

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole doctorale Sciences-Technologie-Santé

Faculté de Médecine

Année 2005

Thèse n°

**UNIVERSITE DES SCIENCES DE LA SANTE
LIBREVILLE-OWENDO**

Faculté de Médecine

THESE EN CO-TUTELLE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES DE LA SANTE LIBREVILLE-OWENDO

Discipline : Biologie Sciences Santé

Spécialité : Parasitologie

Présentée et soutenue publiquement par

Caroline BODA

le 7 janvier 2005

à la Faculté de Médecine de Limoges

Contribution des modèles expérimentaux dans l'étude des trypanosomoses africaines

Dr. Bernard BOUTEILLE

Directeur de thèse

Directeur du Laboratoire de Neuroparasitologie et
Neuroépidémiologie Tropicale (EA 3174)

Université de Limoges

Pr. Maryvonne KOMBILA

Directeur de thèse

Chef du Département de Parasitologie-Mycologie

Université des Sciences de la Santé Libreville-Owendo

Président : **Pr. Michel DUMAS**, Université de Limoges, France

Rapporteurs : **Pr. Stanny GEERTS**, Institut de Médecine Tropicale, Anvers, Belgique

Pr. Philippe VINCENDEAU, Université Victor Segalen, Bordeaux 2, France

Examineurs : **Pr. Philippe BLOT**, Université des Sciences de la Santé Libreville-Owendo

Directeurs de thèse : **Pr. Maryvonne KOMBILA**, Université des Sciences de la Santé Libreville-Owendo, Gabon

Dr. Bernard BOUTEILLE, Université de Limoges, France

Les épreuves ne sont pas là pour nous décourager mais pour être surmontées

Remerciements

Ma sincère reconnaissance se porte vers le Professeur Michel Dumas, qui a bien voulu m'accueillir à l'institut. Il a toujours pris le temps de m'écouter, de comprendre mes problèmes et de m'aider à trouver des solutions. Sincères remerciements.

Merci au Docteur Bernard Bouteille d'avoir accepté de diriger ce travail et de m'avoir accueillie au sein de son équipe accueil. Sans lui, beaucoup de choses n'auraient pas été possibles.

Je remercie le Professeur Maryvonne Kombila d'avoir accepté de co-diriger mon travail. Elle a permis de fonder une co-tutelle avec le Gabon afin que le travail de cette thèse trouve son application sur le terrain.

Sincères remerciements aux Professeurs Philippe Vincendeau et Stanny Geerts pour l'attention qu'ils ont bien voulu porter à mon travail. Merci de leur précieux avis et de leurs compétences.

Je suis très reconnaissante envers le Professeur Philippe Blot qui m'a accueilli au CIRMF où j'ai pu effectuer un travail impossible à réaliser en France. Merci d'avoir porté de l'intérêt à mon travail et à ses difficultés et de participer au jury.

Merci au Docteur Claude Couquet d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires au bon déroulement de mon étude, de sa compréhension et de son extrême gentillesse. Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire départemental pour leur sympathie et leur disponibilité. Je remercie particulièrement Hélène Dumet pour son aide précieuse et efficace, mais aussi sa gentillesse et sa bonne humeur.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers le Professeur Marie-Odile Jauberteau pour son aide, ses conseils et sa disponibilité. Elle a su m'apporter un avis impartial sur tout ce que j'ai entrepris. Je remercie le Professeur Fernand Boutros-Toni pour m'avoir apporté ses compétences en matière de biostatistiques.

Un grand remerciement à la fondation Bleustein-Blanchet pour la vocation qui m'a donné une chance de réussir et a très certainement initié mon projet de thèse. Je suis reconnaissante envers l'Agence Universitaire de la Francophonie pour les soutiens moral et financier qu'elle m'a apportés.

Je remercie sincèrement le Docteur Sylvie Bisser pour l'aide qu'elle m'a apporté chaque fois que j'en ai eu besoin dans ce travail, pour sa disponibilité et sa compréhension.

Barbara, Bertand, Caro, Cathy, Christophe, Stéphanie : je ne vous remercierai jamais assez d'avoir entretenu la bonne humeur quotidienne du laboratoire (chacun à sa manière...), indispensable à dissiper les grisailles de la thèse. Merci de votre présence chaque fois que j'en ai eu besoin et de la sincère amitié dont vous m'avez fait preuve au laboratoire et en dehors...L'œil attentif et objectif que vous avez porté sur ce travail et vos précieux conseils m'ont été d'une aide considérable. Je vous souhaite à tous la plus grande réussite pour l'avenir.

Un grand merci à tout le personnel de l'institut pour leur aide et leur sympathie.

Je souhaite également remercier le personnel des laboratoires de Parasitologie, d'Hématologie et d'Immunologie du CHU de Limoges pour leur disponibilité et leur aide. Un remerciement particulier au Docteur Mireille Drouet et à Jean-Luc Fauchet pour avoir éclairé le chemin obscur de la cytométrie. Merci à Jacques de l'animalerie du CHU pour son aide précieuse et sa gentillesse.

Une pensée particulière à ma mère et ma famille, à Emmanuel et à sa famille, ainsi qu'à mes amis (Murielle, Bernard, Valérie, Virginie, Franck, Fanny, Violaine, Pierre, Alexandre), qui m'ont toujours soutenu et encouragé, quelles qu'étaient mes décisions. Ils ont su me comprendre et m'épauler sans jamais me juger.

Table des matières

Introduction	14
Situation actuelle	16
1. Les trypanosomoses africaines	18
1.1. Données historiques.....	18
1.2. Géographie	18
1.3. Les parasites et leurs vecteurs	20
1.4. Les foyers	25
1.5. La transmission.....	26
2. La maladie chez l'homme	30
2.1. Epidémiologie.....	30
2.2. La maladie	31
3. La maladie chez l'animal	53
3.1. Epidémiologie.....	53
3.2. Le tableau clinique.....	57
3.3. Physiopathologie	59
3.4. Diagnostic	61
3.5. Le traitement.....	62
4. Résistances thérapeutiques	67
4.1. Les mécanismes de résistance	67
4.2. Origine des résistances	70
5. Modèles d'études expérimentaux de la maladie du sommeil.....	72
5.1. Modèles <i>in vitro</i>	72
5.2. Modèles <i>in vivo</i>	72
Travaux personnels	76
1. Patients, animaux et méthodes	77
1.1. Les parasites	77
1.2. Les patients	78
1.3. Origine des animaux utilisés en expérimentation.....	79
1.4. Infection des animaux.....	80
1.5. Protocoles pour l'expérimentation animale.....	81
1.6. Cytométrie en flux pour le typage lymphocytaire	84

1.7. Analyses statistiques.....	88
2. Résultats	90
2.1. Plasma kinetics and efficacy of oral megalzol treatment in infected sheep with <i>Trypanosoma brucei brucei</i> (article 1) (voir annexe 2).....	90
2.2. Methylene blue: evidence for <i>in vitro</i> efficiency and <i>in vivo</i> failure in trypanocidal activity (article 2).....	109
2.3. Effectiveness of megalzol and megalzol-suramin combination on <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> infection in vervet monkeys (article 3, en préparation).....	147
2.4. Essai thérapeutique de la combinaison DFMO-Nifurtimox chez le singe vert infecté par <i>T. b. gambiense</i>	149
2.5. Etudes des modifications immunologiques dans le sang et le LCR de patients infectés par <i>T. b. gambiense</i>	154
2.6. Etudes des modifications immunologiques dans le sang et le LCR de singes infectés par <i>T. b. gambiense</i>	157
Discussion et perspectives.....	165
1. Les modèles animaux dans la maladie du sommeil	166
2. Essais de traitements trypanocides sur différents modèles d'études.....	171
2.1. Effets trypanocides du bleu de méthylène.....	171
2.2. Activité trypanocide du mégazol chez le mouton et le singe	172
2.3. Essai de la combinaison DFMO-nifurtimox dans le traitement de la phase nerveuse chez le singe vert infecté par <i>T. b. gambiense</i>	174
3. Mise au point de la technique de cytométrie en flux dans l'étude des trypanosomoses	177
4. Evolution des profils lymphocytaires du sang et du LCR au cours de l'infection à <i>T. b. gambiense</i>	179
5. Utilisation du vervet (<i>Cercopithecus aethiops</i>) comme modèle d'étude immunologique de la trypanosomose humaine africaine	184
Conclusion.....	190
Bibliographie.....	192
Annexes.....	222

Abréviations

ABC : *ATP Binding Cassettes*

ADN : acide désoxyribonucléique

ALAT : alanine aminotransférase

AMM: autorisation de mise sur le marché

APC : Allophycocyanine

ARN: acide ribonucléique

ASAT : aspartate aminotransférase

ATP: adénosine triphosphate

CATT : *Card Agglutination Trypanosomiasis Test*

CD: *cluster of differentiation*

C_{max} : concentration maximale

DEAE : diéthylamino éthyl

DFMO: 2 – (difluorométhyl) - DL - ornithine monochlorhydrate

EDTA : acide éthylènediamine tétraacétique

ELISA: *Enzyme linked Immunosorbent Assay*

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

FL: fluorochrome

FSC : *forward scatter*

GPI : récepteur glycosylphosphatidylinositol

h: heure

HIV : virus de l'immunodéficience humain

IC : concentration inhibitrice

IFN- γ : interféron gamma

IgG: immunoglobuline G

IgM : immunoglobuline M

IL : interleukine

IM: intra-musculaire

IP: intra-péritonéal

IV : intra-veineux

j: jour

KIVI: *Kit for In Vitro Isolation*

L : lombaire

LCR : liquide céphalorachidien

MEM : milieu essentiel minimum

MIP1- α : *Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha*

MLEE : électrophorèse enzymatique à multilocus

mM : micromolaire

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide-3'-phosphate hydrogène

ng: nanogramme

NK : *natural killer*

NO: monoxyde d'azote

NOS: NO synthase

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

p.o. : per os

PATT : *Procyclic Agglutination Trypanosomiasis Test*

PBS : *phosphate buffer saline*

PC5 : Phycocyanine 5

PCR: réaction de polymérisation en chaîne

PE : Phycoérythrine

P-gp : glycoprotéine P

PSG : tampon phosphate glucosé

RDC: République Démocratique du Congo

SC: sous-cutanée

SIV : virus de l'immunodéficience simien

SNC : système nerveux central

SSC: *side scatter*

STLV : virus lymphotrope simien

T.b.: Trypanosoma brucei

Th : *lymphocyte T helper*

THA : trypanosomose humaine africaine

TLTF : *trypanosome-derived lymphocyte triggering factor*

T_{max} : temps maximal

TNF- α : Facteur tumoral de nécrose alpha

Trs : tours

US: *United States*

VAT : antigène variable de trypanosome

VSG : glycoprotéine de surface variable

Tables des illustrations

Figures

Figure 1 : Répartition géographique des trypanosomoses à <i>T. b. gambiense</i> et <i>T. b. rhodesiense</i> en Afrique sub-saharienne, 1999.....	19
Figure 2 : Structure du trypanosome (<i>Trypanosoma</i> sp forme trypomastigote)	21
Figure 3 : Formes du trypanosome selon l'étape du cycle (a) épimastigote chez l'insecte, (b) trypomastigote chez l'homme	23
Figure 4 : <i>Glossina</i> spp.....	23
Figure 5 : Cycle de transmission du trypanosome	27
Figure 6 : Cycle du trypanosome	29
Figure 7: Activation des cellules du système immunitaire par des antigènes du trypanosome.	37
Figure 8: Activation des macrophages au cours de la trypanosomose africaine.....	38
Figure 9 : (a) Fenêtre d'identification des lymphocytes lors de l'analyse des résultats de cytométrie. (b) exemple de résultats obtenus après marquage des lymphocytes dans le LCR d'un vervet infecté par <i>T. b. gambiense</i> et lecture au cytomètre en flux.	89
Figure 10 : Evolution de la cytorachie chez les singes verts infectés par <i>T. b. gambiense</i> avant et après traitement.	151
Figure 11 : Evolution de la cytorachie des deux singes infectés par <i>T. b. gambiense</i> non traités	152
Figure 12: Proportions des lymphocytes B et T et des cellules natural killer dans le sang de patients atteints de trypanosomose africaine à différents stades	155
Figure 13 : Proportions de lymphocytes B et T dans le LCR de patients atteints de trypanosomose africaine à différents stades.....	156
Figure 14 : Evolution des cellules natural killer ($CD8^+ - CD3^{neg}$) et des lymphocytes $CD8^+ - CD45^{RA}$ dans le sang de vervets au cours de l'infection à <i>T. b. gambiense</i>	160
Figure 15 : Evolution des lymphocytes B dans le LCR des vervets au cours de l'infection à <i>T. b. gambiense</i>	162
Figure 16: Evolution des lymphocytes T $CD8^+ - CD45^{RA}$ dans le LCR de vervets infectés par <i>T. b. gambiense</i>	163

Figure 17 : Diminution des lymphocytes CD8 ⁺ -CD45 ^{RA} et CD8 ⁺ -CD3 ^{nég} dans le sang de singes verts au cours de l'infection à <i>T. b. gambiense</i>	180
Figure 18 : Augmentation des lymphocytes B dans le LCR de singes verts au cours de l'infection à <i>T. b. gambiense</i>	181
Figure 19 : Augmentation des lymphocytes CD8 ⁺ -CD45 ^{RA} dans le LCR de singes infectés par <i>T. b. gambiense</i>	182
Figure 20 : Lymphocytes du sang de singes verts sains.....	185
Figure 21 : Lymphocytes du LCR de singes verts avant atteinte nerveuse.....	187

Tableaux

Tableau 1 : Les traitements de la THA	50
Tableau 2 : Répartition géographique des espèces de trypanosomes des animaux.	56
Tableau 3 : Trypanocides vétérinaires	65
Tableau 4 : Trypanopréventifs vétérinaires.....	66
Tableau 5 : Combinaisons 1 et 2 d'anticorps utilisés pour le marquage des lymphocytes du sang et du LCR chez les patients infectés	85
Tableau 6 : Combinaisons 1, 2, 3,4 d'anticorps utilisés pour le marquage des lymphocytes du sang et du LCR chez les singes verts infectés	85
Tableau 7 : Séries de contrôles isotypiques utilisés lors des marquages des lymphocytes du sang et du LCR de patients infectés.	86
Tableau 8: Série de contrôles isotypiques utilisés pour les marquages des lymphocytes du sang et du LCR des singes verts infectés.	86
Tableaux 9a et 9b : Réglage de l'ampérage de chaque fluorochrome (a) et des compensations entre les quatre couleurs (b) d'après les contrôles isotypiques avant lecture au cytomètre en flux.	87
Tableau 10: Récapitulatif de l'évolution de l'infection à <i>T. b. gambiense</i> et des traitements administrés chez les vervets.	149
Tableau 11 : Récapitulatif des prélèvements de LCR et des résultats principaux de l'analyse cytométrique effectuée dans le LCR des vervets au cours de l'infection.	159
Tableau 12 : Les différents modèles expérimentaux dans l'étude des trypanosomoses.	170
Tableau 13: Proportions des types lymphocytaires, déterminées par cytométrie en flux, dans le sang humain et de singe vert sain.....	186
Tableau 14: Proportions des types lymphocytaires, déterminées par cytométrie en flux, dans le LCR humain et de singe vert sain.	188

Introduction

La trypanosomose humaine africaine (THA) a été qualifiée de ré-émergente en Afrique sub-saharienne où elle constitue un réel problème de santé publique. En effet, les programmes de dépistage et les prises en charge thérapeutiques ont souvent été interrompus ou rendus difficiles par le contexte politique des pays touchés. L'infection chez l'homme est due à un parasite protozoaire flagellé, *Trypanosoma brucei gambiense* en Afrique de l'Ouest et *T. b. rhodesiense* en Afrique de l'Est, transmis par la mouche tsé-tsé. Le parasite se développe dans un premier temps au niveau du chancre d'inoculation puis dans le sang, la lymphe et divers tissus tels que le myocarde avant de gagner le système nerveux central (SNC). Les thérapeutiques actuellement utilisées dans cette maladie ne sont pas satisfaisantes et ce, surtout au stade d'atteinte nerveuse. En effet, le traitement diffère selon le stade de la maladie qui est très délicat à déterminer cliniquement et biologiquement, en raison du manque de critères spécifiques pour la THA. Il est cependant essentiel de pouvoir diagnostiquer précisément l'atteinte nerveuse car les traitements efficaces au stade précoce ne franchissent pas la barrière hémato-méningée et se trouvent donc totalement inefficaces lorsque le parasite a gagné le système nerveux central. A ce stade, les médicaments efficaces sont toxiques et le plus couramment employé, un dérivé de l'arsenic, le mélarsoprol, peut produire une encéphalopathie, mortelle dans la moitié des cas. A part leur toxicité, des résistances primaires et secondaires sont décrites avec ces produits et il y a actuellement une urgence à disposer d'alternatives thérapeutiques.

Chez l'animal, cette maladie se manifeste sous forme d'une infection chronique qui affaiblit les cheptels et leur productivité contribuant ainsi à un lourd déficit économique et alimentaire. Les sous-espèces de parasites responsables sont différentes de celles retrouvées chez l'homme, chez qui elles ne sont en principe pas capables de créer une infection. En Afrique, il s'agit principalement de *T. b. brucei*, *T. congolense* et *T. vivax*, véhiculées par des insectes hématophages. Les symptômes peu caractéristiques rendent le diagnostic difficile et le traitement est souvent tardif. De plus, de nombreuses résistances sont apparues dans les cheptels africains mais les thérapeutiques vétérinaires actuelles n'offrent aucune alternative.

Dans notre étude, nous nous intéressons à la mise au point de nouvelles thérapeutiques susceptibles de traiter les infections chez l'homme et chez l'animal. Pour cela, nous avons

travaillé avec différents modèles expérimentaux. Le mouton, *Ovis aries* infecté par *T. b. brucei* permet de développer un modèle d'infection chez le bétail. Le singe vert, ou vervet, *Cercopithecus aethiops*, infecté par *T. b. gambiense* permet d'étudier une maladie semblable à celle observée chez l'homme. Ce modèle a été très peu utilisé jusqu'alors dans le cadre de la recherche biomédicale et nous avons développé son utilisation comme modèle pour des études thérapeutiques et de physiopathologie.

Nous présentons d'abord la situation actuelle de la maladie en Afrique chez l'homme et l'animal et les connaissances déjà acquises dans ces domaines. Nous présentons ensuite notre travail de thèse qui s'articule autour de 2 axes complémentaires :

- tester *in vitro* puis *in vivo* dans des modèles expérimentaux, des thérapeutiques alternatives actives au stade nerveux de la maladie avec des molécules candidates disponibles qui permettraient d'apporter une réponse applicable rapidement sur le terrain. Nous avons choisi l'utilisation du mégazol, du bleu de méthylène et d'une combinaison DFMO-nifurtimox.
- progresser dans la compréhension des mécanismes d'invasion du SNC à travers une étude immunologique lors du suivi longitudinal de singes infectés expérimentalement puis traités en phase nerveuse confirmée. Nous avons choisi d'étudier les profils lymphocytaires dans le sang et le LCR de vervets infectés. Ce travail a nécessité des essais préalables sur des patients à tous stades de la maladie afin de vérifier la faisabilité de cette étude au cours d'un suivi longitudinal.

Situation actuelle

1. Les trypanosomoses africaines

1.1. Données historiques

Au quatorzième siècle, Ibn Khaldoun écrivait dans « Histoire des Berbères » que le Sultan Djata, du Royaume de Melli (actuel Mali), était frappé d'une léthargie qui le tua. Rétrospectivement, les descriptions faites de la maladie portent à croire qu'il s'agit de la trypanosomose. Il était également connu des marchands d'esclaves que les sujets présentant des ganglions à la base du cou devaient être écartés du marché car voués à une mort inéluctable. Pourtant, ce n'est qu'au début du 20^{ème} siècle que l'étendue de la maladie et ses conséquences ont été reconnues parmi la multitude de personnes atteintes et de décès. A la même époque, le parasite et son vecteur ont été identifiés, puis, en particulier grâce aux travaux de Jamot en 1920, les premiers traitements ont été mis au point. La maladie sévissait dans tout l'Est et l'Ouest Africain, ainsi que dans le sud du continent, le réservoir humain étant très grand et la transmission rapide (Martin et coll., 1909). Des campagnes de lutte contre la maladie ont alors été organisées avec instauration d'équipes de santé mobiles et élaboration de structures spécialisées sous forme du « Service général autonome de la maladie du sommeil » dans les pays francophones, la « Missao de Combate as Tripanosomiasas » dans les pays lusophones et du « Sleeping-Sickness Bureau » dans les pays anglophones. Le travail réalisé à cette époque grâce à la motivation et à la mobilisation du personnel médical permit d'aboutir à d'excellents résultats. La maladie était contrôlée dans ses foyers principaux et chaque patient pouvait bénéficier d'un traitement. Les problèmes politiques, ethniques et économiques qui surgirent après l'indépendance de la plupart des pays contribuèrent à la ré-émergence de la maladie ces trente dernières années. De nos jours, les stratégies de lutte et de contrôle ont beaucoup progressé mais sont malheureusement toujours difficiles à mettre en place et à maintenir en raison des contextes locaux et du manque de moyens.

1.2. Géographie

On distingue quatre grandes zones d'endémicité parmi lesquelles les pays concernés par la trypanosomose sont classés selon le niveau des taux de prévalence de la maladie. Dans

chaque pays, la répartition spatiale des cas déclarés est très hétérogène et apparaît sous forme de foyers et même de micro-foyers.

Les pays où la trypanosomose est épidémique présentent une forte prévalence et un niveau de transmission élevé. Il s'agit de l'Angola, de la République Démocratique du Congo, de l'Ouganda et du Soudan.

Les pays avec une forte endémicité ont une prévalence relativement élevée et en augmentation constante. Ceci s'observe au Cameroun, au Congo, en Côte d'Ivoire, en République Centre Africaine, en Guinée, au Mozambique, en Tanzanie et au Tchad.

Les pays de faible endémie sont le Bénin, le Burkina-Faso, le Gabon, le Ghana, la Guinée équatoriale, le Kenya, le Mali, le Nigeria, le Togo et la Zambie.

Quelques pays ont un statut épidémiologique inconnu à ce jour, tels que le Burundi, le Botswana, l'Éthiopie, le Libéria, la Namibie, le Rwanda, le Sénégal et la Sierra-Leone (voir figure 1).

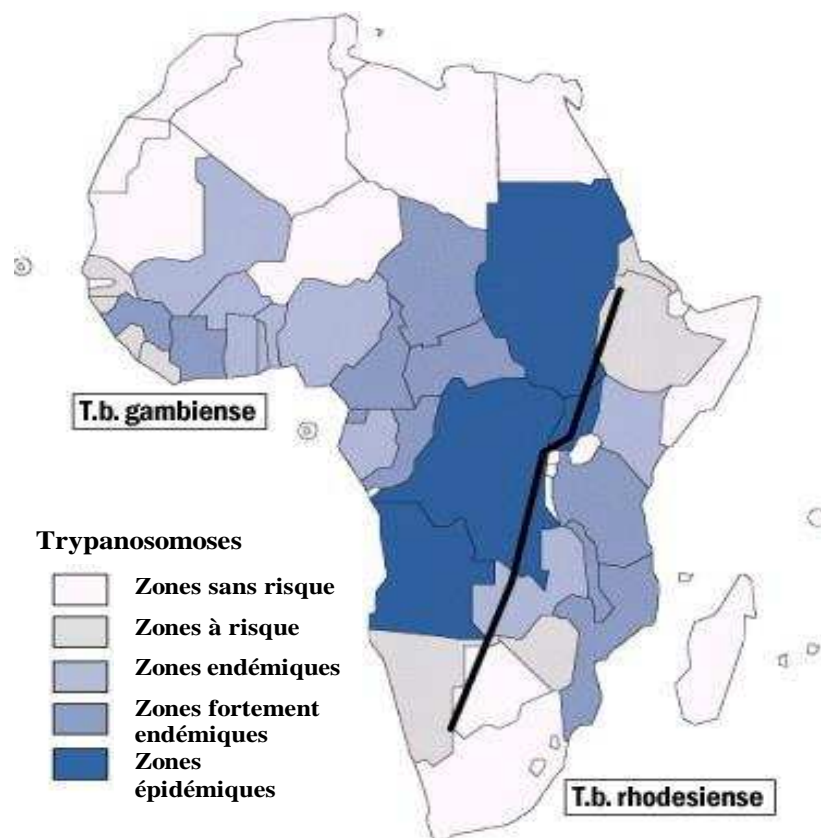


Figure 1 : Répartition géographique des trypanosomoses à *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* en Afrique subsaharienne, 1999 (WHO)

1.3. Les parasites et leurs vecteurs

1.3.1. Les trypanosomes

Les trypanosomes appartiennent aux protozoaires primitifs du règne animal. Leur position taxonomique est la suivante :

Règne des Protista

Sous-règne des Protozoa

Phylum des Sarcomastigophora

Sous Phylum des Mastigophora

Classe des Zoomastigophorea

Ordre des Kinetoplastida

Les Kinetoplastida comprennent des parasites d'hôtes vertébrés, invertébrés ou des deux selon le cycle de développement.

Il s'agit de parasites flagellés qui ont la particularité de changer de morphologie au cours de leur cycle de développement et/ou selon leur hôte. La forme trypomastigote classique de l'espèce *T. brucei* présente un aspect fusiforme (20-30 μM de long par 1,5-3,5 μM de large). C'est un parasite extra-cellulaire qui se multiplie dans les fluides et les tissus par division binaire. L'observation d'un parasite vivant est caractérisée par sa mobilité induite par les ondulations du flagelle. Le flagelle longe le corps cellulaire au bord duquel il est fixé puis se prolonge par une partie terminale libre. Le kinétoplaste, caractéristique des Kinetoplastida, est une structure visible après coloration, en arrière du noyau et contenant l'ADN extra-nucléaire (voir figure 2).

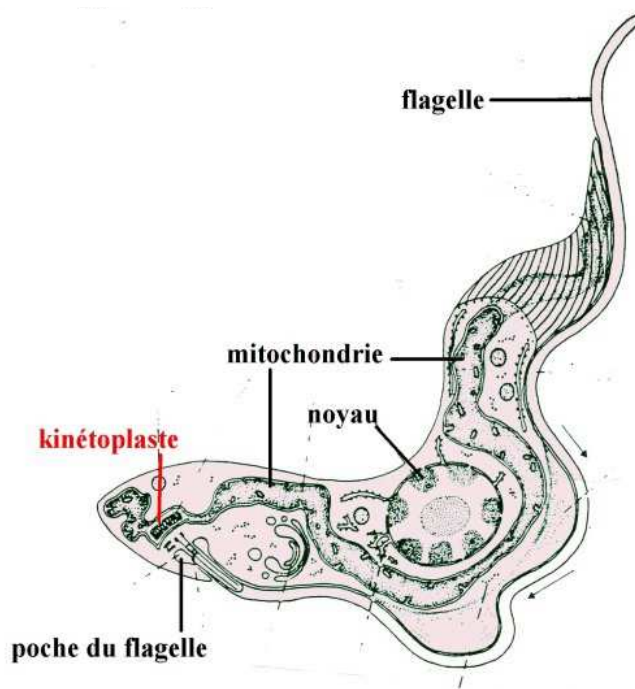


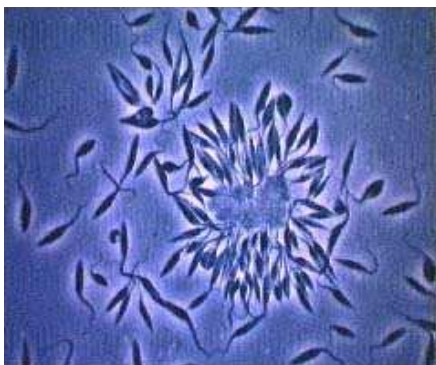
Figure 2 : Structure du trypanosome (*Trypanosoma* sp forme trypomastigote) (Site internet : Université catholique de Louvain, Belgique, www.ucl.ac.be) (grossissement X 400)

Les souches de trypanosomes sont différenciables par une étude de leur ADN nucléaire ou mitochondrial, par électrophorèse des isoenzymes (Gibson et coll., 1999) ou par comparaison des répertoires antigéniques de surface par test de lyse. L'apport de la génétique moléculaire a permis de classer les souches de trypanosomes bien que les résultats discordent et soient encore controversés. Les premiers travaux par analyse isoenzymatique multilocus par électrophorèse (MLEE pour Multilocus Enzyme Electrophoresis) ont apporté une classification qui établit plusieurs groupes au sein de *T. brucei* ssp : grâce aux groupements de zymodèmes, on distingue le groupe de *T. b. gambiense* groupe 1 qui englobe 80 % des trypanosomes isolés de l'Homme (Bagster et coll., 1973 ; Kilgour et coll., 1973 ; Gibson, 1986) mais un doute subsiste quant à la différenciation subspécifique de *T. b. brucei* et *T. b. rhodesiense* chez lesquels plusieurs groupes ont été identifiés (Gibson et coll., 1980 ; Baker, 1995). Des amorces spécifiques de polymérase chain reaction (PCR) ont été mises au point, permettant de différencier par exemple *T. brucei* ssp des autres trypanosomes non pathogènes pour l'homme comme *T. congolense*, à partir de liquides biologiques ou de glossines

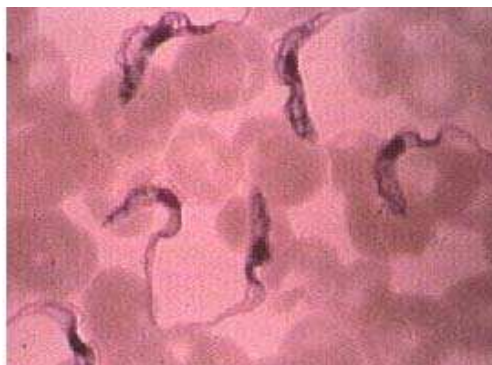
infectées. Cependant, les séquences utilisées pour démontrer la variabilité génétique des souches de *T. b. gambiense* groupe 1 ne permettent pas de montrer un polymorphisme plus vaste que celui obtenu à partir de l'analyse isoenzymatique (Truc et coll., 2000).

Les trypanosomes présentent à leur surface des antigènes qui peuvent être de deux natures différentes : les antigènes variables (VAT) qui s'expriment sous forme d'une glycoprotéine de surface visible (VSG) (Donelson et Turner, 1985) et les antigènes invariants (Overath et coll., 1994). Les VSG sont fixées à la surface externe de la membrane du parasite par un récepteur glycosylphosphatidylinositol (GPI). Les VSG sont codées par des gènes qui sont supposés représenter 10 % du génome. Ils sont d'une grande importance pathogénique étant donné que ces gènes confèrent aux trypanosomes la possibilité de faire varier la nature de leurs antigènes de surface. Seul un gène est exprimé à la fois et les autres restent silencieux jusqu'à la variation antigénique suivante. Environ 10 millions de copies d'une seule VSG sont exprimées à la surface du parasite et au cours de l'infection, une conversion génique constante permet au parasite de faire varier son manteau antigénique et d'échapper ainsi au système immunitaire de l'hôte (Donelson et coll., 2002). Ce phénomène se traduit chez l'hôte par une multiplication rapide dans le sang et des vagues de parasitémie caractéristiques de la maladie (Barry, 1997).

Les parasites peuvent prendre plusieurs formes selon le stade de maturation et l'organisme qui les héberge. Dans le sang des mammifères, on le trouve sous la forme trypomastigote qui englobe les formes courtes ou « stumpy » métacycliques infectantes pour la glossine et les formes longues ou « slender » sous laquelle les parasites se multiplient. Chez la glossine, le parasite s'allonge dans le tube digestif et perd son manteau antigénique de surface. Il s'agit alors de la forme procyclique. Puis il gagne les glandes salivaires, se raccourcit et son kinétoplaste migre à l'arrière du noyau ce qui traduit la forme épimastigote. Par la suite, le kinétoplaste se replace en avant du noyau et le trypanosome reconstitue son manteau antigénique de surface caractéristique de la forme métacyclique. Le parasite est alors à nouveau capable d'infecter un hôte mammifère chez lequel il reprendra sa division (figure 3).



a



b

Figure 3 : Formes du trypanosome selon l'étape du cycle (a) épimastigote chez l'insecte, (b) trypomastigote chez l'homme (Site internet : Université catholique de Louvain, Belgique, www.ucl.ac.be)

1.3.2. Les vecteurs

Les mouches piqueuses ou mouches tsé-tsé, du genre *Glossina*, de la famille des Glossinidae, sont les vecteurs biologiques reconnus de la maladie, à la fois pour les parasites infectant l'homme et ceux infectant l'animal. Deux groupes principaux de mouches tsé-tsé sont distingués selon le mode de vie : les espèces riveraines du groupe *Palpalis* incluent *G. palpalis*, *G. tachinoides* et *G. fuscipes*, les espèces des zones plus arides englobent *G. morsitans*, *G. pallidipes* et *G. swynnertoni*. D'un point de vue morphologique, la tête des glossines se caractérise par la présence d'une suture ptilinale entre les deux yeux, cicatrice d'un sac nécessaire au développement du jeune imago. Les ailes présentent la particularité d'être repliées au repos le long de l'abdomen, qu'elles dépassent en longueur, et sont superposées horizontalement comme des lames de ciseaux (Figure 4).



Figure 4 : *Glossina* spp (Site internet : College of biological Sciences, Ohio State University, www.biosci.ohio-state.edu)

Il a été démontré en 1973 par Harmsen que seules les jeunes glossines sont infectantes en raison de la bonne étanchéité de leur jabot permettant la maturation des trypanosomes avant le passage dans l'intestin de la mouche. En effet, le séjour dans le jabot permet aux trypanosomes de se prémunir contre les attaques enzymatiques du système digestif de la mouche. Cependant, il a été mis en évidence que des mouches du groupe *morsitans* âgées de 21 à 25 jours sont capables d'héberger la maturation des parasites dans les mêmes proportions que les individus ténéraux. Les glossines mâles et femelles sont hémaphages et doivent se nourrir tous les deux jours. Les femelles sont larvipares et ne sont fécondées qu'une seule fois puis donnent naissance à une larve tous les dix jours. Le développement se fait d'abord dans l'utérus et nécessite des repas sanguins. La larve est ensuite déposée dans un endroit humide et sableux qui permettra au jeune imago de se transformer en adulte.

1.3.3. Lutte anti-vectorielle

La lutte anti-vectorielle, contre les glossines vecteurs de la maladie du sommeil, a longtemps été négligée car on pensait que le dépistage et le traitement systématique des malades étaient suffisants pour vaincre l'endémie. Or, il faut tenir compte du fait que la maladie passe par trois éléments : l'homme, hôte et réservoir, la glossine, vecteur, et le réservoir animal favorisant la dissémination des trypanosomes par l'intermédiaire des glossines. S'il est possible de soigner l'homme, il est presque impossible de traiter systématiquement les animaux domestiques et sauvages. La seule façon d'interrompre le cycle reste donc d'agir au niveau du vecteur.

Plusieurs stratégies de lutte ont été expérimentées, plus ou moins invasives pour le milieu, et nombre d'entre elles ont été abandonnées. Parmi les méthodes non chimiques, on compte la destruction du gibier et de la végétation propice aux glossines, le défrichage, les captures de mouches, les lâchers de prédateurs, la stérilisation des mâles, la modification génétique ou l'utilisation de régulateurs de la croissance. Actuellement, la méthode retenue et le plus largement utilisée est la capture de mouches par pose de pièges. Elle présente les avantages de respecter l'environnement, de nécessiter une main d'œuvre réduite et de permettre de couvrir de grandes étendues. Le principe du piégeage doit permettre une élimination des adultes éclos après la pose du piège mais aussi des glossines de réinfestation. Il repose sur l'attraction des mouches à la fois par la couleur du tissu utilisé (bleu électrique ou noire) et par un appât olfactif. Le piège doit être facilement maniable, et de toxicité modérée pour l'homme mais rémanente. Actuellement, il existe deux sortes de système de

piégeage : le piège de forme isodiamétrique dans lequel les mouches emprisonnées sont tuées par un insecticide, et l'écran imprégné d'insecticide sur lequel se posent les mouches. Bien que l'écran soit moins coûteux et plus facile à fabriquer, son faible rayon d'attraction ne le rend réellement efficace que sur les trajets de vol des tsé-tsé et beaucoup moins dans les gîtes où les tsé-tsé se déplacent de façon aléatoire.

La lutte chimique a commencé après 1945, après l'apparition du DDT. Des résultats spectaculaires ont été obtenus au début de son utilisation, malheureusement, ce produit s'accumule dans les vertébrés et les invertébrés tout au long de la chaîne alimentaire et n'est plus recommandé de nos jours. Les traitements chimiques doivent donc tenir compte à la fois du relief, de la végétation, du climat mais aussi des répercussions écologique et toxicologique. Actuellement, ce sont les pyréthriinoïdes qui sont le plus largement utilisés, avec une bonne efficacité et une toxicité moindre pour l'environnement. Ces traitements nécessitent malgré tout un équipement spécialisé et de la main-d'œuvre avertie.

Le choix de la méthode de lutte anti-vectorielle est conditionné par des facteurs économiques et par le type d'appareillage disponible dans le pays. La lutte contre la trypanosomose doit être efficace mais compatible avec les moyens financiers de l'état concerné.

La lutte chimique concerne aussi le traitement prophylactique du bétail contre les mouches. Des spécialités vétérinaires à base de pyréthriinoïdes ont été commercialisées sous forme de bains ou de « pour on » (application sur le dos et le flanc de l'animal) et se sont révélées assez efficaces.

Enfin, les campagnes de lutte organisées régulièrement dans les zones endémiques contribuent largement à la lutte anti-vectorielle, par le dépistage et le traitement des personnes atteintes qui représentent un réservoir d'infection, mais aussi par la pose systématique de pièges dans les zones visitées par les équipes de dépistage.

1.4. Les foyers

La maladie du sommeil se répartit selon des localisations très précises et souvent bien circonscrites qui correspondent aux lieux de vie des vecteurs, les tsé-tsé. Les gîtes à tsé-tsé dépendent essentiellement des conditions climatiques et hygrométriques mais aussi de la fréquentation par l'homme et les animaux. En zone de savanes, on trouve principalement les

tsé-tsé près des lieux de baignades utilisées pour la pêche et les activités ménagères et sur les ponts et zones de gué. En zone forestière, les insectes vont s'installer de préférence dans les bas-fonds humides, partout où l'ombre et l'humidité sont constantes, mais ils peuvent également suivre les déplacements de population humaine et s'installer aux lisières des villages où ils peuvent se nourrir presque exclusivement sur les humains.

1.5. La transmission

1.5.1. Le réservoir

Les glossines se nourrissent préférentiellement sur les animaux. Cependant, l'homme est le principal réservoir du parasite. La notion de réservoir et de porteurs sains est suspectée depuis 1942 chez les animaux domestiques.

Le réservoir sauvage de *T. b. gambiense* est fortement suspecté mais n'est pas encore identifié. Chez les animaux domestiques, le phénomène a été mis en évidence en Côte d'Ivoire et au Liberia chez le porc qui est capable d'héberger durant 4 années *T. b. gambiense* sous forme infectante pour l'homme. On sait d'ores et déjà que certaines espèces de singes sont sensibles à la maladie (Gibson et coll., 1978 ; Mehlitz et coll., 1982 ; Noireau et coll., 1989).

Pour *T. b. rhodesiense*, le réservoir animal a été mis en évidence beaucoup plus rapidement : à la fois le bétail et le réservoir sauvage jouent un rôle important (Hutchison et coll., 2003). Il s'agit essentiellement du guib harnaché (*Tragelaphus scriptus*) et du Bubale (*Alcelaphus buselaphus*) (Gibson et Welde, 1985 ; Onyango et coll., 1966). D'autres espèces sauvages ne sont pas exclues.

D'autre part, les animaux domestiques peuvent intervenir dans le cycle de transmission sauvage lors de pâturages.

L'homme également peut être infecté par le réservoir sauvage au cours des activités de chasse, surtout en ce qui concerne *T. b. rhodesiense*. L'existence du réservoir animal encore mal identifié pourrait expliquer la persistance et la réactivation de foyers historiques de maladie du sommeil à *T. b. gambiense* (Hide, 1999) (figure 5).

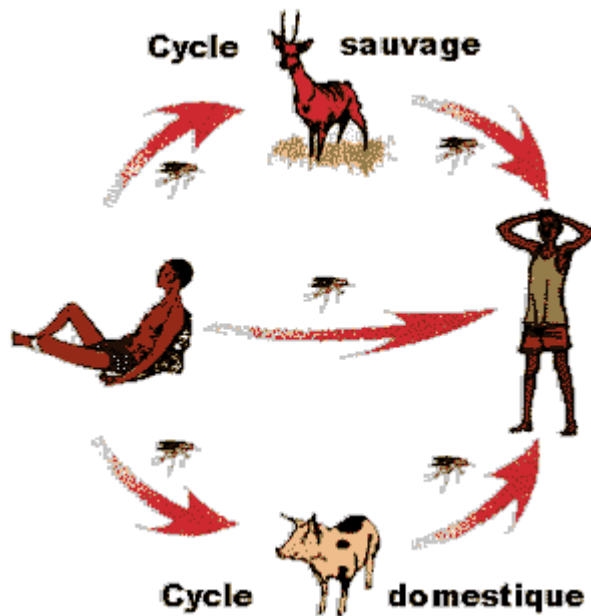


Figure 5 : Cycle de transmission du trypanosome (Site internet : Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale, OCEAC, [www. ns1.cm-refer.org/site_oceac/](http://www.ns1.cm-refer.org/site_oceac/))

Des techniques moléculaires récentes basées sur la détection du gène de résistance au sérum humain dans le génome parasitaire ont permis de mettre en évidence des souches de trypanosomes infectantes pour l'homme dans le réservoir domestique animal (Welburn et coll., 2001).

Des études restent à faire pour préciser les espèces réservoirs de *T. b. gambiense* et ainsi mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie pour adapter les programmes de lutte.

1.5.2. Le cycle de transmission

Les mouches deviennent infectantes environ 21 jours après s'être nourries sur un homme ou un animal infecté. Les parasites subissent alors une série de modifications morphologiques et biochimiques puis migrent dans les glandes salivaires de la mouche. Ils sont inoculés à l'homme à la faveur d'une piqûre qui est suivie alors par une lésion cutanée appelée trypanome. Puis ils migrent vers les nœuds lymphatiques, le sang et autres tissus et la personne devient source de contamination pour toutes les autres glossines qui pourraient la

piquer à nouveau. Les malades en premier stade de la maladie représentent donc le réservoir le plus dangereux et bien souvent ils ne sont pas dépistés car ils ne ressentent pas encore les symptômes invalidants de la maladie. En deuxième stade, le nombre de parasites diminue progressivement dans le sang et du fait de la gravité de la maladie, les personnes infectées abandonnent peu à peu leur activité à l'extérieur et sont alors moins exposées aux glossines (Figure 6).

