

UNIVERSITE DE LIMOGES

**Ecole Doctorale ED 258
Science-Technologie-Santé
Faculté de Médecine
Année 2005
Thèse n°**

**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO**

**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Laboratório de Glicobiologia**

**Thèse en co-tutelle
Pour obtenir le grade de**

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

**Discipline : Biologie-Sciences-Santé
Spécialité : Immunologie et Parasitologie**

DOUTOR EM CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**Disciplina : Biofísica
Especialidade : Biologia Celular e Imunologia**

Présentée et soutenue publiquement par

Bertrand COURTILOUX

Le 29 juin 2005

**Etude des mécanismes inflammatoires
au cours de la trypanosomose humaine africaine :
Applications en diagnostic et en thérapeutique.**

**Dr. B. BOUTEILLE
Directeur de thèse**

**Pr. M. O. JAUBERTEAU-MARCHAN
Directrice de thèse**

**Pr. L. MENDONÇA PREVIATO
Directrice de co-tutelle de thèse**

Jury

**Monsieur le Pr. Michel DUMAS
Monsieur le Pr. Krister KRISTENSSON
Monsieur le Pr. Philippe VINCENDEAU
Mademoiselle le Dr. Sylvie BISSER
Madame le Pr. Lucia MENDONÇA PREVIATO
Madame le Pr. Marie Odile JAUBERTEAU-MARCHAN
Monsieur le Dr. Bernard BOUTEILLE**

**Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de co-tutelle de thèse
Directrice de thèse
Directeur de thèse**

« C'est la curiosité qui a été et qui demeure à l'origine de toute connaissance »

Aristote

Notre travail de thèse a été réalisé à l'Institut d'Epidémiologie Neurologique et de Neurologie Tropicale, dans l'Equipe Accueil EA 3174 "Neuroparasitologie Tropicale et Neuroépidémiologie" et dans l'Equipe Accueil EA 3842 "Homéostasie cellulaire et Pathologies" de l'Université de Limoges.

Il a été aussi réalisé dans le cadre d'une co tutelle de thèse avec le laboratoire de glycobiologie de l'Institut de Biophysique Carlos CHAGAS FILHO, de l'Université Fédérale de Rio de Janeiro.

Nous avons bénéficié d'une bourse de la région Limousin, du BQR "Actions Internationales" de l'Université de Limoges pour nos missions de travail (Gabon et Brésil) et du projet de coopération franco-brésilien CAPES/COFECUB n°405/02.

Notre travail a aussi été retenu par le Ministère de la Recherche dans le cadre de subventions allouées aux thèses réalisées en co tutelle (Année 2003).

Ce travail a également été financé en partie par la Fondation Pierre Fabre (Castres, France).

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur le Professeur Michel DUMAS, de nous faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Merci pour vos conseils, votre expérience et vos qualités humaines, qui nous ont permis de travailler sur la trypanosomose depuis presque 6 ans.

Nous remercions le Docteur Bernard BOUTEILLE, Directeur de l'équipe EA-3174 Neuroparasitologie et Neuroépidémiologie Tropicale, pour nous avoir accueillis dans son équipe de recherche, pour avoir accepté la direction de cette thèse, pour son soutien et ses connaissances sur la trypanosomose.

Madame le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU MARCHAN, nous tenons à vous remercier pour nous avoir hébergé au sein de votre laboratoire, EA-3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies, vos compétences, votre dévouement pour la trypanosomose à toute épreuve, vos conseils et votre disponibilité ont permis la réalisation de ce projet dans les meilleures conditions.

Nous tenons à témoigner notre reconnaissance à Madame le Professeur Lucia MENDONÇA PREVIATO pour nous avoir accueilli au sein de son Laboratoire de Glycobiologie de l'UFRJ au Brésil au cours de mes deux séjours.

Monsieur le Professeur Philippe VINCENDEAU, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Krister KRISTENSSON, nous vous exprimons toute notre gratitude pour avoir accepté de juger ce travail.

Merci, Madame le Docteur Sylvie BISSER, d'avoir accepté notre invitation à ce jury de thèse et merci de nous avoir transmis votre passion pour la trypano et de nous avoir fait bénéficier de votre aide et de votre expérience de terrain tout au long de ce travail.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur Pierre Marie PREUX, Directeur de l'IENT, pour l'aide qu'il a pu m'apporter. Merci également aux membres de l'équipe EA 3174 Neuroparasitologie et Neuroépidémiologie Tropicale, en particulier Mademoiselle Lynda PERVIEUX. Je remercie également les membres de l'équipe EA 3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies.

Aux femmes qui m'ont supporté (ou que j'ai supporté !!) 3, 4 ou 5 ans, en tout premier lieu le Dr Caroline BODA, merci de m'avoir sorti de prison entre autre et merci pour ta disponibilité permanente et ta sincère amitié. A Mesdemoiselles Stéphanie GIRAUD et Barbara BESSETTE pour m'avoir tout enseigné sur la vie de la Femme dans un laboratoire et ailleurs... Drs Catherine DECOURT et Caroline LEMORVAN, merci pour votre soutien et aide maintenant à distance, merci pour vos qualités humaines sans conteste. Merci également à Gaëlle BEGAUD, et Elodie LOUM pour leur bonne humeur quotidienne.

Merci à Monsieur Christophe LAUTRETTE pour ses bons conseils, sa bonne humeur et son soutien depuis le début de cette aventure, merci également à Monsieur le Docteur Kim LEE.

Merci à Mademoiselle Murielle GIRARD de m'avoir initié à la trypanosomose et à la rigueur du travail en laboratoire.

Obrigado a Professor José Osvaldo PREVIATO, ter-me acolhido no Brasil e ter-me feito descobrir o seu país, mas igualmente ter-me guiado sobre as estradas da análise dos glicolipídios. Obrigado igualmente aos meus amigos brasileiros, Katherine ANTUNES MATTOS, Adriane TODESCHINI, Orlando AGRELLOS FILHO, Wagner BARBOSA DIAS, Juliana MANASFI FIGUEIREDO, Lilian de OLIVEIRA MOREIRA, e também a todos os demais companheiros de laboratório....

Merci au Doyen de la Faculté de Pharmacie de Limoges, Monsieur le Professeur Gérard HABRIOUX, d'avoir autant oeuvré au financement d'une partie de ma 4^{ème} année de thèse. Je remercie au même titre Monsieur le Professeur ACHARD pour son aide au financement de l'autre partie de ma 4^{ème} année.

Mes plus profonds remerciements au laboratoire de parasitologie de Limoges et en particulier à Madame le Professeur Marie-Laure DARDE, aux techniciennes, techniciens et secrétaires (en particulier Christine) de son laboratoire ainsi que les techniciennes du laboratoire d'immunologie pour leur aide, les techniciens du laboratoire d'hématologie en particulier Jean Luc FAUCHER.

Merci à Monsieur Jacques DEMOMENT pour l'entretien des animaux. Merci également à Mademoiselle Gislaine DESFORGE pour maintenir la propreté de nos bureaux et laboratoires.

Je tiens également à remercier les secrétaires de l'Institut de Neurologie Tropicale (Geneviève, Pascale et celles qui sont passées plus ou moins brièvement à l'institut pour qui je garde un excellent souvenir).

Merci à mes amis éparpillés un peu partout : Jacques, Jean Luc, Maïté, Francine, Céline, Patrice, Valérie et pardon à ceux que j'oublie...

Enfin, un grand merci à mes parents pour leur soutien de tous les instants et qui ont plus que tous contribué à leur façon à l'aboutissement de ce travail...

RESUME DETAILLE

La trypanosomose humaine africaine (THA) ou maladie du sommeil est une maladie parasitaire qui pose un véritable problème de santé publique : 60 millions d'individus sont exposés, et 20 000 à 25 000 nouveaux cas sont déclarés par an. Ces chiffres ne reflètent pas la réalité, en raison de la difficulté à détecter tous les cas. La THA est due à un protozoaire flagellé sanguicole du genre *Trypanosoma* dont le vecteur est la mouche tsé-tsé ou glossine. Deux espèces sont responsables de la THA (i) *Trypanosoma brucei gambiense* (parties occidentale et centrale de l'Afrique) et (ii) *T. b. rhodesiense* (partie orientale de l'Afrique). Schématiquement, on distingue 2 stades dans l'évolution clinique de la maladie, le stade de dissémination dans tout l'organisme ou stade lymphatico-sanguin et le stade méningo-encéphalitique ou stade de polarisation nerveuse. C'est au cours de ce stade que l'on observe les signes neurologiques : troubles du sommeil, troubles de la sensibilité subjective, troubles des fonctions endocriniennes. Puis, la maladie évolue vers un stade de démyélinisation terminale conduisant à la mort des patients. Le mélarsoprol, dérivé arsenical actif au stade neurologique, est très toxique et provoque dans 5% des cas le décès des patients par encéphalopathie. Le diagnostic des stades dont dépend le traitement reste difficile, car le moment et le mécanisme de passage de la barrière hémato-encéphalique demeurent imprécis par manque de critères spécifiques. Seule la découverte des trypanosomes dans le liquide céphalorachidien (LCR) permet d'affirmer le diagnostic de stade nerveux. Néanmoins, la détection des parasites dans le LCR est difficile, tout particulièrement lors des campagnes de prospection. De ce fait, sur le terrain, le critère habituellement retenu pour le diagnostic de stade neurologique est une élévation de la cytorachie supérieure à 5 cellules par μL de LCR, critère discuté car non spécifique. Dans notre étude pour l'analyse des résultats nous avons opté pour une autre classification biologique. Ainsi l'analyse des résultats a été effectuée en introduisant un stade intermédiaire dont la cytorachie est comprise entre 5 et 20 cellules par μL de LCR, le stade 1 correspond à une cytorachie inférieure à 5 cellules par μL de LCR et le stade 2 correspond à une cytorachie supérieure à 20 cellules par μL de LCR.

L'objectif principal de notre travail de thèse est l'étude des mécanismes inflammatoires au cours de la trypanosomose humaine africaine et leurs applications en diagnostic et en thérapeutique. Pour comprendre ces mécanismes nous avons étudié les types lymphocytaires et leur état d'activation dans le sang et le LCR de malades aux cours des différents stades de la maladie. Puis nous nous sommes intéressés au franchissement de la

barrière hémato-méningée par les cellules immunes des patients en stade neurologique. Nous avons développé un test permettant de détecter des anticorps spécifiques du stade neurologique de la THA. Enfin, nous avons analysé les structures glycolipidiques du trypanosome vraisemblablement responsables de la synthèse de certains anticorps spécifiques du stade neurologique.

Nous avons réalisé le typage lymphocytaire à la fois dans le sang et dans le LCR de patients par rapport à une population contrôle de même origine. Par cette technique nous avons montré que dans le sang des malades, tous stades confondus, le taux de lymphocytes B augmente de façon significative ce qui permet d'expliquer la grande diversité d'anticorps produits dans le sang des patients atteints de THA. En revanche, le taux de lymphocyte T diminue de façon significative ceci confirmant le caractère immunosuppresseur de la maladie. Avec l'évolution de la maladie, le taux de cellule B CD19 augmente de façon significative dans le LCR des patients. Cette augmentation pourrait constituer un critère de diagnostic du stade 2, plus précis et surtout plus précoce que la cytorachie.

Nous avons cherché à comprendre quels étaient les mécanismes d'attraction des ces lymphocytes dans le système nerveux central (SNC). Dans le sérum et le LCR des patients et de sujets contrôles nous avons mesuré et comparé les taux d'IL-1 β , les taux de chémokines IL-8, MIP-1 α , MCP-1 et RANTES, à l'origine de la migration lymphocytaire. Dans le sérum des patients, quel que soit le stade de la maladie, nous n'avons pas noté de modifications significatives du taux de MIP-1 α , MCP-1, IL-8 ou bien d'IL-1 β . Seul le taux de RANTES est diminué de manière significative entre les patients en stade 1 et ceux en stade intermédiaire et en stade 2, semblant traduire simplement une diminution de la réaction inflammatoire. En revanche, dans le LCR des patients, on note une différence significative entre les taux des patients en stade 1, en stade intermédiaire et en stade 2 pour IL-1 β , IL-8, MCP-1, RANTES et MIP-1 α . Cette différence est surtout importante pour MCP-1, chémokine très importante dans le mécanisme de recrutement des lymphocytes vers le SNC. MCP-1 pourrait donc être un marqueur de stade.

Nous savons que la rupture de la barrière hémato-encéphalique, mal connue, se produit au cours du stade 2 de la maladie. Nous avons étudié l'induction de l'apoptose par les LCR des patients sur les cellules microgliales et sur les macrophages qui participent normalement à sa protection. Contrairement aux LCR contrôles, le LCR des patients atteints de THA induit

l'apoptose sur les cellules microgliales et endothéliales. Nos résultats ont prouvé que des LCR en stade 2 induisent l'apoptose à des niveaux plus élevés sur les cellules microgliales, tandis que le stade de la maladie n'influe pas sur l'induction de l'apoptose sur les cellules endothéliales. Le LCR des patients en stade 2 contient plus de sFasL que celui des patients en stade 1, et les anticorps anti-Fas ont été détectés uniquement chez les patients en stade 2. Mais il semble que d'autres facteurs pro-apoptotiques soient impliqués.

Nous avons montré que les trypanosomes sont capables d'induire la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6, l'IL-8 et le monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales. Ces cellules, cultivées en présence des glycoprotéines variables de surface (VSG) du trypanosome, augmentent leur production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-8, et de NO. Les VSG solubles induisent la translocation de NF- κ B et l'expression des molécules d'adhérence. Ces VSG pourraient probablement être les facteurs solubles moléculaires responsables de l'activation des cellules endothéliales. Le coefficient de perméabilité de ces cellules augmente quand elles sont cultivées en présence des trypanosomes, du surnageant de culture de parasite ou des VSG. Ainsi, *T. b. gambiense* peut activer les cellules endothéliales *in vitro*, par le relargage de facteurs solubles. Les conséquences de cette activation par des produits du parasite peuvent inclure une potentialisation de la réaction inflammatoire, le recrutement de leucocytes, le passage des trypanosomes dans le SNC, et le dysfonctionnement de la barrière durant le stade neurologique de la THA.

Des travaux antérieurs ont montré que la réponse immunitaire induite dans le SNC au cours de la THA conduit à la production spécifique de certains anticorps notamment des anticorps anti-galactocérébrosides (GalC) mais également des anticorps anti-neurofilament (NF). Nous avons développé un test de terrain permettant de rechercher de façon simple ces anticorps dans le LCR des patients et ainsi de diagnostiquer le stade de la maladie. Nous avons utilisé ce test pour le diagnostic de stade, en complément des critères habituels, lors de deux prospections, en Angola et en République Centrafricaine. La détection des deux anticorps anti-NF et anti-GalC dans le LCR par dot-ELISA montre 83,2% de sensibilité et 100% de spécificité pour la détermination du stade 2. Le dot ELISA pourrait être très utile pour la détermination du stade nerveux de la THA dans les campagnes de prospection où le personnel médical de terrain est peu équipé.

Nous avons cherché à améliorer notre test de diagnostic dot ELISA. Ceci nous a

permis de déterminer, par des techniques structurales, la nature glycolipidique d'un constituant antigénique du trypanosome. Nous avons ainsi mis en évidence le glucosylcéramide. Nous avons également montré que le parasite possède une enzyme active, la glucosylcéramide synthase, qui pourrait être impliquée dans les mécanismes d'apoptose et donc faciliter le passage du parasite dans le SNC des patients. Des essais d'immunisation avec les produits de synthèse de cette enzyme nous ont montré une certaine protection contre le parasite. Il reste à caractériser de façon plus précise cette enzyme et son implication dans le métabolisme du parasite et particulièrement dans les mécanismes de chimiorésistance dans le THA.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs de stade de la maladie du sommeil grâce à la cytométrie en flux, le dosage de chémokines ou le dot ELISA. Les perspectives importantes sont l'adaptation au terrain de la recherche de ces nouveaux marqueurs par des moyens simples et peu coûteux afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de THA.

The human african trypanosomose (HAT), or sleeping sickness, is a parasitic disease which still remains a true public health problem : 60 million individuals are exposed, and 20 000 to 25 000 new cases develop each year. Nevertheless, these figures are not representative of reality, because of difficulties encountered for detecting all cases. HAT is due to a protozoon *Trypanosoma* whose vector is the tsetse fly or glossine. Two species are responsible for HAT (i) *Trypanosoma brucei gambiense* (West and central Africa) and (ii) *T b rhodesiense* (Eastern Africa). Schematically, 2 stages are distinguished in the clinical disease evolution, the stage of dissemination in all the organism, or heamo-lymphatic stage, and the meningo-encephalitic polarization stage, or nervous stage. During this latter stage, neurological signs can be observed as sleep disorders, disturbed subjective sensitivity or endocriniane disorders. Then, a demyelinating stage begins before the patients die. The melarsoprol, which corresponds to an arsenical derivative treatment that is active at the neurological stage, is very toxic and causes the death of the patients by encephalopathy in 5% of the cases. Diagnosis of the stage, on which depends the treatment, remains difficult because both the timing and the mechanism by which the trypanosome pass through the heamo-encephalic barrier remain uncertain, due to the lack of really specific criteria. Only the presence of trypanosomes in the cerebrospinal fluid (CSF) allows to confirm the diagnosis of nervous stage. Nevertheless, the detection of the parasites in the CSF is difficult, particularly at the time of the field campaigns. That's the reason why criterion usually retained for the neurological diagnosis of stage is an increase in the cell count higher than 5 cells by μL of CSF, which still remain non specific criterion. In our study we chose another biological classification so to analyse the results. Thus, the analysis of the results was carried out by introducing an intermediate stage, for which the cell count is between 5 and 20 cells by μL of CSF : stage 1 corresponds to a cell count lower than 5 cells by μL of CSF and stage 2 corresponds to a cell count higher than 20 cells by μL of CSF.

