta en sommeil lent.

Répliquant la majeure partie des troubles observés en phase méningo-encéphalitique de la THA, notre modèle expérimental constitue donc un outil d'étude pour d'éventuelles nouvelles thérapeutiques. Son utilisation lors d'essais pré-cliniques peut donc être envisagée. En outre, il ouvre des perspectives d'études approfondies de la physiopathologie de l'atteinte.