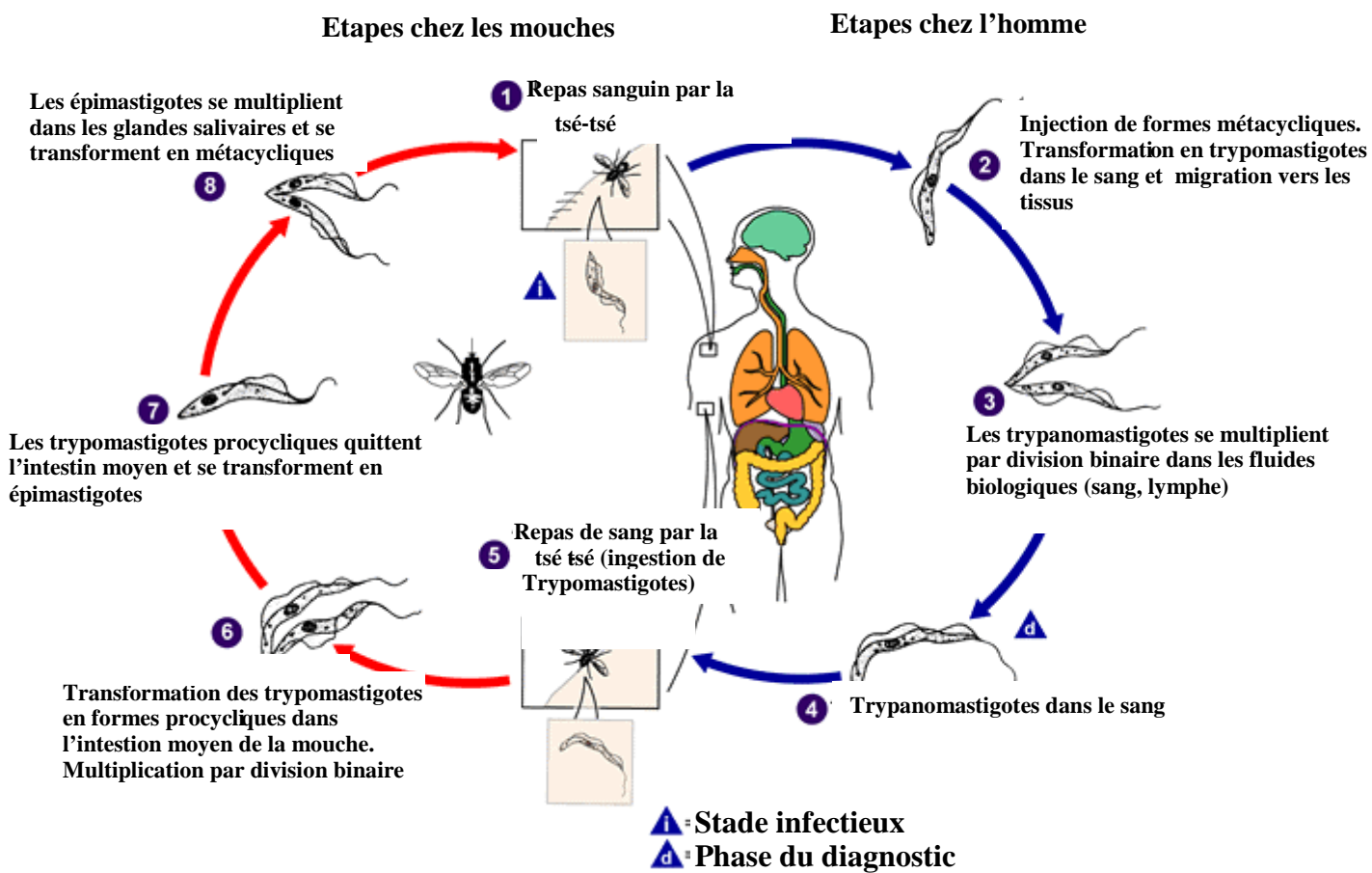


Figure 6 : Cycle du trypanosome (d'après Center for Disease Control, CDC, site internet, www.cdc.gov/)

2. La maladie chez l'homme

2.1. Epidémiologie

2.1.1. Importance de la maladie

2.1.1.1. Importance médicale

La maladie du sommeil menace actuellement plus de 60 millions de personnes dans 36 pays de l'Afrique sub-saharienne, dont 22 appartiennent aux pays les moins développés du monde. Cependant, seuls 3 à 4 millions des personnes à risque sont sous surveillance et les 45000 cas rapportés en 1999 ne reflètent pas la réalité mais seulement le manque de dépistage systématique. On estime que 300 000 à 500 000 personnes sont atteintes par la maladie (OMS, 1998).

Le dépistage des malades et les soins spécifiques requièrent un personnel expérimenté, des financements, des dispensaires bien équipés et des médicaments disponibles en quantité suffisante. De plus, en l'absence de campagnes de dépistage systématiques et de traitement, la majorité des personnes atteintes sont menacées de décéder avant même d'avoir été diagnostiquées.

2.1.1.2. Importances économique et sociale

La THA a des conséquences importantes sur le développement et le monde rural en diminuant la main d'œuvre, les capacités de travail et les productions agricoles. Cette pathologie reste un obstacle majeur au développement de régions entières. Dans des pays tels que l'Angola, la République démocratique du Congo ou le Soudan, les capacités à faire face à la situation épidémique sont largement dépassées par l'ampleur de la transmission et de la prévalence. En effet, de nombreuses provinces de ces pays présentent une prévalence de 20 % (OMS, 2000).

2.1.2. Les espèces parasites

En Afrique, on distingue deux espèces de trypanosomes infectants pour l'homme, appartenant au groupe *T. brucei* spp : *T. b. gambiense* en Afrique de l'Ouest, responsable d'une affection chronique, théoriquement pathogène pour l'homme et certains primates non-humains seulement et *T. b. rhodesiense* en Afrique de l'Est, responsable d'une anthroponose à évolution aiguë.

2.1.3. Mode d'infection et de transmission

Les personnes les plus susceptibles de s'infecter sont bien sûr celles qui fréquentent les gîtes à tsé-tsé, à savoir les travailleurs de la forêt, les pêcheurs mais également les jeunes enfants accompagnant leur mère ou ceux traversant une zone à risque chaque jour pour se rendre à l'école. Des touristes peuvent être concernés par l'infection au cours de leur voyage. A l'heure actuelle, le déplacement massif des populations pour des raisons politico-ethniques vers des zones endémiques, les conditions de précarité et l'absence d'assainissement augmentent le risque d'infection.

La transmission s'effectue toute l'année, même si elle semble favorisée en savane durant la saison sèche lorsque l'homme est obligé d'approcher plus fréquemment les cours d'eau. En forêt, les périodes dangereuses dépendent surtout de l'activité humaine et se situent aux moments des gros travaux telle que la mise en culture dans les rizières.

2.2. La maladie

2.2.1. Tableau clinique

Deux stades sont reconnus dans la maladie du sommeil : le stade hémolympatique qui correspond à la multiplication du parasite dans le sang, le système lymphatique et les organes puis le stade nerveux au cours duquel le système nerveux central est impliqué par passage des trypanosomes à travers la barrière hémato-méningée. Souvent le passage du stade I au stade II de la maladie se fait après une période relativement longue de quelques semaines à quelques mois avec *T. b. gambiense* alors que l'évolution en stade nerveux apparaît beaucoup plus rapidement lors d'infection à *T. b. rhodesiense*. Dans les deux cas, le passage d'un stade à l'autre n'est pas distinct et reste très difficile à identifier chez le patient (Dumas et Bisser, 1999).

2.2.1.1. Stade hémolympatique (stade I)

La piqûre de glossine est douloureuse et provoque une lésion locale, le chancre ou trypanome qui est plus fréquent dans les formes de la maladie d'évolution rapide comme celle à *T. b. rhodesiense* (Malvy et al, 2000). Le trypanome permettrait un diagnostic précoce de la maladie mais on ignore sa fréquence d'apparition et il est difficilement reconnaissable sur les peaux noires.

Les symptômes apparaissent de manière très variable entre 1 et 3 semaines après la piqûre infectante. Des épisodes de fièvre pouvant durer de 5 à 7 jours sont alors concomitants d'adénopathies généralisées. L'hypertrophie des nœuds lymphatiques, qui correspond à la phase de multiplication des parasites dans le système lymphatique, est caractéristique au niveau de la chaîne cervicale, où les parasites peuvent être mis en évidence après ponction du suc ganglionnaire. La fièvre évolue sous forme de pics élevés et correspond à l'envahissement de l'organisme par le parasite et aux phases de variations antigéniques mettant en jeu les mécanismes de défense naturels de l'hôte. Les premiers symptômes restent malgré tout non spécifiques : il s'agit de céphalées accompagnés d'arthralgie, de malaise, d'une perte de poids et d'une apathie (Apted, 1970).

Les atteintes organiques sont très variées et englobent le foie, la rate, le système cardiovasculaire, endocrinien et les yeux. Les dysfonctionnements systémiques associés sont alors diversifiés et peuvent donner lieu à des erreurs diagnostiques (Atouguia et Kennedy, 2000 ; Duggan et Hutchinson, 1966). Les anomalies cardiaques sont moins caractéristiques et ont été étudiées tardivement (Collomb et Burtholi, 1967 ; Bertrand et coll., 1973 ; Poltera et coll., 1976). Cependant, *T. b. rhodesiense* peut donner lieu à des atteintes cardiaques aiguës rapidement mortelles par arythmie et pancardite. *T. b. gambiense* peut provoquer une tachycardie persistante et dissociée de l'hyperthermie, des douleurs précordiales atypiques, des troubles du rythme auriculo-ventriculaire, un souffle, une chute de la tension artérielle ou des signes en faveur d'une myocardite ou d'une péricardite débutante.

2.2.1.2. Stade méningoencéphalique (stade II)

L'atteinte du système nerveux apparaît rapidement ou insidieusement sur plusieurs années. Encore une fois, les manifestations cliniques sont nombreuses et variées, sans signes pathognomoniques. Les principaux symptômes peuvent relever de troubles psychiatriques, moteurs, sensoriels ou du cycle circadien. Les perturbations mentales que l'on observe parfois

sont très subtiles et apparaissent sous la forme de lassitude, d'irritabilité, de céphalées, de changements apparents de la personnalité, de violence, d'hallucinations, de tendances suicidaires et de troubles maniaques (Atouguia et Kennedy, 2000 ; Duggan et Hutchinson, 1966).

Les troubles moteurs se manifestent par des tremblements, des fasciculations musculaires de la langue et des membres, une hypertonie avec syndrome pyramidal, des mouvements choréiformes et stéréotypés, une ataxie cérébelleuse, une paralysie radiculaire, une polynévrite ou une paralysie nerveuse isolée (Atouguia et Kennedy, 2000 ; Borremans et Van Bogaert, 1933).

Les troubles sensoriels peuvent se présenter sous la forme de prurit et d'une profonde hyperesthésie qui se traduit par le signe de la « clé de Kérandel », du nom de celui qui décrit sa propre maladie en 1910. Il s'agit d'une douleur profonde empêchant la réalisation de gestes simples tel que tourner la clé dans la serrure. Ce symptôme a été rapporté très fréquemment chez les européens (Kerandel, 1910 ; Duggan et Hutchinson, 1966).

Les perturbations du cycle veille-sommeil se traduisent d'abord par de la lassitude puis engendrent des épisodes répétés de somnolences diurnes et d'insomnies nocturnes. Les épisodes de sommeil, qui sont alors répétés sur tout le nyctémère, débutent par des phases de sommeil paradoxal alors que chez un Africain sain, le sommeil paradoxal survient après environ une heure de sommeil orthodoxe (Buguet et coll., 2004).

En l'absence de traitement, le stade final de la maladie se caractérise par des convulsions, un sommeil quasi-permanent, une double incontinence et une cachexie entraînant un coma et une mort inéluctable.

2.2.2. Physiopathologie

L'inoculation de trypanosomes à l'organisme hôte provoque d'abord une réaction immunitaire locale, le chancre, constitué d'une réaction oedémateuse avec infiltrat lymphocytaire et macrophagique et prolifération des cellules endothéliales et des fibroblastes. Puis les trypanosomes migrent dans les voies lymphatiques efférentes vers les ganglions lymphatiques locaux où ils se multiplient activement et sont ensuite libérés dans le sang circulant en même temps que les lymphocytes réactionnels à leur présence (Barry, 1984).

2.2.2.1. Neuropathogénèse

Le processus pathologique observé au cours du stade II de la maladie du sommeil correspond à une méningoencéphalite accompagnée d'une prolifération cellulaire dans les leptoméninges et d'une diffusion périvasculaire de macrophages et lymphocytes (Adams et coll. 1985 ; Atouguia et Kennedy, 2000). Les macrophages constituent un élément central dans l'initiation des mécanismes immunitaires induits au cours de la THA (Vincendeau et coll., 1999). On note dans le parenchyme cérébral la présence d'une activation astrocytaire et macrophagique adjacente et des vascularites. Les parasites semblent posséder à leur surface des molécules capables d'activer certaines cellules du système nerveux central. En effet, les VSG et leurs récepteurs membranaires les GPI sont des activateurs de macrophages (Paulnock et coll., 2002 ; Magez et coll., 1998). Une autre molécule parasitaire, le Trypanosome-derived Lymphocyte Triggering Factor (TLTF) active les CD8 qui produisent l'IFN- γ . Les CD4 et les cellules natural killer, activés lors de la réponse immunitaire, libèrent à leur tour l'IFN- γ . Les astrocytes sont également capables de s'activer au contact des parasites et libèrent des molécules inflammatoires (Sternberg, 1998 ; Olsson et coll., 1993 ; Bentivoglio et coll., 1994). Ainsi, l'arrivée du parasite dans le système nerveux déclenche une cascade d'activation parmi les cellules du système immunitaire et du système nerveux central de l'hôte.

Parallèlement, des cellules de Mott sont mises en évidence dans la substance blanche et correspondent à des cellules plasmiques modifiées contenant des inclusions éosinophiles remplies d'IgM. Ces cellules produisent des anticorps et des auto-anticorps responsables de l'amplification des phénomènes immunitaires et aussi des lésions myeliniques au cours de cette pathologie (Girard et coll., 2000).

Le rôle et les mécanismes d'induction des cytokines et chemokines sont encore imparfaitement connus dans cette pathologie (Mac Lean et coll., 2001). On note par exemple des taux d'IL-10, IL-6 et IL-8 élevés chez les patients infectés par *T. b. gambiense* en stade nerveux (Lejon et coll., 2002). En revanche, le taux d'IL-10 se trouve augmenté à la fois dans le sang et le LCR de patients en stade I et II de la maladie à *T. b. rhodesiense* et diminue après traitement.

Dans le LCR de patients en stade nerveux, on a également observé une élévation du TNF- α libre et des prostaglandines D2, ces dernières pouvant être corrélées à l'état de somnolence du stade avancé (Pentreath, 1995).

Cependant, il faut tenir compte du fait que ces paramètres biologiques sont soumis à des variations liées au cycle circadien et l'interprétation de leurs modifications n'est pas toujours aisée.

2.2.2.2. Immunopathologie

Le système immunitaire de l'organisme hôte est fortement sollicité au cours des infections à trypanosomes. Les lymphocytes interviennent de façon primordiale dans les réponses immunitaires. Ils expriment à leur surface membranaire des antigènes. Ceux-ci sont reconnus par des anticorps monoclonaux. Un groupe d'anticorps monoclonaux reconnaissant un antigène porté par les leucocytes permet de définir un cluster de différenciation (CD) et la détermination des sous-populations lymphocytaires.

Les lymphocytes B produisent les anticorps et expriment à leur surface plusieurs antigènes dont le CD19 et le CD20. Les lymphocytes T reconnaissent et détruisent les cellules infectées par un virus, activent les phagocytes et assistent les lymphocytes B dans leur production d'anticorps. Ils présentent tous à leur surface l'antigène CD3. Les lymphocytes T auxillaires ou helper (Th) produisent également des cytokines et la majorité exprime l'antigène CD4 à la surface membranaire. Les cellules Th1/Th2 sont de sous-populations de cellules T auxillaires distinguées en fonction du type de cytokines qu'elles produisent. Les cellules Th1 produisent de l'IFN- γ et de l'interleukine 2 (IL-2). Les cellules Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-10 et du TNF- α . Ces deux types de cellules participent également au développement des lymphocytes T cytotoxiques. Ces lymphocytes T cytotoxiques expriment majoritairement l'antigène CD8 et sont capables de détruire les cellules cibles infectées par des virus. Lors de leur activation, les lymphocytes T expriment des antigènes supplémentaires à leur surface, comme par exemple le CD25 qui correspond à la chaîne β du récepteur à l'IL-2. Il existe également des marqueurs phénotypiques des lymphocytes T naïfs, non stimulés par l'antigène, comme le CD45RA. En revanche, après contact avec un antigène, certains lymphocytes T expriment alors le phénotype des lymphocytes mémoires, le CD45RO.

Les cellules natural killer, ou NK, sont des cellules capables de détruire une grande variété de cellules cibles sensibilisées par un anticorps. Ce sont pour l'essentiel des cellules non-T et non-B, bien que certaines soient également des lymphocytes T (NK-T) et prolifèrent alors dans certaines pathologies. Les cellules NK expriment à leur surface les antigènes CD56 et CD16 mais il s'agit également des cellules qui expriment l'antigène CD8 mais pas le CD3.

L'ensemble des antigènes exprimés à la surface membranaire des lymphocytes sont utilisés pour la reconnaissance et le typage lymphocytaire par la technique de cytométrie en flux.

L'infection par les trypanosomes provoque chez l'hôte une réponse immunitaire qui comporte deux composantes. Une réaction T-indépendante apparaît suite à une forte activation des lymphocytes B qui produisent alors des anticorps en grande quantité, essentiellement des IgM non spécifiques. Certains de ces anticorps sont également dirigés contre des auto-antigènes et correspondent à l'activation non spécifique des lymphocytes B qui produisent naturellement des autoanticorps (Guilbert et coll., 1982).

Les anticorps dirigés contre les constituants variants des trypanosomes se lient à la surface membranaire des parasites et participent aux baisses de parasitémie observées au cours de l'infection. A ce moment, seuls les nouveaux variants antigéniques, qui sont alors présents à moins de 0,1 %, subsistent dans le sang et se multiplient pour former la vague de parasitémie suivante (Molyneux et coll., 1996).

L'activation spécifique des CD4 par la VSG a été montrée. Des T CD4 spécifiques de VSG ont été identifiés dans la cavité péritonéale de souris infectées. Ces réactions immunitaires conduisent à la production de cytokines de type Th1 (IFN- γ , IL-2) et Th2 (IL-4) et de TNF- α (Schleifer et coll., 1993). Une fois stimulées, ces cellules activent à leur tour les cellules cytotoxiques. Elles participent également au switch des immunoglobulines en phénotype IgG1, IgG2a et IgG3 (figure 7) (Schleifer et coll., 1993). Le TLTF aurait une action directe sur les lymphocytes T CD8, entraînant la synthèse d'IFN- γ .

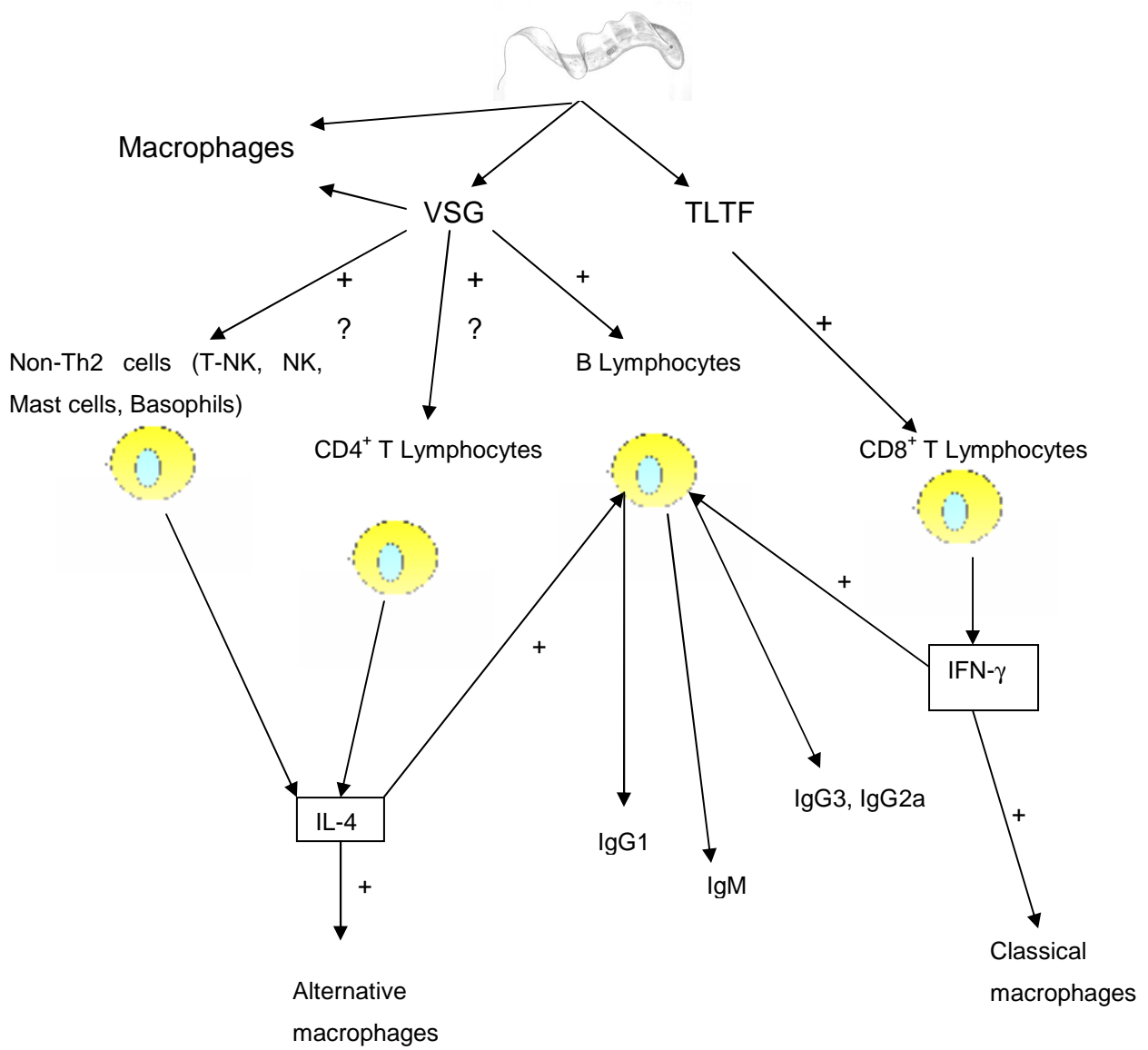


Figure 7: Activation des cellules du système immunitaire par des antigènes du trypanosome.

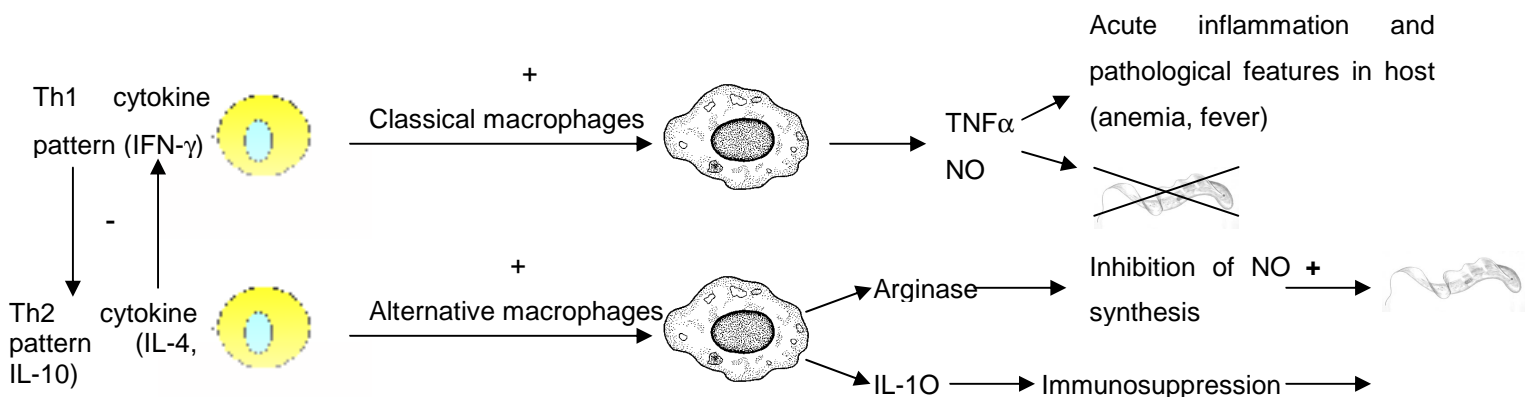


Figure 8: Activation des macrophages au cours de la trypanosomose africaine.

Sous l'action des VSG et de la réponse cellulaire induite, les macrophages produisent des prostaglandines, des cytokines pro-inflammatoires, du monoxyde d'azote (NO), du TNF- α et des espèces réactives de l'oxygène (superoxyde et peroxyde d'hydrogène), qui constituent des médiateurs de la pathologie observée (anémie, méningite) et de l'immunosuppression (Magez et coll., 1998). Deux types de macrophages, les classiques et les alternatifs sont en cause dans la réponse immunitaire (figure 8) (Namangala et coll., 2000; 2001). *In vitro* et chez la souris, le TNF- α présente à la fois une action trypanolytique et immunosuppressive pour l'hôte (Magez et coll., 1997). Il se lie aux résidus glucidiques de surface du parasite et présente une action toxique pour les lysosomes parasitaires. Au niveau des monocytes humains, les trypanosomoses et leurs composants (VSG) induisent également une forte synthèse de TNF- α (Daulouède et coll., 2001). Le NO est un radical libre impliqué dans la réponse inflammatoire par le biais des endotoxines, des cytokines ou encore des stress physiques ou chimiques (Vincendeau et coll., 1999). Une étude a démontré des taux de nitrates élevés dans le sang de patients infectés par *T. b. rhodesiense* se qui traduit une activation de la synthèse du NO (Sternberg, 1996). Chez la souris infectée expérimentalement, le NO et les prostaglandines produits par les macrophages pourraient jouer un rôle dans l'immunosuppression en agissant en synergie (Schleifer et coll., 1993). La L-arginine étant le substrat commun de la NO synthase (NOS) et de l'arginase, la régulation de la production de NO s'effectue également par l'arginase, qui consomme la L-arginine pour synthétiser la L-ornithine.

L'intervention des cytokines a été étudiée ces dernières années et a montré son importance dans le processus pathologique. Elles agissent comme des antagonistes de l'immunostimulation ou comme des cytokines pro-inflammatoires. L'IL-10, qui est produite au cours de l'infection, possède un pouvoir inhibiteur de la réponse Th1 et de l'activation des macrophages ou des monocytes (Moore et coll., 1993). L'équilibre entre les réponses de type Th1 et Th2 est alors perturbé et la synthèse de NO, d'IL-6, d'IL-12 et de TNF- α se trouve donc indirectement inhibée (Gazzienelli et coll., 1992). Bien que la réponse de type Th2 possède des effets bénéfiques dans la défense contre les agents infectieux, des taux élevés d'IL-10 peuvent réduire la réponse immunitaire et sont le signe d'une atteinte nerveuse avancée (Uzonna et coll., 1998). Ainsi, dans le cas de la THA, l'IL-10 agit comme un effecteur immuno-suppresseur (Uzonna et coll., 1998).

2.2.3. Le diagnostic

Un tableau clinique typique en zone d'endémie peut suffire à poser un diagnostic, cependant, le caractère non-spécifique des signes cliniques impose de réaliser le diagnostic différentiel avec d'autres infections comme le paludisme, la tuberculose, le sida, la leishmaniose, la toxoplasmose, la fièvre typhoïde, la syphilis et l'encéphalite virale (Atougua et coll., 2000). La recherche du parasite dans les liquides biologiques doit être effectuée avec une grande attention. De plus, le diagnostic de stade est déterminant pour le choix du traitement, qui sera forcément plus toxique et plus lourd à instaurer si une atteinte nerveuse a été mise en évidence.

2.2.3.1. Méthodes diagnostiques

2.2.3.1.1. Les techniques diagnostiques utilisables sur le terrain

Le diagnostic parasitologique direct

Sang et ganglions

Le diagnostic spécifique de la phase hémolympatique consiste à mettre les parasites en évidence dans le sang ou le suc ganglionnaire. Pour *T. b. gambiense*, ce diagnostic est plus difficile à faire étant donné que les parasitémies fluctuent au cours du temps et seuls des examens répétés permettent d'apporter la preuve parasitologique.

La ponction des nœuds lymphatiques hypertrophiés s'effectue facilement au niveau de la chaîne cervicale, après immobilisation du ganglion et prélèvement à l'aide d'une petite aiguille pour injection sous-cutanée. On dépose le contenu de l'aiguille sur une lame de verre que l'on recouvre d'une lamelle et le montage est observé au microscope (10X40).

L'examen du sang se fait par piqûre au bout du doigt ou prélèvement sur tube contenant un anticoagulant. L'observation peut se faire à partir d'une goutte de sang frais étalé entre lame et lamelle ou à partir d'un frottis coloré ou encore d'une goutte épaisse. L'examen de la goutte entre lame et lamelle se fait immédiatement mais peut être différé concernant le frottis et la goutte épaisse. On utilise ensuite un microscope (10X40) pour détecter la présence des parasites.

La sensibilité de ces techniques est cependant basse étant donné la faible quantité de sang qui peut être observée et le fait que les parasitémies sont souvent inférieures au seuil de détection qui est de 6000 trypanosomes/mL (Van Meirvenne et coll., 1989).

Ainsi, pour avoir une chance de détecter les parasites dans une quantité limitée de sang, il est souvent nécessaire de les concentrer. La technique de Woo utilise le principe de la centrifugation dans des tubes capillaires : 70 µL de sang sont placés dans un tube à hématocrite hépariné et fermé par de la plasticine ou à la chaleur d'une flamme. Après 2 minutes de centrifugation à 8500 tours/min dans une centrifugeuse à hématocrite, les tubes sont maintenus sur une lame recouverte de lamelle. L'interstice entre lame et lamelle est rempli par de l'eau et le montage est ainsi observé au microscope (10X10). Les parasites sont alors présents à la jonction entre les globules blancs et le plasma (Woo, 1970). Cette technique se révèle d'autant plus sensible que l'on multiplie les tubes pour un même patient. Ainsi, à partir de 3 à 4 tubes par personne, on obtient un seuil de détection de 600 trypanosomes/mL.

Une autre technique de concentration, la mini-colonne stérile échangeuse d'ions, trouve son utilité chez les patients pour lesquels le doute persiste malgré les résultats négatifs des examens précédemment décrits. Cette technique repose sur la différence de charge électrique entre la surface membranaire des trypanosomes et celle des éléments figurés du sang. L'utilisation d'une colonne de diéthylamino éthyl (DEAE)-cellulose permet de séparer de façon sélective les trypanosomes du sang par chromatographie ionique. L'éluant utilisé, un

tampon phosphate salin glucosé (PSG), est précisément ajusté à pH=8 afin de retenir les globules rouges et de laisser passer les parasites. L'éluat est récupéré dans un tube conique et centrifugé 5 minutes à 3000 trs/min afin de concentrer les trypanosomes. Le culot est ensuite observé entre lame et lamelle au microscope 10X40 (Lumsden et coll., 1979). Pour les faibles parasitémies, il est préférable de récupérer l'éluat dans une pipette Pasteur dont l'extrémité aura été au préalable obturée à la flamme et protégée par un cône de pipette. Après centrifugation (3000 trs/min, 5 min), la pipette est montée entre lame et lamelle, de l'eau complète l'intervalle entre les deux et l'extrémité de la pointe est observée au grossissement X10 du microscope.

LCR

L'observation des parasites après ponction lombaire peut se faire par observation directe au microscope, dans une cellule de comptage cellulaire. Vingt à trente μL de LCR sont nécessaires pour une observation au grossissement X40. La sensibilité de la technique n'est donc pas très élevée et il est indispensable de concentrer les parasites d'autant plus qu'ils se trouvent souvent en faible quantité dans le LCR. Pour cela, on utilise les techniques de centrifugation. La double centrifugation (2500 tours/min, 5 min, deux fois de suite) suivie de l'examen microscopique du culot augmente les chances d'observer des parasites d'autant plus que le volume de LCR examiné est important (2 mL au moins). La simple centrifugation modifiée consiste à centrifuger une seule fois le prélèvement dans une pipette Pasteur dont l'extrémité aura été au préalable obstruée à la flamme et protégée par une pointe en plastique. L'observation de l'extrémité de la pipette (10X40) après montage entre lame et lamelle permet de mettre en évidence les trypanosomes (Lejon et coll, 1998). Il est cependant fréquent de ne pas parvenir à observer les parasites dans le LCR lors d'atteinte nerveuse.

Outre l'examen direct parasitologique, l'observation du LCR au microscope permet de déterminer la cytorachie qui donne une indication du stade de la maladie sans pour autant être spécifique de la maladie du sommeil. De même, les analyses du LCR renseignent sur l'état inflammatoire du système nerveux central mais ne permettent pas de poser un diagnostic spécifique ni de déterminer précisément le stade de la maladie. Ainsi, lors de suspicion de trypanosomose ou afin de préciser le stade de la maladie chez un patient positif dans le sang, on peut avoir recours au dosage de la protéinorachie et des IgM dont le taux est anormalement élevé dans le LCR d'un patient trypanosomé. Il est ainsi possible de disposer d'un faisceau

d'argument en faveur d'un stade nerveux surtout dans les cas précoces où la clinique est pauvre et les arguments biologiques dissociés.

Le diagnostic indirect

Le dépistage a été considérablement amélioré avec la mise au point de tests immunologiques permettant le dépistage des anticorps fabriqués au cours de l'infection. La spécificité de ces tests est cependant remise en cause par la présence de réactions croisées et ne permet pas de se passer des analyses parasitologiques directes. La difficulté d'obtenir une bonne sensibilité réside dans le fait que ces tests reposent sur l'utilisation de très nombreux antigènes différents et sont difficiles à standardiser. Le test par agglutination directe (CATT/*T. b. gambiense*) est devenu le test de terrain le plus utilisé. Il est plus facilement reproductible car l'antigène utilisé est souvent le trypanosome entier (Magnus et coll., 1978). Il est réalisable en quelques minutes et facile d'utilisation, ce qui permet de dépister plusieurs centaines de personnes par jour. Il s'utilise avec du sang hépariné et sa sensibilité est de 75% à 100%. Dans 1% à 3% des cas, on observe des réactions faussement positives qui peuvent être diminuées en diluant le sérum au 1/5^{ème}. Ce test a été amélioré avec la mise au point d'un test au latex qui facilite son utilisation sur le terrain (Lejon et coll., 2002).

Le procyclic agglutination trypanosomiasis test (PATT) a été mis au point à partir de formes de *T. brucei* de culture. Il permet de réaliser le diagnostic de *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense* à partir de sérum.

Un test d'agglutination indirecte a été mis au point par Boné et Charlier en 1975. Il repose sur l'utilisation d'érythrocytes recouverts d'antigènes extraits de trypanosomes sous formes sanguines. Le test est commercialisé sous forme de tube capillaire ou de plaque et a déjà utilisé avec succès dans différents pays africains.

2.2.3.1.2. Méthodes de diagnostic utilisées en recherche

Culture

Les trypanosomes sont relativement faciles à cultiver, que ce soit par inoculation à l'animal ou par culture *in vitro*. Ces techniques ne sont pas adaptées à une utilisation sur le

terrain en raison du délai entre la mise en culture et la multiplication du parasite. Ces méthodes sont à réserver à des centres de référence comme test de confirmation.

La culture *in vitro* se réalise aisément à partir d'un prélèvement de sang frais prélevé sur anticoagulant. Un test récent d'isolation (kit for *in vitro* isolation, KIVI) a été mis au point. Le kit est composé de milieu de culture supplémenté par des antibiotiques, du polyanéthol sulfonate anti-coagulant anti-complément, des seringues et des aiguilles. Le sang collecté stérilement est mis en culture avec les solutions fournies et incubé à 25°C dans l'obscurité. Dans ces conditions, les formes sanguines de trypanosomes se transforment en formes procycliques. Un échantillon est prélevé aseptiquement du flacon et examiné deux fois par semaine pendant 4 semaines pour mettre en évidence la présence de trypanosomes. Ce kit convient au diagnostic de *T. b. gambiense* et sa sensibilité est très élevée (Truc et coll., 1992; MacNamara et coll., 1995 ; Truc et coll., 1994).

Le diagnostic *in vivo* se fait sur souris de laboratoire après inoculation par voie intrapéritonéale de 300 µL de sang prélevé sur tube hépariné. On surveille ensuite tous les deux jours la survenue d'une parasitémie chez la souris par observation entre lame et lamelle (microscope 10X40) d'une goutte de sang prélevée au bout de la queue. La multiplication de *T. b. rhodesiense* chez la souris se fait facilement et les parasites apparaissent en grande quantité dans le sang dès le 3^{ème} jour post-inoculation. Pour certaines souches de *T. b. gambiense*, les parasitémies faibles et transitoires imposent d'avoir recours à un traitement immunosuppresseur chez la souris avant inoculation.

Tests immunologiques

Des tests ELISA ont été développés et reposent soit sur la détection d'antigènes soit sur celle des anticorps produits par l'hôte (Liu et coll, 1989; Olako-Mukani, 1994 ; Nantulya 1992). Cependant, ils nécessitent du matériel spécialisé et les résultats obtenus sont contradictoires et peu reproductibles.

Le diagnostic immunologique par fluorescence est possible à partir de lames recouvertes d'antigènes de trypanosomes. Le sérum à tester est déposé sur la lame, incubé avec un anticorps anti-IgG humain couplé au fluorochrome isothiocyanate de fluorescéine

(FITC). Après 20 à 30 minutes, les lames peuvent être lues grâce à un microscope à épifluorescence (10X40). Les antigènes utilisés sont préparés à partir de *T. brucei* cultivés sur rats ou souris. On utilise les antigènes variants les plus fréquents chez *T. b. gambiense* mais leur diversité diminue la sensibilité du test. Il conviendrait de mettre au point un test à base d'antigènes invariants retrouvés à la fois chez *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* (Vervoot et coll., 1983 ; Magnus et coll., 1978).

Détection des acides nucléiques

La détection d'acide nucléique est une technique moléculaire sensible et spécifique en théorie. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a montré son intérêt dans le diagnostic de la maladie du sommeil (Penchenier et coll., 1996) mais la difficulté d'identifier les sous-espèces réside dans leur similitude moléculaire. Cependant, des amorces ont été mises au point récemment pour mettre en évidence à partir de sang total humain ou animal la présence de *T. b. gambiense* de façon relativement spécifique et sensible. Cette amorce reconnaît une séquence codant pour une glycoprotéine spécifique de *T. b. gambiense* (Radwanska et coll., 2002).

Récemment, le gène conférant à *T. b. rhodesiense* la résistance au sérum humain a été recherché chez des parasites présents chez l'homme, les animaux et les vecteurs. Ce gène a été mis en évidence uniquement chez les espèces de parasites infectantes pour l'homme et permettrait alors de différencier *T. b. rhodesiense* et *T. b. brucei* (Njiru et coll., 2004).

2.2.3.2. Critères de diagnostic du stade de la maladie

Ces critères diagnostiques sont déterminants pour le choix du traitement. Ils permettent d'adapter le traitement le plus efficace et le moins toxique possible en accord avec l'état d'avancement de la maladie. Actuellement, les critères appliqués sur le terrain sont ceux préconisés par l'OMS (présence de trypanosomes dans le système lymphatico-sanguin et cytorachie > 5 cellules/ μ L ou protéinorachie > 450 mg/L). Ils sont peu spécifiques et fortement controversés car la cytorachie seuil par exemple correspond également au seuil de détection des chambres de lecture utilisées. Certains cas discordants et notamment au début de l'invasion nerveuse ne trouvent ainsi pas leur place dans l'arbre décisionnel actuel et le choix

du traitement n'est probablement pas adapté. Il est primordial de trouver des critères plus adaptés notamment pour ces cas discordants.

Lorsqu'un patient s'est révélé être positif au test CATT à la dilution 1/8 ème (qui est la dilution réalisée en pratique), avec mise en évidence des parasites dans le sang, une ponction lombaire est systématiquement pratiquée afin de préciser le stade de la maladie. Pour cela, les marqueurs recherchés sont la cytorachie, la protéinorachie et la présence de trypanosomes dans le LCR. Si le parasite est observé, le patient est systématiquement classé en stade II. Cette découverte étant cependant aléatoire, il est recommandé de se baser sur la cytorachie et la protéinorachie en cas de résultat parasitologique négatif. Une cytorachie supérieure à 5 cellules/ μ L ou une protéinorachie supérieure à 450 mg/L augmentent les suspicions d'atteinte nerveuse mais ces critères portent à discussion. Ce sont cependant les seuls disponibles de nos jours pour déterminer le choix thérapeutique. La tendance actuelle est de porter le seuil à 10 cellules/ μ L dans les campagnes de dépistage (Simarro et coll, 2004, sous presse).

Préconisé par Mattern et coll. en 1980, le dosage des IgM, a été récemment proposé à nouveau dans la détermination du stade et un test d'agglutination au latex est actuellement disponible pour le terrain, bien que le seuil de positivité reste à être déterminé par des études multicentriques (Lejon et coll., 1998 ; Bisser et coll., 1997). On considère une atteinte nerveuse si le taux d'IgM dépasse 100 mg/L de LCR ou s'il représente plus de 10 % de la protéinorachie (Greenwood et coll, 1973 ; Oudard et coll., 1976 ; Itazi, 1983).