The principal objective of our PhD work is the study of the inflammatory mechanisms during HAT and their possible applications in diagnosis and therapeutic. To understand these mechanisms, we studied the lymphocyte sub-types and their activation in the blood and the CSF of patients at different stages of the disease. Then we tried to understand the mechanism used by immunes cells of the patients to cross of the blood brain barrier in neurological stage. We developed a test allowing to detect specific antibodies of the neurological stage of the HAT. Lastly, we analysed the glycolipidic structures of the trypanosome probably responsible

for the synthesis of certain specific antibodies of the neurological stage.

We analysed lymphocyte types both in blood and in CSF of patients and we compared these results with a control population of the same ethnic origin. By this technique, we showed that in the blood of the patients, in all stages, the rate of B cells increases to a significant degree, thus explaining the great diversity of antibodies produced in patients blood. On the other hand, the T cells decreases to a significant degree, confirming the immunosuppressive character of the disease. During evolution of the disease, the rate of CD19 B cells increases to a significant degree in the CSF of the patients. This increase could constitute a criterion of diagnosis for stage 2, and especially earlier than the cytorachie.

We tried to understand which were the mechanisms by which these lymphocytes are attracted to the central nervous system (CNS). In the serum and the CSF of both patients and controls, we measured and compared the rates of IL-1 β , of chemokines IL-8, MIP-1 α , MCP-1 and RANTES, which constitute the origin of the lymphocyte migration. In the serum of the patients, whatever the stage of the disease, we did not note any significant modification of the rate of MIP-1 α , MCP-1, IL-8 or of IL-1 β . Only the rate of RANTES is decreased significantly between the patients in stage 1 and those in intermediate stage and stage 2, which simply reflects a reduction in the inflammatory reaction. On the other hand, the LCR of the patients we highlighted a significant difference between the rates of IL-1b, IL-8, MCP-1, RANTES and MIP-1 α for the patients in stage 1, intermediate stage and stage 2. This difference is even more pronounced for MCP-1, which is a chemokine largely important for recruitment of the lymphocytes towards the SNC. MCP-1 could thus be a marker of stage.

We know that the rupture of the blood brain barrier occurs during stage 2 of the disease. We studied the apoptosis induction by the CSF components on both microglial cells and macrophages, which normally take part in its protection. Contrary to the controls CSF, the patients CSF induce apoptosis on both microglial and endothelial cells. Our results proved that CSF in stage 2 induces apoptosis on higher levels on the microglial cells, while the stage of the disease does not influence the apoptosis induction in the endothelial cells. The CSF of the patients in stage 2 contains more sFasL than that of patients in stage 1, and anti-Fas antibodies were detected only among patients in stage 2. But it seems that much more pro-apoptotic factors are involved.

We showed that the trypanosomes are able to induce the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-8 and nitric oxide (NO) by the endothelial cells. These cells, cultivated in the presence of the variable surface glycoproteins (VSG) of the trypanosome, increase their production of TNF- α , IL-6, IL-8, and NO. The soluble VSG induce the translocation of NF- κ B and the expression of adhesion molecules. These VSG could probably be the molecular soluble factors responsible for the activation of the endothelial cells. The coefficient of permeability of these cells increases when they are cultivated in the presence of trypanosomes as well as culture supernatant of parasite or VSG. Thus, *T. b. gambiense* can activate the endothelial cells *in vitro*, by the release of soluble factors. The consequences of this activation by the parasite products can include an inflammatory reaction, the recruitment of leucocytes, the passage of the trypanosomes in the SNC, and the dysfunction of the barrier during the neurological stage of the THA.

Previous work showed that the immunizing response induced in the SNC during the HAT, leads to the specific production of some antibodies, in particular anti-galactocerebrosides (GalC) but also anti-neurofilament antibodies (NF). We developed a field test allowing to detect in a simple way these antibodies in the patients CSF and thus to diagnose the stage of the disease. We used this test for the diagnosis of stage, in complement of the usual criteria, at the time of two field surveys, in Angola and Central African Republic. The detection of the two anti-NF and anti-GalC antibodies in the CSF by dot-ELISA showed 83,2% of sensitivity and 100% of specificity for the determination of stage 2. Dot-ELISA could be very useful for the determination of the nervous stage of the HAT in the field survey where the medical personnel of ground is equipped little. We sought to improve our diagnostic test dot-ELISA. This enabled us to determine, by structural techniques, the glycolipidic nature of an antigenic component of the trypanosome. We thus highlighted the glucosylceramide. We also showed that the parasite contained an activated enzyme, the glucosylceramide synthase, which could be involved in the apoptosis mechanisms and thus could facilitate the crossing of the parasite in the CNS patients. Tests of immunization with the products of this enzyme showed us a protection against the parasite. A more precise characterisation of this enzyme still remains to be performed, so as to point out its implication in the metabolism of the parasite and particularly in the mechanisms of chemo-resistance in the HAT. This work enabled us to highlight new markers of stage of the sleeping sickness, using flow cytometry, cytokines measurement or dot-ELISA, which constitute important

prospects for the adaptation to the field diagnosis. Actually, these new markers are detectable by simple and inexpensive means, which should help to improve the number of detected and cured HAT patients.

A doença parasítica tripanosomíase humana africana (THA) ou doença do sono é um grave problema de saúde pública: 60 milhões de indivíduos são expostos e 20.000 a 25.000 novos casos são declarados por ano. Devido às dificuldades para detectar todos os casos, estes números não refletem a realidade. A THA é causada por um protozoário flagelado sanguícola do gênero *Trypanosoma* cujo vetor é a mosca tsé-tsé ou *glossina*. Duas espécies são responsáveis pela THA (i) *Trypanosoma brucei gambiense* (partes ocidentais e centrais da África) e (ii) *T. b. rhodesiense* (parte oriental da África). Esquemáticamente, distinguem-se 2 fases na evolução clínica da doença, a fase de disseminação em todo o organismo ou fase linfaticosanguínea e a fase meningo-encefálica ou fase de polarização nervosa. É nesta fase que observa-se os sinais neurológicos: perturbações do sono, perturbações da sensibilidade subjetiva e perturbações das funções endócrinas. Em seguida, a doença evolui para uma fase de desmielinização terminal que conduz à morte dos doentes. O melarsoprol, derivado arsenical ativo na fase neurológica, é muito tóxico e provoca em 5% dos casos o falecimento dos doentes por encefalopatia. O diagnóstico das fases das quais depende o tratamento é difícil, porque o momento e o mecanismo de passagem da barreira hemato-encefálica são imprecisos por falta de critérios específicos. Só a descoberta dos tripanosomas no líquido céfalo-raquidiano (LCR) permite afirmar o diagnóstico da fase nervosa. A detecção dos parasitos no LCR é difícil, particularmente quando das campanhas de prospecção. Nos trabalhos de campo, o critério habitualmente aceito para o diagnóstico de fase neurológica é a observação de um número superior a 5 linfócitos/ μL no LCR. Este critério é discutível porque não é específico. No nosso estudo, para a análise dos resultados, optamos por outra classificação biológica. Assim a análise dos resultados foi efetuada introduzindo uma fase intermediária cuja contagem está compreendida entre 5 e 20 linfócitos/ μL de LCR. Desta forma, a fase 1 corresponde à contagem inferior a 5 linfócitos/ μL no LCR e a fase 2 corresponde à contagem superior a 20 linfócitos/ μL no LCR.

O objetivo principal do nosso trabalho de tese é o estudo dos mecanismos inflamatórios observados durante a tripanosomíase humana africana e as suas possíveis aplicações em diagnóstico e terapêutica. Para melhor compreender estes mecanismos estudamos os tipos linfocitários e o seu estado de ativação no sangue e o LCR de pacientes em diferentes fases da doença. Estudamos ainda a passagem da barreira hemato-encefálica pelas células imunes dos doentes em fase neurológica. Desenvolvemos um teste que permite detectar anticorpos específicos da fase neurológica da THA. Por último, analisamos as

estruturas glicolípídicas do tripanosoma, aqueles que são provavelmente responsáveis pela síntese de anticorpos específicos da fase neurológica.

Realizamos uma tipagem linfocitária ao mesmo tempo no sangue e no LCR de doentes em relação à uma população controle com a mesma origem. Por esta técnica mostramos que no sangue dos pacientes, todas as fases confundidas, a taxa de linfócitos B aumenta de maneira significativa o que permite explicar a grande diversidade de anticorpos produzidos no sangue dos doentes atingidos pela THA. Em contrapartida, a taxa de linfócitos T diminui de maneira significativa o que confirma o caráter immunosupressivo da doença. Com a evolução da doença, a taxa de células B CD19 aumenta de maneira significativa no LCR dos doentes. Este aumento poderia constituir um critério de diagnóstico da fase 2, mais preciso e sobretudo mais precoce do que a análise do LCR.

Procuramos compreender quais são os mecanismos de atração dos linfócitos no sistema nervoso central (SNC). Medimos e comparamos as taxas de IL-1 β , IL-8, MIP-1 α , MCP-1 e RANTES, originalmente da migração linfocitária no soro e no LCR de doentes e de pacientes de controle. No soro dos doentes, independentemente da fase da doença, não notamos modificações significativas da taxa de MIP-1 α , MCP-1, IL-8 ou IL-1 β . Só a taxa de RANTES se mostra diminuída significativamente entre os doentes nas fases 1, intermediária e fase 2, parecendo representar simplesmente uma diminuição da reação inflamatória. Em contrapartida, no LCR dos doentes, é observada uma diferença significativa entre as taxas dos doentes nas fases 1, intermediária e 2 para IL-1 β , IL-8, MCP-1, RANTES e MIP-1 α . Esta diferença é sobretudo importante para MCP-1, citocina muito importante no mecanismo de recrutamento dos linfócitos para o SNC. MCP-1 poderia por conseguinte ser um indicador de fase.

Sabemos que a ruptura da barreira hemato-encefálica, mal conhecida, ocorre durante a fase 2 da doença. Estudamos a indução da apoptose pelos LCR dos doentes sobre as células microgliais e sobre os macrófagos que participam normalmente na sua proteção. Contrariamente aos LCR de controle, no LCR dos doentes atingidos pela THA há indução da apoptose sobre as células microgliais e endoteliais. Os nossos resultados provaram que no LCR de doentes na fase 2 há indução de apoptose a níveis mais elevados sobre as células microgliais, enquanto a fase da doença não influencia sobre a indução de apoptose sobre as células endoteliais. O LCR dos doentes em fase 2 contém mais sFasL que o dos doentes em

fase 1, e os anticorpos antifas foram detectados unicamente nos doentes em fase 2. Mas há evidências de que outros fatores proapoptóticos possam estar implicados.

Mostramos que os tripanosomas são capazes de induzir a síntese de citocinas proinflamatórias como o TNF- α , IL-6, IL-8 e óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais. Estas células, cultivadas na presença das glicoproteínas variáveis de superfície (VSG) do tripanosoma, aumentam a sua produção de TNF- α , IL-6, IL-8 e de NO. As VSG solúveis induzem translocação de NF- κ B e a expressão de moléculas de aderência. Estas VSG poderiam, provavelmente, ser os fatores solúveis moleculares responsáveis pela ativação das células endoteliais. O coeficiente de permeabilidade destas células aumenta quando são cultivadas tanto na presença dos tripanosomas, como no sobrenadante de cultura de parasitos ou de VSG. Assim, *T. b. gambiense* pode ativar as células endoteliais *in vitro*, pela liberação de fatores solúveis. As consequências desta ativação pela liberação de moléculas do parasito podem incluir uma potencialização da reação inflamatória, o recrutamento de leucócitos, a passagem dos tripanosomas ao SNC e a disfunção provocada na barreira durante a fase neurológica do THA.

Trabalhos anteriores mostraram que a resposta imune induzida no SNC pela THA conduz à produção específica de certos anticorpos, nomeadamente dos anticorpos antigalactocerebrósidos (GalC) mas igualmente os anticorpos antineurofilamento (NF). Desenvolvemos um teste de campo que permite procurar de maneira simples este anticorpo no LCR dos doentes e assim de diagnosticar a fase da doença. Utilizamos este teste para o diagnóstico de fase, além dos que são utilizados habitualmente, quando de duas prospeções, em Angola e na República Centro Africana. A detecção dos dois anticorpos antiNF e antiGalC no LCR por dot-Elisa apresentou 83,2% de sensibilidade e 100% de especificidade para a determinação da fase 2. Desta forma, a análise por dot-ELISA poderia ser muito útil para a determinação da fase neurológica da THA nas campanhas de prospeção onde o pessoal médico de campo dispõe de poucos recursos.

Procuramos melhorar o nosso teste de diagnóstico dot-ELISA. Isto nos permitiu determinar, por técnicas estruturais, a natureza glicolipídica de um constituinte antigénico do tripanosoma. Assim, destacamos a glucosilceramida. Mostramos igualmente que o parasito possui uma enzima ativa, a glucosilceramida sintase, que poderia estar implicada nos mecanismos de apoptose que poderiam agir facilitando a entrada do parasito no SNC dos

doentes. Ensaios de imunização com os produtos de síntese desta enzima mostraram-nos certa proteção contra o parasito. Resta ainda caracterizar de maneira mais precisa esta enzima e a sua implicação no metabolismo do parasito e particularmente nos mecanismos de quimioresistência na THA.

Este trabalho permitiu-nos destacar novos indicadores de fase da doença do sono pela utilização de citometria de fluxo, dosagem de citocinas e dot-ELISA. As perspectivas importantes são a adaptação ao terreno da investigação destes novos indicadores por meios simples e pouco dispendiosos a fim de melhorar a caracterização dos doentes atingidos pela THA.

SOMMAIRE

| | |
|---|-----|
| REMERCIEMENTS | 4 |
| SOMMAIRE | 19 |
| INTRODUCTION..... | 30 |
| ETAT ACTUEL DE LA QUESTION | 32 |
| I- La maladie du sommeil..... | 32 |
| 1- Données épidémiologiques | 32 |
| 2- Les acteurs..... | 37 |
| 3- Clinique de la THA | 47 |
| 4- Diagnostic de la maladie | 49 |
| 5- Critères actuels classant les patients en stade II..... | 56 |
| 6- Le traitement | 57 |
| 7- Le vaccin : rêve ou réalité | 60 |
| 8- Les interrogations actuelles..... | 61 |
| II- Rappels d'immunologie | 64 |
| 1- Généralités..... | 64 |
| 2- Les cellules et organes immunitaires | 66 |
| 3- Les chémokines et les migrations lymphocytaires..... | 73 |
| 4- Les réponses immunitaires | 76 |
| 5- Les réponses immunitaires innées induites lors d'une infection..... | 84 |
| III- Immunopathologie de la maladie du sommeil | 87 |
| 1- Immunologie de la THA | 87 |
| 2- Rôles des cytokines | 94 |
| 3- Le rôle du monoxyde d'azote (NO) dans les infections à trypanosome | 95 |
| 4- Passage du parasite dans le SNC..... | 97 |
| OBJECTIFS | 123 |
| PATIENTS ET MÉTHODES | 125 |
| I- Les prélèvements chez les patients atteints de THA | 125 |

| | |
|--|-----|
| 1- Mission en République Centrafricaine | 127 |
| 2- Mission en Angola | 129 |
| 3- Mission au Gabon..... | 131 |
| 4- Origines des sérums et LCR contrôles | 132 |
| II- Le matériel biologique..... | 136 |
| 1- Les trypanosomes | 136 |
| 2- Les souris..... | 136 |
| III- Les méthodes | 137 |
| 1- Cytométrie en flux pour le typage lymphocytaire..... | 137 |
| 2- Dosage des chémokines et d'IL-1 β dans le sérum et le LCR des patients..... | 143 |
| 3- Recherche des auto-anticorps anti-galactocérebrosides et anti-neurofilament | 143 |
| 4- Dosage des protéines dans les sérums et les LCR..... | 145 |
| 5- Analyse glycolipidique..... | 145 |
| 6- Détection de la glucosylcéramide synthase par immunofluorescence indirecte | 147 |
| 7- Dosage de la β -glucosidase dans les trypanosomes | 147 |
| 8- Tests <i>in vitro</i> des inhibiteurs de la glucosylcéramide synthase..... | 148 |
| 9- Infection des souris..... | 149 |
| 10- Analyses statistiques | 151 |
| RÉSULTATS | 153 |
| 1- Analyse lymphocytaire dans le sang et le LCR des patients atteints de THA..... | 153 |
| a- Protocole..... | 153 |
| b- Population étudiée | 154 |
| c- Analyse du profil lymphocytaire dans le sang | 154 |
| d- Analyse du profil lymphocytaire dans le LCR..... | 163 |
| 2- Analyse des chémokines et d'IL-1 β au cours de la THA | 165 |
| a- Population d'étude..... | 165 |
| b- Détection des chémokines d'IL-8, MCP-1, MIP-1 α et RANTES et de IL-1 β chez les patients | 166 |
| c- Taux d'IL-1 β , MCP-1, MIP-1 α , IL-8 et RANTES dans les sérums des patients..... | 166 |
| d- Taux d'IL-1 β , MCP-1, MIP-1 α , IL-8 et RANTES dans les LCR des patients..... | 166 |
| e- Corrélation entre le taux de chémokines et la présence du parasite dans le LCR..... | 171 |
| f- Etude de la corrélation des chémokines dans le sang et le LCR des patients..... | 173 |
| 3- Induction de l'apoptose <i>in vitro</i> sur des cellules microgliales et endothéliales par le LCR de | |

| | |
|---|-----|
| patients atteints de THA..... | 177 |
| 4- Activation des cellules endothéliales en présence de trypanosome africain..... | 186 |
| 5- Tests ELISA et Dot Blot..... | 196 |
| 6- Résultats de l'analyse de la structure glycolipidique du trypanosome | 204 |
| a- Mise en évidence du sucre et de la base | 204 |
| b- Marquage par immunofluorescence indirecte de la glucosylcéramide synthase | 206 |
| c- Dosage de l'activité de la glucosylcéramide synthase | 208 |
| d- Inhibition de la synthèse du glucosylcéramide | 209 |
| e- Effet des inhibiteurs de la synthèse du glucosylcéramide <i>in vivo</i> | 211 |
| f- Résultats de l'immunisation des souris par du glucosylcéramide et de galactocérobrosides | 212 |
| g- Suivi de l'immunisation des souris par du glucosylcéramide | 213 |
| DISCUSSION | 215 |
| CONCLUSION - PERSPECTIVES..... | 230 |
| BIBLIOGRAPHIE | 232 |
| SITES INTERNET CONSULTÉS..... | 258 |
| ANNEXES | 259 |
| Annexes 1 | 260 |
| Annexes 2 | 261 |
| TABLE DES MATIÈRES | 267 |

ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

APC : Allophycocyanine

ARN: acide ribonucléique

ATP: adénosine triphosphate

CATT : *Card Agglutination Trypanosomiasis Test*

CD: *cluster of differentiation*

DEAE : diéthylamino éthyl

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

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

EDTA : acide éthylènediamine tétraacétique

ELISA: *Enzyme linked Immunosorbent Assay*

FITC : isothiocyanate de fluoréscéine

FL: fluorochrome

FSC : *forward scatter*

GalC : galactocérébroside

GluC : glucosylcéramides

GPI : récepteur glycosylphosphatidylinositol

h: heure

HIV : virus de l'immunodéficience humain

IC : concentration inhibitrice

IFI : Immunofluorescence indirecte

IFN- γ : interféron gamma

ICCT : *Instituto de Combate e Controlo das Tripanossomias*

Ig : immunoglobuline
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*
LCR : liquide céphalorachidien
MCP-1 : *Monocyte Chemoattractant Protein*
MEM : milieu essentiel minimum
MIP1- α : *Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha*
ng: nanogramme
NF: neurofilaments
NK : *natural killer*
NO: monoxyde d'azote
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
PBS : *phosphate buffer saline*
PC5 : Phycocyanine 5
PCR: réaction de polymérisation en chaîne
PE : Phycoérythrine
PNLTHA : Programme national de Lutte contre la THA
PBS : tampon phosphate salin
RANTES : *Regulated upon Activation T cell Expressed and Secreted*
RCA: République Centrafricaine

SNC : système nerveux central

SSC: *side scatter*

T.b.: *Trypanosoma brucei*

Th : *lymphocyte T helper*

THA : trypanosomose humaine africaine

TLTF : *trypanosome-derived lymphocyte triggering factor*

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor α*

VAT : antigène variable de trypanosome

VSG : glycoprotéine variable de surface

Table des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Evolution de la THA en Afrique au cours du siècle dernier..... | 34 |
| Figure 2: Répartition de la THA en Afrique | 35 |
| Figure 3: Comparaison du nombre de cas de THA enregistrés en 1995 au nombre de cas estimés en 1995 par pays d'Afrique | 35 |
| Figure 4: Classification des trypanosomes..... | 37 |
| Figure 5: <i>Trypanosoma brucei brucei</i> | 39 |
| Figure 6: Cycle de développement et biologie des trypanosomes pathogènes. | 41 |
| Figure 7: Représentation schématique de <i>Trypanosoma brucei</i> | 42 |
| Figure 8: <i>Glossina palpalis</i> | 43 |
| Figure 9: Distribution géographique de la Tsé-Tsé en Afrique | 44 |
| Figure 10: L'écran bleu/noir/bleu | 45 |
| Figure 11: Piège biconique proche d'un point d'eau | 46 |
| Figure 12 : Variation antigénique du trypanosome chez la souris | 87 |
| Figure 13 : Carte géographique de la RCA indiquant le lieu de la prospection..... | 127 |
| Figure 14 : Carte géographique de l'Angola indiquant le lieu de la prospection..... | 129 |
| Figure 15 : Carte géographique du Gabon indiquant le lieu de la prospection..... | 131 |
| Figure 16 : (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 de patients infecté par <i>T. b. gambiense</i> et lecture au cytomètre en flux. | 142 |
| Figure 17: Représentation du taux de lymphocytes B (CD 19) et T (CD 3 et sous types CD 4 et CD 8) et des NK dans le sang de 33 patients trypanosomés (en bleu) par rapport à 27 patients contrôles africains (en blanc). | 156 |
| Figure 18 : Etat d'activation des lymphocytes T (marquage CD25, CD14 et CD69) entre un groupe contrôle (n =13, en blanc) et un groupe de patients atteints par la THA (n = 17, en bleu)..... | 157 |
| Figure 19 : Etat d'activation des lymphocytes B par le CD5 et CD19, entre un groupe contrôle (n =13, en blanc) et un groupe de patients atteints par la THA (n = 17, en bleu). | 159 |
| Figure 20: Représentation du taux de lymphocytes B et T dans le LCR de 8 patients en stade 1 | |

| | |
|--|-----|
| (blanc), 4 patients en stade intermédiaire (bleu), 13 patients en stade 2 (rouge) et 4 patients contrôles (vert). | 164 |
| Figure 21 : Taux de chémokines dans le sérum (A) et LCR (B) en fonction du stade de la maladie. | 170 |
| Figure 22 : Comparaison du taux de chemokines, MCP-1, IL-8, MIP-1 α , RANTES, IL-1 β chez les patients en stade 2, en fonction de la présence (rouge) ou non (bleu) du trypanosome dans le LCR. | 172 |
| Figure 23 : Chromatographie en couche mince des glycolipides purifiés extraits de <i>T. b. brucei</i> AnTat 1.9 (<i>Tbb</i>) et de <i>T. b. gambiense</i> MBA (<i>Tbg</i>). | 204 |
| Figure 24: Résultats de la spectrométrie de masse d'échantillons de <i>T. b. b.</i> AnTat 1.9. | 205 |
| Figure 25 : Immunofluorescence indirecte sur <i>T. b. brucei</i> AnTat 1.9 avec des anticorps anti-glucosylcéramide synthase (GCS 5.2) révélés par des anticorps anti Ig de lapin marqués FITC. | 207 |
| Figure 26 : Immunofluorescence indirecte sur <i>T. b. brucei</i> AnTat 1.9 avec l'anticorps anti-glucosylcéramide synthase (GCS 5.2) révélés par des anticorps anti Ig de lapin. | 208 |
| Figure 27 : Voie de synthèse des gangliosides, et inhibiteurs potentiels de chaque étape d'après Bleicher et Cabot, 2002. | 209 |
| Figure 28 : Représentation de la concentration ($\mu\text{g/mL}$) de Vérapamil, Kétoconazole, Mifépristone et ciclosporine A en fonction du pourcentage d'inhibition de la croissance de parasites <i>T. b. brucei</i> AnTat 1.9. | 210 |
| Figure 29 : Les deux types d'Ig testées dosés (IgG et IgM) après immunisation par deux antigènes, glucosylcéramides (GluC) et galactocérebrosides (GalC) et leurs contrôles respectifs sur des lots de 5 souris. | 213 |

Tables des Tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1: Récapitulatifs des traitements utilisés pour la THA..... | 59 |
| Tableau 2 : Principales caractéristiques des lymphocytes du sang circulant | 70 |
| Tableau 3 : Récapitulatif des différentes missions organisées pour le diagnostic de stade, le dosage des chémokines et le typage lymphocytaire..... | 134 |
| Tableau 4 : Récapitulatif des marqueurs utilisés pour le typage lymphocytaire..... | 139 |
| Tableau 5 : Séries de contrôles isotypiques utilisés lors des marquages des lymphocytes du sang et du LCR de patients infectés. | 140 |
| Tableau 6 : Réglage de l'ampérage de chaque fluorochrome et des compensations entre les quatre couleurs d'après les contrôles isotypiques avant lecture au cytomètre en flux..... | 141 |
| Tableau 7 : Solvant de chaque molécule testée et dilutions employées pour la détermination de l'IC50..... | 148 |
| Tableau 8 : Répartition des types et sous types lymphocytaires dans le sang chez un groupe de patients (n = 33) atteints de THA et chez un groupe contrôle (n = 27)..... | 155 |
| Tableau 9 : Différences entre les types et sous types lymphocytaires T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ mémoires et naïfs dans le sang chez dans un groupe contrôle (n = 13) et un groupe de patients (n = 17) atteints par la THA. | 158 |
| Tableau 10 : Différences d'activation des lymphocytes T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ et des lymphocytes B (CD19 ⁺) sanguins entre un groupe contrôle (n = 13) et groupe de patients (n = 17) atteints pas la THA..... | 160 |
| Tableau 11 : Différences entre les cellules NK, les cellules NK-T et les NK-T activés chez des contrôles(n = 13) et chez des patients (n = 17) atteints par la THA..... | 161 |
| Tableau 12 : Différences entre les effecteurs T CD8 ⁺ dans le sang d'un groupe contrôle (n = 13) et d'un groupe de patients (n = 17) atteints de THA..... | 162 |
| Tableau 13 : Pourcentage des types lymphocytaires dans le LCR d'un groupe de contrôles (n = 4) et d'un groupe de patients atteints de THA (n = 25 patients)..... | 163 |
| Tableau 14 : Cytorachie et nombre moyen de trypanosomes dans le LCR des contrôles et de patients en fonction du stade de la maladie..... | 165 |
| Tableau 15 : Taux de MCP-1, IL-8, MIP-1 α , RANTES et IL-1 β dans le sérum et LCR de patients en fonction du stade de la THA, et chez 4 patients contrôles. | 168 |
| Tableau 16 : Corrélation entre les taux de IL-1 β , IL-8, MCP-1, MIP-1 α et RANTES pour | |

| | |
|--|-----|
| chaque groupe (contrôles, S-1, S-int, S-2). | 174 |
| Tableau 17 : Corrélation entre les taux de IL-1 β , IL-8, MCP-1, MIP-1 α et RANTES dans le LCR pour chaque groupe (contrôles, S-1, S-int, S-2). | 176 |
| Tableau 18 : Résultats <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des inhibiteurs de la glucosylcéramide synthase... .. | 212 |

INTRODUCTION

La trypanosomose humaine africaine (THA) ou maladie du sommeil pose un grave problème de santé publique puisqu'en Afrique où elle sévit, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) estime que plus de 60 millions d'individus sont exposés au risque de la contracter.

La THA est due à un protozoaire flagellé sanguicole du genre *Trypanosoma* dont le vecteur est un insecte du genre *Glossina*, la mouche tsé-tsé.

Après inoculation par la mouche, le parasite se propage par voie lymphatico-sanguine (stade 1), puis pénètre dans le système nerveux central (SNC) par polarisation nerveuse (stade 2).

Le diagnostic et le traitement de la phase de polarisation nerveuse de la THA restent difficiles, mais il est important de réaliser un diagnostic entre le stade 1 et 2, afin d'aider le clinicien dans son choix thérapeutique car les traitements actifs contre cette maladie sont limités. Le seul traitement efficace en stade 2 repose sur un dérivé de l'arsenic, le mélarsoprol, qui entraîne le décès d'environ 5% des sujets traités.

Au cours de la THA on note une infiltration puis une très nette augmentation de la cytorachie dans le liquide céphalo-rachidien des patients. Jusqu'à présent la nature même des cellules envahissant le système nerveux central était inconnue chez l'homme. Pour la première fois, nous avons déterminé par cytométrie en flux le type et le sous type lymphocytaire des cellules au cours de l'infection. Cette analyse cytométrique a été réalisée non seulement dans le sang de patients et de contrôles mais aussi dans le liquide céphalo-rachidien. Ce travail avait également pour objectif de rechercher un nouveau marqueur de stade de la maladie.

Après avoir exploré la nature lymphocytaire des cellules présentes dans le liquide céphalo-rachidien des malades, nous avons cherché à comprendre comment ces cellules pouvaient franchir la barrière hémato-méningée. Pour comprendre ce mécanisme d'attraction, nous avons dosé certaines chémokines (IL-1 β , IL-8, MCP-1, MIP-1 α et RANTES) impliquées dans la chimio-attraction des cellules vers une inflammation.

Nous présentons ici les résultats du dosage des chémokines dans le sérum et le LCR de

malades, prélèvements obtenus lors de prospections. Ces dosages ont permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs de stade de la maladie mais également ont permis de mieux comprendre les changements immunitaires dans la THA.

Nous avons développé un test à la fois sensible et spécifique du stade 2 de la maladie du sommeil. Ce test simple de mise en oeuvre sur le terrain est basé sur la recherche d'anticorps spécifiques: les anticorps anti-neurofilaments et anti-galactocérobrosides que l'on retrouve dans le LCR des malades en stade nerveux. Cette recherche des anticorps a d'abord été réalisée par ELISA, mais cette méthode peu sensible et difficile à réaliser sur le terrain a été abandonnée au profit du dot blot, méthode plus simple et plus sensible que les ELISA. Pour valider ce test, plusieurs enquêtes de prospection ont été réalisées : en République Centrafricaine et en Angola, afin de vérifier la faisabilité du test sur le terrain.

Enfin dans l'objectif d'améliorer le test précédemment décrit nous avons, lors de nos stages de co-tutelle avec le laboratoire de glycobiologie de l'UFRJ au Brésil, cherché à mettre en évidence un antigène spécifique du parasite. L'utilisation de cet antigène dans le test que nous avons précédemment développé permettrait d'améliorer ses caractéristiques de sensibilité et de spécificité. La synthèse au niveau parasitaire de cet antigène peut être bloquée et permettrait d'envisager des applications thérapeutiques contre une infection à *Trypanosoma brucei gambiense* ou *Trypanosoma brucei rhodesiense* car cet antigène est présent à la surface de ces deux parasites. Puis, l'immunisation d'animaux contre *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* par ce glycolipide a constitué la dernière voie de recherche de ce travail.

ETAT ACTUEL DE LA QUESTION

I- La maladie du sommeil

1- Données épidémiologiques

a- Un peu d'histoire

La maladie du sommeil n'est pas une de ces maladies émergentes mal connues mais plutôt une maladie que l'on redécouvre car négligée. Pour la première fois, Ibn Khaldoun signale la mort du Sultan Mari Djata II en 1373. En 1623, Aleixo da Abron décrit le Mal de Loanda. Winterbottom voit les adénopathies en 1793. Bruce montre le rôle de la glossine dans la trypanosomose animale en 1895. Forde traite la "fièvre" d'un capitaine de bateau fluvial en Gambie en 1901 et voit des "vermicules" que Dutton, à Liverpool, reconnaît comme trypanosomes. Patrick Manson identifie les 2 maladies ("fièvre à trypanosomes" et "maladie du sommeil") en 1904.

Durant la période coloniale, Muraz, Richet et surtout Jamot (Ducloux, 1989) obtiennent des résultats spectaculaires uniquement par prospections médicales. A cette époque le "rendement" des prospections médicales était tel que l'on pouvait se dispenser de toute autre forme de lutte complémentaire notamment antivectorielle. L'assainissement exhaustif du réservoir humain suffit, semble-t-il, à résoudre le problème.

Cette pratique dure plusieurs décennies ; le vecteur, bien qu'objet d'études poussées, n'est considéré que comme un élément "secondaire" dans la lutte et les médecins se préoccupent peu de son élimination. A leur décharge il faut préciser que les méthodes de lutte antivectorielle étaient souvent lourdes, onéreuses et peu convaincantes quant à leur efficacité. Rappelons la fameuse prophylaxie agronomique qui demandait des efforts considérables pour des résultats plutôt médiocres surtout en zones forestières.