2.2.4. Le traitement

Les traitements utilisés de nos jours n'ont pas évolué depuis plusieurs décennies (Bouteille et coll., 2003). Leur emploi n'est pas facile car il s'agit de traitements de longue durée qui nécessitent une surveillance continue du patient. De plus, ils ne sont pas dénués de toxicité qui donne lieu à des effets secondaires de gravité diverse. Ainsi, la mise sous traitement spécifique d'un patient atteint de trypanosomose nécessite d'effectuer un bilan afin de s'assurer qu'il supportera le traitement, de lui apporter un support nutritionnel et vitaminique ainsi qu'une surveillance précise afin de rechercher tout signe de complication. Le traitement ne peut s'effectuer qu'en milieu hospitalier en présence de personnel compétent disposant de l'équipement approprié. On dispose de plusieurs molécules thérapeutiques dont le choix se fait selon l'état d'avancement de la maladie qui est déterminé par le résultat des

examens cliniques et biologiques. En effet, les molécules actives sur les trypanosomes sont classées en deux groupes selon leur capacité à atteindre le système nerveux central par passage de la barrière hémato-méningée. Il est donc facile de comprendre que le traitement actuel de la maladie du sommeil dépend entièrement des critères diagnostiques disponibles (tableau 1 page 50).

2.2.4.1. Traitement de la phase hémolympatique (stade I)

Au stade I de la maladie, la suramine et la pentamidine sont les principaux produits utilisés. On peut également les utiliser en stade II en association avec les molécules spécifiques de la phase nerveuse.

La pentamidine, commercialisée sous le nom de Pentacarinat[®] (Rhône-Poulenc, France), est une diamidine aromatique commercialisée depuis 1937, qui inhibe la synthèse des polyamines. Le mode d'action trypanocide de la pentamidine est encore mal élucidé.

La posologie est de 4 mg/kg/jour soit en injection intra-musculaire profonde après dilution du produit, soit par voie intra-veineuse, en perfusion lente dans du sérum glucosé ou physiologique. L'administration se fait tous les deux jours. La cure complète est de 10 injections.

La concentration plasmatique maximale se fait en 1 heure. L'élimination est très lente en raison d'une grande affinité de la molécule pour les tissus. De plus, 70 % à 80 % des molécules s'attachent aux protéines plasmatiques. L'élimination peut aller de 7 à 48 jours après une injection intra-veineuse et 11 % du produit sont évacués par voie rénale.

La pentamidine ne passe pas la barrière hémato-méningée et est donc réservée à la phase I de la maladie. Cependant, une étude a montré son efficacité chez des patients en stade II et certaines équipes ont proposé d'instaurer ce traitement pour les stades précoces de la phase nerveuse (Doua F et coll., 1996). Toutefois, ces résultats ont été controversés et restent à être réévalués plus précisément sur le terrain (Lejon et coll., 2003a).

Outre son caractère douloureux lors de l'injection intra-musculaire, la pentamidine possède de nombreux effets secondaires: généralement, on observe une hypotension, des douleurs abdominales et/ou thoraciques, une hypersalivation, des vertiges et des nausées. La

pentamidine occasionne une néphrotoxicité modérée et réversible, une hypoglycémie et plus rarement, une hyperglycémie voire un diabète quelques mois après le traitement. En général, les effets secondaires s'arrêtent une semaine après la fin du traitement mais peuvent être atténués par l'emploi d'un traitement symptomatique concomitant.

La suramine, sous forme sodique (Germanin[®], commercialisée par Bayer) est la deuxième molécule de choix pour la phase lymphatico-sanguine de la maladie du sommeil. Elle agit sur la glycolyse des trypanosomes, qui est indispensable à la survie des parasites. Cependant, des effets secondaires peuvent apparaître rapidement après la première administration qui doit être suivie d'une surveillance accrue afin de déceler éventuellement des nausées, vomissements, urticaires, choc et troubles de la conscience. Ainsi, le traitement démarre toujours par une dose d'essai de 5 mg/kg le premier jour, suivie d'injections de 20 mg/kg les jours 5, 11, 23 et 30. Des effets secondaires tardifs peuvent se manifester en cours de traitement (vomissements, prurit, urticaire, hyperesthésie, paresthésie, photophobie, larmoiement, atrophie optique) ou bien après le traitement (troubles rénaux, stomatites, dermatoses, agranulocytose, anémie hémolytique avec ictère). La suramine étant un macrofilaricide, elle est surtout prescrite dans le stade I des infections à *T. b. rhodesiense*, en raison du risque de choc dans les zones d'endémie à *T. b. gambiense* où sévit également *Onchocerca volvulus*.

2.2.4.2. Le traitement de la phase méningo-encéphalique (stade II)

Le mélarsoprol ou MelB contenu dans l'Arsobal[®] (Aventis, France) a été introduit dans la thérapie de la maladie du sommeil en 1947 par Friedheim et demeure encore actuellement le traitement de référence de la phase nerveuse. Il s'agit d'un dérivé arsenical qui agit en fin de synthèse des polyamines du parasite, sur la trypanothione réductase. Cette enzyme joue un rôle important dans les défenses anti-oxydatives et dans le maintien de l'environnement réducteur. Les molécules oxydatives sont en effet fatales pour les trypanosomes. Il agit également sur la glycolyse en inhibant la pyruvate kinase. Cette molécule est capable de traverser la barrière hémato-méningée.

Le protocole thérapeutique s'effectue par séries de 3 à 4 injections selon le nombre de cellules présentes dans le LCR. La posologie maximale est de 3,6 mg/kg/jour à atteindre de manière progressive en trois jours, sans dépasser la dose totale de 180 mg/jour. La durée du

traitement varie de 20 à 40 jours selon le stade de la maladie et l'état clinique du patient. Elle peut atteindre 45 à 60 jours pour les cas de rechute ou les grabataires.

La concentration plasmatique du mélarsoprol atteint 2 à 4 mg/mL 24h après l'injection et se trouve encore à plus de 0,1 mg/mL au bout de 120 h. Dans le LCR sa concentration varie d'un individu à l'autre avec un maximum à 260 ng/mL et un minimum en dessous du seuil de détection. Le mélarsoprol est peu éliminé par les urines (environ 20 % de la dose injectée) et les matières fécales. Six jours après la dernière injection, seulement 85 % du mélarsoprol est éliminé. Aussi pour prévenir cette accumulation dans le corps, les cures ne doivent pas excéder trois ou quatre injections et une dose maximale admissible a été déterminée.

Actuellement, l'OMS préconise un nouveau protocole basé sur les résultats d'un modèle pharmacocinétique à raison de 2,2 mg/kg/jour durant dix jours (Burri et coll., 2000). Ce schéma a l'avantage de réduire la durée d'hospitalisation, le coût et le dosage du traitement cependant la toxicité innérente du produit n'est pas modifiée (Schmid et coll., 2004).

En effet, le mélarsoprol est pourvu d'une grande toxicité qui se manifeste sous sa forme la plus grave par une encéphalopathie qui survient chez 5 à 10 % des malades traités et se révèle mortelle dans 10 à 50 % de ces cas. L'intérêt de l'adjonction d'une corticothérapie est discuté. D'autres effets secondaires peuvent survenir sous forme de fièvres isolées, de phlébites au point d'injection lié à la toxicité directe du solvant de ce produit (le propylène glycol).

A part la toxicité innérente à ce produit, des résistances se développent dans plusieurs régions d'Afrique Centrale allant jusqu'à des taux de 25 -30 % dans certaines régions en Angola.

Nous ne disposons actuellement que d'une alternative thérapeutique, le DFMO. Le maintien actuel de ce médicament a été possible grâce à un don d'Aventis pour les années 2001-2006. Le DFMO ou 2 - (difluorométhyl) - DL - ornithine monochlorhydrate est commercialisé sous le nom d'Ornidyl[®] par Aventis Pharma (France) et son utilisation initiale était indiquée pour les affections néoplasiques. Le DFMO est un inhibiteur irréversible de l'ornithine décarboxylase, enzyme clé de la biosynthèse des polyamines nécessaires à la croissance des cellules. Il agit donc comme cytostatique, c'est-à-dire en bloquant les enzymes essentielles à la prolifération des trypanosomes. Le DFMO entraîne une forte baisse de la

synthèse de macromolécules, y compris celles des antigènes variants de surface. Rendus incapables de synthétiser de nouveaux variants antigéniques, les trypanosomes sont détruits. De plus, le DFMO favoriserait l'action du mélarsoprol et pourrait donc être utilisé en synergie avec celui-ci.

Il ne s'utilise que sous forme injectable à la posologie de 400 mg/kg/24heures à répartir toutes les 6 heures, pendant 14 jours. Chez l'enfant, le produit s'élimine plus rapidement et la dose est alors calculée en fonction de la surface corporelle sur la base de 4 g/m². Le produit s'administre par perfusion lente d'au minimum 45 minutes. En cas de troubles rénaux, il convient d'ajuster les doses pour compenser la diminution de l'excrétion rénale.

Des effets secondaires peuvent apparaître sous forme de diarrhées, anémies ou troubles neurologiques.

Après administration intra-veineuse, l'élimination du DFMO est très rapide, dont 80 % sous forme inchangée dans les urines. La demi-vie d'élimination plasmatique est de 3 heures.

Des résistances au DFMO sont récemment apparues chez *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* présente une résistance innée à ce produit (Iten et coll., 1995).

Dans quelques rares cas réfractaires au mélarsoprol, l'emploi du nifurtimox (Lampit®, Bayer) s'est révélé efficace bien que toxique (Van Nieuwenhowe et coll., 1992 ; Pépin et coll., 1992). Cette molécule utilisée dans le traitement de la maladie de Chagas ne dispose pas de l'AMM pour le traitement des trypanosomoses africaines. Il s'agit d'un nitrofurane qui se prend par voie orale. Il agirait en créant un stress oxydatif chez les parasites, par production d'anion superoxide et de radicaux libres. Les conséquences de ce stress entraîneraient de graves dommages sur les membranes lipidiques, les protéines et les acides nucléiques. Les posologies varient selon les centres de traitement de 15 à 20 mg/kg en 3 doses pendant 30 à 60 jours. Il est à l'origine d'hémolyses médicamenteuses chez les personnes atteintes de drépanocytose et/ou déficientes en glucose 6-phosphate déshydrogénase. Le médicament présente également des effets toxiques sous forme d'anorexie, de vomissements et de troubles neurologiques.

Produit	Dénomination commerciale	Classe moléculaire	Indication	Mécanismes d'action	Posologies	Effets secondaires Toxicité
Suramine	Germanin®	Naphtylamine polysulphonate	Phase I <i>T.b. gambiense</i> <i>T.b. rhodesiense</i>	Inhibition des enzymes de la glycolyse	5mg/kg jour 1 10mg/kg jour 3 20mg/kg jours 5, 11, 23, 30 IV lente	Nausées, vomissements, choc, paresthésie, troubles rénaux, modifications hématologiques
Pentamidine	Pentacarinat® Aventis	Diamidine aromatique	Phase I <i>T.b. gambiense</i>	Inhibition de la synthèse des polyamines	4mg/kg/jour, IM profonde ou IV, tous les 2 jours, 20 jours	Douleurs abdominales, vertiges, nausées
Mélarsoprol	Arsobal® Sedapharm	Dérivé arsenical	Phase II <i>T.b. gambiense</i> <i>T.b. rhodesiense</i>	Inhibition trypanothione reductase et pyruvate kinase	3,6mg/kg/j maxi, en 3-4 séries de 3-4 injections séparées par 10 jours de repos IV lente	Encéphalopathie mortelle, Fièvres isolées, phlébite, réaction cutanée
DFMO (2 – (difluorométhyl) - DL - ornithine monohydrochloride monohydrate)	Ornidyl® Aventis	Analogue de l'ornithine	Phase II Rechutes <i>T.b. gambiense</i>	Inhibition de l'ornithine décarboxylase	400mg/kg/24 heures, 14 jours IV lente 4g/m2 chez l'enfant	Diarrhées, anémies, troubles neurologiques
Nifurtimox	Lampit® Bayer	Nitrofurane	Phase II Rechutes <i>T.b. gambiense</i> <i>T.b. rhodesiense?</i>	Production de stress oxydatif chez le parasite par ion superoxide (O ₂ ⁻) et radicaux libres	15 à 20mg/kg 14 jours voie orale	Anorexie, vomissements, troubles neurologiques

Tableau 1 : Les traitements de la THA

2.2.4.3. Molécules en développement

Actuellement, deux molécules sont en cours d'investigations afin de développer leurs propriétés trypanocides sur le marché médicamenteux, humain ou vétérinaire.

Le DB 289, un dérivé diaminé, est en cours de développement dans le traitement des infections à *Pneumocystis carinii*. Il s'agit d'une prodrogue d'un métabolite actif qui peut s'administrer oralement. Une bonne activité sur les trypanosomes africains a été mise en évidence à la fois *in vitro* et sur différents modèles animaux en stade I de la maladie. Les essais cliniques de phase I se sont achevés récemment et n'ont montré aucun effet secondaire. Les essais de phase II ont démarré en Angola et en République Démocratique du Congo. Des composés dérivés de la même famille sont en cours d'étude dans le traitement de la phase nerveuse (Sturk et coll., 2004).

Le mégazol est un nitro-imidazolé synthétisé en 1968 et dont l'efficacité a été étudiée sur *T. cruzi* (Filardi et Brener, 1982). Puis, son action trypanocide a été prouvée d'abord *in vitro* sur différentes souches de trypanosomes puis *in vivo*, chez la souris et le singe (Bouteille et coll., 1995 ; Enanga et coll., 2000). Son administration combinée à la suramine a permis une guérison dans un modèle murin d'infection chronique en stade nerveux de la maladie (Enanga et coll., 1998). Sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique et sa bonne tolérance chez l'animal en a fait un composé prometteur dans la recherche de trypanocides et nous a amené à étudier plus profondément ses propriétés thérapeutiques et pharmacologiques (Enanga et coll., 2000). Malheureusement, l'étude de sa toxicité a révélé un pouvoir mutagène (test d'Ames positif et test des micronuclei) qui a bloqué son développement (Poli et coll., 2002 ; Nessler et coll., 2004) en thérapeutique humaine. Il reste un candidat potentiel en médecine vétérinaire.

Ainsi, un traitement trypanocide idéal doit répondre à plusieurs exigences simultanées: être actif en phase nerveuse, peu toxique, facile d'utilisation sur une courte durée et de faible coût. Comme il est difficile de mettre rapidement sur le marché une nouvelle molécule alliant ces caractéristiques, les stratégies actuelles visent à rationaliser les traitements pour les rendre plus efficaces et moins toxiques en faisant varier la durée, les doses et les modes d'administration. Les combinaisons de trypanocides existant déjà sur le marché répondraient également aux critères d'efficacité et d'innocuité recherchés actuellement.

2.2.4.4. Coût des traitements

Actuellement, il est difficile d'apprécier le coût des traitements spécifiques contre la maladie du sommeil depuis que la fondation Aventis s'est engagée à une donation de Pentamidine, Arsobal et Eflornithine pour 5 ans (2001 à 2006). Grâce à cette donation, le DFMO est maintenant souvent utilisé en première intention dans les centres de soin ou chez les personnes venant d'une zone géographique où des résistances au mélarsoprol ont été décrites. Auparavant, le DFMO était rarement employé, étant donné que le traitement complet d'un homme de 60 kg nécessite 34 flacons et s'élevait alors à 2040 US dollars.

3. La maladie chez l'animal

3.1. Epidémiologie

3.1.1. Importance de la maladie

3.1.1.1. Importance économique

Les trypanosomoses animales existent sur tous les continents. En Afrique subsaharienne, elles représentent la première maladie à transmission vectorielle chez le bétail et constituent encore de nos jours un obstacle majeur au développement de l'élevage dans cette région. L'Afrique compte plus de 200 millions de bovins dont environ un quart se situe dans les régions infestées de glossines (FAO, 1997). Le déficit annuel de productivité représente 1 million de tonnes de viande et 1,6 million de tonnes de lait. En l'absence de glossines, le cheptel bovin pourrait être accru de 33 millions de têtes. Les pertes directes par mortalité sont aggravées par les pertes indirectes dues à l'amaigrissement, la morbidité et les problèmes de reproduction souvent difficiles à quantifier (avortement, stérilité, augmentation de l'intervalle entre deux vêlages). Selon la Banque Mondiale, les pertes de revenus en agriculture varient entre 800 et 1600 millions de dollars US en fonction du degré d'impact des trypanosomoses. D'autre part, ces pertes sous-entendent une réduction des protéines alimentaires disponibles pour l'homme et la diminution de l'indépendance économique pour les Etats concernés.

3.1.1.2. Importance zoonotique

Les différentes espèces de trypanosomes ont en général une spécificité d'hôtes. Ainsi, les espèces infectantes pour les animaux ne sont pas sensées être pathogènes pour l'homme. Or, le concept de réservoir et de porteurs sains parmi les animaux est bien connu pour cette maladie. Il s'agit d'animaux capables d'héberger les trypanosomes pathogènes de l'homme (*T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*) sans développer cliniquement la maladie. Ils constituent ainsi une source de contamination pour les tsé-tsé et s'intègrent dans le cycle de transmission

de l'homme. Ils sont d'autant plus dangereux qu'ils ne présentent aucun signe apparent de la maladie et ne sont donc ni diagnostiqués ni traités.

D'autre part, il a été mis en évidence des phénotypes de *T. congolense* résistants au sérum humain normal (Joshua, 1989). De plus, une infection mixte à *T. brucei* spp et à *T. congolense* a été identifiée chez un patient de Côte d'Ivoire (Truc et coll., 1998). Ainsi, selon une étude récente le groupe de *T. congolense* a été classé en trois phénotypes selon le degré de résistance au sérum humain : un groupe complètement résistant comme *T. brucei gambiense* et les souches résistantes de *T. b. rhodesiense*, un groupe relativement sensible comme les souches sensibles de *T. b. rhodesiense* et un groupe sensible au sérum humain normal comme *T. vivax* ou *T. evansi*. Ainsi, certaines sous-espèces de *T. congolense* pourraient provoquer une infection chez l'homme ou au moins être responsables d'une surinfection opportuniste lors d'une infection mixte à *T. brucei* spp (Van Xong et coll., 2002).

Ceci explique pourquoi les trypanosomoses africaines ont été classées parmi les affections zoonotiques. Cependant, peu d'études sont faites pour déterminer la part des infections humaines contractées à partir des animaux et les données disponibles sont rares et parcellaires (Coker et coll., 2000). Le cycle parasitaire serait favorisé par les animaux domestiques vivant au contact des habitations et des biotopes des tsé-tsé (Kalu et coll., 1996 ; Molyneux, 1998).

3.1.2. Les espèces de trypanosomes de l'animal

Chez l'animal, on distingue classiquement plusieurs espèces de trypanosomes.

Les trypanosomoses africaines, regroupées sous le terme de Nagana affectent diverses espèces de mammifères. Elles sont dues à *T. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense* (pour lequel existent trois sous-types : savannah, forest et kilifi), *T. uniforme*, *T. simiae* et *T. godfreyi*. *Trypanosoma suis* est désormais considéré comme un sous-groupe de *T. simiae* (Gibson et coll., 2001).

Le surra, trypanosomose des camélidés et des équidés est due à *T. evansi*.

Trypanosoma equiperdum est responsable de la dourine ou trypanosomose équine contagieuse. Elle est décrite également sur le continent européen.

La répartition géographique des trypanosomes diffère selon la sous-espèce. Ainsi, *T. congolense* et *T. brucei* ssp sont limités à l'Afrique sub-saharienne, zone de distribution des glossines.

Trypanosoma theileri se retrouve dans différentes régions du monde entier, essentiellement en Afrique de l'Est et au Moyen-Orient, mais aussi en Europe et dans le sud des Etats-Unis.

Trypanosoma evansi sévit en Afrique Noire, en Afrique du Nord, au Proche Orient, au Moyen Orient, en Asie Centrale, en Asie Orientale jusqu'aux Philippines, en Amérique du Sud.

Trypanosoma vivax sévit en Afrique dans et hors des zones à glossines, en Amérique Centrale et en Amérique du Sud.

3.1.3. Les espèces-hôtes

De nombreuses espèces de vertébrés sont concernées par les trypanosomes. Les ruminants (bovins, ovins, caprins, camelins) domestiques et sauvages sont réceptifs à *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei brucei*, *T. evansi*. Les porcins en revanche, sont peu sensibles à *T. brucei*, *T. vivax* et *T. congolense* alors que *T. simiae* en Afrique tropicale et *T. suis* en Afrique orientale sont très pathogènes. Les carnivores sont quant à eux sensibles à *T. brucei* et *T. congolense*. *Trypanosoma theileri* infecte principalement le bétail, pour lequel il n'est pas pathogène, et plus particulièrement les bovins.

En principe, les espèces affectant les animaux ne sont pas capables de provoquer une maladie chez l'homme et certains primates non-humains. Ainsi, le singe, tout comme l'homme, se trouve être réfractaire à *T. brucei brucei*, *T. vivax* et à la plupart des sous-espèces de *T. congolense*. Certains primates sont sensibles à *T. brucei gambiense* (Afrique occidentale) et *T. brucei rhodesiense* (Afrique orientale) (tableau 2).

Espèces de trypanosomes	Espèces hôtes	Répartition géographique
<i>T. congolense</i>	Bovins, ovins, caprins, camelins, carnivores	Afrique sub-saharienne
<i>T. vivax</i>	Bovins, ovins, caprins, camelins	Afrique, Amérique centrale, Amérique du sud
<i>T. brucei brucei</i>	Bovins, ovins, caprins, camelins, carnivores	Afrique sub-saharienne
<i>T. evansi</i>	Bovins, ovins, caprins, camelins	Afrique noire, Afrique du nord, Proche orient, Moyent orient, Asie centrale, Asie orientale, Amérique du sud
<i>T. equiperdum</i>	Equins	Afrique, Europe
<i>T. simiae</i>	Porcins	Afrique
<i>T. theileri</i>	Bovins	Afrique de l'est, Moyent-orient, Europe, sud des Etats-Unis

Tableau 2 : Répartition géographique des espèces de trypanosomes des animaux.

3.1.4. Modalités de transmission

Les parasites sont transmis par divers insectes hématophages. Il s'agit souvent de vecteurs biologiques et le parasite effectue dans ce cas un cycle évolutif plus ou moins complexe dans l'insecte avant d'être transmis. La transmission peut se faire de façon mécanique: la transmission est alors passive au cours de repas sanguins multiples et rapprochés, le parasite étant transporté sur les pièces buccales souillées de l'insecte.

De multiples insectes hématophages peuvent jouer le rôle d'hôtes vicariants. Les plus importants sont les tabanidés et les stomoxes. Ainsi, il a été mis en évidence expérimentalement que *T. vivax* et *T. congolense* peuvent être tous deux transmis mécaniquement par des tabanidés africains, *Atylotus fuscipes* et *Atylotus agrotus* respectivement (Desquennes et coll., 2004). *Trypanosoma evansi* est quant à lui transmis de façon exclusivement mécanique par des tabanidés ou des stomoxes (Gardiner, 1989). *Trypanosoma theileri* se transmet également par les glossines et par des tabanidés tels que *Haematopota pluvialis*, *Haematopota italica*, *Hybomitra micans* et *Tabanus bromius*.

Seules les glossines (ou mouches tsé-tsé) sont des vecteurs biologiques. Les trypanosomes se multiplient et connaissent des phases de maturation à l'intérieur de différents organes de l'insecte. Les cycles diffèrent selon les espèces de trypanosomes. *T. b. brucei* et *T. suis* suivent le même parcours que *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* : jabot, œsophage, intestin où ils deviennent procycliques, puis glandes salivaires où ils redeviennent

métacycliques infectants. *Trypanosoma vivax* s'attache à l'intérieur de la cavité du proboscis, entre labre et labium, où il se multiplie; les formes infectantes pourront aussi se retrouver dans l'hypopharynx. *Trypanosoma congolense* et *T. simiae* se développent dans l'intestin moyen puis migrent vers le proventricule et l'œsophage en direction du proboscis. Ils se fixent à la paroi et s'y multiplient et les formes infectantes métacycliques migreront vers l'hypopharynx. La durée totale du cycle chez la glossine est de 5 à 10 jours pour *T. vivax*, 18 jours pour *T. congolense* et 30 jours pour *T. b. brucei* (Itard, 1980).

D'autres voies de transmission sont possibles : par morsure de chiroptères pour *T. evansi*, par voie oro-digestive en ce qui concerne *T. evansi* et *T. brucei* et par voie sexuelle uniquement pour *T. equiperdum*.

Tout comme chez l'homme, les animaux domestiques et sauvages s'infectent dans les lieux de vie des tsé-tsé, ombragés et humides. Il s'agit principalement des cours d'eau lors de l'abreuvement et dans les galeries forestières aux moments les plus ensoleillés de la journée. La transmission se fait toute l'année surtout quand les animaux vivent en troupeau au contact de l'homme et entretiennent ainsi le cycle de transmission. Une étude récente a démontré un fait souvent observé sur le terrain : les mouches tsé-tsé se nourrissent préférentiellement sur le bétail infecté par *T. congolense* et moins sur le bétail infecté par *T. vivax* ou non infecté. Ce phénomène reste encore inexpliqué bien que les effets de l'infection sur la vasodilatation cutanée soit suspectée (Moloo, 2000). Les mouches sont capables de transmettre des infections mixtes à *T. congolense* / *T. b. brucei* après s'être nourries sur animal doublement infecté. Leur capacité à véhiculer les deux espèces de parasites dépend surtout de leur susceptibilité aux trypanosomes, étant donné qu'une mouche réfractaire à *T. congolense* est également réfractaire à *T. b. brucei* (Van Den Bossche, 2004).

3.2. Le tableau clinique

Les symptômes apparaissent après une incubation variable d'une à quelques semaines. La trypanosomose se manifeste en deux temps : la première phase se caractérise par des poussées fébriles séparées par des périodes d'apyrexie, des altérations sanguines avec notamment une anémie, de la splénomégalie, des polyadénites inguinale, préscapulaire et précurrale. L'anémie apparaît dans les 2 à 3 semaines suivant la piqûre infectante ; elle est reflétée par la chute du taux d'hémoglobine en même temps que celle du nombre de globules

rouges et de l'hématocrite. Dans la seconde phase de la maladie, lorsque le parasite peut être détecté dans le LCR, la maladie évolue vers un tableau d'encéphalomyélite, avec des troubles nerveux de type parésie des membres postérieurs, pica, hyperesthésie, somnolence, coma. Les animaux meurent dans un tableau de cachexie terminale.

La maladie évolue sous forme de crises, correspondant aux phases de parasitémie. Elle revêt différentes formes : suraiguë avec issue fatale en moins d'une semaine, aiguë se manifestant par des accès de 3 à 6 jours, des périodes de rémissions de 6 à 8 jours et une issue fatale en 2 mois, et chronique sous forme d'accès légers suivis de longues périodes de rémission et une issue fatale en plusieurs mois. Dans les formes chroniques, les troubles endocriniens influent sur les caractères de la reproduction et l'atteinte cardiaque, sous forme d'une myocardite dégénérative, est une cause de mortalité (Abebe et Eley, 1992).

Dans les conditions d'élevage en Afrique, les animaux chroniquement infectés succombent souvent suite à un stress nutritionnel (saison sèche), pathologique (surinfection bactérienne ou parasitaire) ou physiologique (parturition, sevrage, lactation, transhumance) (Abebe et Eley, 1992).

Les manifestations cliniques diffèrent selon l'espèce et la souche de parasite en cause. Une infection par *T. congolense* type savannah, chez le zébu entraîne une parasitémie plus forte, un hématocrite plus faible et une leucopénie plus marquée qu'avec les types forest et kilifi. Les symptômes sont plus marqués avec le type savannah et la mort apparaît en 29 à 54 jours, tandis que les animaux en conditions expérimentales semblent capables de se débarrasser de leur infection due aux types forest et kilifi (Bengaly et coll., 2002). *T. b. rhodesiense* est capable de provoquer une infection chez les bovins, de gravité variant de l'infection inapparente au stade méningoencéphalique (Wellde, 1989a ; Wellde, 1989b).

Trypanosoma equiperdum, agent d'une infection sexuellement transmissible équine, se manifeste sous la forme d'une inflammation et d'un oedème des organes génitaux et peut provoquer des avortements. Certains étalons peuvent être porteurs asymptomatiques.

Cependant, la présence de trypanosomes chez un hôte réceptif ne se traduit pas nécessairement par une expression clinique. De nombreux facteurs d'ordre génétique (races trypanotolérantes), individuel (état nutritionnel, antécédents pathologiques) influent sur la multiplication des parasites et la réceptivité des hôtes.

3.3. Physiopathologie

3.3.1. Anatomie pathologique

Les lésions observées sont inconstantes, peu spécifiques et sans signes pathognomoniques. Elles sont essentiellement liées aux perturbations du compartiment sanguin. L'anémie des trypanosomoses animales s'établit selon deux phases. Elle accompagne la parasitémie de la première phase et résulte d'une hémolyse extra-vasculaire. Les globules rouges sont détruits par le système phagocytaire dans la rate, le foie et la moëlle osseuse. Il s'agit d'une anémie normochrome normocytaire qui cesse d'être régénérative au cours de la phase chronique et devient normocytaire ou microcytaire et normochrome ou hypochrome. Elle traduit alors un dysfonctionnement de la moelle osseuse. Les lésions vasculaires s'observent dans les artérioles sous forme de foyers de nécrose. Chez le chien et le cheval, des oedèmes déclives sont parfois décrits. *Trypanosoma congolense* et *T. vivax* sont exclusivement vasculaires et provoquent une maladie de type lymphoproliférative. *Trypanosoma brucei* spp peut en revanche envahir les tissus et accéder au LCR par passage dans les plexus choroïdes.

Au début de l'infection, on observe une hypertrophie ganglionnaire, splénique et hépatique, tandis que les animaux infectés chroniquement présentent plutôt une hypoplasie des organes lymphoïdes. On suppose que des lésions hypophysaires pourraient être à l'origine des troubles endocriniens observés (Abebe et Eley, 1992). Les lésions cardiaques sont des myocardites congestives en plage, associées parfois à de l'hydro-péricardite. Parfois, il s'agit de myocardites dégénératives avec des foyers de nécrose. Les atteintes dermatologiques surviennent par défaut de vascularisation et se traduisent par des pertes de poils ou un pelage altéré. Lors d'infection chronique du derme, des papules et des pétéchies des muqueuses apparaissent.

Des lésions oculaires sont possibles avec opacification de la cornée essentiellement chez le chien et le cheval ou sous forme de kératites interstitielles, d'uvéites et parfois de conjonctivites purulentes pouvant conduire à la cécité.

3.3.3. Immunologie et trypanotolérance

La maladie chez les bovins provoque des modifications immunologiques différentes selon l'espèce et la souche de trypanosomes en cause. Dans l'infection à *T. congolense*, les réponses prolifératives lymphocytaires spécifiques des lymphocytes T sont restreintes aux ganglions. Elles sont transitoires, génératrices d'IFN- γ mais pas d'IL-2. L'immunosuppression est moins marquée mais toujours liée aux macrophages. Les principaux médiateurs de l'infection, le TNF- α , l'IFN- γ et le NO ne sont pas produits de façon massive. Il semblerait que les macrophages soient désactivés et ceci, sous l'influence de l'IL-10 produit au cours de l'infection (Taylor, 1998).

Les zébus constituent une grande partie du bétail africain et sont très sensibles à la maladie (Duvallat et coll., 1988 ; Paling et coll., 1991a et b). En revanche, l'élevage de bovins africains dits trypanotolérants serait un bon moyen de limiter les pertes causées par trypanosomose parmi le bétail. Ils sont capables de contrôler la prolifération parasitaire et de maintenir un hématoците et un poids relativement stable par rapport aux bovins trypanosensibles. La race de bovidés N'Dama (*Bos taurus*) est la plus connue pour sa capacité à supporter l'infection à trypanosomes (Stewart, 1937; Murray et coll, 1981). Ce caractère lui est conféré de façon héréditaire par la présence de plusieurs gènes localisés sur des chromosomes différents qui contribuent aux trois principaux indicateurs de tolérance qui sont l'anémie, le poids corporel et le contrôle de la parasitémie (Hanotte et coll., 2003). De plus, les bovins N'Dama atteignent des niveaux de production comparables à ceux des autres races de bovins africains (ex : *Bos indicus*) et sont capables de maintenir leur productivité même en conditions naturelles difficiles (Murray et coll., 1981 ; Starkey et coll., 1984). Le caractère trypanotolérant n'est pas seulement constaté chez les bovins mais aussi chez les ovins et les caprins et plus rarement chez quelques races de poney comme le Kotokoli de Côte d'Ivoire (Chabeuf, 1983).

Le mécanisme de tolérance en cause est mal connu mais une étude récente a comparé la réponse immunitaire chez une race sensible (Bora) et une race trypanotolérante (N'Dama). Une différence significative a été observée dans la production d'IFN- γ suite à l'infection expérimentale à *T. congolense*. Les taux produits dans les nœuds lymphatiques sont plus élevés chez les bovins Bora que chez les N'Dama. Or, il est connu que l'IFN- γ intervient dans la réponse immunitaire au niveau de la stimulation des macrophages et des lymphocytes B et

pourrait alors affecter l'expression isotypique des anticorps produits au cours de la trypanosomose. De même, il a été montré chez la souris que l'IFN- γ inhibe les précurseurs hématopoïétiques et pourrait alors être en partie responsable de l'anémie sévère observée chez les races trypanosensibles. En revanche, la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 ne semble pas jouer un rôle dans le caractère de tolérance à la maladie (Lutje et coll., 1996).

3.4. Diagnostic

Le diagnostic clinique est quasiment impossible à poser avec certitude en raison de l'absence de signe pathognomonique. Le diagnostic différentiel est délicat à faire parmi les pathologies induisant un tableau clinique de mauvais état général avec œdèmes déclives, conjonctivite et/ou kératite et hypertrophie ganglionnaire. Cependant, en l'absence de matériel de laboratoire, il est possible pour un vétérinaire de se baser sur l'état clinique de l'animal pour traiter la trypanosomose étant donné que, selon les souches de trypanosomes, 30 à 87 % des animaux présentent les symptômes cliniques et les modifications hématologiques les plus fréquemment observées lors de la maladie (Magona et coll., 2003).

Le diagnostic parasitologique se fait par examen microscopique direct (sang frais, frottis sanguins ou gouttes épaisses) ou après concentration par centrifugation en microtubes à hématocrite hépariné. Les modifications de l'hémogramme telles que l'anémie et un hématocrite inférieur à 25 % renforcent les suspicions de trypanosomose.

Le diagnostic séro-immunologique par recherche d'anticorps (immunofluorescence, ELISA, agglutination) peut se faire par plusieurs méthodes. Le Card Agglutination Test (CATT) peut être utilisé pour détecter les infections à *T. evansi* chez le dromadaire. Le test a récemment été évalué chez des buffles infectés expérimentalement et naturellement par *T. evansi* et a permis de détecter des anticorps 8 jours après l'infection expérimentale. Chez les animaux prélevés sur le terrain, le CATT a permis de dépister des animaux négatifs à la recherche parasitologique classique dans le sang (Hilali et coll., 2004). Les autres méthodes sérologiques reposent essentiellement sur la détection d'anticorps dirigés contre des antigènes internes préparés à partir d'extraits parasitaires bruts. Cependant, la méthode d'obtention des antigènes n'est pas standardisable pour toutes les espèces de parasites et la présence d'anticorps chez l'animal ne signe pas une infection active étant donné qu'on retrouve des anticorps longtemps après traitement dans les zones de forte prévalence. Un kit ELISA a déjà

été réalisé à partir d'un antigène standardisé de *T. congolense* et *T. vivax* (Rebeski et coll., 1998). Récemment, une protéine parasitaire invariante, que l'on retrouve chez *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei* à tous les stades parasitaires, a été identifiée et clonée. Elle permet de disposer d'un antigène spécifique de façon reproductible par recombinaison antigénique. Un test ELISA a été élaboré à partir de cette protéine : bien que la sensibilité soit à améliorer, cet antigène permet de différencier les infections actives des traces sérologiques d'infections passées chez des bovins (Boulangé et coll., 2002). Des méthodes ELISA indirectes existent aussi pour le diagnostic de *T. congolense*, *T. vivax* et *T. evansi* chez les caprins et les équidés (Lejon et coll., 2003b ; Magona et coll., 2002 ; Wernery et coll., 2001). Elles sont cependant moins sensibles que la recherche par concentration dans les tubes à hématocrite.

Les tests immunoenzymatiques visant à détecter les antigènes circulant dans le plasma au cours de l'infection n'ont pas donné de résultats efficaces pour le diagnostic des trypanosomoses bovines (Eisler et coll., 1998).

Les techniques PCR ont été mises au point pour *T. congolense*, *T. b. brucei*, *T. simiae* et *T. vivax*. Ces techniques reposent sur l'extraction préalable de l'ADN parasitaire à partir de prélèvements biologiques chez l'animal infecté (Moser et coll., 1989 ; Desquesnes et coll., 2001). Ces méthodes sont indispensables à la compréhension de l'épidémiologie et pour l'identification des infections chez le vecteur (Kukla et coll., 1987). Il est également possible de différencier les espèces de trypanosomes infectant l'animal des souches de *T. b. gambiense* groupe 1 pathogène pour l'homme (Biteau et coll., 2000). Récemment, l'utilisation de fragments de restriction de l'ADN a permis la mise au point d'un diagnostic des affections mixtes (Delespaux et coll., 2003). Combinées à l'hybridation moléculaire, les PCR sont très utiles à la détection de caractères résistants chez les parasites pour évaluer l'efficacité des trypanocides dans une région donnée (Clausen et coll., 1999).

3.5. Le traitement

Les traitements disponibles en médecine vétérinaire reposent sur différentes molécules dont l'espèce cible et le spectre d'action diffèrent. Actuellement, deux molécules dominent le marché des traitements chez les bovins : l'acéturate de diminazène (curatif) et le chlorure

d'isoméтамидium (préventif). On réserve les sels de quinapyramine, la suramine et les dérivés arsenicaux pour traiter les infections à *T. evansi* chez le dromadaire (voir tableaux 3 et 4). De nombreuses autres préparations médicinales à partir de dérivés trypanocides sont disponibles sur le marché africain, avec cependant des degrés d'efficacité et des coûts très variés.

D'autre part, les sels d'homidium sont connus pour leur pouvoir mutagène et doivent être utilisés avec précaution, en respectant les délais de consommation des productions animales.

La stratégie thérapeutique curative est en général recommandée dans les zones de faible endémie. Les animaux sont alors traités lorsque la maladie se déclare cliniquement avec modification de l'hémogramme, avec ou sans confirmation parasitologique. Les animaux nouvellement introduits dans un troupeau sont suivis régulièrement et traités dès la moindre suspicion car ils risquent d'une part d'apporter de nouvelles souches de parasites et d'autre part, d'être plus sensibles aux souches qui sévissent dans leur nouvelle aire de vie.

La chimioprophylaxie est instaurée dans les régions où le bétail est constamment soumis à des pressions parasitaires fortes. Le risque d'infections répétées justifie l'utilisation d'un traitement préventif toute l'année, d'autant plus que les molécules curatives ont un temps d'efficacité limité et engendreraient un coût élevé lors d'une utilisation répétée à large échelle (Connor et coll., 1989). Le traitement prophylactique s'effectue selon les périodes à risque et le pourcentage d'animaux dépistés infectés au sein du cheptel. Les infections individuelles en dehors des périodes de prophylaxie peuvent être traitées isolément par un traitement curatif (Maloo et coll., 1988 ; Trail et coll., 1985). La stratégie préventive requiert moins de main d'œuvre car moins de surveillance individuelle étant donné que les animaux ne sont pas traités au cas par cas. Ainsi, le choix de la stratégie s'effectue aussi selon les conditions d'élevage et la qualité de gestion des troupeaux (Gu et coll., 1999).

Aucune nouvelle molécule trypanocide n'a été développée depuis les trente dernières années. Chaque année, environ 25 millions de doses de trypanocides sont vendues et échappent à toute réglementation ce qui favorise les mauvaises utilisations et l'apparition de résistances (Holmes, 1997). Pourtant, il est clairement établi que les trypanocides, quand ils sont utilisés à bon escient, jouent un rôle important dans le contrôle économique des trypanosomoses animales. Cependant, le manque de vétérinaires et d'information mène à des

utilisations thérapeutiques inadaptées. Les conséquences s'en ressentent à la fois au niveau individuel, chez les éleveurs qui investissent beaucoup dans les thérapeutiques trypanocides sans résultat, et au niveau économique, par une baisse de la productivité animale. De même, lors de l'apparition de résistances, il est indispensable qu'une personne qualifiée puisse identifier et corriger les erreurs de stratégie.

Produit	Dénomination commerciale	Trypanosomes sensibles	Espèces cibles	Posologies
Suramine	Suramine® Naganol® Naganine®	<i>T. brucei sp</i> <i>T. evansi</i>	Canidés Camélidés Equidés	10 mg/kg/j IV ou IM
Mélarso mine	Cymelarsan®	<i>T. brucei sp</i> <i>T. evansi</i>	Canidés Camélidés Equidés	0,25 mg/kg SC ou IM
Homidium (bromure)	Ethidium®	<i>T. vivax</i> <i>T. congolense</i>	Bovidés Petits ruminants Equidés	1 mg/kg IM
Homidium (chlorure)	Novidium®	<i>T. vivax</i> <i>T. congolense</i>	Bovidés Petits ruminants	1 mg/kg IM
Isometamidium	Trypamidium® Samorin® Veridium®	<i>T. vivax</i> <i>T. congolense</i> <i>T. b. brucei</i> <i>T. evansi</i>	Bovidés Petits ruminants Equidés Canidés Camélidés	0,25 à 1 mg/kg IM ou IV
Diminazène	Veriben® Trypazène® Berenil® Ganaseg® Trypan®	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i>	Bovidés Petits ruminants	3,5 mg/kg SC ou IM
		<i>T. b. brucei</i>	Equidés Bovidés	7 mg/kg IM
		<i>T. evansi</i>	Camélidés	3,5 mg/kg IM
Quinapyramine (Sulfate)	Antrycide® (sulfate) Trypacide® (sulfate)	<i>T. vivax</i> <i>T. congolense</i> <i>T. b. brucei</i> <i>T. simiae</i>	Canidés Camélidés	5 mg/kg SC
		<i>T. evansi</i> <i>T. b. brucei</i> <i>T. evansi</i>	Equidés Camélidés	3 mg/kg SC

Tableau 3 : Trypanocides vétérinaires (d'après Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, CIRAD)

Produit	Dénomination commerciale	Trypanosomes sensibles	Espèces cibles	Posologies	Durée de protection
Isometamidium	Trypamidium® Samorin® Veridium®	<i>T. vivax</i> <i>T. congolense</i> <i>T. b. brucei</i> <i>T. evansi</i>	Bovidés Petits ruminants Equidés Canidés Camélidés	0,25 à 1 mg/kg IM ou IV	2 à 4 mois
Homidium	Ethidium®	<i>T. vivax</i> <i>T. congolense</i>	Camélidés Equidés	1 mg/kg IM	
Quinapyramine (Sulfate + chlorure)	Antrycide® prosalt Trypacide® prosalt	<i>T. vivax</i> <i>T. congolense</i> <i>T. b. brucei</i> <i>T. evansi</i>	Equidés Camélidés	50 mg/10kg SC	2 à 3 mois

Tableau 4 : Trypanopréventifs vétérinaires (d'après Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, CIRAD)

4. Résistances thérapeutiques

Des cas de résistances aux trypanocides ont été décrits à la fois en thérapeutique humaine et vétérinaire. Elles sévissent souvent par région et sont liées à la souche de parasites qui s'y est développé. Dans certains foyers, les résistances posent un réel problème médical en raison du peu d'alternative thérapeutique disponible pour traiter des patients de stade II.