Depuis l'accès à l'indépendance des Etats de l'Afrique sub-saharienne, la spectaculaire reprise de la THA est imputable à l'arrêt des prospections médicales actives : arrêt expliqué

puisque les faibles prévalences ne permettaient plus de considérer la THA comme un problème majeur de santé publique. Dans la plupart des Etats, le dépistage actif laisse la place au dépistage passif avec un personnel de moins en moins spécialisé et motivé.

La situation des pays, de l'époque coloniale à nos jours, a évolué sur plusieurs plans. Les moyens disponibles pour la santé s'amenuisent, et, bien souvent, aucun médicament n'est disponible pour le traitement des sommeilleux. Des modifications socio-économiques profondes entraînent un déplacement de la THA des zones sahélo-soudaniennes vers des zones semi-forestières où les conditions écologiques sont rapidement transformées sous l'effet d'une colonisation humaine de plus en plus forte (Walsh et coll., 1993). Les populations ne sont plus contraintes à se présenter aux contrôles médicaux et une grande majorité des personnes (la plupart du temps immigrées) sont inconnues des services sanitaires. Dans le même temps les mouvements et déplacements de populations s'intensifient, favorisant la dispersion du parasite. Les formes asymptomatiques de la THA, apparemment de plus en plus fréquentes, accentuent la démobilisation du monde rural qui, de plus, redoute un traitement à la fois dangereux et onéreux (Jamonneau et coll., 2004 ; Sternberg, 2004).

Cette évolution explique partiellement la lente mais inexorable reprise de la THA au sud du Sahara.

b- Epidémiologie actuelle

Maîtrisée durant l'époque coloniale grâce à des dépistages réguliers et un traitement systématique des personnes atteintes, la maladie du sommeil en recrudescence depuis une vingtaine d'années (Figure 1), pose à nouveau un grave problème de santé publique (Kuzoe, 1993 ; Cattand, 1994 ; ; Smith et coll., 1998 ; Dumas, 2000 ; Pépin et Meda, 2001). C'est une maladie limitée au continent africain, dans une zone géographiquement située à 15° latitude nord et 23° latitude sud, correspondant à la zone de répartition du vecteur. Elle est due à la transmission à l'homme de *Trypanosoma brucei gambiense*, en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale et *T. b. rhodesiense* en Afrique de l'Est.

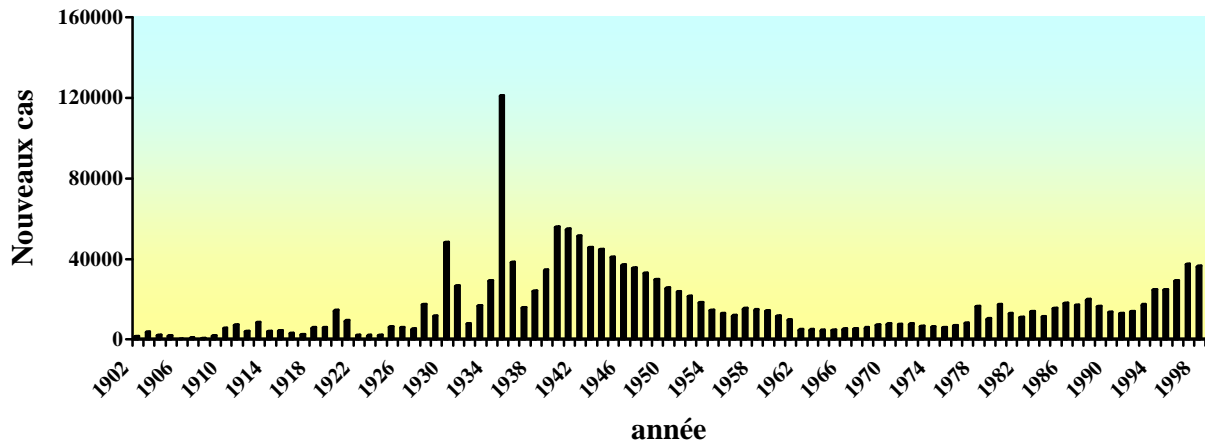


Figure 1 : Evolution de la THA en Afrique au cours du siècle dernier

(source OMS)

Particulièrement en République Démocratique du Congo, en Ouganda, au Soudan (Ancelle et coll., 1994 ; Artzroumi et Gouteux, 1996 ; Moore et Richer, 2001) et en Angola (Stanghellini et Josenando, 2001) la maladie du sommeil continue de tuer les villageois. Pour ces pays on parle d'hyper endémie. Dans certains villages du Bandundu et de l'Equateur en République Démocratique du Congo, près de 90 % des habitants sont touchés. Au Tchad (Stanghellini et coll., 1989) dans la région de Moundou, en Centrafrique, au Congo, en Guinée, en Côte d'Ivoire, en Tanzanie, au Malawi, au Mozambique et au Cameroun on parle de méso-endémie (Figure 2).

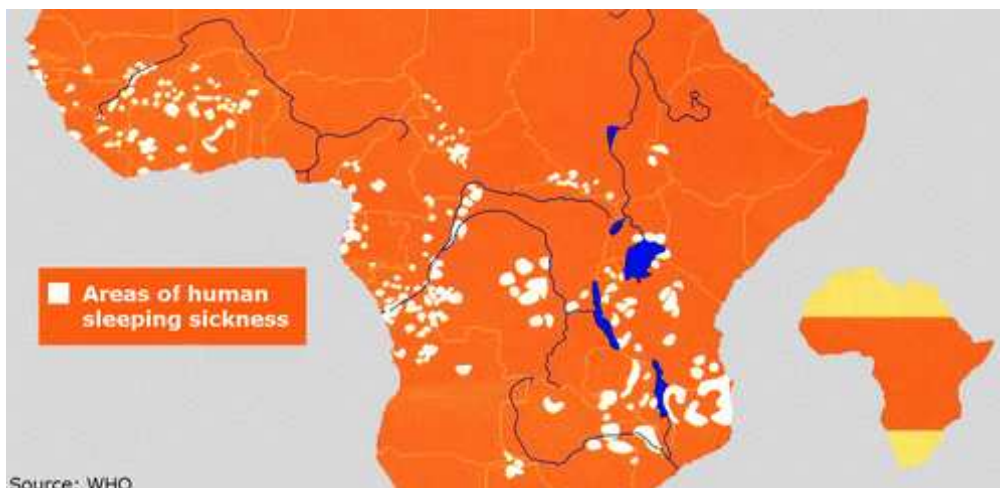


Figure 2: Répartition de la THA en Afrique

(source OMS)

L'OMS estime que 60 millions de personnes vivent dans des régions rurales exposées aux mouches tsé-tsé et que 500 000 personnes sont atteintes.

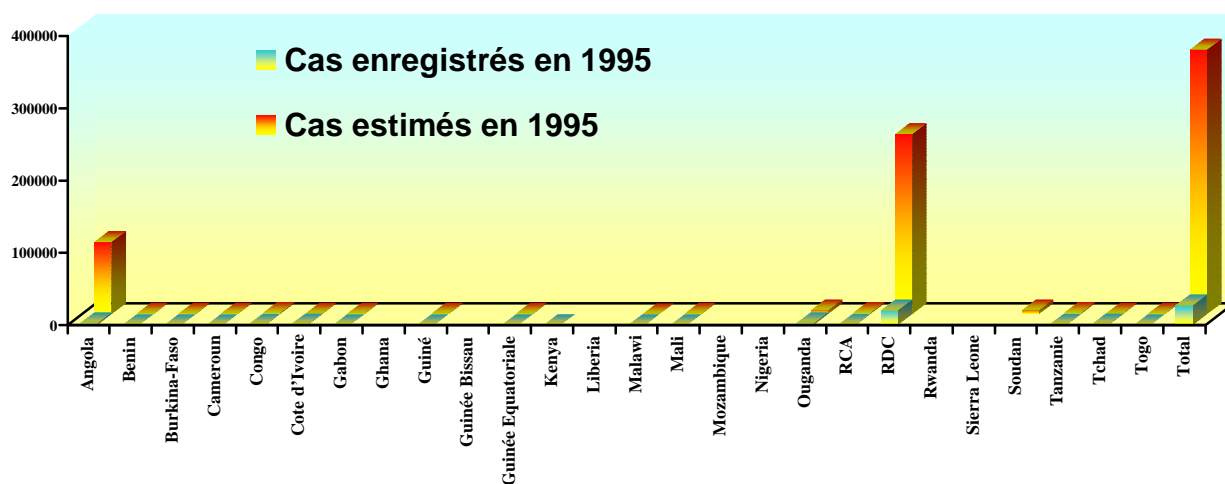


Figure 3: Comparaison du nombre de cas de THA enregistrés en 1995 au nombre de cas estimés en 1995 par pays d'Afrique

(source OMS)

Chaque année, 25 000 à 30 000 cas sont notifiés pour l'ensemble des pays touchés ce qui ne représente qu'une partie du nombre réel des trypanosomés (Figure 3).

Aujourd'hui, selon les estimations de l'OMS, seul un malade sur dix a une chance d'être traité.

Dans certaines régions, la mortalité par maladie du sommeil dépasse celle imputée au SIDA ou au paludisme (Cattand et coll., 2001). Des milliers de personnes meurent chaque année de la THA sans même avoir été dépistées. En l'absence de soins, la mort est inéluctable.

Plusieurs facteurs expliquent le retour des ravages causés par la THA. Les services sanitaires sont désorganisés et sans moyens, ils ne peuvent exercer une surveillance régulière des foyers de transmission, de plus la pauvreté et la malnutrition accentuent la vulnérabilité des individus. Ainsi en République Démocratique du Congo, et dans les autres pays d'Afrique centrale cette affection, qui a causé plus de 500 000 morts dans le bassin du Congo au début du XX^{ème} siècle, a repris l'ampleur des temps passés (Gastellu-Etchegorry et coll., 1999).

Il est vrai que cette maladie n'est pas une priorité car la maladie du sommeil ne touche que les populations rurales reculées et non les citadins. C'est la "maladie du bout de la piste", celle qui touche les villageois, ceux dont personne ne se préoccupe. Et depuis la suspension de la coopération sanitaire par les militaires occidentaux qui œuvraient dans la région, la maladie flambe à nouveau. Les tableaux cliniques variés de cette affection font que les habitants ne font pas toujours la relation entre les mouches et la maladie, mettant sur le compte de la magie ou de la sorcellerie l'affection dont sont victimes ces "sommeilleux" qui ne peuvent plus travailler, cultiver leurs champs où réaliser les simples gestes de la vie quotidienne. Pourtant, certaines techniques de lutte sont à la portée des villageois, la mise en place des pièges en tissu fabriqués localement et placés autour des villages permettent de capturer les mouches et de faire baisser leur nombre de près de 95% en trois mois (Ryan et coll., 1981).

2- Les acteurs

a- Les parasites

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés sanguicoles. Ils appartiennent à la famille des Trypanosomatidae (Figure 4).

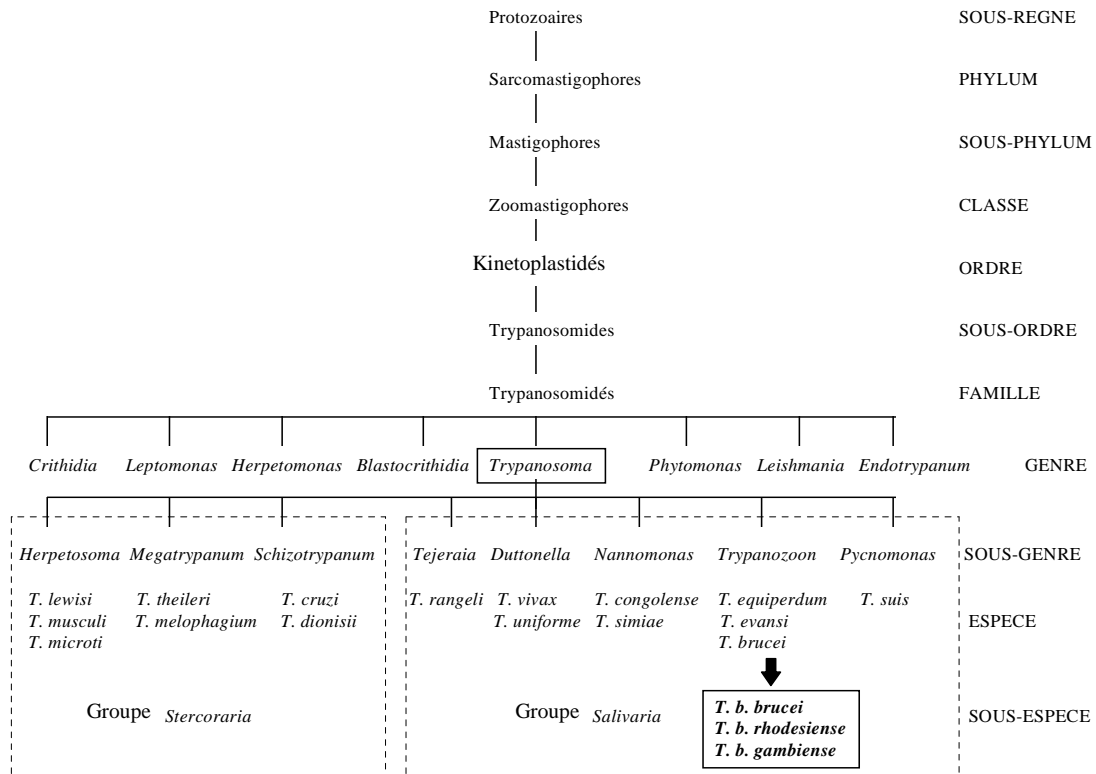


Figure 4: Classification des trypanosomes

(D'après Vickermann, 1985).

Très répandus dans la nature, ils parasitent de nombreux vertébrés, poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères. Tous ne sont pas pathogènes. Il en existe deux grands groupes :

- **Les *Stercoraria***, transmis par les déjections du vecteur, ce qui suppose un cycle se prolongeant jusqu'à l'ampoule rectale de ce dernier. L'exemple type est *Trypanosoma cruzi*, agent de la trypanosomose américaine, dont le vecteur est une punaise appartenant à la famille des Reduviidae. *Trypanosoma cruzi*, chez l'hôte vertébré, comprend des formes extracellulaires et des formes intracellulaires.

- **Les *Salivaria***, dont la transmission se fait par piqûre, soit par passage du parasite dans les glandes salivaires, soit directement par les organes piqueurs de l'insecte. L'exemple type est *Trypanosoma brucei* qui comprend 3 sous espèces transmises par la mouche Tsé-Tsé. *Trypanosoma brucei* est un parasite extracellulaire chez l'hôte vertébré. Ainsi on distingue :

- ***Trypanosoma brucei brucei*** (Figure 4), parasite du bétail et des carnivores domestiques, responsable d'une trypanosomose appelée Nagana. Utilisé comme modèle expérimental, il permet la réalisation de nombreuses études sans risque de contamination humaine. *Trypanosoma brucei brucei* a permis notamment l'élaboration d'un modèle murin avec atteinte nerveuse (Jennings et coll., 1972 ; Poltera, 1985 ; Bafort et coll., 1987 ; Keita et coll., 1997).



Figure 5: *Trypanosoma brucei brucei*

(Site internet : <http://www.micromacro.co.uk/science/html/parisitology/sc3006.htm>)

- *Trypanosoma brucei gambiense* qui est l'agent de la maladie du sommeil dans sa forme chronique en Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale. Il n'est théoriquement pathogène que pour l'homme, mais il existe des animaux porteurs pouvant jouer le rôle de réservoir du parasite (porcs, moutons...).

- *Trypanosoma brucei rhodesiense* est l'agent d'une anthroponose. Présent en Afrique de l'Est, il est responsable chez l'homme d'une forme particulière de THA dont l'évolution clinique est aiguë.

Ces 3 sous-espèces sont identiques d'un point de vue morphologique mais leurs formes varient selon le stade du cycle de développement où elles se trouvent.

L'exemple de *T. brucei* est présenté sur la figure 6:

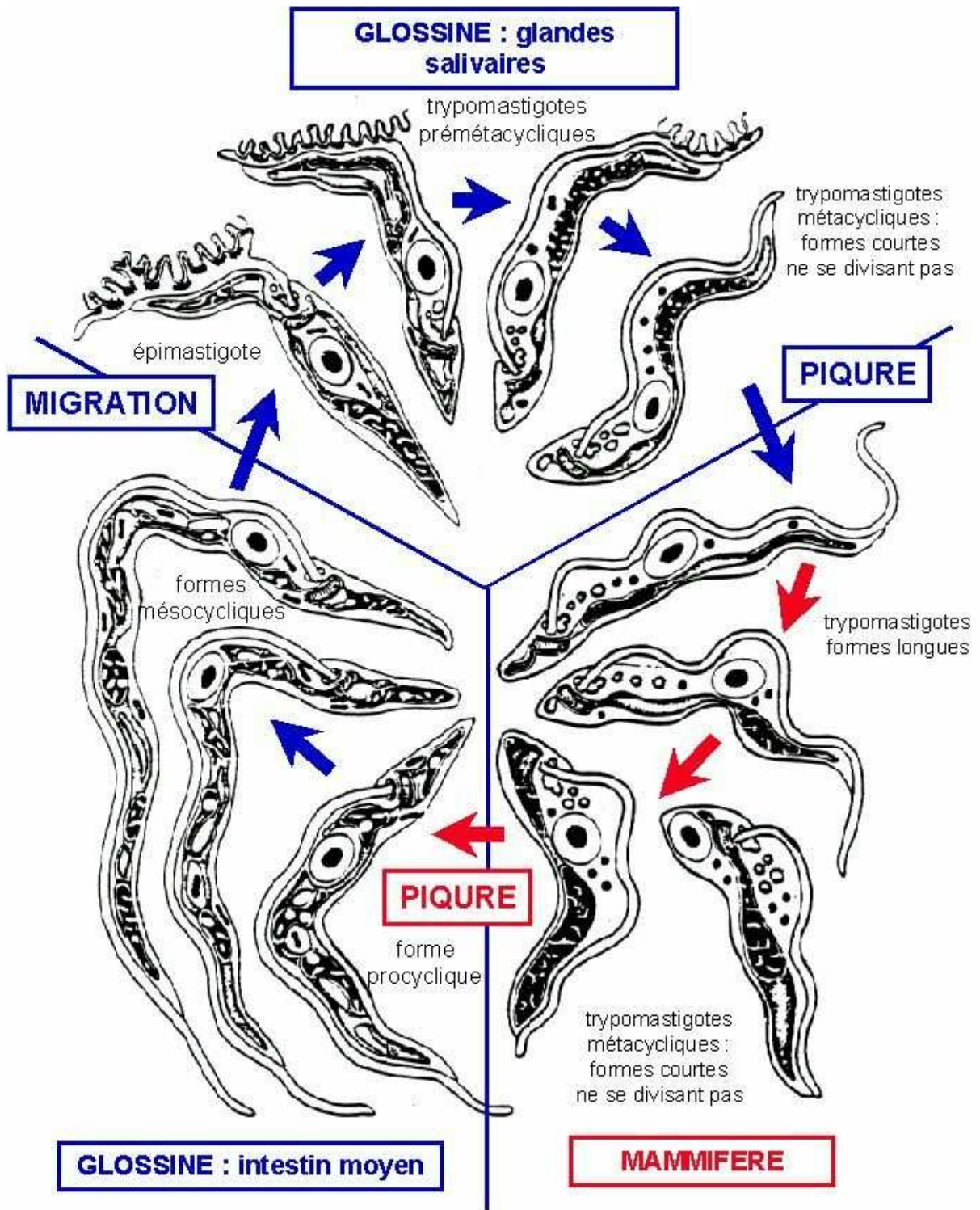


Figure 6: Cycle de développement et biologie des trypanosomes pathogènes.

(d'après K. Vickerman, 1985)

Forme "sanguicole" chez le vertébré (trypomastigote) : parasite de forme allongée, dont la taille moyenne est de 23 µm X 2,5 à 3 µm, comprenant un corps cellulaire en forme de feuille, avec un noyau central (Figure 7). A la partie postérieure se situe le kinétoplaste où prend naissance le flagelle, d'abord interne, qui se dégage du corps pour soutenir une membrane ondulante. Ce kinétoplaste possède un ADN formé d'un réseau de maxicercles (environ 10 à 100) et de minicercles (de 5000 à 20000). Le flagelle gagne l'avant du corps où il peut, soit s'arrêter (trypomastigote métacyclique, "stumpy") soit se prolonger sous forme de flagelle libre (trypomastigote en division, "slender"). Ces formes se déplacent librement dans le sang et les liquides tissulaires. Seules les "slender" se multiplient et se reproduisent en 6 heures par divisions binaires et longitudinales. Seules les formes trapues, "stumpy" ou métacycliques, se développent chez l'insecte.

A- Flagelle antérieur.

B- Cytosquelette.

C- Noyau.

D- Mitochondrie.

E- Kinétoplaste.

F- Glycosome.

G- Poche flagellaire.

H- Corps basal.

I- Appareil de Golgi.

J- Réticulum endoplasmique.

K- Membrane ondulante.

L- Attachement du flagelle à la membrane ondulante.

M- Attachement du flagelle directement à la cellule

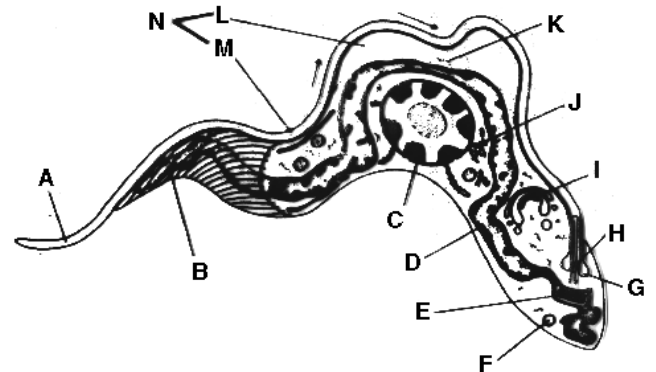


Figure 7: Représentation schématique de *Trypanosoma brucei*

Formes chez l'insecte : arrivé dans l'estomac de l'insecte, le trypanosome métacyclique, se transforme en forme procyclique avec une activation mitochondriale. Après un long périple dans l'insecte, le trypanosome se retrouve dans les glandes salivaires où il prend la forme épimastigote, légèrement plus courte que la précédente avec un noyau central et un kinétoplaste pré-nucléaire. La membrane ondulante est plus réduite, le flagelle reste libre (Figure 7). Après plusieurs transformations, le trypanosome prendra une forme métacyclique infectante, avec régression mitochondriale, ce qui permet l'adaptation à la vie chez l'hôte vertébré. Récemment une reproduction sexuée a été démontrée chez l'insecte indiquant la possibilité d'échange génétique entre les trypanosomes (Tait, 1983 ; Pépin et coll., 1992 ; Mathieu-Daude et coll., 1995).

b- Tsé-tsé : " la mouche qui tue"

- Le vecteur

Les glossines ou Tsaltsalya, nom donné par les éthiopiens pour mouche piqueuse, sont des diptères brachycères Muscidae, de la sous famille des Glossinidae, dont il n'existe qu'un genre, le genre *Glossina*.



Figure 8: Glossina palpalis

(PW Pappas et SM Wardrop: College of Biological Sciences, Ohio State University).

La tsé-tsé est une grosse mouche brune (de 6 à 16 mm sans le proboscis) aux ailes croisées au repos. *Glossina palpalis* vit autour des points d'eau de l'Afrique de l'Ouest, c'est le vecteur principal (Figure 8). *Glossina tachinoïdes* vit dans les forêts galeries, c'est un vecteur important de *T. b. gambiense*. *Glossina morsitans* vit en savane sèche au contact des troupeaux d'Afrique orientale, c'est le vecteur de *T. b. rhodesiense* (Figure 9).

La mouche pique les animaux sauvages et domestiques qui passent à sa portée. Les glossines peuvent se contaminer lors de leurs premiers repas sanguins, et une sur mille dans la nature, transmet les trypanosomes à l'homme par ses piqûres (Rogers et Randolph, 1985).

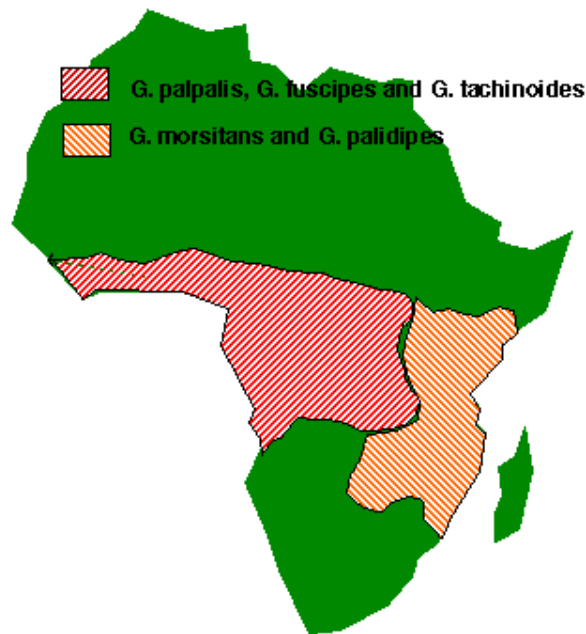


Figure 9: Distribution géographique de la Tsé-Tsé en Afrique

(Site internet : Université catholique de Louvain)

- La lutte anti-vectorielle

La lutte anti-vectorielle peut se faire selon trois techniques :

- l'écran est simple à construire mais son attractivité dépend presque exclusivement du choix des tissus. Il doit être attractif de loin et inciter la glose à se poser pour qu'elle puisse prendre une dose mortelle d'insecticide. Moins efficace que les pièges, l'écran présente par contre 4 avantages : il est très maniable et une grande quantité d'écrans peut être transportée par une seule personne ; il est robuste et peut être confié à tous dans n'importe quelle situation ; on peut très facilement le ré-imprégner d'insecticides par simple immersion dans un récipient ; il n'est pas cher (Figure 10).



Figure 10: L'écran bleu/noir/bleu

(Source : <http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biologie/photosql/photos>.)

- Les pièges sont des volumes à l'intérieur desquels la glose doit pénétrer. Elle y est tuée soit par exposition prolongée au soleil, soit par contact avec un insecticide déposé sur le

tissu qui le compose. La glossine est attirée par la couleur bleue et par le contraste entre le piège et l'environnement ; à proximité du piège elle est attirée par le contraste entre le tissu bleu et les ouvertures sombres (Lancien et Gouteux, 1978 ; Green, 1988, 1989). Il existe une version améliorée de ces pièges : le piège biconique (Figure 11), basé sur le même principe et destiné à améliorer le rendement, faciliter sa construction mais aussi diminuer le prix de revient (Laveissière, 1990).



Figure 11: Piège biconique proche d'un point d'eau

La lutte antivectorielle de l'avenir semble être la méthode du mâle stérile. Elle consiste à introduire dans une population sauvage des individus de la même espèce, stérilisés physiquement ou chimiquement, pour compromettre la descendance et, à la longue, aboutir à la disparition de cette population. Cette technique repose sur le fait que les femelles ne s'accouplent généralement qu'une fois et conservent toute leur vie le sperme du mâle, fécond ou non, dans leurs spermathèques. Cependant elle pose une série de problèmes : l'élevage de masse de l'espèce, le choix de la méthode stérilisante, la compétitivité des mâles de laboratoire, la taille des effectifs à lâcher (Vreysen et coll., 2000).

3- Clinique de la THA

Peu après la piqûre infectante de la glossine, l'homme développe un chancre d'inoculation (ou trypanome). Ce furoncle sans tête peut passer inaperçu surtout sur peau noire. Il contient de nombreuses formes parasitaires monomorphes de type long et effilé. Puis les trypanosomes se multiplient et diffusent dans l'organisme par voie sanguine et par voie lymphatique. Les personnes atteintes deviennent alors sans le savoir des réservoirs de trypanosomes pour les mouches. Cette phase lymphatico-sanguine peut durer plusieurs années (Chimelli et Scaravilli, 1997). Ce stade 1 correspond à la dissémination sanguine et aux premières réactions de défense de l'organisme par l'intermédiaire du système macrophagique (Poltera et coll., 1985). On peut résumer la symptomatologie clinique à quatre signes principaux (Dumas, 1995) :

- **Une fièvre anarchique et rebelle** à tout traitement non spécifique. Elle oscille entre 38° et 38°5 et peut s'accompagner d'une détérioration de l'état général.

- **La présence de ganglions palpables** (adénopathies), de volume moyen, élastiques, mobiles et indolores. On les trouve surtout localisés le long du cou et à sa base (chaînes ganglionnaires sus-claviculaires et cervicales), signe de Winterbottom.

- **Le foie et la rate** sont un peu augmentés de volume (hépto et splénomégalie).

- **Des signes cutanés** qui sont de 3 types : les trypanides, les œdèmes et le prurit. Les trypanides sont des taches variants du rose au rouge violacé, de 5 à 15 cm de diamètre, localisées au thorax, aux épaules et aux hanches. Elles peuvent prendre l'aspect de marbrures, de placards irréguliers, de taches annulaires ou de taches confluentes polycycliques à grandes courbures. Elles passent presque toujours inaperçues sur peau noire. Les œdèmes se voient surtout sur la face. Le visage prend un aspect bouffi que l'on qualifie de lunaire. Le prurit est parfois intense et rebelle.

D'autres signes sont parfois décrits mais moins caractéristiques comme des troubles digestifs (vomissements, diarrhée), des lésions oculaires (iritis, irido-cyclite, chorio-rétinite, peu caractéristiques).

Lorsque les parasites gagnent le système nerveux, on parle alors de phase de polarisation nerveuse ou phase méningo-encéphalitique. Ce stade 2, est caractérisé par une

inflammation des tissus du cerveau réalisant une méningo-encéphalite mésenchymateuse avec infiltration cellulaire péri-vasculaire. Alors que les signes de la première période, exception faite de la fièvre, régressent puis disparaissent (adénopathies, hépato et splénomégalie, trypanides) des signes neurologiques extrêmement variés apparaissent ou s'amplifient. On peut les classer comme suit (Dumas, 1995) :

- **Troubles de la sensibilité** : dans le cas d'un sommeilleux, la sensibilité superficielle peut être plus ou moins augmentée (hyperesthésie) ou diminuée (hypoesthésie) mais c'est surtout la sensibilité profonde qui est perturbée. Cela se traduit, en particulier, par « le signe de Kérandel » : la douleur à la pression est telle que le malade ne peut tourner une clé dans une serrure.

- **Troubles psychiques** : le comportement du malade peut aller de l'apathie aux crises psychiatriques aiguës (tendances criminelles ou suicidaires, perversion...), de l'hilarité à la tristesse. Globalement, le malade change radicalement de comportement.

- **Troubles moteurs** : ils sont inconstants et variés. On observe des tremblements, des mouvements involontaires très brusques, saccadés et anarchiques (chorée) ou lents et ondulatoires, particulièrement aux mains (athétose), des signes d'incoordination rendant, par exemple, impossible le mouvement volontaire consistant à poser un doigt sur le bout du nez (syndrome cérébelleux) ou d'hypertonie raidissant les muscles moteurs (hypertonie extrapyramidale). Plus tardivement peuvent apparaître des crises convulsives.

- **Troubles neuroendocriniens** : ils sont la conséquence d'une atteinte de l'axe diencéphalo-hypophysaire qui règle la plupart des sécrétions hormonales. On observe de nombreux troubles hormonaux entraînant la stérilité (avec aménorrhée et frigidité chez la femme, impuissance chez l'homme), troubles de la régulation thermique, de la soif, une insuffisance thyroïdienne.

- **Troubles du sommeil** : ce sont les signes les plus évocateurs. Ils commencent par une succession d'épisodes de veille et de sommeil, le malade s'endormant à n'importe quel moment pour se réveiller un peu plus tard et ceci de jour comme de nuit. Très souvent on constate une perturbation du rythme nyctéméral, avec des cycles du sommeil débutant par une phase de sommeil paradoxal alors que normalement cette phase ne commence qu'après une heure de sommeil orthodoxe (Buguet et coll., 1994, 2001, 2004). A la fin le malade est

dans un état d'hébétude permanente.

L'évolution de la maladie en l'absence de traitement se fait vers une cachexie dite sommeilleuse terminale. En phase terminale, le malade est sans expression, décharné, grabataire, trémulent et froid, indifférent à lui-même et à son entourage, il s'endort. Sans pudeur, sans propreté, émacié, squelettique, il s'achemine avec indifférence vers un coma continu par une encéphalite démyélinisante, auto entretenue, irréversible, que seule la mort, accompagnée de convulsions, pourra interrompre, souvent par infection intercurrente, rarement par évolution terminale.

L'analyse de l'ensemble des signes cliniques permet une différenciation en 2 stades : le stade 1 ou stade lymphatico-sanguin et le stade 2 ou stade nerveux, mais ces signes en pratique ne permettent pas une différenciation entre les stades sauf lorsque l'affection est très évoluée. Le diagnostic entre les stades reste donc difficile, des marqueurs spécifiques d'évolution de la maladie n'ayant pas été identifiés.

4- Diagnostic de la maladie

a- Méthode de détection dans le sang et dans les prélèvements ganglionnaires

Deux grands types de méthodes peuvent être distingués, en fonction des critères spécifiques comme la détection du trypanosome ou bien des critères moins spécifiques comme l'anémie (Cattand et de Raadt, 1991).

Méthodes directes basées sur la détection du trypanosome :

- **Ponction des ganglions lymphatiques** : les prélèvements sont effectués, généralement, sur les ganglions lymphatiques latéro-cervicaux. Le suc ganglionnaire est prélevé à l'aiguille puis refoulé sur une lame qui est ensuite recouverte d'une lamelle et examiné de la même façon que les préparations de sang à l'état frais. Les frottis fixés peuvent aussi être stockés pour un examen ultérieur après coloration.

- **Prélèvement de sang** : comme le trypanosome est un parasite du sang et des autres tissus c'est pour cela qu'il est recommandé pour le diagnostic, de prélever le sang à la fois au

niveau des vaisseaux sanguins et des capillaires.