Afin de contourner les capacités de résistance des parasites, il est indispensable d'en étudier les mécanismes. Ils varient selon la classe chimique des trypanocides et n'ont pas encore été entièrement élucidés.

4.1. Les mécanismes de résistance

4.1.1. Diminution de l'accumulation de molécule dans le parasite

Les premières démonstrations de résistance des trypanosomes ont été obtenues par Paul Ehrlich (Guttman et Ehrlich, 1908). L'utilisation de colorants vitaux tels que l'acridine lui a permis de montrer un défaut de l'accumulation de la molécule chez les souches résistantes. Depuis, de nombreuses études ont confirmé ce phénomène au moyen de l'immunofluorescence et de la radioactivité sur plusieurs souches de parasites (Hawking et Smiles, 1941 ; Fulton et Grant, 1955 ; Carter et coll., 1995). Ce mécanisme entre en jeu dans la résistance à la pentamidine chez *T. b. brucei* et à l'isométymidium chez *T. congolense*. Les formes procycliques de *T. b. brucei* résistantes accumulent moins de DFMO que les souches sensibles. Une diminution de l'accumulation de drogue chez une souche résistante peut avoir pour origine une diminution de la capture ou une augmentation de l'efflux cellulaire. Dans les deux cas, des mutations dans les gènes codant les systèmes de transport transmembranaire sont en cause étant donné que la plupart des trypanocides ne diffusent pas librement dans les cellules. Les mutations pourraient s'exprimer sous la forme d'une augmentation d'un transporteur d'efflux, de la diminution d'un transporteur d'influx ou de la perte de spécificité d'un transporteur pour son substrat. Actuellement, on a identifié les transporteurs d'influx comme étant des perméases transporteurs de purines et les transporteurs d'efflux comme des

protéines de la famille des ABC (ATP Binding Cassettes) transporteurs. Des études restent à faire pour identifier d'autres transporteurs et surtout détecter une éventuelle mutation pour ce transporteur chez les souches résistantes.

4.1.2. Diminution du transport d'influx

Les transporteurs de purines ont été mis en évidence dans le phénomène de capture du mélarsoprol par diminution de l'absorption parasitaire du mélarsoprol en présence d'adénine et d'adénosine *in vitro* (Carter et Fairlamb, 1993). Ce transporteur a été dénommé P2 puis un autre transporteur de purine a été identifié sous le nom de transporteur P1 (Carter et Fairlamb, 1993). Depuis, on a démontré la présence de nombreux autres transporteurs de purines chez les trypanosomes (De Koning et Jarvis, 1997 ; 1999 ; De Koning et coll., 1998 ; Wallace et coll., 2002) et certains d'entre eux ont été clonés (Sanchez et coll., 1999, 2002 ; Burchmore et coll., 2003 ; Henriques et coll., 2003) mais aucun n'est impliqué dans le transport des trypanocides. En revanche, on a montré chez une souche de *T. b. brucei* sélectionnée pour son caractère résistant au melarsen cysteamine chez la souris, une perte des transporteurs P1 et P2 (Carter et Fairlamb, 1993). Le transporteur P2 est également impliqué dans le transport de la pentamidine ce qui explique les résistances croisées entre les dérivés arsenicaux et les diamidines (Carter et coll., 1995 ; De Koning et coll., 2001). Des résistances croisées ont été observées chez *T. equiperdum* et *T. evansi* et dans les deux cas, la perte des transporteurs des purines a été démontrée (Barrett et coll., 1995 ; Ross et coll., 1996). Le groupe amidine est présent à la fois dans les diamidines, le mélarsoprol et l'adénine. Il a été confirmé *in vitro* que ce groupe constitue le substrat reconnu spécifiquement par le transporteur des purines (De Koning et coll., 1999).

Le gène TbAT1 a été identifié dans l'expression du transporteur P2 et son absence chez des souches mutantes de trypanosomes délétés a montré qu'il n'était pas essentiel à la survie des parasites (Matovu et coll., 2003). Dans le cas du DFMO, il est nécessaire que deux mutations se produisent dans le génome parasitaire pour que la résistance soit effective (Phillips et Wang, 1987).

4.1.3. Augmentation du transport d'efflux

Les transporteurs de la famille des ABC protéines ont été mis en cause dans le système d'élimination des xénobiotiques chez les trypanosomes. Ces protéines de transport sont largement représentées chez les eucaryotes et les procaryotes et ont un très grand éventail de substrats. Elles fonctionnent par une activité ATPasique qui permet un transport actif à l'encontre du gradient de concentration. Elles agissent comme des pompes d'efflux et sont à l'origine de nombreuses résistances médicamenteuses, essentiellement dans le domaine de la chimiothérapie anti-cancéreuse. Parmi elles, les P-glycoprotéines ont été les plus étudiées et le plus impliquées dans les phénomènes de résistance (Riordan et coll., 1985 ; Krishnamachary et Center, 1993). Dans les formes sanguines de *T. b. brucei*, le gène TbMRPA code pour un transporteur ABC qui, lorsqu'il est surexprimé 10 fois, confère une résistance au mélarsoprol (Shahi et coll., 2002). Actuellement, on ne sait cependant pas si la surexpression du gène TbMRPA est à l'origine des rechutes chez les patients traités au mélarsoprol étant donné que l'isolement et le transport des souches isolées sur le terrain est souvent impossible en raison des difficultés politiques ou des mauvaises conditions d'accès aux foyers où sévissent les résistances.

Cas particulier de *T. b. rhodesiense* et DFMO

La résistance innée de *T. b. rhodesiense* au DFMO a été évoquée dans les années 80 lors d'un essai clinique chez des patients d'Afrique de l'Est pour lesquels un taux de guérison de 30% seulement a été obtenu. Une étude chez le rat a confirmé que seuls 35% de rats infectés par *T. b. rhodesiense* pouvaient être guéris par une cure de DFMO (Bales et coll., 1989 ; Bacchi et coll., 1990, 1993). Pourtant, les phénomènes de capture et d'efflux de la molécule par le parasite ne semblent pas modifiés par rapport à ce qu'on observe chez *T. b. gambiense*. Dans ce cas, il s'agit d'une modification dans la cible du DFMO. Le DFMO agit comme inhibiteur de l'ornithine décarboxylase, une enzyme-clé dans la biosynthèse du parasite. Chez *T. b. rhodesiense*, la durée de vie de l'enzyme est plus courte, ce qui permet un turn-over important. De plus, l'ARN messager codant pour cette enzyme a été retrouvée en quantité 10 fois plus importante que chez *T. b. gambiense* (Iten et coll., 1997). Ainsi, la production enzymatique pourrait se faire dans des proportions qui dépassent les capacités inhibitrices du DFMO.

4.2. Origine des résistances

En thérapeutique humaine, les principales résistances rapportées concernent le mélarsoprol. Elles sont décrites au Soudan, en Angola, en République Démocratique du Congo (RDC) et en Ouganda. En Ouganda, les taux de rechutes atteignent 30 %, pour des patients chez qui une deuxième cure de mélarsoprol se révèle tout aussi inefficace. Le problème est d'autant plus grave que le mélarsoprol est actuellement le traitement de référence de la phase nerveuse.

L'apparition de résistance chez un microorganisme se fait naturellement après exposition de l'agent pathogène à une molécule donnée. Il existe également des résistances innées avant même contact entre le microorganisme et la drogue. Les résistances peuvent apparaître à quatre niveaux différents : l'hôte, le vecteur, la molécule, le parasite. Dans le cas du DFMO, le système immunitaire de l'hôte joue un rôle majeur dans la réussite du traitement (De Gee et coll., 1983). En cas d'immunodépression chez l'hôte, les parasites se retrouvent exposés au DFMO pendant un temps suffisamment long pour effectuer la sélection des clones résistants ou provoquer des mutations chez des clones sensibles.

Chez le vecteur, on a montré des échanges génétiques entre les parasites de l'espèce *T. brucei* (Jenni et coll., 1986 ; Degen et coll., 1995). Or, le caractère de résistance est conféré par un gène qui peut ensuite se transmettre de façon clonale aux générations suivantes.

La nature des molécules trypanocides est un facteur potentiel de sélection de souches résistantes. La résistance à l'éthidium peut être en partie attribuée au fait qu'il contient un agent mutagène susceptible de provoquer des variants génétiques chez les trypanosomes et ainsi favoriser l'apparition de facteurs de résistance.

Chez l'animal, les conditions d'administration d'un produit sont autant de risques de provoquer l'émergence de souches résistantes. Le sous-dosage rend le traitement inefficace tout en permettant une exposition sanguine prolongée des parasites au médicament. De plus, les traitements de masse dans les grands troupeaux des aires endémiques sont responsables d'une pression de sélection élevée, d'autant plus que les traitements prophylactiques sont conduits sur une grande partie de l'année.

L'utilisation des traitements vétérinaires pourrait influencer sur l'apparition des résistances observées chez l'homme. En effet, les mécanismes de résistance au mélarsoprol ne sont pas connus et chez l'homme les dosages sont généralement respectés excluant un mécanisme d'échappement lié aux traitements insuffisants. De même, les patients sont généralement traités en dehors des zones de transmission des glossines excluant une propagation des résistances au moment de l'administration des traitements. Cependant, bien que les traitements vétérinaires diffèrent de ceux prescrits chez l'homme, des résistances croisées ont été démontrées entre le diminazène et le mélarsoprol car les deux molécules sont prises en charge par le transporteur P2 aminopurine (Barrett et coll., 1999). Le lien entre les traitements massifs et inadaptés du bétail et l'apparition de résistance chez *T. b. gambiense* est encore incertain étant donné que les parasites ont en général une spécificité d'espèces. En revanche, on sait que 20% des parasites retrouvés chez le bétail en Afrique de l'Est peuvent être pathogènes pour l'homme (Hide, 1999). De plus, l'existence d'un réservoir animal n'exclue pas l'hypothèse que les souches de *T. b. gambiense* résistantes proviennent d'une sélection chez les animaux traités au diminazène.

Pour cette raison, il est préconisé de traiter les animaux avant tout transport vers une nouvelle aire de vie afin d'éliminer le risque de véhiculer des parasites pathogènes pour l'homme, et de choisir préférentiellement l'isométabidum ou l'homidium. Bien que le risque d'apparition de résistance chez l'animal soit plus élevé avec ces deux molécules qu'avec le diminazène, cette stratégie thérapeutique serait préférable en terme de santé publique humaine (Geerts et Holmes, 1998). Cependant, le pouvoir mutagène de ces deux molécules rend leur utilisation délicate car les délais de consommation des productions animales doivent être ensuite scrupuleusement respectés.

5. Modèles d'études expérimentaux de la maladie du sommeil

5.1. Modèles *in vitro*

Les formes sanguines de trypanosomes se cultivent aisément *in vitro*, quelles que soient l'espèce et la souche. Pour cela, des milieux ont été mis au point et semblent convenir à la culture de *T. brucei* spp aussi bien qu'aux espèces pathogènes de l'animal. Il s'agit d'un milieu, enrichi par du 2-mercaptoéthanol (Baltz et coll., 1985) ou de la L-cystéine (Duszenko et coll., 1985).

L'utilisation de cultures de trypanosomes permet, entre autre, l'étude biomoléculaire de leur génome et trouve son application dans l'étude des résistances et de leurs mécanismes.

5.2. Modèles *in vivo*

5.2.1. Les rongeurs

Le modèle souris

Les modèles d'étude de la maladie du sommeil ont d'abord été mis au point pour *T. brucei* spp. chez la souris. L'étude des lésions cérébrales est possible avec certaines souches de *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* connues pour provoquer des parasitémies d'apparition lente chez les rongeurs et permettre ainsi un mode d'évolution chronique de la maladie (Poltera et coll., 1982). En revanche, après infection des souris par *T. b. brucei*, les parasitémies apparaissent sous un mode aigu, entraînant le décès des animaux avant que les lésions nerveuses ne se mettent en place (Poltera et coll., 1980). Ceci est surtout vrai pour la souche de *T. b. brucei* AnTat1.9. qui évolue vers une issue fatale en 3 à 5 jours.

Pour l'étude de la phase nerveuse après infection par *T. b. brucei*, des modèles murins d'infection chronique ont été mis au point par traitement au diminazène ou à la suramine qui

ne franchissent pas la barrière hémato-encéphalique et ne peuvent éliminer les parasites qui ont déjà gagné le système nerveux central (Jennings et Gray, 1983a ; Poltera et coll., 1985 ; Keita et coll., 1997). Pour cela, on utilise les souches de *T. b. brucei* GVR 35 ou AnTat1.1E par exemple, qui permettent une survie de 30 jours environ après l'infection. Ces modèles évoluent sous forme de rechutes après traitement et l'histopathologie permet de mettre en évidence des lésions de méningo-encéphalite aiguë.

Le modèle murin est également utilisé pour l'étude des infections à *T. congolense*.

Le modèle murin de trypanosomose est utilisé dans les études histopathologiques (Keita et coll., 1997), physiopathologiques (Amole et coll., 1989 ; Poltera et coll., 1982), biomoléculaires, thérapeutiques et pharmacocinétiques (Nok et coll., 2003 ; Shi et coll., 2003 ; Enanga et coll., 1998, 1999).

Le modèle rat

Des modèles d'études ont été développés chez le rat pour *T. congolense* (Ojok et coll., 2002, *T. evansi* (Biswas et coll., 2001), *T. b. brucei* (Mulenga, 2001), *T. b. rhodesiense* (Bafort et Schmidt, 1983, modèle chez *Microtus montanus*), *T. b. gambiense* (Van Marck et coll., 1981). Récemment, un modèle d'étude des caractéristiques cliniques et comportementales de la maladie chez le rat a été mis au point avec la souche AnTat 1.1E (Darsaud et coll., 2003). Son application a permis l'étude des troubles du sommeil qui sont caractéristiques lors de l'atteinte nerveuse chez l'homme (Darsaud et coll., 2004). Plusieurs espèces de rats (*Mastomys coucha*, *Bandicota bengalensis*, *Microtus montanus*, *Cricetomys gambianus*) ont été utilisés pour étudier la physiopathologie et l'histopathologie de *T. congolense* (Ojok et coll., 2002 ; Bengaly et coll., 2002 ; Biswas et coll., 2001).

5.2.2. Le modèle mouton

Le mouton s'infecte facilement par *T. b. brucei* (Losos et Ikede, 1972). De plus, parmi les ruminants, c'est une espèce facile à élever, qui demande un minimum de locaux et d'entretien et chez laquelle les prélèvements peuvent se faire sans problème, à la fois pour le sang et le liquide céphalo-rachidien (Ndo et coll., 1991). L'infection par *T. b. brucei* AnTat 1.9 se fait par voie sous-cutanée et évolue entre 34 et 172 jours. Les symptômes cliniques apparents sont de l'hyperthermie, une anémie, de l'anorexie et de l'apathie. La parasitémie

apparaît en moyenne au 9^{ème} jour post-infection et persiste à des taux plus ou moins élevé tout au long de la maladie. L'augmentation de la cytorachie et l'apparition de parasites dans le LCR sont observables entre le 27^{ème} et le 71^{ème} jour (Bouteille et coll., 1988a). Les protéines du LCR sont modérément augmentées mais les IgM en revanche atteignent plus de 10 % des protéines totales. L'analyse histopathologique révèle une atteinte de tous les organes sauf les reins et les poumons. Les lésions cérébrales montrent entre autres des infiltrations lymphoplasmocytaires et péri-vasculaires typiques de la maladie chez l'homme (Bouteille et coll., 1988b).

Ainsi, le modèle mouton a permis de mettre en évidence les auto-anticorps produits lors de l'atteinte nerveuse (Jauberteau et coll., 1991; Amevigbe et coll., 1992 ; Jauberteau et coll., 1994).

5.2.3. Le modèle primate non-humain

Les singes sont susceptibles d'être infectés par des trypanosomes et les premières infections expérimentales ont été obtenues avec *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense* (Losos et Ikede, 1972). En revanche, certaines espèces sont plus résistantes à *T. b. gambiense* comme les babouins (*Papio* sp) qui possèdent un facteur sérique trypanolytique qui est absent chez les Cercopithèques (*Cercopithecus* sp), les Patas (*Erythrocebus patas*), les colobes (*Colobus* sp) et les macaques (*Macaca* sp), ce qui laisse supposer une réceptivité de ces espèces aux trypanosomes (Seed et coll., 1990).

Communément, on utilise le modèle singe vert ou vervet (*Cercopithecus aethiops*) pour reproduire les infections à *T. b. rhodesiense* (Poltera et coll., 1981; Schmidt et Sayer, 1982a; Poltera et Sayer, 1983; Rudin et coll., 1983; Poltera et coll., 1985b; Sayer et coll., 1987). Ce modèle reproduit la clinique observée chez l'homme mais aussi les lésions du système nerveux central. La durée de vie est de 65 jours en moyenne et on détecte les parasites dans le LCR entre les 19^{ème} et 41^{ème} jours après infection. A ce moment là, un traitement par le diminazène ou la suramine permet de prolonger la durée de vie sans éliminer totalement les parasites du système nerveux central ce qui permet d'observer des signes de méningo-encéphalite et de lésions cérébrales plus sévères (Schmidt et Sayer, 1982b; Poltera et coll.,

1985a). L'utilisation du singe infecté par *T. b. rhodesiense* a été très utile dans l'étude de molécules thérapeutiques (mélarsoprol, DFMO) et de leurs combinaisons (Sayer et coll., 1985, 1987; Burudi et coll., 1994), en immunologie (Pearson et coll., 1986), physio- et immunopathologie (Poltera et Sayer, 1983 ; Poltera et coll., 1985a).

Ce modèle est malgré tout délicat à réaliser en raison de la survie très courte autorisée par *T. b. rhodesiense*. C'est pourquoi le modèle d'infection chronique a été mis au point par infection du singe vert par *T. b. gambiense*. La maladie évolue sous forme de parasitémies fluctuantes accompagnées de fièvre, d'anémie, d'adénopathies et d'un état général plus ou moins altéré (perte de poids, dysorexie, apathie). L'atteinte cérébrale a lieu plus tardivement, vers le 170^e jour post-infection, et on observe alors une augmentation de la cytorachie et apparition de trypanosomes dans le LCR. Ce modèle a été utilisé une première fois pour un essai thérapeutique et pour la pharmacocinétique d'un nouveau trypanocide, le mégazol (Enanga et coll., 2000). Ces travaux ont été poursuivis au cours de notre travail.

Travaux personnels

1. Patients, animaux et méthodes

1.1. Les parasites

1.1.1. Origine

Les souches *T. b. brucei* AnTat 1.9 et *T. b. gambiense* MBA ont été gracieusement données par l'Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold (Anvers, Belgique). Elles ont été fournies sous forme de cryostabilat dans l'azote liquide.

1.1.2. Culture *in vitro*

Pour les études *in vitro*, les stabilats ont été rapidement décongelés au bain-marie à 37°C puis remis en culture dans des plaques de 24 puits dans le milieu minimum essentiel avec sels d'Earles (Gibco). Ce milieu avait été au préalable supplémenté par de la L-glutamine à 2 mM (Gibco), du tampon HEPES (Gibco) à 25 mM, du glucose (Sigma) à 0,2 %, du pyruvate de sodium (Gibco) à 2 mM, de la pénicilline à (Gibco) 150 UI/L, de la thymidine à 0,01 mM (Sigma), et de l'hypoxanthine à 0,1 mM (Sigma). Au moment de son utilisation, le milieu minimum essentiel supplémenté a été complété par de la bathocuproïne sulfate à 0,05 mM (Sigma), de la L-cystéine à 1,5 mM (Sigma), du 2-mercaptoéthanol à 0,12 mM (Sigma), et du sérum de cheval à 20% (v/v) (Gibco). Avant leur utilisation *in vitro*, les parasites ont été cultivés dans une étuve à 37°C, avec 5% de CO₂ durant une période d'adaptation de 14 jours.

1.1.3. Détermination de la concentration inhibitrice de 50% (IC₅₀) de la croissance parasitaire *in vitro*

(cf article 2 infra pp 106-124).

En résumé, les souches de trypanosomes ont été incubées durant 48 heures avec la molécule testée à différentes concentrations. Deux puits contrôles n'ont reçu que du sérum physiologique. Passé le délai d'incubation, les trypanosomes ont été dénombrés dans chaque

puits et le pourcentage de survie a été calculé en fonction du nombre de parasites dans les puits contrôle. L'IC50 a été obtenue grâce au logiciel GraphPad prism.

1.2. Les patients

Le sang et le LCR de patients ont été utilisés dans une étude préalable afin de mettre au point la technique de cytométrie en flux au cours de la THA dans des conditions de terrain. Le typage lymphocytaire a été réalisé sur des prélèvements sanguins provenant de 2 patients en stade 1, 6 patients en stade intermédiaire et 9 patients en stade 2. Parmi ces patients, le LCR d'un des patients en stade 1, de 3 des 6 patients en stade intermédiaire et de 8 des 9 patients en stade 2 ont également été analysés. Des consentements éclairés ont été signés avant la réalisation des prélèvements nécessaires à l'étude (voir annexe 1). Les patients étaient dépistés par le test CATT sur le sang et la présence de trypanosomes était recherchée par la technique de Woo (Woo, 1970). La détermination du stade s'est faite d'après les analyses systématiques parasitologiques et biologiques du sang et du LCR, selon les critères suivants:

Patient en stade 1 : cytorachie inférieure à 5 cellules/ μ L, pas de trypanosomes dans le LCR ni de synthèse intra-thécale d'IgM.

Patient en stade intermédiaire : cytorachie comprise entre 5 et 20 cellules/ μ L, et/ou synthèse intra-thécale d'IgM et absence de trypanosomes dans le LCR.

Patient en stade 2 : cytorachie supérieure à 20 cellules/ μ L, et/ou présence de trypanosomes dans le LCR, et/ou synthèse intra-thécale d'IgM.

Les patients ont été dépistés au Gabon et en Angola, à la faveur des campagnes nationales de dépistage de la trypanosomose. Au Gabon, la prospection s'est faite dans le foyer de Coco Beach. En Angola, les patients ont été dépistés passivement au centre de soins des trypanosomoses de Viana, situé à une vingtaine de kilomètres de Luanda, ou activement au cours des prospections dans le foyer de Bengo.

Les paramètres biologiques des individus variant au cours de la journée, nous nous sommes attachés à réaliser tous les prélèvements le matin entre 8 heures et 11 heures, afin d'obtenir des résultats de cytométrie reproductibles et comparables.

1.3. Origine des animaux utilisés en expérimentation

1.3.1. Les souris

Des souris Swiss femelles, de 20 à 25g, provenant du centre de primatologie du Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF, Gabon), ont été utilisées pour l'essai thérapeutique du DFMO associé au nifurtimox et des modifications immunologiques chez le singe vert infecté par *T. b. gambiense*. Après une période d'adaptation de 7 jours suivant leur arrivée, elles ont été utilisées dans le protocole expérimental. Les animaux recevaient une alimentation équilibrée et de l'eau à volonté.

D'autres souris Swiss de 20 à 25 g ont été utilisées dans l'étude du bleu de méthylène chez la souris infectée par *T. b. brucei*, dans l'étude du mégazol chez le mouton infecté par *T. b. brucei* et dans l'étude du mégazol chez le singe infecté par *T. b. gambiense*. (voir infra les articles 1, 2 et 3 correspondants, pp90-108, pp109-127, pp128-147).

1.3.2. Les primates non humains

Huit Vervets (*Cercopithecus aethiops*) mâles et femelles subadultes, de 3 à 7 kg, infectés par *T. b. gambiense* ont été utilisés au cours de l'essai thérapeutique concernant le DFMO associé au nifurtimox. Cinq d'entre eux provenaient du centre de primatologie du Centre International de Recherche Médicale de Franceville (CIRMF, Gabon), trois provenaient du Centre de Recherche Médicale et Sanitaire de Niamey (CERMES, Niger). Leur âge a été estimé entre 3 et 9 ans. Les animaux ont préalablement été mis en quarantaine au cours de laquelle ils ont été dépistés pour les virus SIV, STLV, hépatite C et pour la tuberculose. Une coprologie a permis d'adapter le traitement adéquat si besoin. Une autorisation pour l'utilisation des primates non-humains dans le cadre de la recherche biomédicale a été accordée par le comité d'éthique du CIRMF, selon la déclaration d'Helsinki concernant l'utilisation et les soins à apporter aux animaux de laboratoire, promulguée par l'institut national pour la santé (USA).

Dix autres vervets, fournis par le CIRMF et le CERMES, ont été utilisés dans l'étude de l'efficacité du mégazol chez le singe vert infecté par *T. b. gambiense* (voir article 3, pp128-147).

1.3.3. Les moutons

Les moutons, adultes femelles de 45 à 55 kg, provenaient d'un élevage indemne de pathologie infectieuse. Ils ont été maintenus en stabulation au laboratoire départemental d'analyses et de recherche vétérinaires durant un mois avant expérimentation au cours duquel ils ont été vaccinés contre la pasteurellose et vermifugés d'après les résultats de la coprologie réalisée. (Voir article 1, pp90-108).

1.4. Infection des animaux

1.4.1. Infection des souris

Les cryostabilats contenant les souches *T. b. gambiense* MBA et *T. b. brucei* AnTat 1.9 ont été décongelés rapidement au bain-marie à 37°C. La mobilité des trypanosomes a été vérifiée par observation microscopique. Les parasites ont été dilués dans du milieu essentiel minimum (MEM) avec sels d'Earles, complétementé comme décrit précédemment. Les souris ont été infectées par injection intra-péritonéale de 200 µL de milieu contenant les trypanosomes. La parasitémie a ensuite été vérifiée tous les deux jours par prélèvement de sang au bout de la queue et observation microscopique. Deux souris ont été infectées pour un premier passage de la souche. Après obtention d'une parasitémie, le sang d'une souris a été prélevé et dilué dans du MEM dans le but d'infecter deux autres souris pour un deuxième passage. Le décès des premières souris infectées a permis de s'assurer de la pathogénicité de la souche.

1.4.2. Infection des moutons

Les moutons ont été inoculés par *T. b. brucei* AnTat 1.9 à raison de 10^4 parasites par voie sous-cutanée (article 1, pp90-108).

1.4.3. Infection des primates non humains

Le sang d'une souris parasitée a été prélevé stérilement par ponction cardiaque, puis dilué dans du MEM de façon à obtenir une concentration de 5.10^3 parasites/mL. L'infection a été réalisée par injection intra-veineuse de la suspension (2 mL) de 10^4 parasites, après pose d'un cathéter dans la veine saphène. Une souris a été infectée avec la même suspension et sa

parasitémie contrôlée 3 jours plus tard afin de s'assurer de la pathogénicité des parasites en fin de protocole.

1.4.4. Suivi de l'infection

Des prélèvements de sang (recueillis sur tube à EDTA) et de liquide céphalo-rachidien (LCR) ont été réalisés chez les primates non-humains tous les quinze jours. Les parasites étaient recherchés après concentration en tube à hématocrite selon la technique de Woo (1970).

Le LCR a été prélevé, sous anesthésie générale (cf infra page 78) par ponction lombaire entre L4 et L5 après tonte et désinfection soigneuse du site de prélèvement. Deux cents μL à 2 mL pouvaient être récupérés selon les cas. Les LCR visiblement hémorragiques étaient systématiquement écartés.

Les paramètres biologiques des individus variant au cours de la journée, nous nous sommes attachés à réaliser tous les prélèvements le matin entre 8 heures et 11 heures, afin d'obtenir des résultats de cytométrie reproductibles et comparables.

L'observation des LCR à la cellule de Kova a permis de déterminer la présence de parasites, la cytorachie et le nombre de globules rouges. Etant donné les difficultés du prélèvement chez le singe vert, nous n'avons utilisé pour interprétation que les LCR contenant moins de 500 hématies $/\mu\text{L}$.

Les suivis parasitologiques des souris, des moutons et des autres vervets infectés et traités au mégazol sont décrits dans les articles correspondants (voir les articles 1, 2 et 3 correspondants, pp90-108, pp109-127, pp128-147).

1.5. Protocoles pour l'expérimentation animale

1.5.1. Les molécules utilisées

Le DFMO, Ornidyl[®] (Aventis), se présente sous la forme d'un soluté aqueux pour injection parentérale à 200 mg/mL. Les flacons ont été gracieusement fournis par le Programme National de Lutte contre la Trypanosomose d'Angola, Luanda, Angola.

Le nifurtimox (Lampit[®], Bayer) a été obtenu par un don de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Il s'agit de comprimés sécables à 120 mg de nifurtimox.

Le mélarsoprol (Arsobal[®], Aventis Pharma) a été obtenu par un don de l’OMS. Il s’agit d’ampoules pour injection intra-veineuse contenant 180 mg de principe actif dans 5 mL.

D’autres molécules ont été étudiées telles que le mégazol, le bleu de méthylène, la suramine et la pentamidine dont le protocole est rapporté dans les articles 1, 2 et 3 (pp90-108, pp109-127, pp128-147).

1.5.2. Administration des traitements

Lors de l’étude du DFMO associé au nifurtimox chez le singe vert infecté par *T. b. gambiense*, le traitement n’a été entrepris qu’après confirmation du stade nerveux. Les critères décisionnels du stade étaient les suivants :

- observation de parasites à l’inspection du LCR dans la cellule de Kova,
- cytorachie supérieure à 100 cellules/ μ L dans deux prélèvements consécutifs, en l’absence de globules rouges,
- mauvais état général avec signes nerveux marqués (abattement, cachexie, prostration, parésie, état de somnolence, crises convulsives).

Le DFMO a été administré à 200 mg/kg/jour et le nifurtimox à 10 mg/kg/jour, répartis en deux prises quotidiennes, pendant 8 jours pour le 1er groupe (quart de la dose totale habituellement prescrite chez l’homme) et pendant 15 jours pour le 2^{ème} groupe (demi-dose totale habituellement prescrite chez l’homme). Les deux produits ont été donnés simultanément par voie orale dans l’alimentation. Les comprimés de nifurtimox ont été fractionnés selon le poids de chaque singe et réduits en poudre avant administration. En cas de mauvaises prise (ration alimentaire non-ingérée dans sa totalité), la dose a été doublée dans la ration suivante.

Les cas de rechute ont été traités par de l’Arsobal[®] ou du mégazol en fonction de l’état clinique du singe (possibilité ou non de prise *per os*). Pour le mélarsoprol, le schéma thérapeutique était de 3 injections par semaine de 3,6 mg/kg, suivi d’une période de repos de 7 jours. Trois séries d’injections ont ainsi été pratiquées. Pour le mégazol, 100 mg/kg/j ont été administré *per os* pendant 3 jours consécutifs.

Les traitements administrés aux souris, aux moutons et aux singes traités par le mégazol sont décrits dans les articles correspondants (voir les articles 1, 2 et 3, pp90-108, pp109-127, pp128-147)

1.5.3. Anesthésie des primates non-humains

Les vervets ont toujours été manipulés et examinés sous anesthésie générale. À jeun depuis 12 heures, ils recevaient une injection intra-musculaire de kétamine (Kétamine 1000, Merial, France) de 8 à 10 mg/kg qui permet d'obtenir en 5 à 10 minutes une sédation plus ou moins profonde durant environ 30 minutes. En cas d'hypersécrétion, une injection sous-cutanée d'atropine était pratiquée à raison de 0,05 mg/kg. L'anesthésie était contrôlée par les paramètres cliniques suivants : température rectale, couleurs des muqueuses, fréquences cardiaque et respiratoire. Les animaux étaient remis dans leur cage en fin d'expérimentation où ils étaient surveillés jusqu'au réveil et ne recevaient ni eau ni nourriture avant une reprise totale de la conscience.

1.5.4. Suivis biologique et clinique

Les examens cliniques et biologiques ont été réalisés tous les quinze jours puis tous les mois après traitement. L'examen clinique comprend :

- prise de la température rectale,
- examen des muqueuses,
- pesée,
- palpation des nœuds lymphatiques superficiels,
- mesure de la fréquence respiratoire,
- électrocardiogramme.

Du sang sur tube sec était prélevé pour les analyses biochimiques qui englobent le dosage des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT), de l'urée et de la créatinine, des protéines totales et de leur électrophorèse.

La numération et la formule sanguines ont été réalisées à partir de sang prélevé sur tube EDTA.

1.5.5. Suivi pharmacocinétique

Une étude pharmacocinétique a été réalisée pour le mégazol chez le mouton sain et pour la combinaison DFMO-Nifurtimox chez le vervet. Les détails concernant les temps et la nature des prélèvements, les techniques de dosage du mégazol et le traitement des résultats sont détaillés dans les articles correspondants. (article 1, pp90-108). La pharmacocinétique de la combinaison est en cours de réalisation.

1.6. Cytométrie en flux pour le typage lymphocytaire

1.6.1. Marquage des lymphocytes du sang total

Les lymphocytes du sang sont marqués à partir du sang total en vue d'être analysés par cytométrie en flux. Pour chaque patient, deux combinaisons de trois anticorps permettent le marquage (tableau 4). Pour chaque singe, on réalise 4 combinaisons d'anticorps en triple ou quadruple marquage (tableau 5). Le sang est prélevé sur tube EDTA chez les patients et les singes. Le sang des patients est dilué au demi dans un milieu de conservation (Cytocheck, Dako). Le sang des singes est analysé extemporanément. Au moment du marquage, le sang est réparti dans des microtubes à raison de 50 µL par combinaison. Les anticorps couplés à des fluorochromes (isothiocyanate de fluorescéine (FITC), Phycoérythrine (PE), Phycocyanine 5 (PC5), Allophycocyanine (APC)) sont ajoutés dans chaque tube selon la combinaison voulue (tableaux 5 et 6). Le contenu des tubes est légèrement agité puis incubé à température ambiante durant 15 à 20 minutes à l'abri de la lumière. Ensuite 1 mL de tampon de lyse des globules rouges ($\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$ 0,9mM, NH_4Cl 131mM) est ajouté dans chaque tube. Après ajout du tampon de lyse, les cellules sont incubées durant 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière, puis centrifugées. Le culot est ensuite lavé deux fois en PBS. En cas de mauvaise lyse (coloration rouge persistante), une deuxième lyse a été pratiquée selon le même protocole. Le culot de lymphocytes est ensuite fixé en présence de 250 µL de PBS à 4% de Cellfix (BD, France). Tous les anticorps ont été fournis par BD (France) à l'exception du CD25 clone 1HT44H3 qui a servi à marquer les lymphocytes des vervets, et qui a été fournis par Beckman Coulter (France).

Les échantillons étaient ensuite analysés au cytomètre (Facs Calibur, BD, France) dans un délai de 24 heures.

1.6.2. Marquage des lymphocytes du LCR

Immédiatement après prélèvement et lecture de la cytorachie, les lymphocytes du LCR étaient marqués en vue des analyses cytométriques. Pour cela, des anticorps couplés à des fluorochromes sont ajoutés à 100 µL de LCR (voir tableaux 4 et 5) et incubés 15 minutes à +4°C. Les échantillons ont été fixés par du CellFix (BD) à 10 %. La lecture pouvait alors s'effectuer dans les 5 jours suivants. Une série de contrôles isotypiques adaptés a été réalisée par jour de prélèvement (tableaux 7 et 8).

	FITC	PE	PC5
1	CD19 (clone n° J4.119)	CD56 (clone n° N901)	CD3 (clone n° UCHT1)
2	CD4 (clone n° 13B8.2)	CD25 (clone n° B1.49.9)	CD8 (clone n° B9.11)

Tableau 5 : Combinaisons 1 et 2 d'anticorps utilisés pour le marquage des lymphocytes du sang et du LCR chez les patients infectés

CD19 : marqueur des lymphocytes B ; CD3 : marqueur des lymphocytes T ; CD4, CD8 : marqueurs des sous-types de lymphocytes T ; CD56 : marqueur des cellules natural killer (NK) ; CD25 : marqueur d'activation des lymphocytes T ; FITC : isothiocyanate de fluorescéine, PE : Phycoérythrine, PC5 : Phycocyanine

	FITC	PE	PerCP	APC
1	CD3 clone FN18	CD56 clone MY31	CD20 clone L27	HLA-DR clone L243
2	CD45RA clone Leu-18	CD4 clone SK3	CD8 clone SK1	
3	CD3 clone FN18	CD28 clone L293	CD8 clone SK1	
4	CD3 clone FN18	CD25 clone 1HT44H3	CD8 clone SK1	HLA-DR clone L243

Tableau 6 : Combinaisons 1, 2, 3,4 d'anticorps utilisés pour le marquage des lymphocytes du sang et du LCR chez les singes verts infectés

CD20 : marqueur des lymphocytes B ; CD3 : marqueur des lymphocytes T ; CD4, CD8 : marqueurs des sous-types de lymphocytes T ; CD56 : marqueur des cellules natural killer (NK) ; HLA-DR : marqueur des lymphocytes B et des lymphocytes T activés ; CD45^{RA} : marqueur des lymphocytes T naïfs ; CD28, CD25 : marqueurs d'activation des lymphocytes T ; FITC : isothiocyanate de fluorescéine, PE : Phycoérythrine, PerCP : péricidin-chlorophylle-a-protéine, APC : Allophycocyanine

1.6.4. Réalisation de contrôles isotypiques

Les contrôles isotypiques ont été réalisés à chaque série de marquage (sang, lymphocytes isolés, LCR). Ils consistent à marquer les lymphocytes étudiés avec des anticorps dirigés contre des lymphocytes de souris de façon à apprécier le taux de fixation non spécifique. Pour cela, une série de combinaison est utilisée en fonction des marquages à réaliser. Les contrôles isotypiques permettent également d'effectuer les réglages individuels pour chaque fluorochrome.

	FITC	PE	PerCP
1	IgG1 souris	IgG1 souris	IgG1 souris
2	CD19 (clone n° J4.119)	IgG1 souris	IgG1 souris
3	IgG1 souris	CD4 clone SK3	IgG1 souris
4	IgG1 souris	IgG1 souris	CD8 clone SK1

Tableau 7 : Séries de contrôles isotypiques utilisés lors des marquages des lymphocytes du sang et du LCR de patients infectés.

FITC : isothiocyanate de fluorescéine, PE : Phycoérythrine, PerCP : périidin-chlorophylle-a-protéine

	FITC	PE	PerCP	APC
1	IgG1 souris	IgG1 souris	IgG1 souris	IgG2 souris
2	CD3 clone FN18	IgG1 souris	IgG1 souris	IgG2 souris
3	IgG1 souris	CD4 clone SK3	IgG1 souris	IgG2 souris
4	IgG1 souris	IgG1 souris	CD8 clone SK1	IgG2 souris
5	IgG1 souris	IgG1 souris	IgG1 souris	HLA-DR clone L243
6	IgG1 souris	IgG2A souris	IgG1 souris	IgG2 souris
7	CD3 clone FN18	IgG2A souris	IgG1 souris	IgG2 souris
8	IgG1 souris	CD25 clone 1HT44H3	IgG1 souris	IgG2 souris
9	IgG1 souris	IgG2A souris	CD8 clone SK1	IgG2 souris
10	IgG1 souris	IgG2A souris	IgG1 souris	HLA-DR clone L243

Tableau 8: Série de contrôles isotypiques utilisés pour les marquages des lymphocytes du sang et du LCR des singes verts infectés.

FITC : isothiocyanate de fluorescéine, PE : Phycoérythrine, PerCP : périidin-chlorophylle-a-protéine,
APC : Allophycocyanine

1.6.5. Lecture des échantillons : passage au cytomètre en flux

Les lymphocytes isolés du sang et du LCR marqués comme décrits précédemment ont été lus au cytomètre en flux (FacsCalibur, BD) en adaptant les réglages selon les contrôles

isotypiques. En résumé, un premier graphe taille/structure des lymphocytes (SSC (side scatter) = f (FSC (forward scatter)) a été réalisé afin de placer la fenêtre d'analyse exclusivement sur les lymphocytes. Puis la lecture des contrôles isotypiques a permis d'effectuer les réglages des ampérages de chaque fluorochrome ainsi que les compensations à ajuster en fonction des quatre couleurs utilisées. D'une manière générale, les réglages suivants ont été appliqués à la lecture des échantillons (tableaux 9a et 9b) :

a

Fluorochrome	Ampérages
FITC	620 à 650 A
PerCP	600 à 635 A
PC5	550 à 580 A
APC	480 à 520 A

b

% FL1 - %FL2	0,1 à 0,5 %
% FL2 - %FL1	25 à 28 %
% FL2 - %FL3	2,4 à 2,8 %
% FL3 - %FL2	12 à 15%
% FL3 - %FL4	5 à 7 %
% FL4 - %FL3	7 à 9%

Tableaux 9a et 9b : Réglage de l'ampérage de chaque fluorochrome (a) et des compensations entre les quatre couleurs (b) d'après les contrôles isotypiques avant lecture au cytomètre en flux.

FL1 = fluorochrome 1 (FITC), FL2 = fluorochrome 2 (PE), FL3 = fluorochrome 3 (PerCP, PC5), FL4 = fluorochrome 4 (APC)

1.6.6. Analyses des résultats de cytométrie en flux

Après lecture, les résultats ont été analysés grâce au logiciel CellQuest Pro (BD, France). Plusieurs graphes ont été créés :

SSC = f(FSC) afin de placer la fenêtre sur les lymphocytes (fenêtre R)

FL2 = f(FL1)

FL3 = f(FL2)

FL3 = f(FL1)

FL1 = f(FL4)

FL2 = f(FL4)

FL3 = f(FL4)

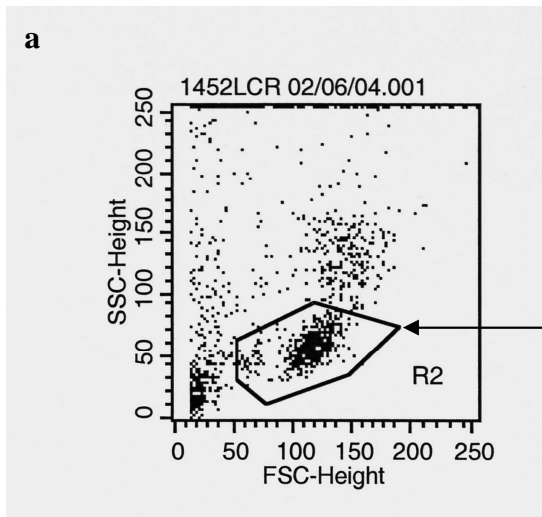
Tous les graphes ont ensuite été centrés sur R. La barre de statistiques a été positionnée sur les graphes en fonction des contrôles isotypiques afin de déterminer les populations négatives, simplement et doublement positives. A partir de là, les pourcentages de populations lymphocytaires positives pour un type de marquage ont été définis dans les cadrans statistiques (figure 9 page 89).

1.7. Analyses statistiques

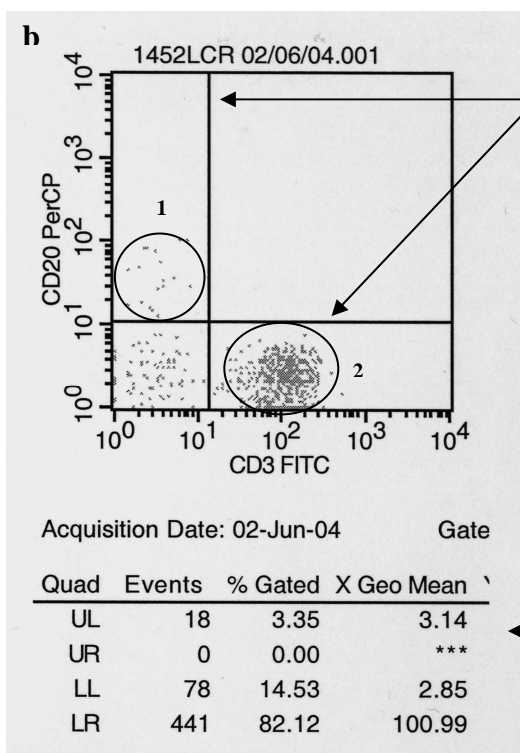
Les analyses statistiques ont été réalisées en collaboration avec le Professeur Boutros-Toni, unité de biostatistiques, Faculté de Médecine de Limoges.

Chez l'homme, les différentes populations lymphocytaires du sang et du LCR ont été étudiées statistiquement selon les stades de la maladie : stade 1, stade intermédiaire et stade 2. Pour cela, un test de Mann-Whitney a été utilisé pour chacun des sous-types lymphocytaires et a été considéré comme significatif pour $p < 0,05$.

L'évolution des populations lymphocytaires du sang et du LCR des singes verts a été étudiée en fonction du temps et de la cytorachie. Un test de régression simple a été effectué pour chaque sous-type lymphocytaire en fonction des jours après infection et de la cytorachie. Lorsque p était inférieur à 0,05 entre deux paramètres, un test de Spearman a alors été pratiqué pour confirmer les résultats qui ont alors été considérés significatifs si ce test apportait à nouveau un $p < 0,05$. Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel StatView (SAS Institute INC., USA).



Fenêtre centrée sur les lymphocytes déterminés par leur taille (SSC) et leur structure (FSC)



Barres de statistiques qui déterminent les cadrans supérieurs gauche et droit (UL et UR) et inférieurs gauche et droit (LL et LR)

1. Populations lymphocytaires positives pour le marquage dans le cadran supérieur gauche donc pour le CD20

2. Populations lymphocytaires positives pour le marquage dans le cadran inférieur droit donc pour le CD3

Statistiques indiquant le pourcentage de cellules dans chaque cadran par rapport à la population totale comptabilisée dans R

Figure 9 : (a) Fenêtre d'identification des lymphocytes lors de l'analyse des résultats de cytométrie. (b) exemple de résultats obtenus après marquage des lymphocytes dans le LCR d'un vervet infecté par *T. b. gambiense* et lecture au cytomètre en flux.

2. Résultats

2.1. Plasma kinetics and efficacy of oral megazol treatment in infected sheep with *Trypanosoma brucei brucei* (article 1) (voir annexe 2).

(Vet Parasitol, envoyé le 21/08/03, accepté le 09/02/04. 2004 May 26; 121 (3-4): 213-223).

Caroline BODA, Bertin ENANGA, Hélène DUMET, Gérard CHAUVIERE, François LABROUSSE, Claude COUQUET, Sylvie SAIVIN, Georges HOUIN, Jacques PERIE, Michel DUMAS, Bernard BOUTEILLE

RESUME

Un modèle de mouton infecté expérimentalement par *T. b. brucei* avait été validé précédemment. Nous avons utilisé ce modèle pour tester l'efficacité du mégazol sur onze moutons infectés. Dès l'apparition de la parasitémie, 11 jours après infection, le mégazol a été administré par voie orale en cure unique de 40 mg/kg ou 80 mg/kg. Après une période de guérison transitoire, tous les animaux ont rechuté dès le 2^{ème} jour post-traitement, à l'exception de deux d'entre eux qui ont été considérés comme guéris 150 jours après traitement et n'ont présenté aucun signe de rechute après une période de suivi de 270 jours. Afin de comprendre l'échec du mégazol à traiter tous les moutons infectés en phase lymphatico-sanguine, une étude pharmacocinétique du mégazol a été conduite. Les concentrations plasmatiques, mesurées par chromatographie liquide 8 heures après le traitement chez les moutons infectés, se sont révélées très faibles, sauf chez les animaux guéris, suggérant une mauvaise absorption orale du mégazol. Le profil plasmatique du mégazol mesuré chez des moutons sains traités par une dose unique de 80 mg/kg confirme une absorption rapide et faible du mégazol associée à une demi-vie courte. De plus, les propriétés pharmacocinétiques du mégazol sont l'objet d'une grande variation individuelle. Ces données suggèrent que l'échec thérapeutique du mégazol est relatif à la faible biodisponibilité orale du produit chez le mouton. Ainsi, le mégazol est un bon traitement pour guérir l'infection à *T. b. brucei* chez le mouton mais la voie orale n'est pas toujours efficace chez cette espèce.

**Plasma kinetics and efficacy of oral megalol treatment
in *Trypanosoma brucei brucei*-infected sheep**

Caroline BODA^{1*}, Bertin ENANGA¹, Hélène DUMET², Gérard CHAUVIERE³,
François LABROUSSE⁴, Claude COUQUET², Sylvie SAIVIN⁵, Georges HOUIN⁵,
Jacques PERIE³, Michel DUMAS¹, Bernard BOUTEILLE¹

^{1,*} Institut d'Epidémiologie Neurologique et de Neurologie Tropicale (EA3174),
Faculté de Médecine, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 LIMOGES, France

² Laboratoire Départemental d'Analyses et Recherches Vétérinaires de la Haute-Vienne,
av Prof Joseph de Léobardy 87000 LIMOGES cedex, France

³ Groupe de Chimie Organique Biologique UMR-CNRS 5068, Université Paul Sabatier,
118 Route de Narbonne, Bât. IIR1-B2, 31062 TOULOUSE cedex 4, France

⁴ Laboratoire d'anatomie pathologique, CHU Dupuytren
2 av Martin Luther King 87042 LIMOGES cedex, France

⁵ Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie Clinique, CHU Rangueil-Larrey,
1 av Prof Jean Poulhes 31403 TOULOUSE, France

*** Corresponding author**

Institut d'Epidémiologie et de Neurologie Tropicale, 02, rue du Dr. Marcland, 87025
Limoges, cedex, France

Tel : + 33 5 55 43 58 20

Fax : +33 5 55 43 58 21

E-mail : caroboda@yahoo.fr

Abstract

Experimentally infected sheep have been previously developed as an animal model of trypanosomiasis. We used this model to test the efficacy of megazol on eleven *Trypanosoma brucei brucei*-infected sheep. When parasites were found in blood on day-11 post-infection, megazol was orally administered at a single dose of 40 mg/kg or 80 mg/kg. After a transient aparasitaemic period, all animals except two relapsed starting at day-2 post-treatment, which were considered as cured on day-150 post-treatment and showed no relapse after a follow-up period of 270 days. In order to understand the high failure of megazol treatment to cure animals, a kinetic study was carried out. Plasma concentrations of megazol determined, by reverse-phase high-performance liquid chromatography at 8 h post-treatment in these animals, were lowered, suggesting slow megazol absorption, except in cured animals. However, megazol plasma profiles in uninfected sheep after a single oral dose of megazol showed a fast and megazol lowered absorption associated with a short plasma half-life of drug. Inter-individual variation of megazol pharmacokinetic properties was also observed. These findings suggested that the high failure rates of megazol treatment were related to poor drug availability after oral administration in sheep. In conclusion, megazol could cure sheep with *T. b. brucei* infection but oral administration was not an effective route.

Keywords: sheep, *Trypanosoma brucei brucei*, megazol, kinetics, plasma, milk, cerebrospinal fluid.

2.2. Methylene blue: evidence for *in vitro* efficiency and *in vivo* failure in trypanocidal activity (article 2)

(soumis à “Chemotherapy” le 01 octobre 2004)

Caroline Boda, Bertin Enanga, Bertrand Courtioux, Christian Breton, Bernard Bouteille

RESUME

La trypanosomose humaine africaine représente toujours un problème de santé majeur public en raison du peu de molécules thérapeutiques disponibles et de leur potentielle toxicité. Cette maladie, qui concerne également les animaux, est responsable de pertes économiques importantes et son caractère zoonotique complique le contrôle des foyers. Il est urgent de développer de nouveaux trypanocides peu toxiques et faciles d'emploi. Le bleu de méthylène, utilisé en thérapie humaine et vétérinaire, remplit ces conditions. De plus, son pouvoir anti-protozoaire a été mis en évidence dans l'inhibition enzymatique chez le *Plasmodium*. Dans ce travail, nous avons testé l'activité trypanocide du bleu de méthylène *in vitro* qui donne des IC50 encourageantes sur *T.b.gambiense* MBA et *T.b.brucei* AnTat 1.9. Malheureusement, le bleu de méthylène ne permet pas la guérison de souris infectées et traitées par deux administrations séparées de 24H, soit par voie orale à 300mg/kg/jour soit par voie intrapéritonéale à 200mg/kg/jour. Toutes les souris traitées ont rechuté et sont décédées dans la semaine suivant le traitement. Des hypothèses sont émises afin d'expliquer une telle différence d'efficacité entre les essais *in vitro* et *in vivo*. Cependant, le mécanisme d'action trypanocide et le métabolisme *in vivo* du bleu de méthylène méritent d'être étudiés plus profondément afin d'améliorer son pouvoir trypanocide *in vivo*.

Methylene blue: evidence for *in vitro* efficiency and *in vivo* failure in trypanocidal activity

Caroline Boda, Bertin Enanga, Bertrand Courtioux, Christian Breton, Bernard Bouteille

UPRES- EA 3174 Neuroparasitologie et Neuroépidémiologie tropicale

Institut d'Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale, Faculty of Medicine,
02, rue du Dr. Marcland, 87025 LIMOGES Cedex

Trypanocidal activity of methylene blue

Corresponding author: Caroline Boda

Tél: 0555435820

Fax: 0555435821

Mail: caroboda@yahoo.fr

ABSTRACT

Human African Trypanosomiasis remains a health problem difficult to treat because of the few molecules available nowadays and their toxicity. The disease also concerns animals and is responsible for economic difficulties and zoonotic risks. There is an urgent need to develop new drugs for treatment of African trypanosomiasis. Methylene blue is a safe and easy-to-use drug, employed in human therapies. It is also known to act as an enzymatic inhibitor on *Plasmodium* since Ehrlich studied its anti-malarial activity. In this work, methylene blue trypanocidal activity was found *in vitro* but failed to cure trypanosomal infection in mice when administrated at 300 mg/kg *per os* and at 200 mg/kg intra-peritoneally. Mice from both groups relapsed and died within one week after treatment. Differences between *in vitro* and *in vivo* activities are discussed. However, trypanocidal mechanism of action of methylene blue deserves to be deeply studied in order to improve its efficiency *in vivo*.

KEY WORDS

Trypanosoma brucei brucei, *Trypanosoma brucei gambiense*, methylene blue, IC50, mice.

2.3. Effectiveness of megazol and megazol-suramin combination on *Trypanosoma brucei gambiense* infection in vervet monkeys (article 3, en préparation)

RESUME

Les traitements actuels contre la trypanosomose humaine africaine sont peu satisfaisants en raison des effets toxiques qu'ils provoquent et de l'émergence de résistances. Il est indispensable de développer de nouvelles molécules thérapeutiques, telle que le mégazol qui possède des effets prometteurs *in vitro* et chez la souris. Dans cette étude, nous avons testé la posologie efficace pour le traitement de primates non-humains, les vervets (*Cercopithecus aethiops*), infectés par *Trypanosoma brucei gambiense*. Les animaux en phase lymphatico-sanguine ont reçu 100mg/kg/jour de mégazol par voie orale, en une prise ou 3 jours de suite. En phase nerveuse, un animal a été traité par une dose de 100mg/kg de mégazol suivie 15 minutes plus tard par une dose de 20mg/kg de suramine en intra-veineuse

Chez tous les animaux traités, la parasitémie a disparu rapidement et la cytorachie est redevenue normale, de même que les paramètres biologiques et cliniques sont retournés dans les normes. Tous les singes ont été considérés guéris après un suivi de deux ans sans rechute. Ces résultats montrent qu'une dose unique de mégazol est suffisante pour traiter une infection lymphatico-sanguine à *T.b.gambiense*. Dans le cas d'une atteinte nerveuse, l'association du mégazol administré par voie orale 15 minutes avant l'administration de la suramine permet d'obtenir une guérison complète. Ces données sont encourageantes pour poursuivre le développement du mégazol seul ou en association.

ABSTRACT

Current chemotherapy for human African trypanosomiasis (HAT), or sleeping sickness, is unreliable, because of resistance and toxic adverse side-effects. There is an urgent need to find out new trypanocidal drugs. Megazol is among the most promising compounds identified to cure trypanosomiasis.

In this study, we tested the efficacy of megazol on *Trypanosoma brucei gambiense* infection in vervet monkeys, *Cercopithecus aethiops pygerethrus*. Infected monkeys in the hemolymphatic phase were treated with a single dose or with three repeated doses of megazol (100 mg/kg, *per os*) and in the meningoencephalitic phase with one dose of megazol followed 15 minutes later by a single dose of suramin (20 mg/kg, intravenously).

In all treated animals, trypanosomes were quickly cleared from blood as well as from the cerebrospinal fluid (CSF), biological and clinical disorders disappeared the first week post-treatment. All treated monkeys were considered to be cured and were alive without any signs of relapse.

These results suggest that a single dose of megazol is effective on the first stage of *T. b. gambiense* infection in vervet monkeys and when the central nervous system (CNS) is involved, the chemotherapy regimen of megazol combined with suramin is efficient. Further studies using megazol alone when CNS is involved will be useful.

Keywords: Megazol, suramin, human African trypanosomiasis (HAT), *Trypanosoma brucei gambiense*, *Cercopithecus aethiops pygerethrus*

2.4. Essai thérapeutique de la combinaison DFMO-Nifurtimox chez le singe vert infecté par *T. b. gambiense* en phase nerveuse

2.4.1. Protocole

Nous avons réalisé cette étude à partir de huit vervets, sept mâles et une femelle. Cinq des animaux appartenaient au CIRMF (Gabon) et les trois autres provenaient du CERMES (Niamey, Niger).

Les animaux ont été infectés par *Trypanosoma brucei gambiense* MBA à raison de 10^4 parasites par voie intra-veineuse, puis nous avons effectué des prélèvements de sang et de LCR toutes les deux semaines afin de procéder aux analyses parasitologiques. La phase nerveuse était confirmée par au minimum l'un des critères suivants :

- observation de parasites dans le LCR à l'aide de la cellule de Kova
- cytorachie supérieure à 100 cellules/ μ L dans deux prélèvements consécutifs, en l'absence de globules rouges
- mauvais état général avec signes nerveux marqués (abattement, cachexie, prostration, parésie, état de somnolence, crises convulsives)

Une fois le stade nerveux confirmé, les animaux ont été traités et les suivis clinique, parasitologique et biochimique ont été poursuivis toutes les deux semaines.

Le tableau 10 page 149 récapitule les animaux ayant participé à l'étude ainsi que les modalités des différents traitements.

2.4.2. Résultats

Le modèle du singe vert pour l'étude de la trypanosomose humaine africaine avait précédemment été validé et nous l'avons reproduit dans cette étude afin de compléter les données précédemment obtenues, mais surtout de l'utiliser dans l'essai thérapeutique de la combinaison DFMO-nifurtimox.

Après infection, la parasitémie est apparue dans les 10 premiers jours. Selon les animaux, elle s'est ensuite maintenue durant plusieurs semaines successives ou est apparue de façon fluctuante.

Une anémie (hémoglobine < 12 g/dL) accompagnée d'une chute de l'hématocrite (< 40%) est apparue chez les animaux V13, V18, V19, VCA4, V1452 et V1421F à partir du

Identification des singes		V12	V13	V16	V18	V19	V1421F	VCA4	V1452
Sexe		Mâle	Mâle	Mâle	Mâle	Mâle	Mâle	Mâle	femelle
Poids avant traitement (kg)		5,1	4,3	5,5	3	2,6	2,9	6,8	2,6
Traitement reçu	DFMO 100 mg/kg 2X/j + nifurtimox 5 mg/kg 2X/j 8 jours (traitement 1)	NT			+	+	NT	+	+
	DFMO 100 mg/kg 2X/j + nifurtimox 5 mg/kg 2X/j 15 jours (traitement 2)	NT	+	+			NT		
	Administration (jours après infection)		175	159	87	157		77	98
LCR 10 jours avant traitement	Cytorachie (cellules/ μ L)		170	78	330	134		1150	44
	Présence de trypanosomes		non	oui	non	oui		Oui	oui
Rechute	Jours après la fin du traitement		-	1	-	-		25	17
2^{ème} traitement	Arsobal [®] , 3X 3 injections de 3,3mg/kg, IV (traitement 1*)							+	+
	mégazol, 100mg/kg/jour, 3 jours <i>po</i> (traitement 2*)			+					
Décès	Jours après infection		-	-	-	-		-	130
Survie	Mois après traitement		3	3	6	3,5	2	5	0

Tableau 10: Récapitulatif de l'évolution de l'infection à *T. b. gambiense* et des traitements administrés chez les vervets.

NT : non traités

11^{ème} jour après infection, les autres animaux (V12 et V16) ayant conservé un taux d'hémoglobine supérieur à 13 g/dL.

La température corporelle s'est révélée supérieure à 38°C tout au long de l'infection, sans différence avec la température avant infection.

Une faible variation transitoire de poids a été notée chez les animaux V12 et V18. Les autres animaux ont conservé un poids stable durant l'infection.

Une adénopathie, localisée au niveau des nœuds lymphatiques inguinaux et/ou axillaires, a pu être mise en évidence à partir de la 6^{ème} semaine post-infection chez tous les animaux.

Aucune modification des rythmes cardiaque et respiratoire n'a pu être observée. Les électrocardiogrammes pratiqués n'ont révélé aucune anomalie du rythme cardiaque.

La cytorachie était comprise entre 0 et 5 cellules/ μ L durant les 6 premières semaines de l'infection chez tous les animaux. Des fluctuations importantes de la cytorachie ($>$ à 6 cellules/ μ L de LCR puis à nouveau $<$ à 6 cellules/ μ L de LCR) sont apparues chez les animaux V12, V13, V19, V1421F et V16 avant que la phase nerveuse ne soit confirmée. L'apparition de trypanosomes dans le LCR et/ou d'une cytorachie supérieure à 100 cellules/ μ L a été observée la première fois à partir du 53^{ème} jour post-infection chez un animal (VCA4), puis à 68, 81, 151, 151 et 167 jours post-infection chez les animaux V18, V1452, V16, V19 et V13 respectivement. Les animaux VCA4 et V18 sont donc entrés en phase nerveuse très rapidement (confirmée par les analyses biologiques) alors que V1452, V16, V19 et V13 sont d'abord passés par un stade intermédiaire avec augmentation légère de la cytorachie en l'absence de trypanosomes.

Après traitement, la cytorachie des animaux V13, V16, V18 et V19 a diminué par rapport au début du traitement alors que la cytorachie du VCA4 a augmenté. En raison de difficultés de prélèvements, la cytorachie du singe V1452 n'a pu être vérifiée en fin de traitement. Huit mois après infection, deux singes (V12 et V1421F) ont une cytorachie à nouveau inférieure à 5 cellules/ μ L, sans trypanosome, après être passé par une phase intermédiaire, et sont considérés en phase lymphatico-sanguine (figures 10 et 11).

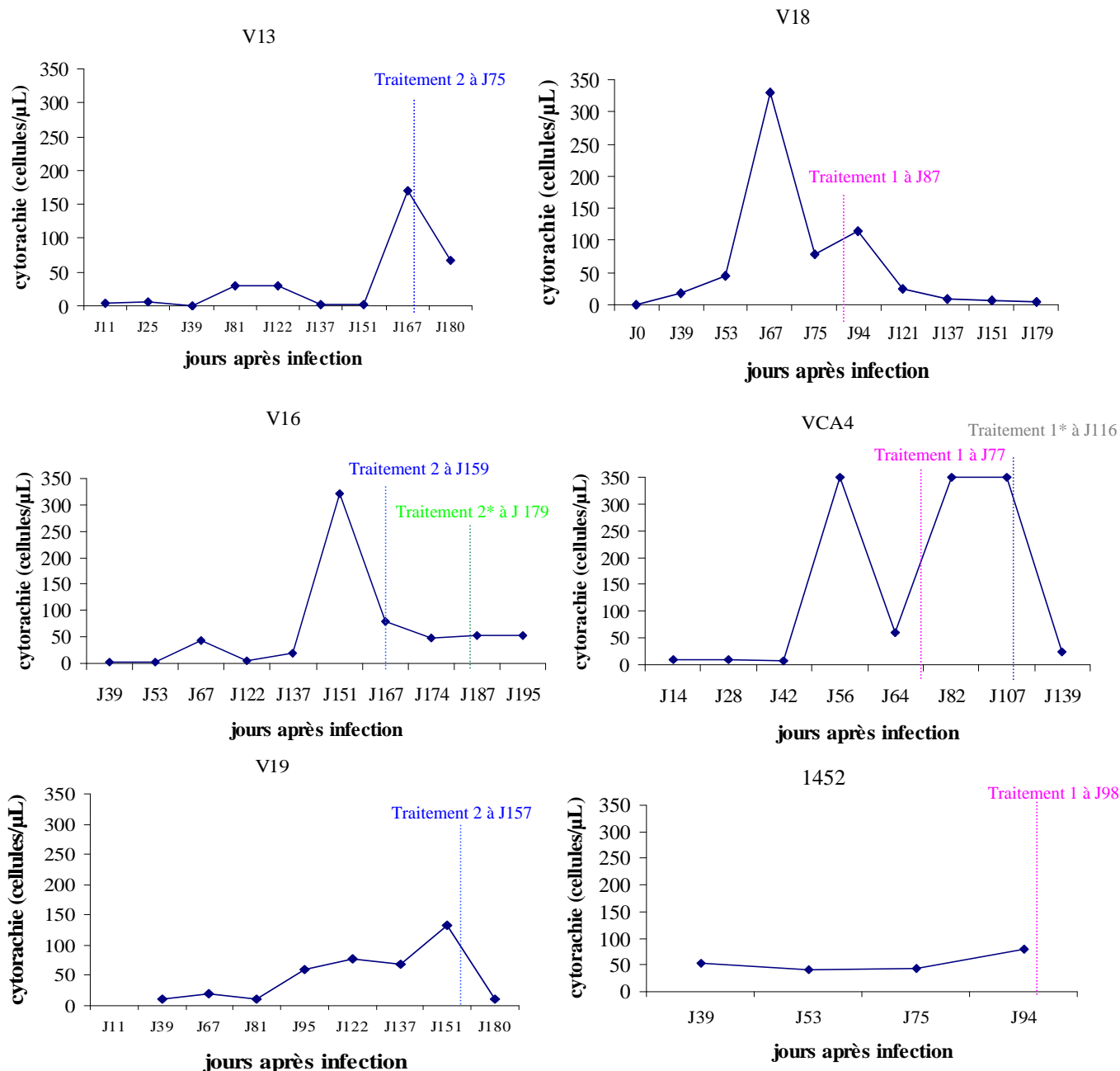


Figure 10 : Evolution de la cytorachie chez les singes verts infectés par *T. b. gambiense* avant et après traitement.

Les traits en pointillés indiquent le jour du début du traitement. **Traitement 1** : 100 mg/kg de DFMO + 5 mg/kg de nifurtimox, voie orale, matin et soir, 8 jours. **Traitement 2** : 100 mg/kg de DFMO + 5 mg/kg de nifurtimox, voie orale, matin et soir, 15 jours. **Traitement 1*** : Administré suite à une rechute. 3,3 mg/kg de mélarsoprol, voie intra-veineuse, 3 jours. 3 séries de 3 séparées par dix jours de repos. **Traitement 2*** : Administré suite à une rechute. 100 mg/kg de mégazol/jour, voie orale, 3 jours.

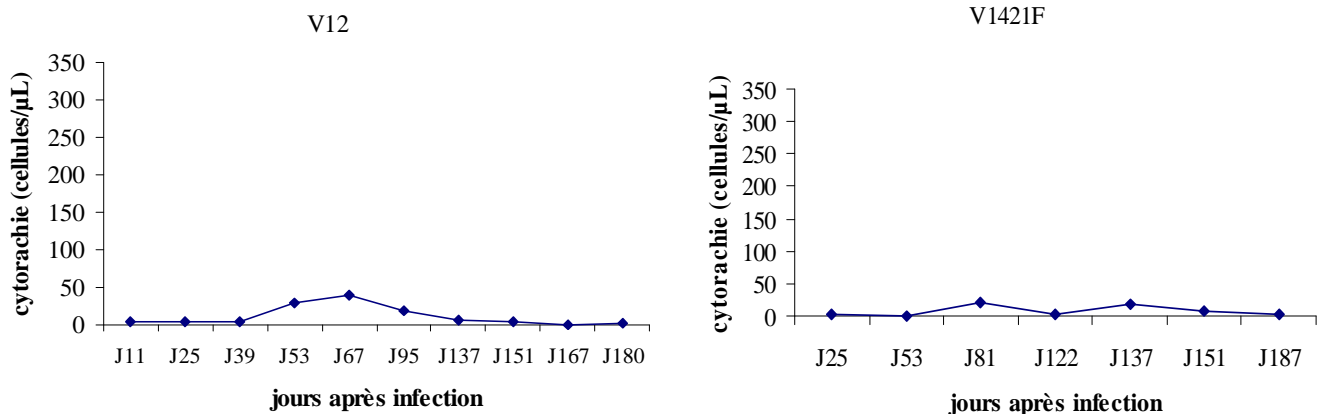


Figure 11 : Evolution de la cytorachie des deux singes infectés par *T. b. gambiense* non traités

La prise de traitement dans l'alimentation n'a posé aucun problème et a été surveillée pour chaque singe et à chaque prise alimentaire.

Le DFMO donné à 200 mg/kg/jour et le nifurtimox donné à 10 mg/kg/jour, fractionnés en deux prises journalières pendant 8 jours, ont permis la guérison de deux animaux (V18 et V19) qui n'ont pas présenté de rechute 5 mois après la fin du traitement. La parasitémie avait disparu au quatrième jour du traitement et la cytorachie est redevenue normale 2 mois après la fin du traitement. Les deux autres singes traités par ce même protocole (VCA4 et V1452) ont rechuté 26 et 39 jours respectivement après la fin du traitement. Les manifestations cliniques ont montré des signes d'atteinte nerveuse avec apathie, épisodes de somnolence et parésie flasque ascendante. Le VCA4 présentait une cytorachie de 433 cellules/μL en l'absence de trypanosomes dans le LCR. La ponction lombaire n'a pu être réalisée pour le V1452.

Les deux animaux ont alors été traités par l'Arsobal, ce qui a permis une guérison du singe VCA4 et une baisse de la cytorachie, alors que le singe V1452 est décédé avant la troisième série d'injections d'Arsobal.

A 171 et 159 jours après infection, deux animaux ont été traités par le DFMO à 200 mg/kg/jour et le nifurtimox à 10 mg/kg/jour fractionnés en deux prises journalières, pendant 15 jours. Le V13 n'a présenté aucune rechute clinique, 6 semaines après la fin du traitement, sans aucune parasitémie ni trypanosomes dans le LCR en fin de traitement. En revanche, des trypanosomes ont été détectés dans le sang et le LCR du singe V16 le dernier jour du traitement. Sa cytorachie était de 48 cellules/μL. Le singe V16 a alors été retraité par le mégazol, à 100 mg/kg/jour par voie orale durant trois jours. A la fin du traitement au mégazol,

les trypanosomes étaient absents du sang et du LCR et le V16 n'a présenté aucune rechute clinique 3 mois après traitement par le mégazol (tableau 10).

2.5. Etudes des modifications immunologiques dans le sang et le LCR de patients infectés par *T. b. gambiense*

2.5.1. Protocole

La méthode de cytométrie en flux n'ayant jamais été utilisée chez des patients atteints de THA, nous avons réalisé cette étude préalable afin de nous assurer de sa faisabilité sur le terrain. Ce travail a également permis d'observer les variations intéressantes qui se produisent dans les sous-types lymphocytaires du sang et du LCR au cours de la maladie.

L'objectif est d'utiliser par la suite la cytométrie en flux chez un modèle animal de THA afin de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et de tenter de mettre en évidence un critère diagnostique spécifique et précoce. Il était donc nécessaire, d'une part, d'évaluer la faisabilité de la technique sur le terrain, en vue d'une application future au cours des prospections, et d'autre part de se rendre compte de l'intérêt de cette technique dans l'étude des THA.

Pour cela, les patients des prospections ont été inclus dans l'étude, après avoir signé un consentement éclairé, et classés en stade selon les critères précédemment décrits. Ainsi, nous avons pu disposer du sang de 2 patients en stade 1, 6 patients en stade intermédiaire et 9 patients en stade 2. Pour le marquage des LCR, nous avons pu obtenir le LCR d'un des 2 patients en stade 1, de 3 des 6 patients en stade intermédiaire et de 8 des 9 patients en stade 2. Les analyses ont été réalisées au Centre de Recherche Médicale de Franceville à l'aide d'un cytomètre en flux (FacsCalibur, BD, France).

Etant donné qu'aucun typage lymphocytaire n'avait été effectué précédemment pour cette pathologie, nous avons choisi des marqueurs lymphocytaires qui représentent les principales populations de lymphocytes: les lymphocytes B (CD19), les lymphocytes T (CD3) et leurs sous-types (CD4, CD8), les marqueurs d'activation (CD25) et les cellules Natural Killer (CD56) afin de suivre leur évolution au cours de l'infection.

Ces marquages ont été réalisés d'une part sur des LCR contenant très peu de lymphocytes (1 cellule/ μ L) et d'autre part dans des conditions de travail et de conservation sur le terrain en Afrique, qui sont très éloignées de celles dont on dispose dans un laboratoire.

Nous avons pu obtenir des données exploitables qui sont présentées ci-dessous. Bien que le nombre de patients soit encore insuffisant, nous avons malgré tout choisi une représentation des résultats sous forme d'histogrammes afin d'en faciliter la compréhension et de représenter visuellement les valeurs obtenues dans chaque groupe étudié.

2.5.2. Typage lymphocytaire dans le sang

Les différents sous-types lymphocytaires (lymphocytes B, lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et leur état d'activation marqué par la présence du CD25, cellules natural killer NK) n'ont pas permis de mettre des différences en évidence en fonction des stades de la maladie. Parmi les lymphocytes T, la sous population de CD4⁺ représente $30,7 \pm 2,1$ % et la sous-population de CD8⁺ $28,1 \pm 9,1$ %, tous stades confondus. Une augmentation des CD8 est observée dans le stade intermédiaire (figure 12).

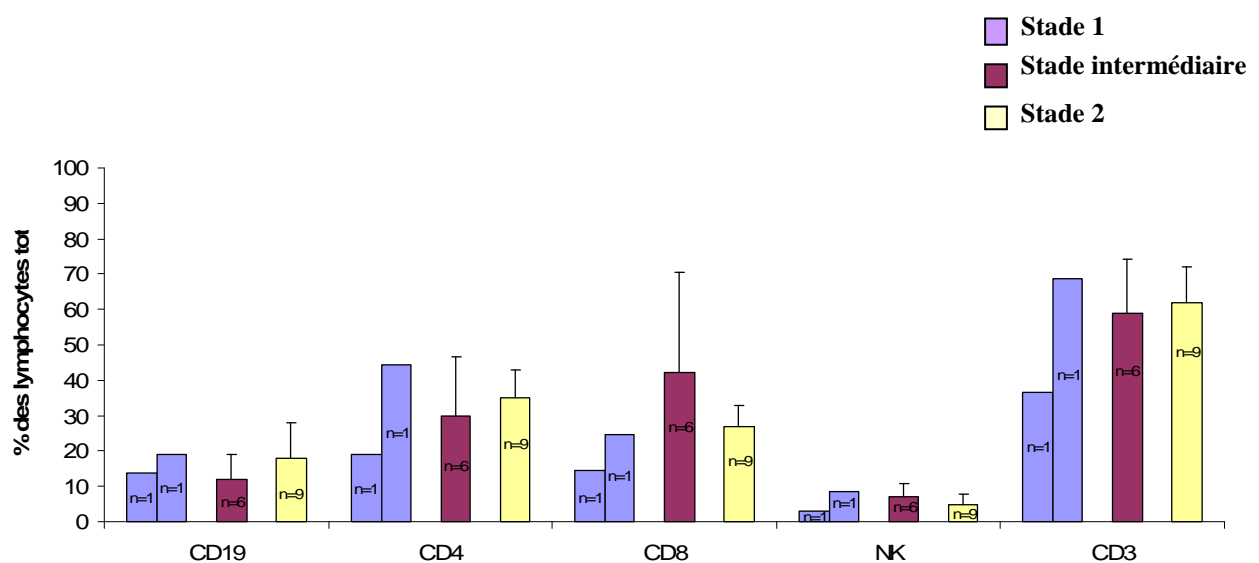


Figure 12: Proportions des lymphocytes B et T et des cellules natural killer dans le sang de patients atteints de trypanosomose africaine à différents stades

Le typage lymphocytaire a été réalisé par cytométrie en flux d'après le sang de patients en stade 1 (n = 2), stade intermédiaire (n = 6) et stade 2 (n = 9). L'effectif n est inscrit sur chaque histogramme. Chaque histogramme représente la moyenne du groupe ou les valeurs individuelles lorsque n est inférieur à 3. Les écart-types sont représentés par les barres supérieures.

2.5.3. Typage lymphocytaire dans le LCR

Les analyses lymphocytaires du LCR des patients infectés ont permis de mettre en évidence une augmentation significative des lymphocytes B entre le stade intermédiaire et le stade 2 ($p= 0,02$).

Les autres marqueurs de sous-types lymphocytaires (lymphocytes T $CD3^+$, $CD4^+$ et $CD8^+$, cellules natural killer) n'ont présenté aucune différence entre les trois stades (voir figure 13). Dans tous les stades, les lymphocytes T $CD4^+$ sont majoritaires ($58,8 \pm 19,2 \%$) par rapport aux $CD8^+$ ($10,3 \pm 4,5 \%$) (figure 11). Aucune activation n'a pu être mise en évidence sur les lymphocytes T dans les 3 stades.

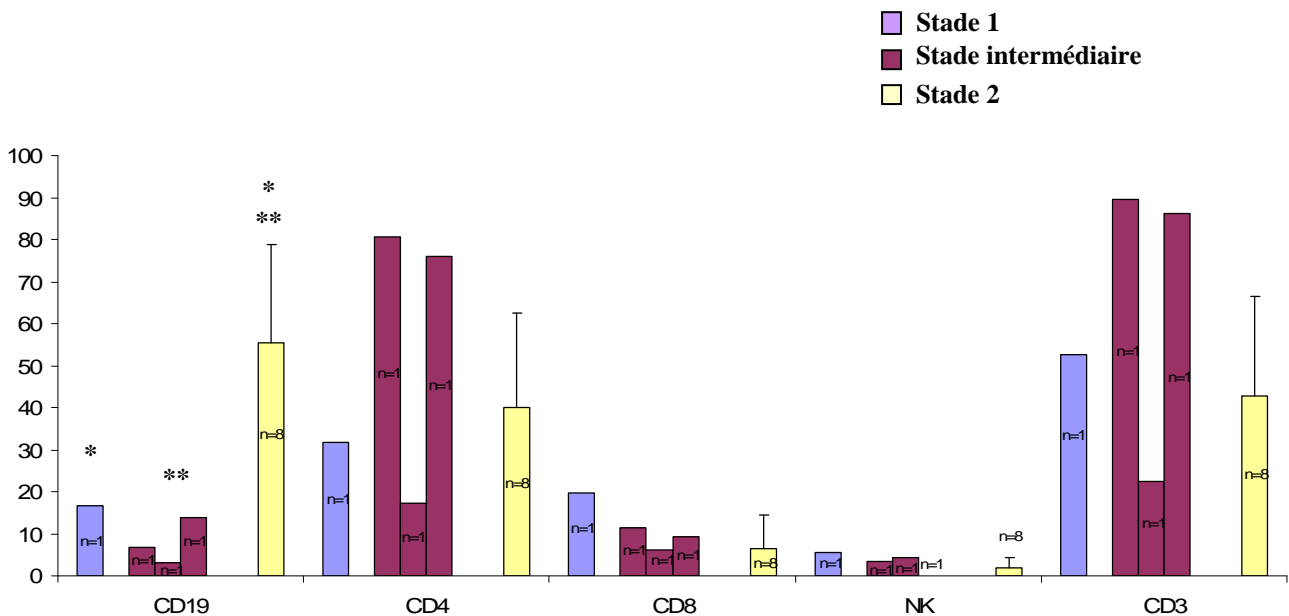


Figure 13 : Proportions de lymphocytes B et T dans le LCR de patients atteints de trypanosomose africaine à différents stades.

Les différences significatives entre les stades sont indiquées par des astérisques. Le typage des lymphocytes a été réalisé par cytométrie en flux d'après le LCR d'un patient en stade 1, et de patients en stade intermédiaire ($n = 3$) et stade 2 ($n = 8$). L'effectif n est inscrit sur chaque histogramme. Chaque histogramme représente la moyenne du groupe ou les valeurs individuelles lorsque n est inférieur à 3. Les écart-types sont représentés par les barres supérieures.

2.5.4. Différences entre les types lymphocytaires du sang et du LCR chez les patients atteints de trypanosomose africaine

Dans le sang, aucune différence significative des types lymphocytaires n'a pu être mise en évidence selon le stade de la maladie. Dans le LCR, on note une augmentation des lymphocytes B significative entre le stade 2 et le stade intermédiaire. L'état d'activation des lymphocytes T recherché par les marqueurs CD25 et CD28 n'a pas montré de différence entre les trois stades de la maladie ni dans le sang ni dans le LCR. Quel que soit le stade de l'infection, le rapport CD4/CD8 ne change pas dans le LCR alors qu'il est inversé dans le sang des patients en stade intermédiaire.

2.6. Etudes des modifications immunologiques dans le sang et le LCR de singes infectés par *T. b. gambiense*

2.6.1. Protocole

L'utilisation du vervet pour les études anatomopathologiques et thérapeutiques a déjà montré l'intérêt de ce modèle. Nous avons donc choisi d'approfondir l'étude de la THA chez le vervet d'un point de vue immunologique en réalisant les typages des lymphocytes du sang et du LCR au cours d'une infection expérimentale. Les mises au point techniques de la cytométrie en flux et les résultats précédemment obtenus chez l'homme nous ont donné de bonnes indications pour réaliser ce travail.

L'analyse cytométrique a été réalisée sur le LCR pour tous les singes ayant été infectés au cours de l'essai thérapeutique de l'association DFMO-nifurtimox, lorsque le prélèvement était possible. En effet, il est très difficile de réaliser des ponctions lombaires chez le singe vert. Ainsi, les LCR visiblement hémorragiques ou contenant plus de 500 hématies/ μ L étaient systématiquement écartés du protocole. De plus, les quantités de LCR prélevées étaient parfois très faibles et insuffisantes pour une analyse de cytométrie en flux. Ceci explique qu'à un temps donné, les analyses de cytométrie n'étaient pas réalisées sur tous les singes mais seulement chez ceux dont la ponction lombaire avait été possible et avait permis d'obtenir un LCR satisfaisant en qualité et en quantité (tableau 11 page 159). Les analyses ont eu lieu dans

le sang avant infection et avant traitement et dans le LCR mais n'ont pu être poursuivies après traitement pour des raisons techniques liées au cytomètre.

Le choix des marqueurs lymphocytaires n'a pu être décidé librement mais a été imposé par le peu d'anticorps disponibles pour les analyses de cytométrie chez le vervet. En effet, les anticorps utilisés reconnaissent les marqueurs humains et croisent avec ceux des lymphocytes de vervets d'après la littérature. Nous avons cependant essayé de reproduire chez le singe les analyses effectuées chez l'homme.

		V12	V13	V16	V18	V19	V1421F	VCA4	V1452
J11	Cytorachie (cellules/ μ L)	5	3	-	H	H	H	10	H
	LB (%)	0,9	0					H	
	CD8-CD45RA (%)	2,3	3,7						
J25	Cytorachie (cellules/ μ L)	5	6	-	-	-	2	9	-
	LB (%)	H	0,8				H	H	
	CD8-CD45RA (%)		3,9						
J39	Cytorachie (cellules/ μ L)	5	0	2	19	11	-	6	54
	LB (%)	0,8	-	H	0,9	1,6		0,6	1,3
	CD8-CD45RA (%)	4,1			5,2	7		7,4	3,4
J53	Cytorachie (cellules/ μ L)	30	-	3	44	-	H	1150	42
	LB (%)	4,7		H	3,3			1,3	1,9
	CD8-CD45RA (%)	-			5,1			5,5	0,2
J67	Cytorachie (cellules/ μ L)	40	-	43	330	21	-	61	-
	LB (%)	4,1		0,6	3,1	1,1		-	
	CD8-CD45RA (%)	10,9		7,3	11,9	-			
J81	Cytorachie (cellules/ μ L)	-	30	-	-	11	21	530	44
	LB (%)		H			1,8	-	-	3,3
	CD8-CD45RA (%)					7,8	-	-	4,2
J95	Cytorachie (cellules/ μ L)	19	-	-	115	60	-	-	H
	LB (%)	7,4				1,3			
	CD8-CD45RA (%)	6,5				6,6			
J122	Cytorachie (cellules/ μ L)	-	25	5	24	78	3	-	-
	LB (%)		H	0,4		5	-		
	CD8-CD45RA (%)			13,3		-			

Tableau 11 : Récapitulatif des prélèvements de LCR et des résultats principaux de l'analyse cytométrique effectuée dans le LCR des vervets au cours de l'infection.