- **Examen de sang à l'état frais** : une petite goutte de sang est placée sur une lame de verre et recouverte d'une lamelle afin d'étaler le sang en une couche monocellulaire. Celle-ci est examinée à l'aide d'un microscope optique (X 200) afin de mettre en évidence les trypanosomes par leur mobilité.

- **Frottis minces colorés** : une goutte de sang est placée à l'extrémité d'une lame porte-objet et étalée en couche mince selon le procédé habituel. L'étalement est rapidement séché à l'air, fixé dans l'alcool méthylique ou au May Grunwald. Le frottis est ensuite coloré au Giemsa. Toutes les lames sont examinées au microscope optique ayant un fort grossissement (X 500-1000). Cette technique permet l'examen morphologique.

- **Gouttes épaisses colorées** : 20-25 μ L de sang sont placés au centre d'une lame de verre et étalés. Il est recommandé de laisser sécher le prélèvement 1 heure voire 2 heures. L'étalement non fixé est coloré au Giemsa. Les lames sont examinées à l'immersion l'aide d'un microscope optique à fort grossissement (X 500-1000). Cette technique a l'avantage de concentrer les parasites et de permettre leur mise en évidence plus facilement. L'inconvénient de cette technique peut être l'altération morphologique des trypanosomes.

- Méthodes par concentration

La plupart des patients parasités par *T. b. gambiense* présentent une parasitémie faible, et la mise en évidence des parasites est difficile. Les méthodes de concentration des parasites deviennent donc nécessaires.

- **Centrifugation en tubes à hématocrite** (Technique de Woo, 1970) : le sang est prélevé sur des tubes capillaires héparinés. Ceux ci sont centrifugés à 3000 g pendant 10 minutes, l'extrémité fermée étant positionnée vers l'extérieur. La lecture se fait à l'interface plasma-leucocytes où sont concentrés les trypanosomes. Le capillaire placé sous un microscope optique, est recouvert d'une lamelle puis l'espace autour de cette portion est recouvert d'eau afin d'éviter les diffractions et la zone de la couche leucocytaire est examinée au microscope optique à faible grossissement (100-200 x). Le système QBC[®] (Quantitative Buffy Coat, Becton-Dickinson) est une variante de cette technique mais nécessite un microscope à fluorescence. Le colorant utilisé pour ce montage est l'acridine orange.

- **Examen au microscope à contraste de phase** : le sang est prélevé dans des tubes capillaires héparinés et centrifugé comme ci-dessus. Le tube est rayé puis coupé 1 mm au-dessous de la couche leucocytaire ; la partie supérieure inclut la couche supérieure des hématies et le plasma. Les éléments contenus dans cette portion de tube sont refoulés sur une lame recouverte avec une lamelle, et examinés au microscope à contraste de phase ou avec un éclairage normal. Il existe une autre possibilité de centrifugation des tubes à hématocrite : c'est une simple micro-centrifugeuse de terrain fonctionnant à la main. Cette centrifugeuse donne des résultats comparables à ceux de la centrifugeuse à hématocrite.

- **Techniques d'hémolyse** : elles ne sont plus utilisées en routine.

- **Filtration sur mini-colonne échangeuse d'anions** (ou mAECT pour mini Anion Exchange Centrifugation) : lorsqu'on fait passer du sang infecté par des trypanosomes sur une colonne échangeuse d'anions appropriée (DEAE-cellulose), les éléments figurés du sang de l'hôte étant chargés plus négativement que ne le sont les trypanosomes, ils sont adsorbés sur la colonne échangeuse d'anions, tandis que les trypanosomes sont élués, en conservant toute leur viabilité et leur infectivité. Une méthode simplifiée de terrain a été mise au point pour le dépistage de parasitémies faibles. Cette technique bien qu'un peu "lourde" a l'avantage de présenter une grande sensibilité.

- **La culture de trypanosomes** : cette technique de mise en évidence des trypanosomes est lourde et onéreuse. Le principe est simple : le sang du patient suspect est inoculé dans un milieu de culture approprié : le KIVI (kit for *in vitro* inoculation). La technique est analogue à celle de l'hémoculture en bactériologie (Aerts et coll., 1992). Si les trypanosomes sont présents dans le sang prélevé, ils s'y multiplient sous forme procyclique et leur mise en évidence est possible par examens microscopiques réguliers. Hormis le coût qui est la première contrainte, il faut entre autre que les prélèvements et l'ensemencement soient faits avec une stérilité rigoureuse. En outre le résultat n'est obtenu que 2 à 3 semaines après l'ensemencement du milieu.

- **Méthodes immunologiques**

Les techniques immunologiques les plus couramment utilisées sont le CATT (Card agglutination trypanosomiasis test) et l'IFI (Immunofluorescence Indirecte) :

- **le CATT** : l'agglutination directe (CATT) est devenue le test de terrain le plus utilisé (Magnus et coll., 1978). Il utilise des trypanosomes formolés, colorés au bleu de Coomassie, isolés du sang de rat par chromatographie sur DEAE-cellulose. Le trypanosome choisi contient un VAT ("Variant Antigen Type") prédominant dans la plupart des souches de *T. gambiense*, le LiTat 1.3. La sensibilité du test varie de 75 à 100%. Il s'utilise sur sang total et lorsque le sérum est dilué au 1/5, sa spécificité augmente.

Il existe des zones où la sensibilité du test est faible notamment au Nigeria ou dans le sud Cameroun. Les anticorps spécifiques de trypanosomes détectés par ce test peuvent encore être détectables 3 ans après le traitement (Frézil et coll., 1978, Paquet et coll., 1992, Garcia et coll., 2000). Des variants de ce test sont actuellement à l'étude notamment un test au latex comportant plusieurs antigènes (Büscher et coll., 1999 ; Jamonneau et coll., 2000).

- **l'IFI** (Immunofluorescence Indirecte) : les tests IFI ont montré leur intérêt dans la lutte contre la THA en Guinée Equatoriale (Simaro et coll., 1991). Ce test ne donne pas de résultats immédiats sur le terrain. Des frottis de trypanosomes obtenus chez des souris sont incubés avec le sérum à tester ou après élution à partir d'un papier filtre, puis avec un conjugué fluorescent de type IgG contre-coloré au bleu d'Evans. La reproductibilité de la technique est liée à l'utilisation d'un VAT standardisé : *T. b. gambiense* LiTat 1.3 (Magnus et coll., 1978). L'IFI peut être utilisée avec sérum ou LCR.

- Méthodes indirectes

Ces méthodes hématologiques démontrent plus les effets du parasite sur leurs hôtes qu'elles ne détectent directement le parasite. L'anémie est un indicateur fiable d'une infection par les trypanosomes, bien qu'elle ne soit pas pathognomonique. L'anémie peut être appréciée par :

- la valeur de l'hématocrite,

- ou, mieux, par le taux d'hémoglobine.

b- Méthodes de détection dans le LCR

Le LCR est un liquide clair, sans couleur contenant des protéines, du glucose, du potassium en faibles quantités mais de grandes quantités de chlorure de sodium. Dans un LCR normal, les substances retrouvées sont les mêmes que celles du sang mais à d'autres concentrations. Soixante dix pour cent du LCR est produit par les plexus choroïdes (ventricules latéraux, toits du 3^{ème} et du 4^{ème} ventricule), le reste est produit par le lit capillaire cérébral (18%) et le métabolisme (12%). Chez l'homme, le LCR correspond à un volume de 150 mL environ dont 23 mL sont présents dans les ventricules. Une production journalière de 0,35 à 0,37 mL/min est assurée, soit environ 400 mL/jour.

Les techniques de dépistage à partir du LCR sont :

- La numération cellulaire : la lecture est possible sur 5 chambres différentes :

La cellule de Fuchs Rosenthal, la cellule de Malassez, la cellule de Neubauer, la cellule de Kova et la cellule de Nageotte. Les chambres des cellules se remplissent par capillarité avec un volume précis de LCR. La lecture se fait au grossissement 10. La limite arbitraire de 5 cellules/ μ L correspondant à la normalité (Miézan et coll., 1998) a été critiquée à de nombreuses reprises. Cette limite de 5 cellules est proche de la limite de détection des chambres de comptage utilisées ce qui permet de larges fluctuations des résultats lors de la répétition de cet examen sur un même échantillon.

Il faut également savoir que le seuil de normalité varie en fonction de l'âge : il est normal jusqu'à 30 cellules/ μ L pendant la première année de vie, normal jusqu'à 20 cellules/ μ L entre 1 et 4 ans, normal jusqu'à 10 cellules/ μ L de 5 ans à la puberté (Kjeldsberg et coll., 1993).

- La protéinorachie

A l'état normal, les protéines du LCR sont constituées de 70% d'albumine et 30% d'IgG originaires du plasma. Ces concentrations relatives se modifient au cours de l'inflammation. Le dosage des protéines n'est pas d'usage courant dans les activités de contrôle de la maladie du sommeil en raison probablement de la nécessité de disposer d'un

matériel adapté et de l'instabilité des réactifs. Le seuil de normalité varie en fonction de la technique colorimétrique utilisée. En effet, les réactions et les absorbances des différentes techniques colorées sont différentes avec l'albumine ou l'IgG.

Technique de précipitation (à l'acide trichloro-acétique (TCA) ou sulfosalicylique). Le test de Sicard Cantaloube consiste en l'addition d'un acide afin de réduire le pH et de dénaturer les protéines qui précipitent. Le volume et l'intensité de précipitation correspondent à une concentration en fonction d'un standard (appréciation visuelle).

Il existe **une version simplifiée de ce test** avec lecture visuelle en comparaison à une gamme standard ou avec une lecture au spectrophotomètre à 450 nm. Trois cents micro-litres de LCR préalablement centrifugés dans un tube sont ajoutés à 900 μ L de TCA dilué à 5% et homogénéisés. La lecture se fait 5 min plus tard en comparant la turbidité à celle de la gamme. La solution stock de TCA doit être renouvelée tous les mois. Le seuil de normalité de cette méthode est de 250 mg/L (OMS, 1983). La précipitation avec l'acide sulfosalicylique est une autre possibilité. Un volume de 1 mL de LCR est ajouté à 3mL d'acide sulfosalicylique à 30 g/L. la lecture visuelle ou au spectrophotomètre à 450 nm est effectuée après 5 minutes. Le seuil de normalité varie entre 100 et 450 mg/L (OMS, 1983).

Les méthodes colorimétriques (Bleu de Coomassie). Il existe 2 techniques différentes, l'une utilise des cuvettes en polystyrène spéciales, l'autre des plaques de lecture ELISA. Le réactif utilisé est le Bleu de Coomassie G250 (Bio-rad), il est utilisé après dilution extemporanée au 1/5^{ème} dans de l'eau distillée. La technique avec cuvette utilise 50 μ L de LCR qui sont déposés dans la cuvette. Deux mille cinq cents micro-litres de réactif sont additionnés puis homogénéisés doucement. La lecture peut se faire au bout de 2 minutes, il est recommandé de ne pas dépasser une heure. La lecture peut être visuelle ou au spectrophotomètre à 595 nm. La concentration sera déduite de la courbe standard. Le seuil de normalité est de 370 mg/L.

La technique utilisant des plaques ELISA nécessite 10 μ L de LCR qui sont déposés dans chaque puits ; 200 μ L de réactif dilué sont additionnés comme précédemment. Après

homogénéisation, la lecture se fait dans l'heure qui suit, éventuellement en utilisant un lecteur ELISA. Le seuil est le même que pour la technique en cuvette.

Méthode utilisant la réduction du Cu^{2+} (BCA). Il faut disposer d'un kit (Pierce) et de plaques ELISA. Le réactif est préparé extemporané, dilué au 1/50. 10 μL de LCR sont pipetés dans les puits, 200 μL de réactif sont ajoutés, homogénéisés et incubés 30 min à 37°C. La lecture peut être visuelle ou avec un lecteur à 540 nm. Pour cette méthode, il n'y a pas de seuil.

La fiabilité et la reproductibilité de ces techniques sont dépendantes de la rigueur, de la propreté du matériel et de l'eau utilisée pour les dilutions des réactifs.

- La recherche de trypanosome :

La détection du trypanosome dans le LCR demeure la preuve irréfutable d'une atteinte du SNC en l'absence de manifestations cliniques évocatrices.

Le LCR doit être examiné immédiatement après le prélèvement, ce qui permet d'observer le trypanosome mobile. Sa mise en évidence au cours du comptage des cellules est peu sensible en raison du faible nombre de parasites dans le LCR. La sensibilité de ces techniques a été améliorée en centrifugeant le LCR. Trois techniques différentes sont alors possibles :

Centrifugation simple du LCR. Un volume de LCR est centrifugé dans un tube conique à vitesse faible (10 min, 1000 g), le surnageant est retiré sans toucher le fond du tube. Le culot est ensuite re-suspendu dans le faible volume de LCR restant et ce volume est transféré sur une lame qui est ensuite recouverte d'une lamelle et examinée au microscope au grossissement 10 ou 40. Il faut examiner scrupuleusement toute la lame (Miézan et coll., 2000).

Double centrifugation du LCR. La centrifugation se fait comme précédemment dans un tube conique en prenant un volume plus important (6-8 mL). Le surnageant est éliminé et le culot homogénéisé et réaspiré dans des tubes capillaires remplis au 3/4, ces tubes sont scellés à la flamme du côté sec du tube. Ils sont centrifugés dans une centrifugeuse à hématocrite (1 min à 13000-15000 g). Ils sont ensuite disposés sur une lame, recouverte d'une lamelle au niveau de l'extrémité scellée, et l'addition d'eau claire entre la lame et la lamelle

permet d'éviter les diffractions. L'examen microscopique des extrémités scellées se fait à l'objectif 10 ; la technique de double centrifugation permet de détecter la présence de trypanosome dans le LCR chez 30 % des patients (Cattand et coll., 1988).

Simple centrifugation modifiée. Cette technique plus simple que la précédente semble tout aussi sensible mais n'a pas été évaluée à grande échelle. On centrifuge 2 mL de LCR (5 min, 450 g) dans une pipette pasteur scellé à la flamme et recouverte d'embout plastique bleu utilisé pour les pipettes automatiques de 1mL. L'extrémité scellée est ensuite examinée dans une chambre de lecture comme pour la double centrifugation avec addition d'eau pour éviter les diffractions (Miézan et coll., 2000).

5- Critères actuels classant les patients en stade II

Classiquement un patient est considéré en stade II de la maladie lors de la découverte d'un trypanosome dans le LCR. Cette découverte est aléatoire et l'OMS recommande l'adoption des critères suivants (OMS, 1998) :

une cytorachie supérieure à 5 éléments/ μ L dans le LCR et présence de trypanosome dans le système lymphatico-sanguin,

une protéinorachie supérieure à 450 mg/L avec présence de trypanosome dans le système lymphatico-sanguin (OMS, 1998).

Ces critères prêtent à discussion pour 4 raisons principales :

- leur manque de spécificité ; une autre infection du SNC peut donner les mêmes altérations (sida, tuberculose, syphilis ainsi que d'autres parasites du SNC),

- leur manque de précision quant aux techniques à utiliser pour permettre une standardisation et une reproductibilité,

- l'absence de conduite précise à tenir pour le suivi des patients, sa durée, le nombre de contrôles et les critères de guérison,

- enfin en pratique sur le terrain, seule la cytorachie est effectuée dans le cadre du

diagnostic du stade nerveux. La mise en évidence du trypanosome est une découverte aléatoire au cours du comptage.

D'autres critères ont été proposés mais leur application à grande échelle est très rarement effectuée :

- présence d'IgM dans le LCR à un taux supérieur à 100 mg/L ou représentant plus de 10 % de la protéinorachie (Greenwood et Whittle, 1973 ; Oudard, 1976),
- présence d'antigènes spécifiques du trypanosome dans le LCR (Nantulya, 1992),
- présence d'anticorps spécifiques dans le LCR. (Wéry et coll., 1970a ; Wéry et coll., 1970b ; Whittle, 1977 ; Roffi et coll., 1979 ; Lemesre et coll., 1988 ; Smith et coll., 1989).

6- Le traitement

a- Les médicaments actuels

Plusieurs produits peuvent être utilisés pour le traitement de la THA, classés en deux groupes basés sur leur capacité ou non à traverser la BHM (Denise et Barrett, 2001 ; Keiser et coll., 2000, Bouteille et coll., 2003).

Dans le cas d'une trypanosomose, 2 traitements sont possibles en fonction de la phase de la maladie :

- Stade I le traitement comporte la pentamidine (Pentacarinat®) ou la suramine (Germanin®),
- Stade II le traitement est basé sur le mélarsoprol (Arsobal®, Mel B) ou l'alpha-difluorométhylornithine (DFMO, éflornithine, Ornidyl®) (Doua et coll., 1987 ; Doua et coll., 1994 ; Mbatia et coll., 2000).

Le nifurtimox présente l'avantage d'être actif aux 2 stades de la maladie, mais ne dispose pas d'autorisation de mise sur le marché pour les trypanosomoses africaines.

Pour une infection avec *T. b. rhodesiense*, le choix se limite à la suramine (Bayer205,

Germanin®) pour le stade précoce et au mélsarsoprol pour une atteinte nerveuse.