H = prélèvement hémorragique inexploitable ; - =absence ou prélèvement en quantité insuffisante

2.6.2. Typage lymphocytaire dans le sang

Au cours du temps, une diminution significative des cellules natural killer (NK) ($CD8^+CD3^{neg}$) ($p = 0,01$) et de lymphocytes $CD8^+CD45^{RA}$ ($p = 0,02$) ont été mises en évidence. En moyenne, avant infection, le taux de $CD8^+CD3^{neg}$ est de $7,9 \pm 5,5$ % et le taux de $CD8^+CD45^{RA}$ est de $16 \pm 6,9$ %. A J53 post-infection, la moyenne des cellules NK est de $2,8 \pm 0,3$ % et les $CD8^+CD45^{RA}$ représentent $9,9 \pm 3,7$ %. Les autres marqueurs des lymphocytes du sang (lymphocytes B $CD20^+$, lymphocytes T $CD3^+$, $CD4^+$ et $CD8^+$ et les marqueurs d'activation $CD25^+$, $CD28^+$) n'ont montré aucune variation significative au cours du temps. Avant infection, les lymphocytes T $CD4^+$ sont moins nombreux ($32 \pm 14,6$ %) que les lymphocytes T $CD8^+$ ($48,7 \pm 16,7$ %) (figure 14). Le typage lymphocytaire n'a pas été poursuivi dans le sang après la huitième semaine post-infection car les premiers résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un marqueur sanguin du stade.

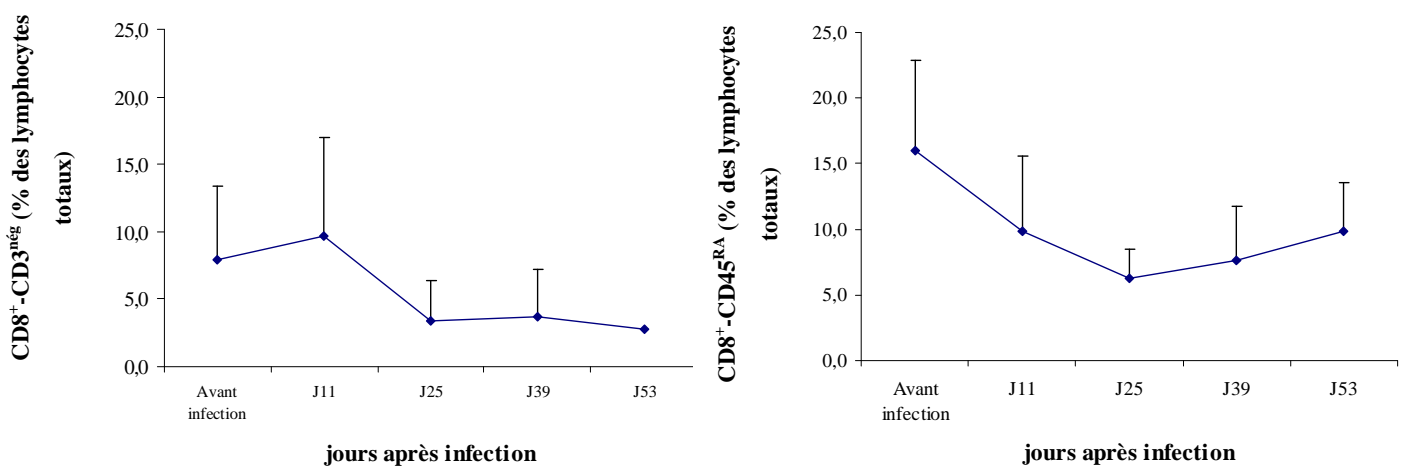


Figure 14 : Evolution des cellules natural killer ($CD8^+CD3^{neg}$) et des lymphocytes $CD8^+CD45^{RA}$ dans le sang de vervets au cours de l'infection à *T. b. gambiense*.

2.6.3. Typage lymphocytaire dans le LCR

Onze jours après infection, la majorité des lymphocytes du LCR sont des lymphocytes T ($82,1 \pm 6,1$ %) et plus particulièrement des lymphocytes T $CD8^+$ ($82 \pm 6,35$ %). Par la suite, on note une augmentation significative au cours du temps des lymphocytes B ($p = 0,03$), mis en évidence par le marqueur membranaire $CD20^+$. Cette augmentation est observée chez les animaux V12, V18, V19, VCA4 et V1452. Chez les autres animaux, le taux de lymphocytes

B est resté inférieur à 1 % au cours de l'infection et n'a pas été considéré comme significatif. L'apparition des lymphocytes B dans le LCR se fait à partir du 39^{ème} jour post-infection (V19) puis chez tous les autres animaux à partir du 53^{ème} jour post-infection. Chez tous ces animaux, l'augmentation des cellules B est antérieure au diagnostic de stade nerveux posé selon nos critères (présence de trypanosomes et /ou cytorachie persistante à plus de 100 cellules/ μ L) (figure 15). Aucune corrélation entre le taux de lymphocytes B et la cytorachie n'a été mise en évidence. Chez les animaux V12 et V1452, aux jours 95 et 67 après infection respectivement, le taux de lymphocytes B a augmenté alors que la cytorachie a diminué. Le typage lymphocytaire n'a pu être réalisé au-delà du 122^{ème} jour post-infection pour des difficultés techniques (voir annexe 3).

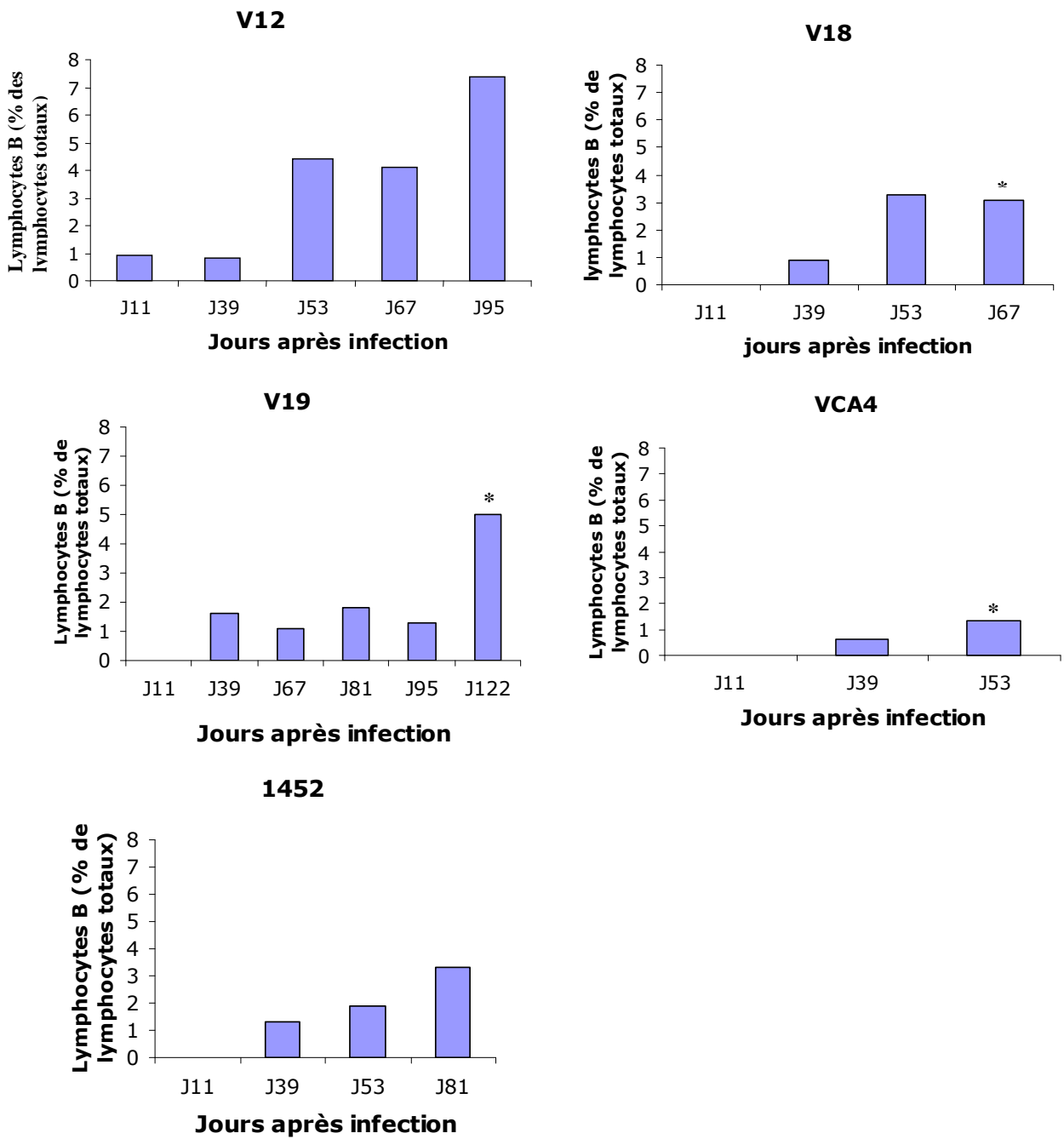


Figure 15 : Evolution des lymphocytes B dans le LCR des vervets au cours de l'infection à *T. b. gambiense*.

La confirmation du diagnostic de la phase nerveuse est indiquée par un astérisque.

Les lymphocytes CD8⁺-CD45^{RA} augmentent significativement au cours du temps (p = 0,002) sur l'ensemble des animaux. Cette augmentation est vérifiée uniquement chez les animaux V12, V16, V18 et V1452 (figure 16). Aucune activation, mise en évidence par une variation des marqueurs CD25 et CD28, n'a pu être observée sur les lymphocytes T.

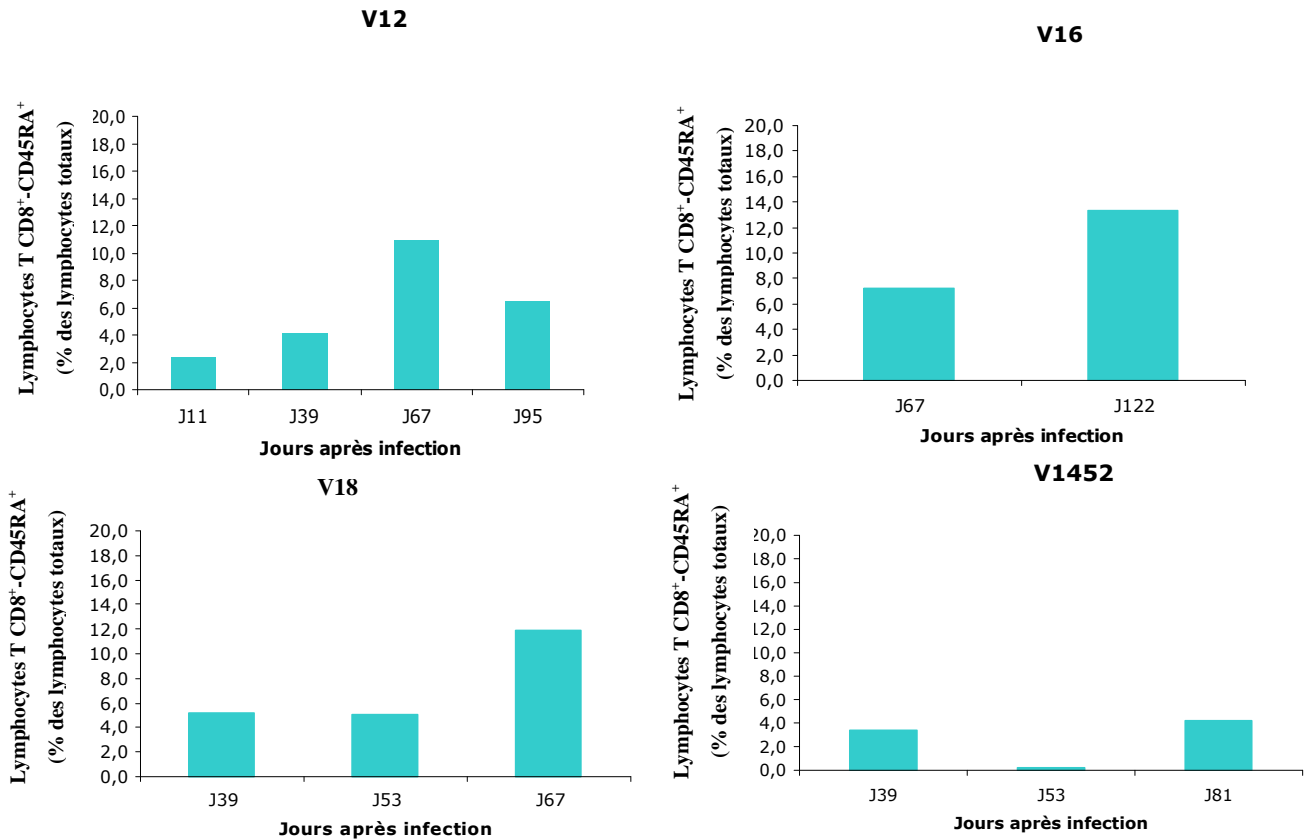


Figure 16: Evolution des lymphocytes T CD8⁺ – CD45^{RA} dans le LCR de vervets infectés par *T. b. gambiense*

2.6.4. Différence entre les types lymphocytaires dans le sang et le LCR de vervets infectés par *T. b. gambiense*

Dans le sang comme dans le LCR, les lymphocytes T de singes verts sont majoritairement CD8⁺. Dans le sang, seules une diminution significative au cours du temps des cellules NK (CD8⁺-CD3^{neg}) et des lymphocytes T CD8⁺-CD45^{RA} est observée en moyenne.

Dans le LCR, les lymphocytes B sont absents en début d'infection et augmentent significativement chez 5 singes au cours de l'infection. Les lymphocytes T CD8⁺-CD45^{RA} augmentent également de façon significative au cours du temps chez 4 animaux.

Discussion et perspectives

1. Les modèles animaux dans la maladie du sommeil

Le modèle de la souris, fréquemment utilisé dans les études des trypanosomoses, a été reproduit dans notre étude pour l'essai thérapeutique du bleu de méthylène pour le traitement des infections à *T. b. gambiense*. Classiquement, la parasitémie apparaît 3 à 5 jours après infection et le décès survient dans le délai de 5 à 7 jours après infection. Dans notre cas, la survenue de la parasitémie puis celle de la mort se sont effectuées dans les mêmes délais. La souris s'infecte facilement par *T. b. gambiense*, même en l'absence de traitement immunosuppresseur et permet d'effectuer rapidement des études. Elle convient très bien aux essais thérapeutiques de la phase lymphaticosanguine. En revanche, l'aspect clinique de la maladie est difficile à observer étant donné le mode aigu sur lequel elle évolue chez la souris et la phase nerveuse est rarement atteinte (tableau 12). Pour les études anatomopathologiques ou les essais de traitements de stade 2, il est donc préférable d'utiliser des souches de trypanosomes provoquant une infection d'évolution chronique, par exemple la souche *T. b. brucei* AnTat 1.1E.

Le mouton avait précédemment été utilisé dans la mise au point d'un modèle d'étude de la maladie du sommeil chez les animaux. Ce modèle, après infection par *T. b. brucei* AnTat 1.9, développe une parasitémie dans les 10 jours suivant l'inoculation. Les signes cliniques sont caractéristiques: dysorexie, hyperthermie fluctuante, amaigrissement, anémie et chute de l'hématocrite (Bouteille et coll., 1988a). Dans le travail décrit précédemment, nous avons confirmé le tableau clinique et les modifications biologiques dues à l'infection à trypanosomes chez le mouton, puis nous l'avons utilisé au cours de l'essai thérapeutique du mégazol en phase lymphatico-sanguine de la maladie. Le mouton permet facilement de réaliser des prélèvements répétés et en quantité suffisante pour des études pharmacocinétiques et les prélèvements de LCR sont tout à fait réalisables sous anesthésie. L'évolution vers la phase nerveuse de la maladie se fait progressivement en quelques mois et permet d'étudier les modifications cliniques puis anatomopathologiques mais aussi l'efficacité de nouveaux traitements à traverser la barrière hémato-encéphalique. Le mouton constitue donc un bon modèle en recherche médicale humaine et vétérinaire pour l'étude des trypanosomoses des animaux de rente, qui restent un frein majeur au développement rural africain. Le tableau 12

page 170 résume les avantages et les limites du modèle du mouton dans l'étude des trypanosomoses.

Il reste indiscutable qu'un modèle animal proche de l'homme est indispensable pour finaliser les essais thérapeutiques pré-cliniques mais aussi pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie humaine. Dans notre travail, nous avons choisi un modèle de primate non humain, le vervet d'Afrique, pour reproduire l'infection à *T. b. gambiense* et tenté de valider un modèle par rapport aux données cliniques et biologiques observées chez l'homme. Cette espèce de singe, qui représente déjà un bon modèle d'étude de l'infection à *T. b. rhodesiense* (Poltera et coll., 1985a; Schmidt et Sayer, 1982a), semble développer les signes cliniques et les modifications biologiques qui surviennent chez des personnes infectées. Le singe vert a permis précédemment l'étude de la pharmacocinétique du mégazol, administré par voie orale après infection (Enanga et coll., 2000). Dans notre étude, les paramètres cliniques et biologiques ont été mesurés toutes les deux semaines afin de suivre l'évolution de la maladie. Après infection des singes, la parasitémie est apparue dans les 10 jours suivant l'inoculation des parasites puis a évolué sous forme de vagues. Le délai d'apparition de la parasitémie et son évolution au cours de l'infection semblent être reproductibles chez le vervet et sont proches de ce qui est observé chez l'homme. En revanche, l'anémie, la chute de l'hématocrite et la perte de poids ne sont pas constantes et sont sujettes à des variations individuelles. Les variations de température corporelle sont difficiles à objectiver en raison du stress occasionné par l'anesthésie et de l'utilisation de la kétamine qui peut provoquer une hypothermie. D'après une étude chez le singe vert, la kétamine et le stress occasionnent des variations des valeurs hématologiques. L'anesthésie par un agent dissociatif tel que la kétamine entraîne une dépression de la fonction cardiaque qui a pour conséquence une chute des leucocytes et une augmentation des érythrocytes. En revanche, l'état de stress est responsable d'une leucocytose et d'une diminution des globules rouges. Au final, les effets cumulés du stress et de l'anesthésie ne semblent pas affecter de façon significative les valeurs hématologiques des vervets alors que les variations individuelles sont beaucoup plus marquées (Wall et coll., 1985). Ainsi, les résultats variables dans la formule sanguine des vervets de notre étude résultent essentiellement d'un phénomène physiologique chez le vervet.

En revanche, l'apparition d'une cytorachie anormalement élevée (supérieure à 5 cellules/ μ L) a été observée chez tous les animaux dans un délai de 6 semaines après infection.

Il serait possible que l'apparition de la phase nerveuse chez l'homme se fasse dans les mêmes délais. De plus, l'étude que nous avons menée a permis de suivre l'évolution de la cytorachie au cours du temps et d'observer ainsi des fluctuations importantes avec des pics à plus de 40 cellules/ μ L suivis d'une cytorachie normale (< 5 cellules/ μ L) 15 jours plus tard. Il est possible que ces 2 vervets soient en phase latente avec présence de trypanosomes dans un site caché ou alors que les réponses immunitaires initiées dans le LCR (objectivé ici par une augmentation des lymphocytes B) ont permis une guérison. Cette observation peut avoir des conséquences importantes par rapport à ce qui se passe chez l'homme. Il s'agit de la première observation de ce type car nous avons placé notre seuil de diagnostic de phase nerveuse suffisamment haut (cytorachie > 100 cellules/ μ L et/ou présence de trypanosomes dans le LCR en l'absence d'hématies) pour pouvoir observer ces fluctuations et réaliser nos essais en phase nerveuse confirmée. Ce phénomène ne peut jamais être mis en évidence chez l'homme car les ponctions lombaires ne peuvent être répétées mais remettent encore plus nettement en cause l'utilisation de la cytorachie seule comme marqueur de stade. Ce résultat peut également remettre en cause la validité des essais thérapeutiques ayant pris des seuils de stade nerveux moins stricts.

Les lésions anatomopathologiques de méningoencéphalite ainsi que les symptômes cliniques observés chez les vervets contrôles en phase nerveuse (article 3 pp128-147) confirment que le singe vert reproduit les caractéristiques du stade 2 de la maladie observées chez l'homme. Lors des rechutes, les signes cliniques d'atteinte nerveuse sont apparus sous forme de somnolence, d'anorexie, de parésie puis de paralysie des membres. La cytorachie était alors systématiquement élevée mais le trypanosome n'a pu être objectivé qu'une fois sur 3. Après traitement, nous avons pu observer l'amélioration des signes cliniques et des paramètres du LCR. Seul un animal a succombé à la cure de mélarsoprol après rechute.

Ainsi, le singe vert semble constituer un modèle d'étude valable de la trypanosomose humaine africaine pour les essais de traitement de stades 1 et 2 mais aussi pour les études de physiopathologie. Le modèle d'étude immunologique, qui n'avait pas encore été validé, a été testé dans ce travail et sera développé plus loin. En revanche, l'apparition de signes cliniques caractéristiques tels qu'une baisse de forme, une dysorexie et une perte de poids ne semble pas constants chez le singe vert infecté et ne doivent pas constituer les éléments de suivi principaux de l'infection (tableau 12). Il serait intéressant de tester la réceptivité à la

trypanosomose humaine africaine et le caractère pathogène chez d'autres espèces de primates non-humains notamment des espèces plus grandes pouvant faciliter la réalisation des ponctions lombaires. Le macaque stumptailed (*Macaca arctoides*) a déjà été utilisé dans un essai thérapeutique pour le traitement de la trypanosomose à *T. b. rhodesiense* (Raether et Seidenath, 1976) et pourrait constituer un modèle d'étude pour *T. b. gambiense*. Le macaque rhesus quant à lui (*Macaca mulatta*) est un modèle validé de la maladie de Chagas (Bonecini-Almeida Mda et coll., 1990) mais peu de données sont disponibles sur les effets des trypanosomoses africaines chez cette espèce.

	Modèles d'étude pour	Utilisation	Avantages	Limites	Références (liste non exhaustive)
Culture <i>In vitro</i>	Trypanosomes de l'homme Trypanosomes des animaux	Essais thérapeutiques (efficacité et résistances des souches) Etudes biomoléculaires Etudes biochimiques Etudes immunologiques	- Culture facile - Résultats rapides	- Risque de dégénérescence des souches - Etudes des interactions parasites-hôtes impossibles	Baltz et coll., 1985 Duszenko et coll., 1985 Bouteille et coll., 1988c, 1988d, 1995 Girard et coll., 2003 Green et coll., 2003
Rongeurs <i>Mus musculus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> , <i>Microtus montanus</i> , <i>Mastomys coucha</i> , <i>Bandicota bengalis</i> , <i>Cricetomus gambianus</i>	<i>T. b. brucei</i> <i>T. b. gambiense</i> <i>T. b. rhodesiense</i> <i>T. congolense</i> <i>T. evansi</i>	Essais thérapeutiques (toxicité, pharmacocinétique) Etudes histopathologiques Etudes physiopathologiques Etudes biomoléculaires	- Infection facile - Evolution rapide de la maladie - Etudes de l'interaction hôte-parasite - Etudes de toxicités des molécules testées - Etudes des lésions neurologiques - Etudes comportementales	- Prélèvements de LCR difficiles - Prélèvements de sang limités en quantité - Nécessité de traiter les animaux au diminazène ou à la suramine pour observer la phase nerveuse - Aspect clinique éloigné de celui observé chez l'homme	Poltera et coll., 1980 Jennings et Urquhart, 1983b Bouteille et coll., 1988c, 1988d, 1995 Amole et coll., 1989 Keita et coll., 1997 Enanga et coll., 1998 ; 1999 Ojok et coll., 2002 Darsaud et coll., 2003 ; 2004 Jennings et coll., 1996
Moutons <i>Ovis aries</i>	<i>T. b. brucei</i> <i>T. evansi</i> <i>T. congolense</i>	Essais thérapeutiques Etudes immunologiques Etudes physiopathologiques	- Infection facile - Evolution en phase nerveuse sur 27 à 71 jours - Prélèvements de sang et de LCR faciles - Modèle d'étude d'une espèce polygastrique	- Nécessité de locaux adaptés - Données difficilement transposables à l'homme - Difficultés à se procurer des réactifs spécifiques du mouton en immunologie	Bouteille et coll., 1988a ; 1988b ; 1988e Jauberteau et coll., 1991 ; 1994 Osaer et coll., 1999 Onah et coll., 2000 Boda et coll., 2004
Singes verts <i>Cercopithecus aethiops</i>	<i>T. b. rhodesiense</i> <i>T. b. gambiense</i>	Essais thérapeutiques (toxicité, pharmacocinétique) Etudes physiopathologiques Etudes immunologiques	- Infection facile - Evolution en phase nerveuse rapide avec <i>T. b. rhodesiense</i> - Possibilité de prélever des quantités de sang satisfaisantes - Modèles reproduisant les maladies observées chez l'homme - Possibilité de suivi longitudinal	- Nécessité de disposer des locaux et du matériel adaptés - Difficulté à se procurer des animaux - Anesthésie systématique des animaux à chaque manipulation - Prélèvements de LCR délicats à réaliser et souvent hémorragiques - Difficulté à se procurer des réactifs immunologiques adaptés au vervet - Evolution en phase nerveuse de quelques mois à 2 ans avec <i>T. b. gambiense</i>	Losos et Ikede, 1972 Schmidt et Sayer 1982a ; 1982b Poltera et Sayer 1983 Poltera et coll., 1985b Sayer et coll., 1985 Burri et coll., 1994 Enanga et coll., 2000

Tableau 12 : Les différents modèles expérimentaux dans l'étude des trypanosomoses.

2. Essais de traitements trypanocides sur différents modèles d'études

2.1. Effets trypanocides du bleu de méthylène

Le bleu de méthylène avait été choisi comme trypanocide potentiel en raison de son activité anti-protozoaire observée chez le *Plasmodium* (Guttman et Ehrlich, 1891; Schirmer et coll., 2003; Becker et coll., 2003). Il a donc d'abord été testé *in vitro* sur *T. b. brucei* AnTat 1.9 et sur *T. b. gambiense* MBA afin d'évaluer sa capacité à détruire ou à inhiber la croissance des trypanosomes. Les résultats nous ont paru très concluants étant donné que les IC50 obtenues chez chacune des souches étaient inférieures à 0,3 μM , ce qui est prometteur d'une bonne activité *in vivo*. Malheureusement, l'administration du bleu de méthylène *per os* ou par voie intra-péritonéale n'a permis aucune guérison chez des souris infectées par *T. b. gambiense*. La connaissance du métabolisme et du mécanisme d'action du bleu de méthylène permet de comprendre l'échec de son activité trypanocide *in vivo*. Le bleu de méthylène est très bien absorbé par voie orale et diffuse dans tous les tissus, y compris le système nerveux central (Peter et coll., 2000). Il est aussitôt pris en charge par les cellules endothéliales qui participent à son passage dans la circulation sanguine, puis par les érythrocytes qui effectuent alors une partie de son métabolisme. Le bleu de méthylène est ainsi successivement réduit et oxydé par les enzymes présentes dans les hématies (May et coll., 2004). Le mode d'action anti-paludique du bleu de méthylène réside dans sa capacité à inhiber des enzymes telles que la glutathion réductase et la guanine cyclase. Ces deux enzymes sont indispensables à la survie des parasites, en participant respectivement à l'équilibre oxydoréducteur et à la différenciation cellulaire du parasite (Mayer et coll., 1993; Shalaby et coll., 2001; Schirmer et coll., 2003). Chez les trypanosomes, la glutathion réductase est remplacée par la trypanothione réductase, mais les deux enzymes présentent de grandes similitudes avec des poids moléculaires très proches. De plus, les quinones et les nitroaromatiques possédant des activités trypanocides sont connus pour agir sur la trypanothione réductase parasitaire grâce à leur potentiel redox (Cenas et coll., 1994). D'autre part, le potentiel redox du bleu de

méthylène a été invoqué dans sa capacité à oxyder de manière non enzymatique le NADPH parasite (Cenas et coll., 1994; Atamna et coll., 1996; Grellier et coll., 2001). Ainsi, il est aisé de comprendre que le métabolisme du bleu de méthylène et les oxydoréductions dont il est l'objet puissent altérer son potentiel redox et ses capacités d'inhibition enzymatique. Ces hypothèses seraient à confirmer par des études *in vitro* plus approfondies de son mécanisme d'action trypanocide et de son métabolisme chez les mammifères. Afin de contourner les effets du métabolisme, il serait intéressant de procéder à des injections intra-cérébro-ventriculaires chez des animaux en phase nerveuse dans le but de vérifier son action *in situ* sur les trypanosomes. Le rat se prête très bien à ce type d'injection et permettrait de vérifier l'hypothèse du métabolisme, d'autant plus qu'un modèle rat a été mis au point pour l'étude des trypanosomes (Darsaud et coll., 2003). Il n'est pas exclu que le manque d'activité trypanocide du mégazol *in vivo* provienne d'un mauvais ajustement de la posologie. Il conviendrait de vérifier cette possibilité par un essai sur souris, avec des administrations de bleu de méthylène répétées au cours du temps.

2.2. Activité trypanocide du mégazol chez le mouton et le singe

Le mégazol, d'abord étudié chez *T. cruzi*, a été testé pour ses actions trypanocides sur *T. b. brucei* et *T. b. gambiense in vitro*, puis *in vivo* chez la souris (Enanga et coll., 1999 ; Enanga et coll., 2000). Les résultats encourageants obtenus nous ont amenés à réaliser un essai thérapeutique chez le mouton infecté par *T. b. brucei*. Les objectifs étaient de pouvoir développer une molécule qui agirait à la fois chez l'homme et l'animal et de connaître sa pharmacocinétique chez les polygastriques, qui représentent la majeure partie du bétail infecté en Afrique.

Les moutons, traités en phase lymphaticosanguine, ont reçu 40 mg/kg (n=6) ou 80 mg/kg (n=5) de mégazol, en une administration unique par voie orale. Seuls deux animaux, traités à 40 mg/kg et 80 mg/kg, n'ont pas présenté de rechute 15 mois après traitement. Chez les autres animaux, la parasitémie est réapparue dans la semaine suivant le traitement. Les paramètres pharmacocinétiques, mesurés chez des moutons sains traités à 80 mg/kg, ont permis de comprendre l'efficacité variable du mégazol chez le mouton infecté. Les concentrations plasmatiques retrouvées ont fait preuve d'une grande variation individuelle dans l'absorption orale du produit. Le dosage du produit chez les animaux infectés 8 heures après traitement a confirmé ce phénomène : les quantités de mégazol plasmatiques étaient très

faibles chez tous les animaux sauf chez les deux moutons ayant guéri et qui présentaient des quantités de mégazol trypanocides d'après les études *in vitro* précédemment réalisées (Bouteille et coll., 1995). Seul un animal a rechuté malgré une concentration plasmatique de mégazol élevée. La différence d'absorption orale du mégazol selon les moutons pourrait s'expliquer par l'anatomie digestive particulière chez les polygastriques. En effet, après ingestion, le produit se répartit dans les 5 compartiments gastriques où il subit à la fois l'effet du métabolisme enzymatique du mouton mais aussi celui de la flore gastrique commensale qui diffère totalement de celle des monogastriques. De plus, le pH du rumen, de l'ordre de 5,5, et son large volume pourraient favoriser l'accumulation des bases faibles telle que le mégazol (pKa 8,5) dans le compartiment stomacal (Mayer et coll., 2000). Ce phénomène, appelé «trapping» ionique, a déjà été constaté pour d'autres bases faibles dans le tractus digestif du mouton (Richez et Ruckebusch, 1979). Le mégazol serait malgré tout un produit intéressant à développer sous forme parentérale ou protégée pour le traitement des trypanosomoses animales.

Le mégazol a également été testé sur un modèle de primate non humain, le vervet, afin de juger de son efficacité sur un modèle proche de l'homme et de mettre au point la posologie efficace. En phase lymphatico-sanguine, le mégazol administré seul par voie orale permet de débarrasser les animaux de leur infection en une seule prise, sans rechute. En phase nerveuse, le mégazol n'a pas donné de résultats concluants chez la souris (Enanga et coll., 1998). Cependant, il a été montré que le mégazol peut traverser la barrière hémato-encéphalique chez le vervet avec des concentrations dans le LCR équivalentes à 5,5 à 10,6 % des concentrations plasmatiques (Enanga et coll., 2000). Nous avons donc choisi de tester l'effet trypanocide du mégazol par voie orale en phase nerveuse, associé à l'action de la suramine, comme cela avait été fait chez la souris (Bouteille et coll., 1995 ; Enanga et coll., 1998). Dans notre étude, la suramine est administrée après une absorption unique de mégazol. Les études précédentes chez la souris avaient démontré une efficacité du mégazol lorsqu'il était administré quatre jours de suite après administration de la suramine. Le mécanisme de l'interaction médicamenteuse est encore mal connu mais il avait été suggéré que l'administration de suramine antérieure à celle du mégazol était en cause dans l'efficacité de l'association. Dans ce cas, la suramine altérerait les mécanismes de transports sélectifs situés au niveau des cellules endothéliales et des astrocytes et faciliterait alors le passage cellulaire du mégazol (Enanga et coll., 1998). D'après les résultats obtenus dans notre étude, ces hypothèses seraient à reconsidérer. Le délai de 24 heures entre l'administration de la suramine et celle du mégazol

de même que les quatre doses successives de mégazol ne semblent pas indispensables pour guérir une atteinte nerveuse chez le singe vert. Ces premiers résultats seraient bien sûr à confirmer sur un plus large effectif de singes infectés et traités d'une part par le mégazol seul, d'autre part par l'association mégazol puis suramine.

Bien qu'aucun effet secondaire n'ait été observé chez le mouton et chez le singe et que les analyses anatomopathologiques n'aient pu mettre en évidence une toxicité d'organe 6 mois et 2 ans après traitement, il a été montré une activité potentiellement mutagène du mégazol par des études *in vitro* et *in vivo* (Enanga et coll., 2003 ; Nesslany et coll., 2004). Les tests des micronuclei sur cellules de rats et de l'analyse des métaphases sur lymphocytes humains ont montré une cytotoxicité et des aberrations structurales des chromosomes après exposition de 4 à 20 heures au mégazol. Chez le rat, on observe une diminution de la multiplication des cellules de la moëlle osseuse après traitement par deux administrations orales de 2 g/kg/jour de mégazol. Ces découvertes récentes ont pour l'instant interrompu toute possibilité de développement de la molécule. Cependant, des dérivés du mégazol, non-mutagènes, ont récemment été synthétisés et leur pouvoir trypanocide a été mis en évidence chez *T. cruzi* (Carvalho et coll., 2004). Les plus efficaces d'entre eux ont une IC50 comprise entre 5,4 et 33,2 µM (IC50 du mégazol = 9,9 µM). Ces dérivés ont été synthétisés à partir d'une hybridation entre le mégazol et des dérivés du guanylhydrazone.

Nous avons alors décidé de choisir le mégazol comme traitement de rechute afin de juger de son efficacité dans les cas de phases nerveuses graves et résistants aux trypanocides actuels. Trois administrations orales de mégazol ont permis de guérir un singe ayant rechuté en phase nerveuse après un traitement d'essai (nifurtimox 10 mg/kg/jour et DFMO 200 mg/kg/jour en deux prises orales durant 15 jours). La cytorachie est redevenue normale un mois après administration du mégazol et aucune rechute clinique ni biologique n'a été constatée à ce jour, deux mois après traitement. Cet essai serait à compléter sur un effectif plus grand avec un suivi de deux années et des études de mutagénicité *in vivo*.

2.3. Essai de la combinaison DFMO-nifurtimox dans le traitement de la phase nerveuse chez le singe vert infecté par *T. b. gambiense*

Afin de faciliter le développement d'une nouvelle thérapeutique, nous avons choisi de tester deux molécules possédant déjà une AMM et ayant des propriétés trypanocides connues.

D'autre part, l'objectif étant de mettre au point un traitement efficace à tous les stades, nous avons choisi deux molécules pouvant passer la barrière hémato-encéphalique. Le but est de pouvoir disposer d'un traitement efficace, peu toxique et en limitant les possibilités d'apparition de résistances.

C'est pourquoi nous avons essayé de traiter les vervets en stade nerveux en utilisant le DFMO et le nifurtimox d'une part à demi-dose, d'autre part à quart de dose totale de celles utilisées chez l'homme. Le traitement a été testé par voie orale afin de disposer d'une thérapeutique simple d'utilisation.

A ce jour, six singes ont été traités et trois d'entre eux ont rechuté. Les rechutes ne semblent pas corrélées avec la dose puisque parmi les rechutes, on compte deux des quatre animaux traités à quart de dose et un des deux animaux traités à demi-dose. Les deux animaux traités à quart de dose ont rechuté dans le mois suivant le traitement alors que le singe traité à demi-dose présentait une parasitémie et des parasites dans le LCR à la fin du traitement. Etant donné que la bonne prise du traitement et l'absence de vomissement associé ont été vérifiées, on peut supposer que les échecs observés proviennent des propriétés pharmacologiques de l'association. Les produits utilisés ont de bonnes propriétés d'absorption orale (le nifurtimox est une formulation pour prise orale et le DFMO est sous forme injectable mais parfois administrée par voie orale aux nourrissons), cependant, il est possible que chez le singe vert, le passage digestif se fasse plus difficilement. D'autre part, la demi-vie du DFMO étant très courte, le produit nécessite une administration répétée 4 fois par jour. Dans le cas de notre étude, afin de respecter les habitudes alimentaires des animaux et d'éviter des perturbations digestives, le traitement a été fractionné en deux prises quotidiennes, ce qui représente peut-être une exposition sanguine trop courte. Les deux cas de rechute tardive ont présenté essentiellement des symptômes nerveux prononcés et une cytorachie élevée, en l'absence de trypanosome. Cependant, il est naturel de penser que l'état clinique et les modifications du LCR étaient dus à la présence du trypanosome dans le système nerveux central et aux conséquences de l'activation immunitaire. Ainsi, la persistance des trypanosomes dans le système nerveux central pourrait s'expliquer par une mauvaise diffusion tissulaire de l'association DFMO-nifurtimox qui parviendrait uniquement à éliminer les parasites sanguins. Ce phénomène pourrait être causé par un antagonisme des deux molécules ou encore par une pharmacodynamique particulière au vervet.

L'ensemble de ces hypothèses serait à vérifier par une étude pharmacocinétique qui permettrait d'évaluer le passage digestif et ses paramètres (C_{max} , T_{max} , demi-vie, temps de résidence moyen) ainsi que la concentration de chaque molécule dans le LCR afin de juger du passage de la barrière hémato-encéphalique. Cette étude a déjà été envisagée et les prélèvements de sang et de LCR ont été réalisés à cet effet mais pour des difficultés techniques, les dosages n'ont pas encore pu être réalisés.

La perspective d'utiliser la combinaison DFMO-nifurtimox à doses réduites reste compromise actuellement étant donné l'efficacité aléatoire à traiter les infections en phase nerveuse. Les seuls avantages résident dans la limitation des effets toxiques par une posologie diminuée et dans la réduction des risques de résistance. Les éléments pharmacocinétiques, qui aideront peut-être à comprendre les raisons de l'échec thérapeutique chez le vervet, pourraient alors permettre d'adapter la posologie, la formulation ou la durée du traitement pour une meilleure efficacité.

3. Mise au point de la technique de cytométrie en flux dans l'étude des trypanosomoses

Les critères de stade actuels ne sont pas satisfaisants et ne permettent pas de poser un diagnostic pour certains cas discordants. Nous avons donc choisi d'analyser de manière plus approfondie les constituants du LCR qui permettraient de mettre en évidence des modifications spécifiques et précoces de l'atteinte nerveuse. Le modèle du vervet infecté par *T. b. gambiense* pourrait être envisagé pour réaliser une telle étude ; de plus, il permet de suivre les modifications au cours du temps. Les expérimentations chez les primates non humains sont délicates à réaliser en raison du coût des animaux et des structures spécialisées nécessaires pour leur entretien. Aussi, nous nous sommes attachés à mettre au point la technique de cytométrie en flux chez des patients au cours des prospections afin d'évaluer la faisabilité et l'intérêt d'utiliser une telle technique par la suite chez le singe. Cette étude a été réalisée pour la première fois dans le sang et le LCR de patients atteints de trypanosomose et a permis d'obtenir des résultats exploitables qui ont confirmé que cette méthode est réalisable dans des conditions de terrain. Cependant, le nombre de patients étudiés est insuffisant et cette étude devrait être approfondie sur un effectif plus grand.

Nos résultats ont montré qu'il est possible d'utiliser la cytométrie en flux pour analyser des LCR dès 1 cellule/ μ L. Ces résultats corroborent les données obtenues par Subira et coll. (2002) qui montrent que le typage lymphocytaire est réalisable pour une cytorachie minimale de 1 cellule pour 3 μ L de LCR. Cette même étude souligne l'importance de la cytométrie en flux pour le diagnostic précis de nombreuses atteintes neurologiques et conforte notre intention de l'utiliser à but diagnostique au cours de la THA.

Dans le cas des analyses que nous avons réalisées, nous avons clairement montré une augmentation du taux de lymphocytes B dans le LCR des patients en stade 2 :

- 6% stade 1 vs $55,4 \pm 23,5$ % stade 2, $p = 0,007$;

- $7,9 \pm 5,5$ % stade intermédiaire vs $55,4 \pm 23,5$ % stade 2, $p = 0,02$

Cette augmentation est considérée comme pathologique d'après les normes des sous-types lymphocytaires dans les LCR humains (Kivisäkk et coll., 2003) et constitue un élément intéressant que nous avons donc choisi d'approfondir chez le vervet par la suite.

D'autre part, le typage lymphocytaire observé dans le sang des patients diffère beaucoup de celui observé dans le LCR. Ce phénomène a déjà été souligné lors d'une étude (Svenningsson et coll., 1995) qui montre que ce phénomène est physiologique et doit être pris en compte dans les analyses cytométriques au cours des processus pathologiques. Il sera donc certainement indispensable de vérifier si le vervet présente cette particularité afin d'en tenir compte lors de l'analyse des résultats obtenus.

Cette étude préalable réalisée dans le sang et le LCR des patients nous a donc confirmé que la cytométrie pourrait être envisagée pour le suivi des vervets infectés et ce, dès le début de l'atteinte nerveuse. Elle nous a également donné des indications sur les sous-types lymphocytaires à cibler dans nos analyses.

4. Evolution des profils lymphocytaires du sang et du LCR au cours de l'infection à *T. b. gambiense*

En raison de la difficulté à se procurer des primates non-humains en expérimentation animale, aucun groupe témoin sain n'a été utilisé mais le sang de chaque animal a été analysé avant infection et le LCR avant atteinte nerveuse.

Dans le sang, aucune modification des différentes populations lymphocytaires n'a pu être mise en évidence chez l'homme. Chez le vervet, les populations de cellules NK et de lymphocytes T $CD8^+CD45^{RA}$ ont baissé significativement au cours de l'infection sur l'ensemble des animaux (NK : $7,9 \pm 5,5$ % avant infection vs $2,8 \pm 0,3$ % 53 jours après infection, $p = 0,01$; $CD8^+CD45^{RA}$: $16 \pm 6,9$ % avant infection vs $9,9 \pm 3,7$ %, $p = 0,02$) (figure 17). Une étude récente chez le singe vert sain indique que la détection des cellules NK du sang se fait de manière plus sensible en dénombrant la population $CD8^+CD3^{nég}$ qu'en utilisant le marqueur de surface membranaire $CD16^+$ (Holznagel et coll., 2002). Cette même étude montre que les cellules NK représentent de 7 % à 11 % de la population totale lymphocytaire du sang chez le singe vert non infecté. Chez les animaux de notre étude ayant présenté une chute du taux de NK au cours de l'infection, le pourcentage de cellules $CD8^+CD3^{nég}$ est de $9,7 \pm 7,2$ % au début de l'infection, confirmant les résultats précédemment démontrés. Après 53 jours d'infection et en l'absence de traitement, le taux de cellules NK chute à $2,8 \pm 0,4$ %. Les cellules NK produisent de l'IFN- γ et contribuent à la destruction des agents pathogènes (Peruzzi et coll., 2000). Ce phénomène a été observé à la fois chez des patients infectés par HIV-1 et chez des macaques porteurs du virus SIV et serait associé à une immunodépression de l'organisme (De souza et coll., 2000 ; Peruzzi et coll., 2000 ; Vowels et coll., 1990). Dans le cas de la trypanosomose, parmi les modifications du système immunitaire de l'hôte, une immunodépression apparaît et serait donc compatible avec la baisse de cellules NK observées chez les vervets. Chez les patients atteints de THA, nous n'avons pas pu mettre en évidence une chute des cellules NK, cependant, l'échantillon de la population étudiée n'a peut-être pas été suffisant. D'autre part, il est connu que les cellules T naïves ($CD45^{RA}$) se différencient en cellules mémoires ($CD45^{RO}$) après une stimulation

antigénique. La diminution de la population naïve dans le sang des singes traduirait alors le contact chronique des lymphocytes avec les parasites. Le phénomène de variation antigénique bien connu chez les trypanosomes stimule constamment les cellules du système immunitaire qui essaient alors d'adapter une réponse durable et efficace.

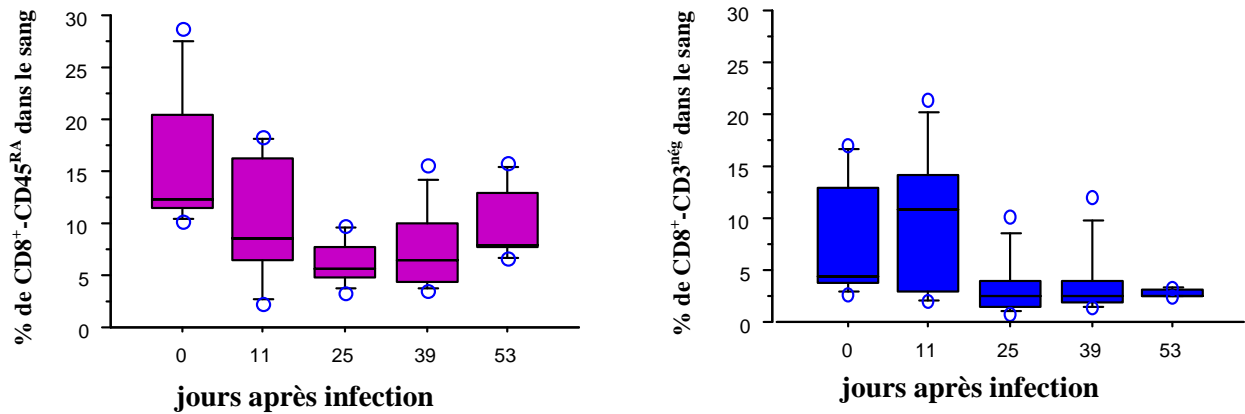


Figure 17 : Diminution des lymphocytes CD8⁺-CD45^{RA} et CD8⁺-CD3^{neg} dans le sang de singes verts au cours de l'infection à *T. b. gambiense*

Ainsi, l'analyse du sang permet de témoigner d'une infection de l'organisme et de la réponse du système immunitaire mais ne permet pas de poser un diagnostic d'atteinte nerveuse lors de trypanosomose. Cette étude confirme donc la nécessité absolue d'analyser le LCR afin de poser un diagnostic de stade.

Nous avons donc choisi de réaliser en parallèle le typage lymphocytaire du LCR chez les patients et chez les singes infectés. Le vervet est une espèce relativement difficile à prélever en ce qui concerne les ponctions lombaires, en raison de sa petite taille d'une part (de 2,5 à 7 kg) mais aussi de la riche vascularisation autour des vertèbres lombaires, destinée à irriguer les constituants de la queue et qui rend les prélèvements hémorragiques. Pour cette raison, de nombreux prélèvements sont manquants et l'analyse des résultats à un temps donné se fait souvent sur un nombre restreint d'individus. Cependant, nous avons pu, grâce aux prélèvements répétés au cours du temps, mettre en évidence des éléments significatifs. Chez le vervet, une augmentation du taux de lymphocytes B (mis en évidence par les marqueurs membranaires CD19⁺ chez l'homme et CD20⁺ chez le singe) apparaît de façon significative

avec l'état d'avancement de l'infection (figure 18). Ce phénomène a été retrouvé chez l'homme entre le stade 1 et le stade 2 et entre le stade intermédiaire et le stade 2.

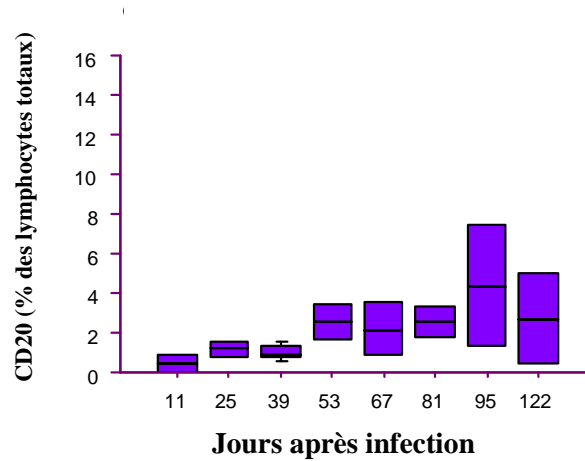


Figure 18 : Augmentation des lymphocytes B dans le LCR de singes verts au cours de l'infection à *T. b. gambiense*

Chez les singes de notre étude, la population majoritaire du LCR est constituée de lymphocytes T en début d'infection et les lymphocytes B représentent moins de 1 %. Aucune étude de cytométrie en flux dans le LCR de singe n'est actuellement disponible pour corroborer ces résultats. Par la suite, chez 5 des animaux infectés, les lymphocytes B apparaissent de façon significative entre le 39^{ème} et le 53^{ème} jour post-infection ($p = 0,03$). Cette augmentation n'est pas corrélée à la cytorachie qui diminue chez deux animaux alors que le taux de lymphocytes B ne cesse d'augmenter. Chez les patients, on note une augmentation significative des lymphocytes B entre le stade 2 et le stade 1 et entre le stade 2 et le stade intermédiaire. Cette lymphocytose B, précédemment décrite dans le sang de patients atteints de trypanosomose, pourrait expliquer la présence du taux d'IgM dans le LCR. Chez l'homme comme chez le singe, cette augmentation apparaît avant que le diagnostic de phase nerveuse ne soit posé, suggérant que la réponse immunitaire dans le LCR interviendrait avant que les lésions nerveuses ne soient installées. L'apparition des lymphocytes B dans le LCR pourrait constituer un marqueur d'atteinte nerveuse précoce qu'il faudrait approfondir par une étude sur une plus large échelle de patients à tous les stades.

Le typage lymphocytaire du LCR a été complété par l'étude des sous-types de lymphocytes T. Chez le singe, on note une augmentation significative des lymphocytes T CD8⁺-CD45^{RA} au cours du temps qui est vérifiée chez 4 des animaux infectés (figure 19). Les cellules CD8⁺-CD45^{RA} sont des cellules naïves qui se différencient en CD8⁺-CD45^{RA-}-CD45^{RO+} au contact d'un antigène et forment les cellules mémoires de l'infection. Or, il a été montré récemment que les cellules naïves peuvent aussi se différencier en lymphocytes CD8⁺-CD45^{RA+}-CD27⁻ ou en CD8⁺-CD45^{RA+}-CD28⁻ après stimulation par un antigène et constituent alors des cellules effectrices cytotoxiques (Hamann et coll., 1999 ; Hohn et coll., 2003). L'augmentation du taux de lymphocytes CD8⁺-CD45^{RA+} observé dans le LCR des singes infectés pourraient alors provenir d'une différenciation des cellules naïves initiales en réponse à la présence du trypanosome. Ce sous-type cellulaire n'a pas été analysé dans les LCR des patients mais mériterait d'être étudié afin de confirmer ce phénomène chez l'homme et de détecter un éventuel marqueur spécifique et précoce du stade 2 de la maladie. En effet, chez les patients comme chez les singes, les marqueurs d'activation des lymphocytes T que nous avons choisis (CD25 et CD28) n'avaient pas permis de mettre en évidence une activation au cours de l'infection. Chez le singe, la recherche d'une stimulation antigénique des lymphocytes T a été approfondie de façon indirecte par le marquage avec le CD45^{RA} qui s'est révélé intervenir dans la réponse immunitaire au cours de l'infection à *T. b. gambiense*.

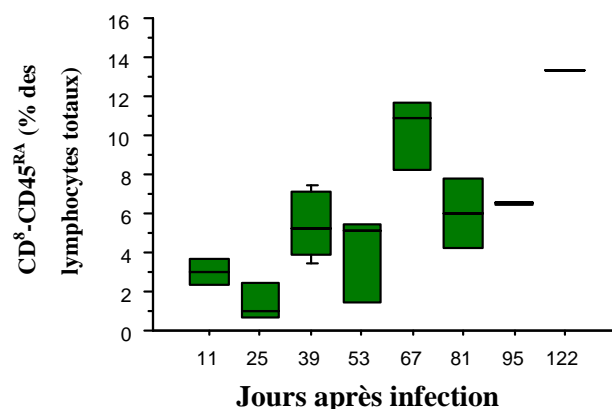


Figure 19 : Augmentation des lymphocytes CD8⁺-CD45^{RA} dans le LCR de singes infectés par *T. b. gambiense*

Ces résultats préliminaires nécessiteraient de poursuivre la caractérisation de la réponse immunitaire du LCR en recherchant le produit de l'activation des lymphocytes. En effet, les chemokines et les cytokines ont déjà été mises en évidence dans le LCR de patients et

pourraient constituer un élément de diagnostic supplémentaire et précoce. La chemokine RANTES intervient dans la chémoattraction des cellules mémoires ($CD4^+CD45^{RO}$) non activées mais aussi des cellules $CD4^+$ et $CD8^+$ activées présentant un phénotype mémoire ($CD45^{RO}$) ou naïf ($CD45^{RA}$) (Schall et coll., 1990 ; Taub et coll., 1993). D'autres chémokines sont produites suite à l'activation des lymphocytes T seulement (IL-8) ou des lymphocytes T et B (MIP1- α) (Miller et Krangel, 1992 ; Vaddi et Newton, 1994; Schall et coll., 1994). L'IL-1 β est quant à elle produite, entre autres, par les lymphocytes et les cellules NK (Warner, 1987). Parmi ces facteurs de la réponse immunitaire, IL-8, MIP1- α et IL-1 β sont produits également par des cellules du système nerveux central (astrocytes et parfois oligodendrocytes) et pourraient donc être retrouvés dans le LCR en cas de pathologie telle que la trypanosomose. De même, la cytokine TNF- α (Tumor Necrosis Factor) est produite par les lymphocytes T et B activés mais aussi par les cellules NK et les astrocytes (Vilcek et Lee, 1991 ; Ruddle, 1992). L'interféron gamma (IFN- γ) joue un rôle important dans l'infection à trypanosomes en favorisant la prolifération de *T. b. brucei* et pourrait contribuer à l'absence de réponse immune efficace au cours de la THA (Darji et coll., 1993 ; Uzonna et coll., 1998 ; Olsson et coll., 1993). Récemment, il a été montré que l'IFN- γ pourrait participer à la progression des parasites vers le système nerveux central par passage de la barrière hémato-encéphalique (Masocha et coll., 2004). On a démontré également que de nombreuses autres cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-10 interviennent dans la trypanosomose et sont produites par les lymphocytes et les cellules du système nerveux central (Lejon et coll., 2002a).

Ainsi, la présence de lymphocytes T activés dans le LCR des singes infectés est une bonne indication pour poursuivre la recherche de critères précoces et spécifiques de diagnostic parmi les composants du système immunitaire du LCR.

Cette étude comparative sang-LCR confirme d'une part que le sang n'est que le témoin d'une infection sans caractère spécifique à la trypanosomose et que la variation antigénique est sûrement responsable du peu de spécificité de la réponse observée. En revanche, la réponse immunitaire décrite dans le LCR est différente de celle du sang avec une stimulation des cellules naïves et une hyperlymphocytose B.

5. Utilisation du vervet (*Cercopithecus aethiops*) comme modèle d'étude immunologique de la trypanosomose humaine africaine

Le vervet a déjà été validé comme modèle d'étude des modifications biologiques et cliniques de la trypanosomose à *T. b. rhodesiense* (Schmidt et Sayer, 1982a et b). Le modèle à *T. b. gambiense* a été utilisé dans notre travail et semble permettre les études de différentes natures telles que les essais thérapeutiques ou les études anatomo-pathologiques de la maladie. En revanche, les modifications immunologiques induites par la trypanosomose n'ont jamais été étudiées chez le vervet. Afin de les interpréter, il est nécessaire de connaître l'état physiologique des profils lymphocytaires du sang et du LCR du vervet et de comparer les différences avec les profils humains. La mise au point d'un tel modèle permettrait de mieux comprendre les dysfonctionnements immunitaires qui ont été mis en évidence chez l'homme et qui pourraient constituer des éléments de diagnostic de stade.

Nous avons donc choisi d'analyser par cytométrie en flux les types lymphocytaires dans le sang et le LCR de singes sains avant infection et de suivre leur évolution après infection. Le profil lymphocytaire du sang de vervet infecté est représenté dans la figure 18. Avant infection, le taux de lymphocytes moyen est de 2293 ± 1026 lymphocytes/ μL . En moyenne, les lymphocytes B représentent $7,8 \pm 5,4$ % (221 ± 194 lymphocytes/ μL) et les lymphocytes T, $78,8 \pm 7,2$ % (1653 ± 970 lymphocytes/ μL) des lymphocytes totaux du sang. Les lymphocytes T sont majoritairement de phénotype CD8^+ à $48,7 \pm 16,7$ % (878 ± 501 lymphocytes/ μL) et les CD4^+ représentent $32 \pm 14,6$ % (814 ± 514 lymphocytes/ μL). D'autre part, chez le singe vert sain, on retrouve $9,7 \pm 7,2$ % (174 ± 115 lymphocytes/ μL) de cellules natural killer (figure 20). Le double phénotype $\text{CD4}^+\text{-CD8}^+$ est présent à moins de 1% (< 17 lymphocytes/ μL). Ces valeurs sont comparables à celles précédemment décrites dans une étude par cytométrie en flux sur sang de vervets (Holznagel et coll., 2002). Les valeurs des lymphocytes B et T sont similaires aux normes sanguines chez l'homme qui sont, pour un total de 2000 lymphocytes/ μL , de 10 à 15% de lymphocytes B (200 à 300 lymphocytes/ μL) et

75 % de lymphocytes T (1500 lymphocytes/ μ L). En revanche, les proportions des phénotypes CD4⁺ et CD8⁺ diffèrent : en effet, chez l'homme, le phénotype CD4⁺ est présent en majorité à 50 % (1000 lymphocytes/ μ L) alors que les CD8⁺ ne représentent que 25 % (500 lymphocytes/ μ L) des lymphocytes totaux du sang. Cette différence entre l'homme et le singe vert a déjà été rapportée et la fréquence élevée de lymphocytes T CD8⁺ est décrite comme physiologique chez le singe vert (Holznagel et coll., 2002) (tableau 13). On trouve 10 à 15 % (200 à 300 lymphocytes/ μ L) de cellules natural killer.

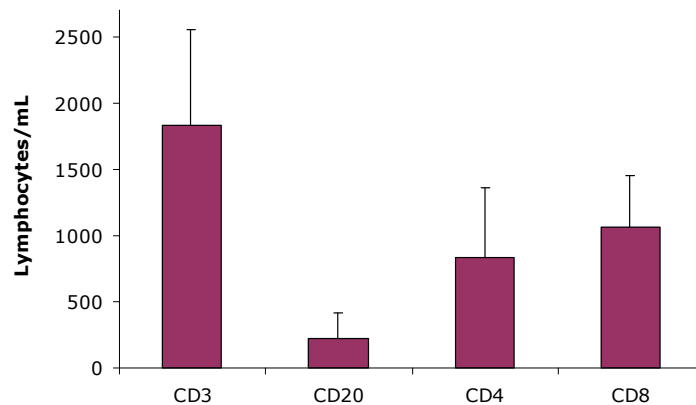


Figure 20 : Lymphocytes du sang de singes verts sains.

Le sang a été analysé par cytométrie en flux chez huit animaux sains.

	Valeurs expérimentales chez le singe vert sain (moyenne ± écart type)		Normes chez l'homme	
	%	Lymphocytes/ μ L	%	Lymphocytes/ μ L
Lymphocytes totaux		2293 +/- 1026		2000
Lymphocytes B	7,8 ± 5,4	221 ± 194	10 à 15	200 à 300
Lymphocytes T	78,8 ± 7,2	1653 ± 970	75	1500
Lymphocytes T CD8	48,7 ± 16,7	878 ± 501	25	500
Lymphocytes T CD4	32 ± 14,6	814 ± 514	50	1000
Cellules natural killer	9,7 ± 7,2	174 ± 115	10 à 15	200 à 300

Tableau 13: Proportions des types lymphocytaires, déterminées par cytométrie en flux, dans le sang humain et de singe vert sain.

Les données chez le singe ont été obtenues expérimentalement chez les huit singes verts de l'étude des modifications immunologiques au cours de la trypanosomose avant infection par *T. b. gambiense*. Les données chez l'homme sont les normes observées chez les individus sains.

Avant atteinte nerveuse, l'analyse du LCR des singes a permis d'observer les normes lymphocytaires chez cette espèce. La cytorachie est en moyenne de 4 cellules/ μ L. Les lymphocytes B sont absents chez tous les animaux et les lymphocytes T sont majoritaires ($82,1 \pm 6,1$ % soit $3,3 \pm 0,7$ cellules/ μ L). Le phénotype $CD4^+CD8^-$ est présent sur 3 ± 1 % ($0,12 \pm 0,0$ cellule/ μ L) des lymphocytes et le phénotype $CD8^+CD4^-$ apparaît sur $71,3 \pm 5,2$ % ($3 \pm 1,3$ cellules/ μ L) des lymphocytes. Le double phénotype $CD4^+CD8^+$ représente $5,7 \pm 0,2$ % ($0,2 \pm 0,1$ cellule/ μ L) des lymphocytes. On retrouve $7,3 \pm 0,1$ % ($0,3 \pm 0,0$ cellule/ μ L) de cellules NK (figure 21).

Si l'on compare ces données expérimentales avec les normes lymphocytaires dans le LCR humain, on observe que la différence principale réside à nouveau dans la forte proportion de lymphocytes T $CD8^+$ dans le LCR de vervets (tableau 14). En effet, le LCR d'un homme, pour une cytorachie inférieure à 5 cellules/ μ L, compte une majorité de lymphocytes T dont $83,4 \pm 16$ % de $CD4^+$. Dans les deux cas, les lymphocytes B sont

présents à moins de 1 % chez les individus sains et leur apparition traduit un phénomène pathologique (Kivisäkk et coll., 2003).

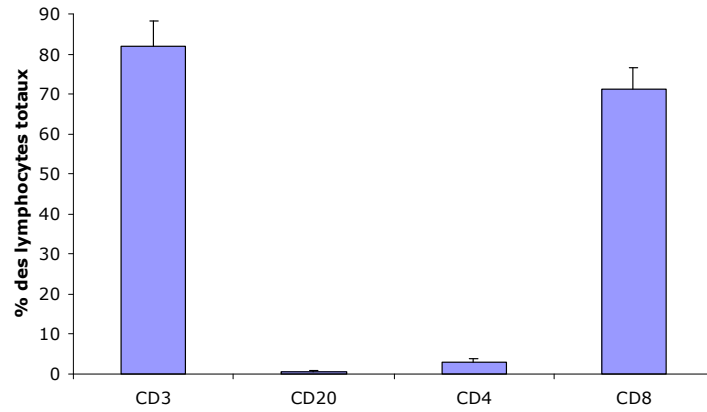


Figure 21 : Lymphocytes du LCR de singes verts avant atteinte nerveuse.

Les analyses ont été réalisées par cytométrie en flux chez deux des huit animaux avant atteinte nerveuse.

	Valeurs expérimentales chez le singe vert sain (moyenne ± écart – type)	Normes chez l'homme (d'après Kivisäkk et coll., 2003)
Lymphocytes totaux (cellules/μL)	4 ± 1,4	< 5
Lymphocytes B (%)	< 1	< 1
Lymphocytes T (%)	82,1 ± 6,1	
Lymphocytes T CD8 (%)	71,3 ± 5,2	11,2 ± 13,8
Lymphocytes T CD4 (%)	3 ± 1	83,4 ± 16
Cellules natural killer (%)	7,3 ± 0,1	

Tableau 14: Proportions des types lymphocytaires, déterminées par cytométrie en flux, dans le LCR humain et de singe vert sain.

Les données chez le singe ont été obtenues expérimentalement chez deux des huit singes verts de l'étude des modifications immunologiques au cours de la trypanosomose avant atteinte nerveuse.

Les données chez l'homme ont été obtenues à partir du LCR d'individus sains (Kivisäkk et coll., 2003).

Le vervet offre donc des perspectives d'études immunologiques de la maladie du sommeil. Cependant, son intérêt est limité par le peu de clones d'anticorps disponibles pour réaliser les techniques d'études immunologiques. En effet, étant donné qu'aucun réactif de laboratoire dirigé contre les constituants antigéniques du vervet n'est proposé sur le marché, il est indispensable d'utiliser les anticorps dirigés contre les antigènes humains qui croisent avec ceux du vervet. Cependant, il n'est jamais possible de connaître exactement le degré de sensibilité et de spécificité de tels anticorps. C'est pour cette raison que nous avons utilisé chez le vervet le CD20 pour le marquage des lymphocytes B car le CD19 que nous avons utilisé à cet effet chez l'homme ne permettait pas la reconnaissance des lymphocytes de vervet. De plus, les difficultés à obtenir du LCR imposent de disposer d'un effectif de singes suffisamment élevé.

La lymphocytose B, qui est commune à l'homme et au vervet au cours de la trypanosomose, pourrait constituer un élément d'étude de la pathologie et un critère de diagnostic à approfondir. Il serait envisageable d'utiliser le singe vert dans de telles études et

d'extrapoler à l'homme les données obtenues. Un test diagnostic de terrain pourrait alors être mis au point par l'utilisation de billes couplées à des anticorps marquées, dirigées contre le marqueur membranaire des lymphocytes B, qui permettrait une analyse rapide du LCR au cours des prospections.

Conclusion

Aujourd'hui encore il est difficile de traiter les patients atteints de trypanosomose africaine en raison du manque de critères diagnostiques précis mais aussi du peu de molécules thérapeutiques disponibles. Le problème peut se résoudre soit en disposant d'un traitement efficace à tous les stades et peu toxique, qui permettrait de s'affranchir du diagnostic de stade, soit en comprenant mieux la physiopathologie de la phase nerveuse afin de mettre en évidence un critère précoce et spécifique qui aboutirait à la réalisation d'un test diagnostique simple et utilisable sur le terrain.

Nos travaux se sont attachés à répondre à cette double problématique de la thérapeutique et du diagnostic biologique de la phase nerveuse.

Nous avons tenté d'évaluer plusieurs molécules thérapeutiques qui faciliteraient le traitement des patients avec le moins d'effets secondaires possible. Le mégazol est très prometteur car il remplit les conditions idéales pour soigner cette pathologie en Afrique. En effet, nos résultats sont en faveur de son utilisation dans le traitement des THA. Il a prouvé son efficacité à tous les stades de la maladie chez le vervet infecté, par un traitement court et facile d'utilisation. De plus, d'après notre essai thérapeutique mené chez le mouton infecté par *T. b. brucei* AnTat 1.9, le mégazol serait utilisable en médecine vétérinaire, à condition de mettre au point une formulation parentérale pour contourner les difficultés d'absorption digestive chez les polygastriques. Son utilisation en médecine vétérinaire contribuerait à l'élimination des foyers persistants. Malheureusement, son pouvoir mutagène potentiel a stoppé son développement et les seuls débouchés de cette molécule seraient une utilisation exceptionnelle pour les patients en phase nerveuse avancée ou les cas de rechutes résistant à tout traitement. Les dérivés non-mutagènes du mégazol récemment synthétisés ouvrent à nouveau des perspectives d'études thérapeutiques sur les trypanosomes africains.

Le bleu de méthylène, molécule en développement pour le traitement du paludisme non compliqué, a montré qu'il possède un effet trypanocide évident *in vitro* mais ne peut guérir l'infection à trypanosome chez la souris. Les résultats du travail que nous avons exposés dans ce mémoire mériteraient d'être approfondis par :

- une étude du métabolisme *in vivo* et du mode d'action trypanocide du bleu de méthylène afin de comprendre son échec,

- des injections intra-cérébro-ventriculaires chez une espèce animale infectée en phase nerveuse afin de contourner les effets du métabolisme sanguin et d'observer son action sur les trypanosomes *in situ*,

- un essai thérapeutique chez une espèce animale dont le métabolisme diffère de celui de la souris.

La tendance actuelle étant de rationaliser les traitements actuellement disponibles, nous avons tenté l'effet de la combinaison DFMO-nifurtimox à doses réduites chez le primate non-humain infecté. Cet essai est toujours en cours de réalisation mais les résultats préliminaires ne sont pas concluants, en raison des rechutes observées. Seule une étude des paramètres pharmacocinétiques permettrait de comprendre les échecs thérapeutiques et d'améliorer les modalités d'administration de cette association.

Nous avons ensuite cherché à améliorer le diagnostic de phase à l'aide du modèle animal vervet, en réalisant un typage des lymphocytes dans le sang et le LCR au cours d'une infection expérimentale. Pour cela, des analyses de cytométrie en flux ont été réalisées au préalable dans le sang et le LCR de patients infectés afin de s'assurer de l'intérêt et de la faisabilité de la technique. Les résultats obtenus chez les patients ont montré l'utilité de la cytométrie en flux pour analyser les faibles quantités de lymphocytes présents dans le LCR et pour tenter de dégager un critère de stade précoce et précis. C'est pourquoi nous avons réalisé le typage des lymphocytes du sang et du LCR chez le modèle vervet qui permet de disposer d'un suivi au cours du temps. Nous avons pu mettre en évidence une augmentation des lymphocytes B et des lymphocytes CD8⁺-CD45^{RA} au cours de l'infection. Ces éléments sont à approfondir par une étude à plus large échelle, complétée par le dosage des cytokines produites par les lymphocytes et pourraient aboutir à la mise au point d'un test diagnostique. Ces études sont en cours de réalisation. Pour cela, le vervet semble offrir de bonnes perspectives d'études malgré les difficultés techniques rencontrées lors des manipulations chez cette espèce.

Bibliographie

Abebe G, Eley R, 1992. Trypanosome-induced hypothyroidism in cattle. *Brit Vet J.* 148, 63-71.

Adams JH, Haller L, Boa FY, Doua F, Dago A, Konian K, 1986. Human African trypanosomiasis (*T. b. gambiense*): a study of 16 fatal cases of sleeping sickness with some observations on acute reactive arsenical encephalopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 12, 81-94.

Adams LB, Hibbs JB Jr, Taintor RR, Krahenbuhl J, 1990. Microbiostatic effects of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for the synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol.* 144, 2725-2729.

Amevigbe MD, Jauberteau-Marchan MO, Bouteille B, Doua F, Breton JC, Nicolas JA, Dumas M, 1992. Human African trypanosomiasis: presence of antibodies to galactocerebrosides. *Am J Trop Med Hyg.* 47, 652-662.

Amole B, Sharpless N, Wittner M, Tanowitz HB, 1989. Neurochemical measurements in the brains of mice infected with *Trypanosoma brucei brucei* (TREU 667). *Ann Trop Med Parasitol.* 83, 225-32.

Apted FIC, 1970. Clinical manifestations and diagnosis of sleeping-sickness. In: "The African trypanosomiasis", Mulligan HW. (Eds) George Allen and Unwin, London, United Kingdom, pp 661-683.

Atouguia JLM, Kennedy PGE, 2000. Neurological aspects of human African trypanosomiasis. In: "Infectious diseases of the nervous system", David LE, Kennedy PGE. (Eds) Butterworth-Heinemann, Oxford, United Kingdom, pp 321-372.

Bacchi CJ, Garofalo J, Ciminelli M, Rattendi D, Goldberg B, McCann PP, Yarlett N, 1993. Resistance to DL-alpha-difluoromethylornithine by clinical isolates of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Role of S-adenosylmethionine. *Biochem Pharmacol.* 46, 471-481.

Bacchi CJ, Nathan HC, Livingston T, Valladares G, Saric M, Sayer PD, Njogu AR, Clarkson AB Jr, 1990. Differential susceptibility to DL-alpha-difluoromethylornithine in clinical isolates of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Antimicrob Agents Chemother.* 34, 1183-1188.

Bafort JM, Schmidt H, 1983. Experimental chronic *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection in *Microtus montanus*. *Am J Trop Med Hyg.* 32, 968-975.

Bagster IA, Parr CW, 1973. Trypanosomes identification by electrophoresis of soluble enzymes. *Nature.* 244, 364-366.

Baker JR, 1995. The subspecific taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *Parasite.* 2, 3-12.

Bales JD Jr, Harrison SM, Mbwabi DL, Schechter PJ, 1989. Treatment of arsenical refractory Rhodesian sleeping sickness in Kenya. *Ann Trop Med Parasitol.* 83, 111-114.

Baltz T, Baltz D, Giroud C, Crockett J, 1985. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *EMBO J.* 4, 1273-1277.

Barrett MP, Zhang ZQ, Denise H, Giroud C, Baetz T, 1995. A diamidine *Trypanosoma equiperdum* clone contains a P2 purine transporter with reduced substrate affinity. *Mol Biochem Parasitol.* 73, 223-229.

Barry JD, 1997. The biology of antigenic variation in African trypanosomes. In: "Trypanosomiasis and leishmaniasis", Hide G, Mottram JC, Coombs GH, Holmes PH. (Eds) CAB international, Oxford, United Kingdom, 89-107.

Barry JD, Emery DL, 1984. Parasite development and host responses during the establishment of *Trypanosoma brucei* infection transmitted by tsetse fly. *Parasitology*. 88, 67-84.

Becker K, Rahlfs S, Nickel C, Schirmer RH, 2003. Glutathione-functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol Chem*. 384, 551-566.

Bengaly Z, Sidibe I, Ganaba R, Desquesnes M, Boly H, Sawadogo L, 2002. Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: clinical observations and haematological changes. *Vet Parasitol*. 108, 1-19.

Bentivoglio M, Grassi-zucconi G, Olsson T, Kristensson K, 1994. *Trypanosoma brucei* and the nervous system. *Trends Neurosci*. 17, 325-329.

Bertrand E, Rive J, Serie F, Kone I, 1973. Encéphalopathie arsénicale et traitement de la trypanosomiase. *Méd Trop*. 33, 385-390.

Bisser S, Bouteille B, Sarda J, Stanghellini A, Ricard D, Jauberteau MO, Marchan F, Dumas M, Breton JC, 1997. Apport des examens biochimiques dans le diagnostic de phase nerveuse de la trypanosomose humaine africaine. *Bull Soc Pathol Exot*. 90, 321-326.

Biswas D, Choudhury A, Misra KK, 2001. Histopathology of *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* infection in bandicoot rat. I. Visceral organs. *Exp Parasitol*. 99, 148-159.

Biteau N, Bringaud F, Gibson W, Truc P, Baltz T, 2000. Characterization of *Trypanozoon* isolates using a repeated coding sequence and microsatellite markers. *Mol Biochem Parasitol*. 105, 187-202.

Boné G, Charlier JL, 1975. Hémagglutination en tubes capillaires: une méthode de diagnostic de la trypanosomiase applicable sur le terrain. *Ann Soc Belge Méd Trop*. 71, 267-273.

Bonecini-Almeida Mda G, Galvao-Castro B, Pessoa MH, Pirmez C, Laranja F, 1990. Experimental Chagas' disease in rhesus monkeys. I. Clinical, parasitological, hematological

and anatomo-pathological studies in the acute and indeterminate phase of the disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 85, 163-171.

Borremans P, Van Bogaert L, 1933. Les manifestations extra-pyramidales de la trypanosomiase chez l'européen. (Syndrome d'inhibition avec stéréotypies, pigmentations cutanées symétriques et anneau cornéen). J Belg neurol Psychiatr. 33, 561-588.

Boulangé A, Katende J, Authié E, 2002. *Trypanosoma congolense*: expression of a heat shock protein 70 and initial evaluation as a diagnostic antigen for bovine trypanosomosis. Exp Parasitol. 100, 6-11.

Bouteille B, Dardé ML, Dumas M, Catanzano G, Pestre-Alexandre M, Breton JC, Nicolas JA, N'do DC, 1988a. The sheep (*Ovis aries*) as an experimental model for African Trypanosomiasis. I. Clinical study. Ann Trop Med Parasitol. 82, 141-148.

Bouteille B, Dardé ML, Dumas M, Catanzano G, Pestre-Alexandre M, Breton JC, Nicolas JA, Munoz M, 1988b. The sheep (*Ovis aries*) as an experimental model for African Trypanosomiasis. II. Biological study. Ann Trop Med Parasitol. 82, 149-158.

Bouteille B, Dardé ML, Pestre-alexandre M, 1988c. Action des médicaments testés en milieu acellulaire et chez la souris infectée par *Trypanosoma brucei brucei*. Bull Soc Path Exot. 81, 533-542.

Bouteille B, Dardé ML, Pestre-alexandre M, 1988d. Efficacité du nifurtimox sur *Trypanosoma brucei brucei* *in vitro* et *in vivo* sur souris Swiss. Bull Soc Fr Parasitol. 6, 15-20.

Bouteille B, Darde ML, Pestre-Alexandre M, Dumas M, Breton JC, Nicolas JA, Catanzano G, Munoz M, 1988e. Traitement de la trypanosomiase expérimentale du mouton à *Trypanosoma brucei brucei*: recherche d'une dose minima active de mélarsoprol. Bull Soc Pathol Exot Filiales. 81, 548-554.

Bouteille B, Marie-Daragon A, Chauvière G, Albuquerque (De) C, Enanga B, Dardé ML, Vallat JM Périé J, Dumas M, 1995. Effect of megalol on *Trypanosoma brucei brucei* acute and subacute infections in Swiss mice. *Acta Trop.* 60, 73-80.

Bouteille B, Oukem O, Bisser S, Dumas M, 2003. Treatment perspectives for human African trypanosomiasis. *Fundam Clin Pharmacol.* 17, 171-181.

Buguet A, Bisser S, Josenando T, Chapotot F, Cespuglio R, 2004. Sleep structure : a new diagnostic tool for stage determination in sleeping sickness. *Acta Trop.* 93, 107-117.

Burchmore RJ, Wallace LJ, Candlish D, Al-Salabi MI, Beal PR, Barrett MP, Baldwin SA, de Koning HP, 2003. Cloning, heterologous expression, and in situ characterization of the first high affinity nucleobase transporter from a protozoan. *J Biol Chem.* 278, 23502-23507.

Burri C, Onyango JD, Auma JE, Burudi EM, Brun R, 1994. Pharmacokinetics of melarsoprol in uninfected vervet monkeys. *Acta Trop.* 58, 35-49.

Burudi EM, Peregrine AS, Majiva PA, Mbiuki SM, Murphy NB, 1994. Response of diminazene-resistant and diminazene-susceptible *Trypanosoma congolense* to treatment with diminazene when occurring as a mixed infection in goats. *Ann Trop Med Parasitol.* 88, 595-606.

Carter NS, Berger BJ, Fairlamb AH, 1995. Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei brucei*. *J Biol Chem.* 270, 28153-28157.

Carter NS, Fairlamb AH, 1993. Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature.* 361, 173-175.

Carvalho SA, da Silva EF, Santa-Rica RM, de Castro SL, Fraga CAM, 2004. Synthesis and new profile of a new functionalized 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazones derivatives, designed as non-mutagenic megalol analogues. *Bioorg Med Chem Lett.* 14, 5967-5970.

Cenas NK, Arscott D, Williams CH Jr, Blanchard JS, 1994. Mechanism of reduction of quinones by *Trypanosoma congolense* trypanothione reductase. *Biochemistry*. 33, 2509-2515.

Chabeuf N, 1983. Trypanotolerant cattle in West and Central Africa. *J S Afr Vet Assoc*. 54, 165-170.

Chauvière G, Bouteille B, Enanga B, de Albuquerque C, Croft SL, 2003. Synthesis and biological activity of nitro heterocycles analogous of megazol, a trypanocidal lead. *J Med Chem*. 46, 427-440.

Clausen PH, Waiswa C, Katunguka-Rwakishaya E, Schares G, Steuber S, Mehlitz D, 1999. Polymerase chain reaction and DNA probe hybridization to assess the efficacy of diminazene treatment in *Trypanosoma brucei*-infected cattle. *Parasitol Res*. 85, 206-211.

Coker AO, Isokpehi RD, Thomas RN, Fagbenro-Beyioku AF, Omilabu SA, 2000. Zoonotic infection in Nigeria: overview from a medical perspective. *Acta Trop*. 76, 59-63.

Collomb H, Bartoli D, 1967. Le coeur dans la trypanosomiase humaine africaine à *Trypanosoma gambiense*. *Bull Soc Path Exot*. 60, 142-156.

Connor RJ, Mukangi DJ, Halliwell RW, 1989. Bovine trypanosomiasis in southern Tanzania: investigation into the incidence of infection and duration of chemoprophylaxis. *Trop Anim Health Prod*. 21, 135-140.

Darji A, Sileghem M, Heremans H, Brys L, De Baetselier P, 1993. Inhibition of T cell responsiveness during experimental infections with *Trypanosoma brucei*: active involvement of endogenous IFN- γ . *Infect Immun*. 50, 382-387.

Darji A, Sileghem M, Heremans H, Brys L, De Baetselier P, 1996. *In vitro* stimulation of immunosuppression caused by *Trypanosoma brucei*: active involvement of Gamma Interferon and Tumor Necrosis Factor in the pathway of suppression. *Infect Immun*. 64, 1937-1943.

Darsaud A, Bourdon L, Chevrier C, Keita M, Bouteille B, Queyroy A, Canini F, Cespuglio R, Dumas M, Buguet A, 2003. Clinical follow-up in the rat experimental model of African trypanosomiasis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 228, 1355-1362.

Darsaud A, Chevrier C, Bourdon L, Dumas M, Buguet A, Bouteille B, 2004. Megazol combined with suramin improves a new diagnosis index of the early meningo-encephalitic phase of experimental African trypanosomiasis. *Trop Med Int Health*. 9, 83-91.

Daulouède S, Bouteille B, Moynet D, De Baetselier P, Courtois P, Lemesre JL, Buguet A, Cespuglio R, Vincendeau P, 2001. Human macrophage tumor necrosis factor (TNF)-alpha production induced by *Trypanosoma brucei gambiense* and the role of TNF-alpha in parasite control. *J Infect Dis*. 183, 988-991.

De Baetselier P., 1996. Mechanisms underlying trypanosome-induced T cell immunosuppression In : "T cell subset and cytokines interplay in infectious diseases", (Eds) Mustafa AS, Al-Attayah RJ, Nath I, Chugh TD, Basel, Karger, pp 124-139.

De Gee ALW, McCann PP, Mansfield JM, 1983. Role of antibody in the elimination of trypanosomes after DL- α -difluoromethylornithine chemotherapy. *J Parasitol*. 69, 818-822.

De Koning HP, Jarvis SM, 1997. Purine nucleobase transport in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochem Soc Trans*. 25, 476S.

De Koning HP, Jarvis SM, 1999. Adenosine transporters in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*: substrate recognition motifs and affinity for trypanocidal drugs. *Mol Pharmacol*. 56, 1162-1170.

De Koning HP, Jarvis SM, 2001. Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter. *Acta Trop*. 80, 245-250.

De Koning HP, Watson CJ, Jarvis SM, 1998. Characterization of a nucleoside/proton symporter in procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. *J Biol Chem*. 273, 9486-9494.

Degen R, Pospichal H, Enyaru J, Jenni L, 1995. Sexual compatibility among *Trypanosoma brucei* isolates from an epidemic area in southeastern Uganda. *Parasitol Res.* 81, 253-257.