Le mélsarsoprol est très toxique et doit être utilisé avec précaution car c'est un dérivé de l'arsenic qui peut, dans certains cas, entraîner une encéphalopathie qui est souvent fatale (5 % des patients, Legros et coll., 1999 ; Blum et coll., 2001).

Les traitements qui ne franchissent pas la BHM peuvent favoriser le risque de progression de la maladie vers un stade neurologique si le stade II n'a pas été diagnostiqué.

La complexité du traitement de la THA se comprend par la dualité du type de traitement en fonction du stade et par la nécessité d'un suivi prolongé des patients (au moins 2 ans) pour affirmer la guérison ce qui, dans les conditions de brousse, n'est pas chose aisée (Dumas et Bouteille, 2000).

Enfin la chimiorésistance est un problème non négligeable. De plus, des résistances apparaissent pour les médicaments actuels (Barrett et Fairlamb, 1999 ; Matovu et coll., 2003 ; Bray et coll., 2003).

| Produit | Dénomination commerciale | Classe moléculaire | Indication | Mécanisme d'action | Posologies | Effets secondaires toxicité |
|---|---|-----------------------------|---|---|---|--|
| Suramine | Germanin® Bayer | Naphtylamine polysulphonate | Stade 1 <i>T. b. rhodesiense</i> | Inhibition des enzymes de la glycolyse | 5 mg/kg jour 1, 10 mg/kg jour3, 20 mg/kg jour5, 11, 23, 30, IV lente | Nausées, vomissements, choc, paresthésie, troubles rénaux, modifications hématologiques |
| Pentamidine | Pentacarinat Pentamidine BP Aventis | Diamidine aromatique | Stade 1 <i>T. b. gambiense</i> | Inhibition de la S- adénosylmethionine décarboxylase | 4 mg/kg, IM profonde ou IV, tous les 2 jours, pendant 20 jours | Douleurs abdominales, vertiges, nausées |
| Mélsarsoprol | Arsobal® sedapharm (Aventis) | Dérivé arsenical | Stade 2 <i>T. b. gambiense</i> <i>T. b. rhodesiense</i> | Inhibition trypanothione reductase et pyruvate kinase | 3,6 mg/kg maxi, en 3-4 séries de 3-4 injections séparées par 10 jours de repos, IV lente | Encéphalopathie mortelle, fièvres isolées, phlébites, réactions cutanées |
| | | | | | 2,2 mg/kg/jour pendant 10 jours (Schmid et coll., 2005 ; Moore, 2005) | Même effets secondaires mais la durée du traitement est plus courte |
| DFMO (2- (difluorométhyl)- DL-ornithine monohydrochloride monohydrate | Ornidyl® Aventis | Analogue de l'ornithine | Stade 2, rechutes <i>T. b. gambiense</i> | Inhibition de l'ornithine décarboxylase | 400 mg/kg/24 heures, 14 jours, IV lente, 4g/m ² chez l'enfant | Diarrhées, anémies, troubles neurologiques |
| Nifurtimox | Lampit® Bayer | Nitrofurane | Stade 2, rechutes <i>T. b. gambiense</i> <i>T. b. rhodesiense</i> (?) | Production du stress oxidatif chez le parasite par ion superoxyde (O ₂ ⁻) et radicaux libres | 15 à 20 mg/kg pendant 14 jours, voie orale | Anorexie, vomissements, troubles neurologiques |

Tableau 1: Récapitulatifs des traitements utilisés pour la THA

Les produits disponibles pour le traitement de la THA sont peu nombreux et souvent toxiques. La disponibilité future de ces produits n'est pas certaine et les cliniciens sont souvent confrontés à des échecs thérapeutiques. La recherche et le développement de nouveaux médicaments spécifiques ont été délaissés pendant de trop nombreuses années, malgré les grands progrès réalisés dans la connaissance des trypanosomes. Il est donc urgent d'intensifier et de faciliter la recherche de nouveaux produits et de tester dans des essais

cliniques randomisés des associations de produits disponibles.

b- Les traitements de l'avenir

A l'heure actuelle, la recherche de nouveaux traitements contre la THA s'avère infructueuse. En effet depuis les années 40, on utilise toujours les mêmes. Dans les années 90, avec le mégazol une nouvelle stratégie est envisagée. Son action trypanocide a été prouvée d'abord *in vitro* sur différentes souches de trypanosomes puis *in vivo* sur la souris et le singe (Marie-Daragon et coll., 1994 ; Bouteille et coll., 1995 ; 2003 ; Enanga et coll., 2000). Son pouvoir à traverser la barrière hémato-encéphalique et sa bonne tolérance chez l'animal notamment chez les ovins (Boda et coll., 2004) a laissé envisager une nouvelle thérapie, malheureusement, les essais de toxicité ont révélé un fort pouvoir mutagène (test d'Ames positif et test des micronuclei) qui a bloqué son développement (Poli et coll., 2002 ; Nessler et coll., 2004).

Un autre traitement éventuel a vu le jour récemment, le DB 289 (amidinophénylfurane). Cette molécule est active dans les infections à *Pneumocystis jiroveci*. Les tests *in vitro* et *in vivo* sur différents animaux en stade I de la maladie sont prometteurs. Les essais cliniques de phase I n'ont montré aucun effet secondaire. Les essais de phase II ont débuté récemment en Angola et en République Démocratique du Congo. En plus, des essais de traitements du stade II sont en cours actuellement (Sturk et coll., 2004).

7- Le vaccin : rêve ou réalité

Le parasite échappe au système immunitaire de l'hôte en faisant varier son manteau antigénique, grâce aux VSG. Ceci est dû à l'expression alternative de certains gènes ou bien dans d'autre cas, au réarrangement de site d'ADN du génotype du trypanosome. Mais certaines protéines comme les récepteurs de surface localisés au niveau de la poche flagellaire du parasite, sont dites invariantes et permettent d'envisager une thérapie vaccinale (Pays, 1995 ; Overath et coll., 1994).

Des protéines intracellulaires invariables ont également été mises en évidence, c'est le

cas par exemple des MAPs (Microtubules Associated Proteins) et plus particulièrement de la p52 qui est une protéine glycosomale. Des rats et des souris immunisés avec cette protéine ont présenté une protection contre différentes souches de trypanosomes et le sérum de ces animaux pouvait entraîner une agrégation des parasites *in vitro* (Balaban et coll., 1995). Toujours en utilisant des MAPs spécifiques au trypanosome, p15, d'autres immunisations ont été réalisées mais cette fois en utilisant comme vecteur vaccinal un adénovirus. Ce dernier a permis de développer une réponse immunitaire non spécifique. Rasooly et Balaban (2004) ont ainsi réussi à produire *in vivo* une protection parasitaire tout en développant une prolifération des lymphocytes T CD8⁺.

Dernièrement, une étude portant sur une immunisation à partir de tubuline de trypanosome a été réalisée. Le transfert passif de l'immunité grâce aux sérums des souris riches en anti-tubuline a été réalisé et a protégé des souris infectées par différentes souches de trypanosomes (Lubega et coll., 2002).

Une autre voie vaccinale se développe, cette fois non pas en utilisant des protéines du parasite mais les glycolipides de surface et les gangliosides. Ces derniers ont été obtenus par TLC et identifiés par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse (Uemura et coll., 2004).

Le premier problème de la thérapie vaccinale est la recherche de l'antigène stable du parasite permettant une réponse immunitaire suffisamment importante et efficace pour toutes les souches.

Cette recherche vaccinale semble pour l'instant assez aléatoire et n'est pas encore sortie des laboratoires. Aucun test n'a été fait à grande échelle sur des animaux et encore moins chez l'homme.

8- Les interrogations actuelles

La première, et non la moindre des questions, est de savoir pourquoi l'endémie sommeilleuse resurgit pratiquement toujours dans ce que l'on appelle les "foyers historiques" où, entre la fin du XIX^{ème} siècle et les années 40, la population fut décimée. Les prospections médicales, seules, avaient pu enrayer le mal. Aucune campagne de lutte antivectorielle contre

la mouche tsé-tsé n'avait contribué à ce succès. Le trypanosome est-il quiescent au niveau de réservoirs proche de l'homme ?

Le réservoir humain a-t-il été totalement assaini ? A en croire les données assez récentes, les tests couramment utilisés pour le dépistage et le diagnostic ne permettent pas d'identifier la totalité des malades, même lors de prospections poussées à but scientifique et, *a fortiori*, lors des prospections de masse (Enyaru et coll., 1998). S'agit-il d'un phénomène lié au parasite, au trypanosome lui-même ? Y-a-t-il eu sélection de souches pathogènes pour l'homme, mais qui simultanément ne répondent pas aux tests et n'occasionnent pas des symptômes d'appel aussi marqués qu'autrefois ?

En ce qui concerne le rôle de l'homme, il serait important de savoir si des souches sont spécifiques d'un foyer ou d'une zone bio-géographique. Les mouvements de populations ont-ils contribué à la dissémination de parasites auxquels les populations humaines "réceptrices" étaient plus ou moins bien adaptées ? Une réponse à cette question supposerait de posséder une "carte d'identité" fiable du trypanosome pour l'identifier et suivre sa dispersion.

La glossine doit, elle aussi, jouer un rôle dans l'évolution de cette maladie. Le cycle du trypanosome dans l'insecte, non encore totalement élucidé, pourrait être sous la dépendance de plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques favorisant ou non la capacité vectorielle de la tsé-tsé ; des facteurs climatiques, alimentaires et peut-être génétiques jouent également un rôle.

Le diagnostic parasitologique de la trypanosomose, par l'observation du parasite dans le sang du malade, est rendu difficile par des parasitémies généralement très basses inférieures au seuil de sensibilité des tests à notre disposition. Il est possible que par défaut de détection, des individus atteints retournent dans le foyer et constituent un réservoir potentiel.

Un autre problème est celui de la détermination du stade de la maladie, basée sur le simple comptage de cellules dans le LCR avec tous les risques d'erreurs qui en résulte. Sur le terrain, la découverte d'une cytorachie supérieure à la normale n'est pas toujours en relation avec l'état du malade. Là encore, beaucoup reste à faire pour apporter des améliorations et une voie possible serait d'utiliser les outils moléculaires (PCR) pour détecter la présence éventuelle du parasite dans le LCR (Seed, 2001).

Il reste donc difficile de nos jours, compte tenu de ce qui vient d'être énuméré, d'organiser des campagnes de lutttes efficaces contre l'endémie sommeilleuse. Et pourtant plusieurs outils ont été mis au point et testés avec succès mais il se pose alors souvent le problème du coût. Les méthodes de lutte contre la glossine sont efficaces et plusieurs systèmes de piègeage ont fait leurs preuves à grande échelle. Le piègeage est facile d'utilisation, rapide à mettre en place et inoffensif pour la faune non cible (Schofield et Maudlin, 2001), cependant dès qu'ils ne sont plus piqués, les villageois manquent de motivation et cessent d'entretenir les pièges...

II- Rappels d'immunologie

Le système immunitaire est chargé de la défense contre les agents pathogènes et de l'élimination des substances étrangères à l'organisme. L'introduction dans l'organisme d'un agent pathogène ou d'une substance étrangère déclenche une réponse immunitaire. La caractéristique essentielle de la réponse immunitaire est la spécificité : la réponse est dirigée de façon très sélective contre l'agent pathogène ou la substance étrangère en cause.

1- Généralités

a- Le système immunitaire reconnaît des antigènes

On appelle antigène (Ag) toute substance reconnue par le système immunitaire. Un antigène peut correspondre à un agent pathogène (bactérie, virus, parasite), à une cellule étrangère à l'organisme (cellules d'un organe greffé, cellules sanguines lors d'une transfusion), à une substance étrangère (sérum antivenimeux d'origine animale, médicament...).

Dans l'immense majorité des cas, les antigènes sont des substances étrangères à l'organisme. Néanmoins, la notion d'antigène et celle de substance étrangère ne sont pas superposables : le système immunitaire peut reconnaître des composants de notre propre organisme (le "soi") que l'on qualifie alors d'auto-antigènes, par opposition aux antigènes exogènes (qui font partie du "non-soi").

b- La cellule responsable de la reconnaissance de l'antigène est le lymphocyte

Les lymphocytes, et eux seuls, reconnaissent spécifiquement les antigènes. Les lymphocytes synthétisent et expriment à leur surface des récepteurs spécifiques d'antigènes. Ils sont les seules cellules à le faire. Les récepteurs pour l'antigène d'un même lymphocyte sont identiques entre eux : chaque lymphocyte ne reconnaît qu'un seul antigène, ce qui assure la spécificité de la réponse.

Les lymphocytes se répartissent en deux populations principales, qui diffèrent par leur

mode de reconnaissance de l'antigène et par leur rôle dans les défenses de l'organisme : les lymphocytes B et les lymphocytes T, responsables respectivement de l'immunité humorale et de l'immunité à médiation cellulaire. L'immunité humorale s'exerce par l'intermédiaire des anticorps, qui sont des molécules d'immunoglobulines (Ig) sécrétées dans les liquides biologiques et susceptibles de reconnaître spécifiquement les antigènes. L'immunité à médiation cellulaire est exercée directement par les lymphocytes T, qui agissent par contact direct avec d'autres cellules de l'organisme.

c- La réponse immunitaire

Au cours de la réponse immunitaire, les lymphocytes spécifiques de l'antigène reconnaissent celui-ci par l'intermédiaire de leur récepteur clonotypique. Cette interaction ligand-récepteur déclenche un signal d'activation au sein des lymphocytes impliqués, ce qui constitue le "premier signal", indispensable pour l'induction d'une réponse immunitaire : les lymphocytes reconnaissant l'antigène sont les seuls à recevoir ce "premier signal", ce qui assure la spécificité de la réponse. Au cours de la réponse immunitaire, les lymphocytes se transforment en effecteurs, capables d'éliminer l'antigène, directement ou indirectement.

La capacité d'un antigène à induire une réponse immunitaire efficace est appelée immunogénicité. L'immunogénicité et l'antigénicité ne sont pas superposables : dans certaines conditions, des antigènes, bien que reconnus par le système immunitaire, n'entraînent pas de réponse immunitaire ; inversement, on peut rendre immunogéniques des antigènes qui ne le sont pas naturellement.

d- La mémoire immunitaire

C'est une des caractéristiques essentielles de la réponse immunitaire. Le contact avec un antigène A induit non seulement une réponse immunitaire anti-A, mais également une mémoire immunitaire : lors d'un deuxième contact avec l'antigène, la réponse anti-A sera plus efficace.

La mémoire immunitaire est spécifique de l'antigène rencontré, vis-à-vis duquel on dit

que le sujet est pré-immunisé. Lors du premier contact avec l'antigène, on dit qu'il y a réponse primaire ; lors du deuxième contact avec le même antigène, on dit qu'il y a réponse secondaire. La réponse secondaire se différencie de la réponse primaire par son apparition plus rapide après le contact avec l'antigène, et, dans le cas de la réponse humorale, par la production d'anticorps en quantité supérieure et de plus forte affinité.

e- Immunité innée et immunité acquise

La réponse immunitaire spécifique ne constitue pas le seul moyen de défense de l'organisme. Elle est complétée par des mécanismes de défense non spécifiques d'antigène.

Ces mécanismes préexistent à l'introduction de l'agresseur dans l'organisme, contrairement à la réponse immunitaire, qui se développe à la suite de celle-ci. C'est la raison pour laquelle on regroupe souvent les mécanismes de défense non spécifiques sous le vocable d'immunité innée, pour l'opposer à l'immunité acquise (spécifique d'antigène).

2- Les cellules et organes immunitaires

Les cellules qui constituent les acteurs des réponses immunitaires sont dérivées des cellules souches de la moelle osseuse, et appartiennent à deux grandes lignées : la lignée lymphoïde et la lignée myélomonocytaire. Elles sont en renouvellement permanent. Trois principaux types cellulaires sont impliqués : les lymphocytes, les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages.

a- Les lymphocytes

Les lymphocytes B et T ne sont pas distinguables morphologiquement. La caractéristique essentielle par laquelle ils diffèrent est l'expression à la membrane de récepteurs clonotypiques distincts : immunoglobuline de membrane (mIg) pour les B et TCR (T cell receptor) pour les T.

On peut caractériser les lymphocytes (mais également les autres cellules de l'immunité) grâce à d'autres molécules membranaires, importantes pour leurs fonctions, et utilisées comme "marqueurs de membrane". Pour qu'une réponse immunitaire puisse se produire, il faut que les lymphocytes reconnaissent l'antigène et qu'ils interagissent avec d'autres éléments du système immunitaire. Ces interactions se font au moyen de glycoprotéines de membrane, que les lymphocytes acquièrent au cours de leur maturation dans les organes lymphoïdes centraux. Ces glycoprotéines diffèrent dans les différentes populations de lymphocytes, qu'elles permettent de distinguer : on les appelle marqueurs de membrane. Comme la présence de ces molécules sur les lymphocytes est détectée au moyen d'anticorps, on les appelle également antigènes de membrane. La nomenclature de ces molécules est basée sur une dénomination en "CD" (cluster de différenciation) avec une numérotation, enrichie à mesure des découvertes.