Delespaux V, Ayral F, Geysen D, Geerts S, 2003. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification: applicability for the diagnosis of mixed infections with different trypanosome species in cattle. *Vet Parasitol.* 117, 185-193.

De Souza MS, Karnasuta C, Brown AE, Markowitz LE, Nitayaphan S, Garner RP, McNeil JG, Birx DL, Cox JH, 2000. A comparative study of the impact of HIV infection on natural killer cell number and function in Thais and North Americans. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16, 1061-1066.

Desquesnes M, Dia ML, 2004. Mechanical transmission of *Trypanosoma congolense* in cattle by the African tabanid *Atylotus agrestis*. *Exp Parasitol.* 105, 226-231.

Desquesnes M, Dia ML, 2004. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. *Vet Parasitol.* 119, 9-19.

Desquesnes M, McLaughlin G, Zoungrana A, Davila AM, 2001. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int J Parasitol.* 31, 610-614.

Deutsch M, Rewers AB, Redgate S, Fisher ER, Boggs SS, 1990. Intra-cerebral ventricular infusion of 5-iodo-2-deoxyuridine (IUDR) as a radiosensitizer in the treatment of a rat glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 19, 85-87.

Donelson J, Turner M, 1985. Les métamorphoses du trypanosome. *Pour la Science.* 90, 14-23.

Donelson JE, 2002. Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Trop.* 85, 391-404.

Doua F, Miezán TW, Sanon Singaro JR, Boa Yapo F, Baltz T, 1996. The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. Am J Trop Med Hyg. 55, 586-588.

Duggan AJ, Hutchinson MP, 1966. Sleeping sickness in Europeans: a review of 109 cases. Trop Med Hyg. 69, 124-131.

Dumas M, Bissler S, 1999. Clinical aspects of human African trypanosomiasis (Chapitre 13) In: "Progress in human African Trypanosomiasis, sleeping sickness", (Eds) Dumas M, Bouteille B, Buguet A. Springer-Verlag, France, pp 214-233.

Duszenko M, Ferguson MAJ, Lamont GS, Rifkin MR, Cross GAM, 1985. Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms *in vitro*. J Exp Med. 162, 1256-1263.

Duvallet G, Ouedraogo A, Pinder M, Van Meleck A, 1988. Observations following the cyclical infection with *Trypanosoma congolense* of previously uninfected Baoule and Zebu cattle In: "The African Trypanotolerant Livestock network, Livestock production in tsetse affected areas of Africa", International Laboratory for Research on Animal Diseases/ International Livestock Centre for Africa (éd.), Nairobi. pp 318-325.

Eisler MC, Lessard P, Masake RA, Moloo SK, Peregrine AS, 1998. Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle. Vet Parasitol. 79, 187-201.

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

Enanga B, Keita M, Chauvière G, Dumas M, Bouteille B, 1998. 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. 3, 736-741.

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

Enanga B, Ariyanayagam MR, Stewart ML, Barrett MP, 2003. Activity of megalol, a trypanocidal nitroimidazole, is associated with DNA damage. *Antimicrob Agents Chemother*. 47, 3368-3370.

FAO, Annuaire de la production, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome. 1997. N° 51, 192 p.

Filardi LS, Brener Z, 1982. A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Ann Trop Med parasitol*. 76, 293-297.

Friedheim EAH, 1951. Mel B in the treatment of trypanamide resistant *T. gambiense* sleeping sickness: observations on drug resistance in the trypanosomes of the French Cameroun. *Am J Trop Med Hyg*. 31, 218-227.

Fulton JD, Grant PT, 1955. The preparation of a strain of *Trypanosoma rhodesiense* resistant to stilbamidine and some observations on its nature. *Ann Trop Med Parasitol*. 49, 377-387.

Gardiner PR, 1989. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. *Adv Parasitol*. 28, 229-316.

Gazzienelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A, 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages. *J Immunol*. 148, 1792-1796.

Geerts S, Holmes PH, 1998. Drug management and parasite resistance in bovine trypanosomiasis in Africa. PAAT technical and scientific. (Ed) FAO, Rome. 40 p.

Gibson WC, Mehlitz D, Lanham SM, Godfrey DG, 1978. The identification of *Trypanosoma brucei gambiense* in Liberian pigs and dogs by isoenzymes and by resistance to human plasma. *Tropenmed Parasit*. 29, 335-345.

Gibson W, De C Marshall TF, Godfrey DG, 1980. Numerical analysis of enzyme polymorphism: a new approach of the epidemiology and taxonomy of trypanosomes of the subgenus *Trypanozoon*. *Adv Parasitol.* 18, 175-246.

Gibson WC, Welde BT, 1985. Characterization of *Trypanozoon* stocks from the South Nyanza sleeping sickness focus in Western Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 79, 671-676.

Gibson W, 1986. Will the real *Trypanosoma brucei gambiense* please stand up. *Parasitol. Today.* 2, 255-257.

Gibson W, Stevens J, Truc P, 1999. Identification of trypanosomes: from morphology to molecular biology (chapitre 2). In: "Progress in human African Trypanosomiasis, sleeping sickness", (Eds) Dumas M, Bouteille B, Buguet A, Springer-Verlag, France, pp 7-29.

Gibson WC, Stevens JR, Mwendia CM, Ngotho JN, Ndung'u JM, 2001. Unravelling the phylogenetic relationships of African trypanosomes of suids. *Parasitology.* 122, 625-31.

Girard M, Bisser S, Buscher P, Bouteille B, Preud'homme JL, Jauberteau MO, 2000. Cross-reactivity of anti-galactocerebroside autoantibodies with a *Trypanosoma brucei* proteolipidic epitope. *Clin Exp Immunol.* 119, 516-22.

Green HP, Del Pilar Molina Portela M, St Jean EN, Lugli EB, Raper J, 2003. Evidence for a *Trypanosoma brucei* lipoprotein scavenger receptor. *J Biol Chem.* 278, 422-7.

Greenwood BM, Whittle HC, Molyneux DH, 1973. Immunosuppression in Gambian trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 67, 846-850.

Grellier P, Sarlauskas J, Anusevicius Z, Maroziene A, Houee-Levin C, Schrevel J, Cenas N, 2001. Antiplasmodial activity of nitroaromatic and quinoidal compounds: redox potential vs. inhibition of erythrocyte glutathione reductase. *Arch Biochem Biophys.* 393, 199-206.

Gu Y, Gettinby G, McKendrick I, Murray M, Peregrine AS, Revie C, 1999. Development of a decision support system for trypanocidal drug control of bovine trypanosomosis in Africa. *Vet Parasitol.* 87, 9-23.

Guilbert B, Dighiero G, Avrameas S, 1982. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. *J Immunol.* 128, 2779-2787.

Guttman P, Ehrlich P, 1891. Über die Wirkung de Methylenblau bei Malaria. *Berl. Klin. Wochenschr.* 28, 953-956.

Hamann D, Kostense S, Wolthers KC, Otto SA, Baars PA, Miedema F, van Lier RA, 1999. Evidence that human CD8⁺CD45^{RA+}CD27⁻ cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division. *Int Immunol.* 11, 1027-1033.

Hanotte O, Ronin Y, Agaba M, Nilsson P, Gelhaus A, Horstmann R, Sugimoto Y, Kemp S, Gibson J, Korol A, Soller M, Teale A, 2003. Mapping of quantitative trait loci controlling trypanotolerance in a cross of tolerant West African N'Dama and susceptible East African Boran cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 7443-7448.

Harmsen R, 1973. The nature of the establishment barrier for *Trypanosoma brucei* in the gut of *Glossina pallidipes*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 67, 364-373.

Hawking F, Smiles J, 1941. The distribution of 4:4'-diamidino stilbene in trypanosomes and mice as shown by fluorescence. *Ann Trop Med Parasitol.* 35, 45-50.

Henriques C, Sanchez MA, Tryon R, Landfear SM, 2003. Molecular and functional characterization of the first nucleobase transporter gene from African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 130, 101-110.

Hide G, 1999. History of sleeping sickness in East Africa. *Clin Microbiol Rev.* 12, 112-125.

Hilali M, Abdel-Gawad A, Nassar A, Abdel-Wahab A, Magnus E, Büscher P, 2004. Evaluation of the card agglutination test (CATT/*T. evansi*) for detection of *Trypanosoma evansi* infection in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt. *Vet Parasitol.* 121, 45-51.

Hohn H, Julch M, Pilch H, Kortsik C, Tully G, Neukirch C, Freitag K, Maeurer M, 2003. Definition of the HLA-A2 restricted peptides recognized by human CD8⁺ effector T cells by flow-assisted sorting of the CD8⁺CD45^{RA+}CD28⁻ T cell subpopulation. *Clin Exp Immunol.* 131, 102-110.

Holmes PH, 1997. New approaches to the integrated control of trypanosomosis. *Vet Parasitol.* 71, 121-135.

Holznagel E, Norley S, Holzammer S, Coulibaly C, Kurth R, 2002. Immunological changes in simian immunodeficiency virus (SIV(agm))-infected African green monkeys (AGM): expanded cytotoxic T lymphocyte, natural killer and B cell subsets in the natural host of SIV(agm). *J Gen Virol.* 83, 631-640.

Hutchinson OC, Fèvre EM, Carrington M, Welburn SC, 2003. Hutchison Lessons learned from the emergence of a new *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness focus in Uganda. *Lancet Inf Dis.* 3, 42-45.

Itard J, 1980. Les trypanosomoses animales. Division de l'enseignement, Institut d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux. Maisons-Alfort.

Itazi OK, 1983. Radial immunodiffusion as a diagnostic test for African Human Trypanosomiasis in cases with neurological involvement. International Scientific Council for publication n°112, scientific publication division of Eleza services Ltd Nairobi, Kenya. pp 101-106.

Iten M, Matovu R, Brun R, Kaminsky R, 1995. Innate lack of susceptibility of Ugandan *Trypanosoma brucei rhodesiense* to DL- α -difluoromethylornithine. *Trop Med Parasitol.* 46, 190-194.

Iten M, Mett H, Evans A, Enyaru JC, Brun R, Kaminsky R. 1997. Alterations in ornithine decarboxylase characteristics account for tolerance of *Trypanosoma brucei rhodesiense* to D, L-alpha-difluoromethylornithine. *Antimicrob Agents Chemother.* 41, 1922-1925.

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

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

Jenni L, Marti S, Schweizer J, Betschart B, Le Page RW, Wells JM, Tait A, Paindavoine P, Pays E, Steinert M, 1986. Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature.* 322, 173-175.

Jennings FW, Gray GD, 1983a. Relapsed parasitemia following chemotherapy of chronic *Trypanosoma brucei* infections in mice and its relation to cerebral trypanosomes. *Contrib Microbiol Immunol.* 7, 147-154.

Jennings FW, Urquhart GM, 1983b. The use of the 2-substituted 5-nitroimidazole, Fexinidazole (Hoe239) in the treatment of chronic *T. brucei* infections in mice. *Zeitschrift für Parasitenkunde.* 69, 577-581.

Jennings FW, Atouguia JM, Murray M, 1996. Topical chemotherapy for experimental murine African CNS-trypanosomiasis: the successful use of the arsenical, melarsoprol, combined with 5-nitroimidazoles, fexinidazole or MK-436. *Trop Med Int Health.* 1, 590-598.

Joshua RA, 1989. Occurrence of human serum resistant *Trypanosoma congolense* in goat and sheep in Nigeria. *Vet Parasitol.* 31, 107-113.

Kalu AU, Uzoukou M, Ikeme M, 1996. Prevalence of tsetse fly and ruminant trypanosomiasis in Kotsina-Ala Local Government Area Nigeria. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 55, 341-352.

Keita M, Bouteille B, Enanga B, Vallat JM, Dumas M, 1997. *Trypanosoma brucei brucei*: a long-term model of human Africa trypanosomiasis in mice, meningo-encephalitis, astrocytosis and neurological disorders. *Exp Parasitol.* 85, 183-192.

Keita M, Dumas M, Vallat JM, Vincendeau P, Cespuglio R, Buguet A, Bouteille B, 2000. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in the central nervous system of mice chronically infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp Parasitol.* 95, 19-27.

Kérandel P, 1910. Un cas de trypanosomiase chez un médecin. *Bull Soc Path Exot.* 3, 642-662.

Kilgour V, Godfrey DG, 1973. Isoenzymes of alanine aminotransferase as possible specific characters of trypanosomes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 67, 1-11.

Kilgour V, Godfrey DG, 1973. Species-characteristic isoenzymes of two aminotransferases in trypanosomes. *Nat New Biol.* 244, 69-70.

Kivisäkk P, Mahad DJ, Callahan MK, Trebst C, Tucky B, Wei T, Wu L, Baekkevold ES, Lassmann H, Staugaitis SM, Campbell JJ, Ransohoff RM, 2003. Human cerebrospinal fluid central memory CD4⁺ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 8389-8394.

Krishnamachary N, Center MS, 1993. The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. *Cancer Res.* 15, 3658-3661.

Kukla BA, Majiwa PA, Young JR, Mooloo SK, ole-MoiYoi OK, 1987. Use of species-specific DNA probes for detection and identification of trypanosome infection in tsetse flies. *Parasitology.* 95, 1-16.

Lejon V, Büscher P, Magnus E, Moons A, Wouters I, Van Meirvenne, 1998. A semi-quantitative ELISA for detect of *Trypanosoma brucei gambiense* specific antibodies in serum and cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients. *Acta Trop.* 69, 151-164.

Lejon V, Lardon J, Kenis G, Pinoges L, Legros D, Bisser S, N'Siesi X, Bosmans E, Büscher P, 2002a. Interleukin (IL)-6, IL-8 and IL-10 in serum and CSF of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness patients before and after treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 96, 329-333.

Lejon V, Legros D, Richer M, Ruiz JA, Jamonneau V, Truc P, Doua F, Dje N, N'Siesi FX, Bisser S, Magnus E, Wouters I, Konings J, Vervoort T, Sultan F, Büscher P, 2002b. IgM quantification in the cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients by a latex card agglutination test. *Trop Med Int Health.* 7, 685-692.

Lejon V, Legros D, Savignoni A, Etchegorry MG, Mbulamberi D, Büscher P, 2003a. Neuro-inflammatory risk factors for treatment failure in "early second stage" sleeping sickness patients treated with pentamidine. *J Neuroimmunol.* 144, 132-138.

Lejon V, Rebeski DE, Ndao M, Baelmans R, Winger EM, Faye D, Geerts S, Büscher P, 2003b. Performance of enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies against *T. congolense* and *T. vivax* in goats. *Vet Parasitol.* 116, 87-95.

Liu MK, Cattand P, Gardiner IC, Pearson TW, 1989. Immunodiagnosis of sleeping sickness due to *Trypanosoma brucei gambiense* by detection of anti-procyclic antibodies and trypanosome antigens in patients' sera. *Acta Trop.* 46, 257-266.

Losos GJ, Ikede BO, 1972. Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *Vet Pathol.* 9, 1-71.

Lumsden WHR, Kimber CD, Evans DA, Doig SJ, 1979. *Trypanosoma brucei*: miniature anion exchange centrifugation technique for detection of low parasitemias: adaptation for field use. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 73, 312-317.

Lutje V, Taylor KA, Kennedy D, Authié E, Boulangé A, Gettiby G, 1996. *Trypanosoma congolense* : a comparison of T-cell-mediated responses in lymph nodes of trypanotolerant and trypanosusceptible cattle during primary infection. *Exp Parasitol.* 84, 320-329.

MacLean L, Odiit M, Sternberg JM, 2001. Nitric oxide and cytokine synthesis in human African trypanosomiasis. *J Infect Dis.* 184, 1086-1090.

Mac Namara JJ, Bailey JW, Smith DH, Wakhooli S, Godfrey DG, 1995. Isolation of *Trypanosoma brucei gambiense* from northern Uganda: evaluation of the kit for *in vitro* isolation (KIVI) in an epidemic focus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 89, 388-389.

Magez S, Geuskens M, Beschin A, del Favero H, Verschueren H, Lucas R, Pays E, de Baetselier P, 1997. Specific uptake of tumor necrosis factor-alpha is involved in growth control of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol.* 137, 715-727.

Magez S, Stijlemans B, Radwanska M, Pays E, Ferguson MA, De Baetselier P, 1998. The glycosyl-inositol-phosphate and dimyristoylglycerol moieties of the glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant-specific surface glycoprotein are distinct macrophage-activating factors. *J Immunol.* 160, 1949-1956.

Magnus E, Van Meirvenne N, Vervoot T, Le Ray D, Wéry M, 1978. Use of freeze-dried trypanosomes in the indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of sleeping sickness. *Ann Soc Belge Méd Trop.* 58, 103-109.

Magona JW, Mayende JS, Olaho-Mukani W, Coleman PG, Jonsson NN, Welburn SC, Eisler MC, 2003. A comparative study on the clinical, parasitological and molecular diagnosis of bovine trypanosomosis in Uganda. *Onderstepoort J Vet Res.* 70, 213-218.

Magona JW, Mayende JS, Walubengo J, 2002. Comparative evaluation of the antibody-detection ELISA technique using microplates precoated with denatured crude antigens from *Trypanosoma congolense* or *Trypanosoma vivax*. *Trop Anim Health Prod.* 34, 295-308.

Maloo SH, Chema S, Connor S, Durkin J, Kimotho P, Machl JHH, Mukendi F, Murray M, Ragieya JM, Trail JCM, 1988. The use of chemoprophylaxis in east African Zebu village cattle exposed to trypanosomiasis in Muhaka, Kenya In: "Livestock production in tsetse affected areas of Africa. International Livestock Centre for Africa and International Laboratory for Research on Animal Diseases (ed). Nairobi, Kenya, pp 283-288.

Malvy D, Djossouf F, Weill FX, Chapuis P, Longy-Boursier M, Le Bras M, 2000. Guess What ! Human West African trypanosomiasis with chancre presentation. *Eur J Dermatol.* 10, 561-562.

Masocha W, Robertson B, Rottenberg ME, Mhlanga J, Sorokin L, Kristensson K, 2004. Cerebral vessel laminins and IFN-gamma define *Trypanosoma brucei brucei* penetration of the blood-brain barrier. *J Clin Invest.* 114, 689-694.

Martin G, Leboeuf A, Roubaud E, 1909. Rapport de la mission d'études de la maladie du sommeil au Congo français, 1906-1908. Masson et Cie, Paris, 721p.

Matovu E, Geiser F, Schneider V, Maser P, Enyaru JC, Kaminsky R, Gallati S, Seebeck T, 2001. Genetic variants of the TbAT1 adenosine transporter from African trypanosomes in relapse infections following melarsoprol therapy. *Mol Biochem Parasitol.* 117, 73-81.

Mattern P, Klein F, Pautrizel R, Jongepier-Geerdes YE, 1980. Anti-immunoglobulins and heterophil agglutinins in experimental trypanosomiasis. *Infect Immun.* 28, 812-817.

May JM, Qu ZC, Cobb CE, 2004. Reduction and uptake of methylene blue by human erythrocytes. *Am J Physiol.* 286, 1390-1398.

Mayer B, Brunner F, Schmidt K, 1993. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol.* 45, 367-374.

Mayer JD, Morello A, Repetto Y, Tellez R, Rodriguez A, Zelada U, Puebla P, Caballero E, Medarde M, Nunez-Vergara LJ, Squella JA, Bonta M, Bollo S, San Feliciano A, 2000.

Effects of 3-chloro-phenyl-1,4-dihydropyridine derivatives on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 125, 103-109.

Mehlitz D, Zillmann U, Scott CM, Godfrey DG, 1982. Epidemiological studies on the animal reservoir of gambiense sleeping sickness. III. Characterization of *Trypanozoon* stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Tropenmed Parasit.* 33, 113-118.

Miller MD, Krangel MS, 1992. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol.* 12, 17-46.

Moloo SK, Sabwa CL, Baylis M, 2000. Feeding behaviour of *Glossina pallidipes* and *G. morsitans centralis* on Boran cattle infected with *Trypanosoma congolense* or *T. vivax* under laboratory conditions. *Med Vet Entomol.* 14, 290-299.

Molyneux DH, 1998. Vector-borne parasitic diseases-an overview of recent changes. *Int J Parasitol.* 28, 927-934.

Molyneux DH, Pentreath V, Doua F, 1996. African Trypanosomiasis in man. In: Manson's Tropical Diseases, (Ed) Cook GC. WB Saunders Company Ltd, London, UK, pp 1183-1196.

Moore KW, O'Garra A, Malefyt RD, Vieira P, Mosmann TR, 1993. Interleukine 10. *Ann Rev Immunol.* 11, 165-179.

Moser DR, Cook GA, Ochs DE, Bailey CP, McKane MR, Donelson JE, 1989. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology.* 1, 57-66.

Mulenga C, Mhlanga JD, Kristensson K, Robertson B, 2001. *Trypanosoma brucei brucei* crosses the blood-brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat chronic disease model. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 27, 77-85.

Murray M, Clifford DJ, Gettinby G, Snow WF, McIntyre WI, 1981. Susceptibility to African

trypanosomiasis of N'Dama and Zebu cattle in an area of *Glossina morsitans submorsitans* challenge. Vet Rec. 109, 503-510.

Murray M, Morrison WI, Whitelaw DD, 1982. Host susceptibility to African trypanosomiasis: trypanotolerance. Adv Parasitol. 21, 1-68.

Namangala B, Brys L, Magez S, De Baetselier P, Beschin A, 2000. *Trypanosoma brucei brucei* infection impairs MHC class II antigen presentation capacity of macrophages. Parasite Immunol. 22, 361-370.

Namangala B, De Baetselier P, Noel W, Brys L, Beschin A, 2001. Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomiasis. J. Leukoc. Biol. 69, 387-396.

Nantulya VM, Doua F, Molisho D, 1992. Diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness using an antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay. Trans R Soc Trop Med Hyg. 86, 42-45.

Ndo D, Nicolas A, Caix M, Bouteille B, Dumas M, Pestre-alexandre M, 1991. Techniques for collectiong cerebrospinal fluid from sheep. Progr Vet Neurol. 2, 77-79.

Nesslany F, Brugier S, Mouries MA, Le Curieux F, Marzin D, 2004. *In vitro* and *in vivo* chromosomal aberrations induced by megalozol. Mutat Res. 560, 147-158.

Njiru ZK, Ndung'u K, Matete G, Ndungu JM, Gibson WC, 2004. Detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense* in animals from sleeping sickness foci in East Africa using the serum resistance associated (SRA) gene. Acta Trop. 90, 249-254.

Noireau F, Paindavoine P, Lemesre JL, Toudic A, Pays E, Gouteux JP, Steinert M, Frézil JL, 1989. The epidemiological importance of the animal reservoir of *Trypanosoma brucei gambiense* in the Congo: Characterization of the *T. brucei* complex. Tropenmed Parasit. 40, 9-11.

Nok AJ, 2003. Arsenicals (melarsoprol), pentamidine and suramin in the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitol Res.* 90, 71-79.

Nok AJ, Ibrahim S, Arowosafe S, Longdet I, Ambrose A, Onyenekwe PC, Whong CZ, 1994. The trypanocidal effect of *Cannabis sativa* constituents in experimental animal trypanosomiasis. *Vet Hum Toxicol.* 36, 522-524.

Ojok L, Kaeufer-Weiss I, Weiss E, 2002. Distribution of *Trypanosoma congolense* in infected multimammate rats (*Mastomys coucha*): light and electron microscopical studies. *Vet Parasitol.* 105, 327-336.

Olaho-Mukani W, Nyang'ao JMN, Ngaira JM, Omuse JK, Mbwabi D, Tengekyon KM, Njenga JN, Igweh AC, 1994. Immunoassay of circulating trypanosomal antigens in sleeping sickness patients undergoing treatment. *J Immunoassay.* 15, 69-77.

Olsson T, Bakhiet M, Höjeberg B, Ljungdahl A, Edlund C, Andersson G, Ekre H-P, Fung-Leung W-P, Mak T, Kristensson K, 1993. CD8 is critically involved in lymphocyte activation by a *T. brucei brucei*-released molecule. *Cell.* 72, 715-727.

OMS, 1998, Control and surveillance of African Trypanosomiasis. Report of a W.H.O. Expert Committee Technical Report Series n°881. Geneva, Switzerland, 114 p.

OMS, 2000. Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases. Chapitre 8, pp 93-106.

Onah DN, Hopkins J, Luckins AG, 2000. Effects of the depletion of CD8(+) T cells and monocytes on the proliferative responses of peripheral blood leucocytes from *Trypanosoma evansi*-infected sheep. *Vet Parasitol.* 92, 25-35.

Onyango RJ, Van Hove K, De Raadt P, 1966. The epidemiology of *Trypanosoma rhodesiense* sleeping sickness in Alego location, Central Nyanza, Kenya. I. Evidence that cattle may act as reservoir hosts of trypanosomes infective to human. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 60, 175-182.

Osaer S, Goossens B, Kora S, Jeffcoate I, 1999. Effects of *Trypanosoma congolense* infection and diet on puberty, age at first lambing and haematology changes in Djallonke ewe lambs. *Vet Parasitol.* 80, 215-230.

Oudard JL, Diallo B, Rolez S, 1976. Contribution du laboratoire au diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine. *Med Afr Noire.* 23, 31-37.

Overath C, Chaudi M, Steverding D, Ziegelbauer K, 1994. Invariant surface proteins in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today.* 10, 53-58.

Paling RW, Moloo SK, Scott JR, Gettinby G, Mc Odimba FA, Murray M, 1991a. Susceptibility of N'Dama and Boran cattle to sequential challenges with tsetse-transmitted clones of *Trypanosoma congolense*. *Parasite Immunol.* 13, 427-445.

Paling RW, Moloo SK, Scott JR, Logan-Henfrey LL, Murray M, Williams DJL, 1991b. Susceptibility of N'Dama and Boran cattle to tsetse-transmitted primary and rechallenge infections with a homologous serodeme of *Trypanosoma congolense*. *Parasite Immunol.* 13, 413-425.

Paulnock DM, Collier SP, 2001. Analysis of macrophage activation in African trypanosomiasis. *J Leukoc Biol.* 69, 685-690.

Pearson TW, Liu M, Gardiner IC, Longridge D, Beecroft RP, Sayer PD, Gould SS, Waitumbi JN, Njogu AR, 1986. Use of procyclic trypanosomes for detection of antibodies in sera from vervet monkeys infected with *Trypanosoma rhodesiense*: an immunodiagnostic test for African sleeping sickness. *Acta Trop.* 43, 391-399.

Penchenier L, Dumas V, Grebaut P, Reifenberg JM, Cuny G, 1996. Improvement of blood fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomiasis. *Parasite.* 3, 387-389.

Pentreath VW, 1995. Trypanosomiasis and the nervous system : pathology and immunology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 89, 9-15.

Pépin J, Milord F, Meurice F, Ethier L, Loko L, Mpia B, 1992. High dose nifurtimox for arseno-resistant *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness : an open trial in Zaire. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 86, 254-256.

Peruzzi M, Azzari C, Rossi ME, De Martino M, Vierucci A, 2000. Inhibition of natural killer cell cytotoxicity and interferon gamma production by the envelope protein of HIV and prevention by vasoactive intestinal peptide. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16, 1067-1073.

Peter C, Hongwan D, Kupfer A, Lauterburg BH, 2000. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *Eur J Clin Pharmacol.* 56, 247-250.

Phillips MA, Wang CC, 1987. A *Trypanosoma brucei* mutant resistant to alpha-difluoromethylornithine. *Mol Biochem Parasitol.* 22, 9-17.

Poli P, Aline de Mello M, Buschini A, Mortara RA, Northfleet de Albuquerque C, da Silva S, Rossi C, Zucchi TM, 2004. Cytotoxic and genotoxic effects of meglumine, an anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests. *Biochem Pharmacol.* 64, 1617-1627.

Poltera AA, Cox JN, Owor R, 1976. Pancarditis affecting the conducting system and valves in human African trypanosomiasis. *Brit Heart J.* 38, 827-837.

Poltera AA, Hochmann A, Lambert PH, 1982. *Trypanosoma brucei gambiense*: cerebral immunopathology in mice. *Acta Trop.* 39, 205-218.

Poltera AA, Hochmann A, Rudin W, Lambert PH, 1980. *Trypanosoma brucei brucei*: a model for cerebral trypanosomiasis in mice—an immunological, histological and electronmicroscopic study. *Clin Exp Immunol.* 40, 496-507.

Poltera AA, Sayer PD, 1983. Cardiac lymph drainage in experimental African trypanosomiasis in vervet monkey. *Bull Soc Path Ex.* 76, 614-621.

Poltera AA, Sayer PD, Brighthouse G, Bovell D, Rudin W, 1985a. Immunopathological aspects of trypanosomal meningoencephalitis in vervet monkeys after relapse following Berenil treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 79, 527-531.

Poltera AA, Sayer PD, Rudin W, Bowell D, 1985b. Trypanosomal cardiac valvulitis in vervet monkeys. *Trop Med Parasitol.* 36, 77-80.

Radwanska M, Claes F, Magez S, Magnus E, Perez-Morga D, Pays E, Buscher P, 2002. Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am J Trop Med Hyg.* 67, 289-295.

Raether W, Seidenath H, 1976. Trypanocidal effect of diamidine 98/202 in experimental *Trypanosoma rhodesiense* infection of the stump-tailed macaque (*Macaca arctoides*). *Tropenmed Parasitol.* 27, 238-244.

Rebeski DE, Winger EM, Aigner H, Wright P, Crowther J, Dwinger RH, 1998. Study of the effect of gamma-irradiation on bovine serum samples on the ability of monoclonal antibodies to detect invariant antigens of *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. brucei* in enzyme-linked immunosorbent assays. *Vet Parasitol.* 79, 109-122.

Richez P, Ruckebusch Y, 1979. Efficacité thérapeutique et disponibilité biologique des médicaments vétérinaires. *Rev. Méd. Vét.* 130, 1311-1344.

Riordan JR, Deuchars K, Kartner N, Alon N, Trent J, Ling V, 1985. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature.* 316, 817-819.

Ross CA, Barns AM, 1996. Alteration to one of three adenosine transporters is associated with resistance to cymelarsan in *Trypanosoma evansi*. *Parasitol Res.* 82, 183-188.

Ruddle NH, 1992. Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta). *Curr Opin Immunol.* 4, 327-332.

Rudin W, Poltera AA, Jenni L, 1983. An EM study on cerebral trypanosomiasis in rodents and primates. *Contr Microbiol Immunol.* 7, 165-172.

Sanchez MA, Tryon R, Green J, Boor I, Landfear SM, 2002. Six related nucleoside/nucleobase transporters from *Trypanosoma brucei* exhibit distinct biochemical functions. *J Biol Chem.* 277, 21499-21504.

Sanchez MA, Ullman B, Landfear SM, Carter NS, 1999. Cloning and functional expression of a gene encoding a P1 type nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 274, 30244-30249.

Sayer PD, Gould SS, Waitumbi JN, Murray PK, Njogu AR, 1985. Guérison des singes infectés par *Trypanosoma rhodesiense* au moyen de faibles doses de mélarsozol ou de suramine et de nitroimidazole. Conseil Scientifique International de Recherche sur les Trypanosomiasés et leur Contrôle. OUA/STRC publication n°113, Harare, Zimbabwe p 131.

Sayer PD, Onyango JD, Gould SS, Waitumbi JN, Raseroka BH, Akol GWO, Ndung'u JM, Njogu AR, 1987. Treatment of African trypanosomiasis with combinations of drugs with special reference to suramin and nitroimidazoles. International Scientific Council for trypanosomiasis Research and Control. 19th meeting, Lomé, Togo. 205-210.

Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV, 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature.* 347, 669-71.

Schall TJ, Bacon KB, 1994. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol.* 6, 865-873.

Schirmer RH, Coulibaly B, Stich A, Scheiwein M, Merkle H, Eubel J, Becker K, Becher H, 2003. Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Rep.* 8, 272-275.

Schirmer RH, Coulibaly B, Stich A, Scheiwein M, Merkle H, Eubel J, Becker K, Becher H, Muller O, Zich T, Schiek W, Kouyate B, 2003. Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Rep.* 8, 272-275.

Schleifer KW, Mansfield JM, 1993. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *J Immunol.* 151, 5492-5503.

Schmid C, Nkunku S, Merolle A, Vounatsou P, Burri C, 2004. Efficacy of 10-day melarsoprol schedule 2 years after treatment for late-stage gambiense sleeping sickness. *Lancet* 364, 789-790.

Schmidt H, Sayer P, 1982a. *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection in vervet monkeys. I. Parasitologic, hematologic, immunologic and histologic results. *Tropenmed Parasitol.* 33, 249-254.

Schmidt H, Sayer P, 1982b. *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection in vervet monkeys. II. Provocation of the encephalitic late phase by treatment of infected monkeys. *Tropenmed Parasitol.* 33, 255-259.

Seed JR, Sechelski B, Loomis MR, 1990. A survey for a trypanocidal factor in primate sera. *J Protozool.* 37, 393-400.

Shahi SK, Krauth-Siegel RL, Clayton CE, 2002. Overexpression of the putative thiol conjugate transporter TbMRPA causes melarsoprol resistance in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol.* 43, 1129-1138.

Shalaby T, Liniger M, Seebeck T, 2001. The regulatory subunit of a cGMP-regulated protein kinase A of *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem.* 268, 6197-6206.

Shalaby T, Liniger M, Seebeck T, 2001. The regulatory subunit of a cGMP-regulated protein kinase A of *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem.* 268, 6197-206.

Shi M, Pan W, Tabel H, 2003. Experimental African trypanosomiasis: IFN-gamma mediates early mortality. *Eur J Immunol.* 33, 108-118.

Simarro PP, Louis FJ, Jannin J, Cattand P, 2004. Lutte contre la trypanosomose humaine africaine: Actualités et perspectives. *Med Trop.* 64, 122.

Starkey JR, Hosick HL, Stanford DR, Liggitt HD, 1984. Interaction of metastatic tumor cells with bovine lens capsule basement membrane. *Cancer Res.* 44, 1585-1594.

Sternberg JM, 1996. Elevated serum nitrate in *Trypanosoma brucei rhodesiense* infections : evidence for inducible nitric oxide synthesis in trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 90, 395.

Sternberg JM, 1998. Immunobiology of African trypanosomiasis. *Chem Immunol.* 70, 186-190.

Stewart JL, 1937. The cattle of the gold coast. *Vet Rec.* 49, 1289-1297.

Sturk LM, Brock JL, Bagnell CR, Hall JE, Tidwell RR, 2004. Distribution and quantitation of the anti-trypanosomal diamidine 2,5-bis(4-amidinophenyl)furan (DB75) and its N-methoxy prodrug DB289 in murine brain tissue. *Acta Trop.* 91, 131-143.

Subira D, Castanon S, Aceituno E, Hernandez J, Jimenez-Garofano C, Jimenez A, Jimenez AM, Roman A, Orfao A, 2002. Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice. *Am J Clin Pathol.* 117, 952-958.

Svenningsson A, Andersen O, Edsbagge M, Stemme S, 1995. Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol.* 63, 39-46.

Taub DD, Lloyd AR, Wang JM, Oppenheim JJ, Kelvin DJ, 1993. The effects of human recombinant MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and RANTES on the chemotaxis and adhesion of T cell subsets. *Adv Exp Med Biol.* 351, 139-146.

Taylor KA, 1998. Immune responses of cattle to African trypanosomes : protective or pathogenic ? *Int J Parasitol.* 28, 219-240.

Trail JCM, Sones K, Jibbo JMC, Durkin J, Light DE, Murray M, 1985. Productivity of Boran cattle maintained by chemoprophylaxis under trypanosomiasis risk. ILCA Research Report No.9, ILCA, Addis Ababa, Ethiopia.

Truc P, Aerts D, McNamara JJ, Claes Y, Allingham R, Le Ray D, Godfrey DG, 1992. Direct isolation *in vitro* of *Trypanosoma brucei* from man and other animals, and its potential value for the diagnosis of gambian trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 86, 627-629.

Truc P, Bailey JW, Doua F, Laveissière C, Godfrey DG, 1994. A comparison of parasitological methods for the diagnosis of gambian trypanosomiasis in an area of low endemicity in Côte d'Ivoire. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 88, 419-421.

Truc P, Cuny G, 2000. Apport de la biologie moléculaire à l'identification des trypanosomes responsables de la trypanosomiase humaine africaine ou maladie du sommeil. *Med. Trop.* 60, 115-119.

Truc P, Jamonneau V, N'Guessan P, N'Dri L, Diallo PB, Cuny G, 1998. *Trypanosoma brucei* spp and *Trypanosoma congolense* : mixed human infection in Côte d'Ivoire. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 92, 537-538.

Uzonna JE, Kaushik RS, Gordon JR, Tabel H, 1998. Immunoregulation in experimental murine *Trypanosoma congolense* infection: anti-IL-10 antibodies reverse trypanosome-mediated suppression of lymphocyte proliferation *in vitro* and moderately prolong the lifespan of genetically susceptible BALB/c mice. *Parasite Immunol.* 20, 293-302.

Vaddi K, Newton RC, 1994. Comparison of biological responses of human monocytes and THP-1 cells to chemokines of the intercrine-beta family. *J Leukoc Biol.* 55, 756-762.

Van den Bossche P, De Deken R, Brandt J, Geerts S, Geysen D, Berkvens D, 2004. The transmission of mixed *Trypanosoma brucei brucei/T. congolense* infections by tsetse (*Glossina morsitans morsitans*). *Vet Parasitol.* 119, 147-153.

Van Marck EAE, Gigase PLJ, Beckers A, Wéry M, 1981. Experimental infections of laboratory rodents with recently isolated stocks of *Trypanosoma brucei gambiense*. 2. Histopathological investigations. Z Parasitenkd. 64, 187-193.

Van Meirvenne N, Büscher P, Aerts D, 1989. Use of SDS for detection of trypanosomes in haemolysed blood samples. Poster presentation, 25^{ème} Séminaire sur les Trypanosomiasis., British society for Parasitology, Glasgow.

Van Nieuwenhowe S, 1992. Advances in sleeping sickness therapy. Ann Soc Belge Méd Trop. 72, 39-51.

Van Xong H, De Baetselier P, Pays E, Magez S, 2002. Selective pressure can influence the resistance to *Trypanosoma congolense* to human serum. Exp Parasitol. 102, 61-65.

Vervoort T, Magnus E, Le Ray D, Van Meirvenne N, 1983. Antigenic variation of *Trypanosoma brucei* with reference to the serodiagnosis of sleeping sickness. Verh K Acad Geneesk Belg. 45, 329-353.

Vervoot T, Magnus E, Van Meirvenne N, 1978. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with variable antigen for serodiagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. Ann Soc Belge Méd Trop. 58, 177-183.

Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. J Biol Chem. 266, 7313-7316.

Vincendeau P, Jauberteau-Marchan MO, Dalouède S, Ayed Z, 1999. Immunology of African trypanosomiasis (chapitre 8) In: "Progress in human African Trypanosomiasis, sleeping sickness", (Eds) Dumas M, Bouteille B, Buguet A. Springer-Verlag, France, pp 137-156.

Vowels BR, Gershwin ME, Gardner MB, McGraw TP, 1990. Natural killer cell activity of rhesus macaques against retrovirus-pulsed CD4+ target cells. AIDS Res Hum Retroviruses. 6, 905-918.

Wall HS, Worthman C, Else JG, 1985. Effects of ketamine anaesthesia, stress and repeated bleeding on the haematology of vervet monkeys. *Lab Anim.* 19, 138-144.

Wallace LJ, Candlish D, De Koning HP, 2002. Different substrate recognition motifs of human and trypanosome nucleobase transporters. Selective uptake of purine antimetabolites. *J Biol Chem.* 277, 26149-26156.

Warner NL, 1987. Human lymphocyte subpopulations: analysis by multiparameter flow cytometry and monoclonal antibodies. *Cancer Detect Prev Suppl.* 1, 515-523.

Welburn SC, Picozzi K, Fevre EM, Coleman PG, Odiit M, Carrington M, Maudlin I, 2001. Identification of human-infective trypanosomes in animal reservoir of sleeping sickness in Uganda by means of serum-resistance-associated (SRA) gene. *Lancet.* 358, 2017-2019.

Wellde BT, Reardon MJ, Chumo BA, Kovatch RM, Waema D, Wykoff DE, Mwangi J, Boyce WL, Williams JS, 1989a. Cerebral trypanosomiasis in naturally-infected cattle in the Lambwe Valley South Nyanza, Kenya. *Ann Trop Med Parasitol.* 83, 151-160.

Wellde BT, Reardon MJ, Kovatch RM, Chumo BA, Williams JS, Boyce WL, Hockmeyer WT, Wykoff DE, 1989b. Experimental infection of cattle with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Ann Trop Med Parasitol.* 83, 133-150.

Wernery U, Zachariah R, Mumford JA, Luckins T, 2001. Preliminary evaluation of diagnostic tests using horses experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet J.* 161, 287-300.

Wernery U, Zachariah R, Mumford JA, Luckins T, 2001. Preliminary evaluation of diagnostic tests using horses experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet J.* 161, 287-300.

Woo PTK, 1970. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop.* 27, 384-386.

ANNEXES

ANNEXE 1

**Consentement éclairé signé par les patients angolais de l'étude des populations
lymphocytaires du sang et du LCR**

DOENÇA DO SONO

FORMULARIO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu Senhor(a)morador(a) do
Município de.....Bairro.....Rua.....
Casa nº.....

declaro estar informado(a) das modalidades do protocolo de pesquisa sobre a melhoria do diagnóstico da fase nervosa da Doença do sono e

tendo lido com o, Médico responsável do centro de investigação a nota de consentimento relativa a este protocolo.

Pela presente, declaro autorizar ~~a minha inclusão~~/ a inclusão do meu parente, filho ou ~~filha~~ neste protocolo nas condições descritas na nota de consentimento.

Assinada por mim.

Impressão digital
(no caso que o interessado não
saiba escrever ou assinar)



Date. 21-11/2012.....

Escrever com todas as letras a menção “Lido e aprovado” e assinar.

ANNEXE 2

Plasma kinetics and efficacy of oral megazol treatment in *Trypanosoma brucei brucei*-infected sheep

Caroline BODA^{1*}, Bertin ENANGA¹, Hélène DUMET², Gérard CHAUVIERE³,
François LABROUSSE⁴, Claude COUQUET², Sylvie SAIVIN⁵, Georges HOUIN⁵,
Jacques PERIE³, Michel DUMAS¹, Bernard BOUTEILLE¹

ANNEXE 3

**Graphiques de cytométrie obtenus par analyse des lymphocytes du LCR des singes verts
au cours de l'infection à *T. b. gambiense*.**