Principaux marqueurs des lymphocytes B :

- CD79 : co-récepteurs associés à l'Ig membranaire qui permet la transduction du signal lors de la liaison de l'antigène à l'Ig de membrane
- CD19, CD20
- molécules de classe II du CMH
- récepteur de type II pour le Fc des IgG (CD32), utilisé pour la rétro-régulation négative de la réponse anticorps par les IgG
- récepteurs pour certains fragments de dégradation du composant C3 du complément, qui jouent un rôle d'amplification de la réponse anticorps.

Principaux marqueurs des lymphocytes T :

- TCR (T cell receptor) qui peut être de deux types : TCR α/β ou TCR γ/δ , récepteur clonotypique. La très grande majorité (>90 %) des lymphocytes T des organes lymphoïdes secondaires utilisent le TCR α/β (lymphocytes T α/β), chez l'adulte.
- CD3 : molécules associées au TCR et permettant la transmission du signal antigénique

- CD2, CD5

- dans le cas des lymphocytes T α/β , la molécule CD4 ou la molécule CD8 selon la sous-population. Ces sous-populations sont appelées respectivement T CD4⁺ (ou T4) et T CD8⁺ (ou T8). La majorité des lymphocytes T du sang sont CD4⁺ (le rapport T4/T8 est d'environ 1,5). Dans les organes lymphoïdes, cette proportion varie selon le cas, mais les lymphocytes CD4⁺ sont généralement majoritaires.

Les molécules CD4 et CD8 interagissent respectivement avec les molécules de classe II et de classe I du CMH. Cette interaction, qui stabilise la liaison entre le TCR et le complexe CMH/peptide, confère aux lymphocytes T une sélectivité pour les classes II ou les classes I.

Les lymphocytes T CD4⁺ interagissent avec les cellules qui présentent des peptides antigéniques associés à des molécules de classe II du CMH.

Les lymphocytes T CD8⁺ interagissent avec les cellules qui présentent des peptides antigéniques associés à des molécules de classe I du CMH.

Les lymphocytes T γ/δ n'expriment en général ni CD4 ni CD8 et sont minoritaires chez le sujet adulte.

Il existe une troisième catégorie de lymphocytes non-T/non-B qui n'expriment ni mIg ni TCR à leur membrane. Ces lymphocytes appartiennent à l'immunité innée, car ils exercent une cytotoxicité cellulaire naturelle (avant toute réponse immunitaire) vis-à-vis de cellules tumorales ou de cellules infectées par un virus. On les qualifie également de cellules NK (pour "natural killer"). Il n'existe pas de marqueur totalement spécifique et universel pour ces cellules, que l'on caractérise par les molécules et propriétés suivantes :

- CD56, CD57

- CD2 en absence de CD3

- récepteur de type III pour le Fc des IgG (CD16), utilisé pour la cytotoxicité dépendante des anticorps

- CD161 : récepteur NKRP-1 de cytotoxicité

- leur morphologie : grandes cellules contenant des granules de cytotoxicité (d'où l'appellation de LGL pour "large granulous lymphocytes")

- leur activité cytotoxique ("NK") vis-à-vis de certaines cibles cellulaires

Les lymphocytes NK représentent une proportion variable des lymphocytes du sang circulant.

Enfin les cellules NK-T sont des lymphocytes uniques qui expriment les marqueurs des cellules NK et des cellules T. A la différence des cellules NK, elles expriment le CD3 et le TCR et à la différence des cellules T elles expriment de manière constitutive les marqueurs de cellules NK comme le CD161. Contrairement aux cellules T conventionnelles, leur répertoire TCR est fortement restreint. Les cellules NK-T présentent une ségrégation tissu-spécifique chez la souris, en effet elles sont plus abondantes dans le foie, le thymus, et la moelle (30%, 30% et 20% de lymphocytes, respectivement), tout en constituant un plus petit pourcentage des lymphocytes dans la rate et le poumon. Chez l'homme, les cellules NK-T CD56⁺ CD161⁺ sont plus nombreuses dans la moelle et le foie et en plus petit nombre dans le sang périphérique (Bendelac et coll., 1997 ; Schmiege et coll., 2003).

Les TCR des cellules NK-T reconnaissent une molécule apparentée au CMH, le CD1d qui est une protéine non polymorphique, exprimée par les cellules dendritiques, les cellules B, les macrophages et les hépatocytes. Cette molécule s'associe à des structures lipidiques et glycolipidiques dont elle permet la présentation antigénique. L'origine et l'identité des antigènes normaux identifiés par les cellules NK-T-CD1d demeurent inconnues. En raison du répertoire TCR fortement restreint des cellules NK-T, il est probable qu'elles identifient seulement un nombre restreint de ligands, présentés par le CD1d (Bendelac et coll., 1997).

Le glycolipide, α -galactosylcéramide, active les cellules NK-T. Identifié à l'origine comme la molécule responsable de l'activité anti-tumorale, l' α -GalCer a la capacité de se fixer au CD1d. En se fixant au CD1d, l' α -GalCer, active les cellules NK-T. Cette interaction est responsable de l'activité anti-cancéreuse de l' α -GalCer (Kobayashi et coll., 1995). Une des propriétés la plus caractéristique des cellules NK-T est la production rapide de cytokines, tels qu'IL-4, l'IFN- γ et du TNF- α . En outre, les études indiquent que des réponses spécifiques des cellules T pourraient être modifiées par l'activation de cellules NK-T, montrant une relation entre les immuno-réactions innées et adaptatives. Toutes ces observations suggèrent un rôle

immuno-régulateur de la part des cellules NK-T par l'intermédiaire de la production de cytokines. En plus de la production de cytokines, les cellules NK-T présentent également une activité lytique efficace. Elles expriment constitutivement Fas-ligand et peuvent éliminer les cellules cibles qui expriment Fas ou les éliminer grâce à leur activité perforine-dépendante (Bendelac et coll., 1997 ; Schmiege et coll., 2003).

Les principales caractéristiques des lymphocytes du sang circulant sont résumées dans le tableau 2.

| | nombre absolu/mm³ | pourcentage | marqueurs usuels |
|---------------------------|-------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| lymphocytes totaux | 1500-4000 | | |
| lymphocytes B | | 10 % | CD19, CD20, CD79 |
| lymphocytes T | | 60-70 % | CD3 |
| lymphocytes T4 | ≥ 500 | 60 % des T totaux | CD4, CD3 |
| lymphocytes T8 | | 40 % des T totaux | CD8, CD3 |
| lymphocytes NK | | 5-15 % | CD56, CD57 |

Tableau 2 : Principales caractéristiques des lymphocytes du sang circulant

b- Les cellules non-lymphocytaires

Des cellules non-lymphocytaires, parfois appelées cellules accessoires, sont indispensables à la réponse immunitaire. Ce sont essentiellement les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages.

Les cellules dendritiques, qui dérivent de précurseurs hématopoïétiques, constituent une population hétérogène, pouvant être d'origine lymphoïde ou myéloïde. Les cellules dendritiques sont les seules cellules présentatrices capables de présenter efficacement les

antigènes aux lymphocytes T naïfs (n'ayant jamais été en contact avec l'antigène). Leur principale fonction est de prendre en charge les antigènes aux interfaces entre l'organisme et le milieu extérieur, et de le transporter vers les organes lymphoïdes secondaires, pour le présenter aux lymphocytes T.

D'un point de vue immunologique, les monocytes/macrophages possèdent les caractéristiques suivantes :

- une capacité pour la phagocytose de particules et la pinocytose de molécules ;
- un équipement enzymatique permettant la dégradation des particules ou le clivage des molécules ingérées, la libération de substances toxiques dans le micro-environnement ;
- la capacité de produire certaines cytokines ;
- la présence à la membrane de molécules du CMH de classe II (qui permet la présentation d'antigène aux T CD4⁺ mémoires et effecteurs, mais pas aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs) ;
- la présence à la membrane de récepteurs de type I et II (CD64 et CD32) pour le Fc des IgG et pour certains fragments de clivage de C3 (pour l'opsonisation et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps).

Les monocytes/macrophages interviennent dans les phénomènes suivants :

- dans l'immunité innée (phagocytose, inflammation...) ;
- à la phase d'induction des réponses : production de cytokines pour amplifier et orienter la réponse immunitaire ; présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD4⁺ mémoires en cas de pré-immunisation ;
- à la phase effectrice des réponses immunitaires pour l'immunité humorale : phagocytose ciblée par les anticorps IgG et les fragments de clivage de C3 (opsonisation) ; pour l'immunité à médiation cellulaire : cytotoxicité (pour les pathogènes intra-cellulaires et pour les cellules de voisinage) et constitution de granulome d'hypersensibilité retardée, après activation par les lymphocytes T CD4⁺ de type Th1, activateur de la réponse cellulaire

(infiltrat de macrophages).

c- Organes lymphoïdes centraux et maturation des lymphocytes

Les lymphocytes B et T se différencient dans des organes lymphoïdes centraux différents. Ils sont produits à partir d'un précurseur commun avec la lignée myélo-monocytaire. Chez le fœtus, ils sont produits dans le foie et ensuite dans la moelle osseuse. Les lymphocytes B sont produits et se différencient dans la moelle osseuse. Les lymphocytes T sont produits dans la moelle osseuse et se différencient dans le thymus.

d- Organes et structures lymphoïdes secondaires

C'est le lieu où les lymphocytes matures naïfs (B ou T) rencontrent l'antigène, et où s'élabore la réponse immunitaire.

Les organes lymphoïdes secondaires sont colonisés par des cellules lymphoïdes provenant des organes lymphoïdes centraux.

Les principaux organes (ou structures) lymphoïdes secondaires sont les suivants.

- les ganglions lymphatiques : les réponses B et T se développent dans des zones distinctes : follicules lymphoïdes pour les cellules B (dans le cortex périphérique) ; zone paracorticale pour les cellules T (dans le cortex profond). Le degré de développement des ganglions est très variable selon les stimulations antigéniques qui s'exercent dans la région du corps qu'ils drainent.

- la rate : elle capte les antigènes véhiculés par le sang, ce qui permet à la fois leur phagocytose par des macrophages et l'induction de réponses immunitaires au sein des cellules lymphoïdes (à la fois T et B) spléniques

3- Les chémokines et les migrations lymphocytaires

a- Le recrutement tissulaire des leucocytes à partir du sang

Le recrutement cellulaire à partir du sang débute par le passage des leucocytes à travers une barrière de cellules endothéliales. Cette migration trans-endothéliale se déroule en quatre étapes successives ; i) le roulement : grâce à des molécules de la famille des sélectines (présentes à la surface des leucocytes) et à leurs ligands (présents à la surface des cellules endothéliales), les leucocytes et les cellules endothéliales interagissent faiblement et de manière réversible. Ainsi, le leucocyte ne "flotte" pas dans le torrent circulatoire, mais il roule sur l'endothélium, poussé par le flux sanguin. ii) l'activation dépendante des chémokines : le leucocyte qui roule entre en contact avec les chémokines produites par les cellules endothéliales activées. iii) l'arrêt ferme: il dépend de l'interaction entre les intégrines leucocytaires activées et leur ligand endothélial. iv) la diapédèse : le leucocyte passe à travers l'endothélium.

b- La migration intra-tissulaire du leucocyte

Une fois parvenu dans l'espace sous-endothélial, le leucocyte poursuit sa migration à travers le tissu. Cette migration est guidée par l'existence d'un gradient de chémokines interstitiel. A partir d'un site de production, qui correspond en général à une cellule immunitaire activée, les chémokines diffusent dans le tissu interstitiel. Mais cette diffusion est vite limitée par la fixation des chémokines sur la matrice extracellulaire. La concentration de chémokines fixées à cette matrice est d'autant plus élevée que l'on se trouve à proximité du site de production. Le leucocyte est capable de reconnaître ce gradient, et de migrer par étapes successives jusqu'au site de production de la chémokine. Ceci définit le chimiotactisme.

c- Les chémokines

Les chémokines sont des cytokines chimiotactiques surtout pour les neutrophiles, les macrophages et parfois les éosinophiles, les lymphocytes ou les NK, qu'elles ont en plus la faculté d'activer. Elles sont réparties en sous-familles d'après leur structure et leurs

homologies génétiques : les CXC-chémokines, les CC-chémokines, les C-chémokines et les CX3C-chémokines.

Les CXC chémokines comme l'IL-8 augmentent la perméabilité vasculaire et favorisent la sortie des leucocytes activés (Sedgwick et coll., 2002).

Les CC-chémokines comme le MCP-1 (monocyte chemoattractant protein ou CCL-2), ont une activité chimiotactique pour les monocytes, mais pas pour les neutrophiles. MCP-1 est chimiotactique pour les cellules NK et les lymphocytes T, et provoque la dégranulation des basophiles. Le MIP-1 α (macrophage inflammatory protein a ou CCL-3) est produite, comme leur nom l'indique, par une lignée monocyttaire activée par le LPS. MIP-1 α attire et active les monocytes avec une efficacité supérieure à celle de MIP-1 β , mais plus faible que celle de MCP-1. MIP-1 α attire surtout les lymphocytes T CD8⁺. Les autres cibles de MIP-1 α , sont les cellules dendritiques, les cellules NK, les éosinophiles et plus faiblement les basophiles. RANTES quant à lui (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted ou CCL-5) attire les lymphocytes T mémoires, les cellules NK, les cellules dendritiques, les éosinophiles, et les basophiles (comme MCP-1, il dégranule ces derniers).

Les chémokines recrutent dans le torrent circulatoire et les tissus, les cellules participant au phénomène inflammatoire. Certaines chémokines, comme MCP-1, accroissent la synthèse et l'expression d'intégrines par les cellules endothéliales et donc la fixation des leucocytes circulant sur l'endothélium vasculaire (Wattanabe et coll., 2003).

Les membres de la sous-famille C-chémokine, lymphotactine (XCL1) et SCM-1 β (single cysteine motif 1 β ou XCL2) sont chimiotactiques pour les lymphocytes.

Les CX3C-chémokines, représentées par la fractalkine (ou neurotactine ou CX3C-L1), qui se trouve à la surface des cellules endothéliales et de certaines cellules du cerveau. Le domaine extracellulaire peut être protéolysé libérant une chémokine soluble chimiotactique pour les monocytes, les lymphocytes T et les neutrophiles.

Le type d'infiltrat dans une maladie inflammatoire est le reflet des chémokines produites par le tissu cible. La plupart des chémokines ne sont pas produites de façon constitutive mais en réponse à des facteurs pro-inflammatoires. Ainsi, les IL-1 α et β , le TNF- α ou les IFN- α et γ sont responsables de l'induction de la plupart des chémokines. Le MCP-1 est

synthétisé par la plupart des cellules sous l'action de l'IL-1 β , et du TNF- α et le LPS des bactéries active la production des CC-chémokines. Les cytokines agissent en plus en modulant l'expression des récepteurs des chémokines. Les chémokines contrôlent la circulation et les mouvements des T, B et cellules dendritiques permettant à ces cellules de se retrouver dans un même lieu avec l'antigène (Alter et coll., 2003 ; Lim et coll., 2004).

Au cours de le THA, expérimentalement il a été mis en évidence la production de chémokines (Liu et coll., 1999). Les résultats ont montré que MIP-2, RANTES et MIP-1 α sont produits de façon précoce par des astrocytes et la microglie et plus tard par les macrophages et les cellules T (Sharafeldin et coll., 2000). Ces résultats suggèrent que les chemokines pourraient contribuer à l'immunopathologie, c'est ce que nous avons cherché à montrer dans notre étude chez l'homme.

d- Les récepteurs de chémokines

Les récepteurs des chémokines appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines trans-membranaires couplés aux protéines G. Ces récepteurs de chémokines sont nommés en fonction de la famille de chémokines qu'ils reconnaissent. Il existe ainsi 10 récepteurs aux CC chémokines (CCR1 à CCR10), 6 récepteurs aux CXC chémokines (CXCR1 à CXCR6), un récepteur (XCR1) pour la lymphotactine et un récepteur (CX3CR1) pour la fractalkine.

L'expression des récepteurs de chémokines varie d'un leucocyte à l'autre. Par exemple, les récepteurs CXCR1 et CXCR2 fixent les CXC chémokines ELR+. C'est parce que les polymorphonucléaires neutrophiles (et eux seuls) expriment CXCR1 et CXCR2 que les CXC chémokines ELR+ recrutent électivement ces cellules.

La régulation de l'expression des récepteurs de chémokines permet également à une cellule de modifier ses propriétés migratoires en fonction de son niveau de maturation ou d'activation. Un lymphocyte T naïf devient effecteur après avoir rencontré son peptide antigénique présenté par une cellule dendritique. Le changement d'expression de ses récepteurs de chémokines lui permet de ne plus recirculer entre les organes lymphoïdes secondaires, mais de se diriger vers tel ou tel tissu périphérique, chaque tissu produisant des chémokines différentes de l'autre. C'est pourquoi, par exemple, certains leucocytes vont migrer uniquement vers la peau (parce qu'ils expriment un certain type de récepteurs), tandis que d'autres vont migrer uniquement vers le tube digestif. C'est aussi parce qu'elle change

l'expression de ses récepteurs de chémokines qu'une cellule dendritique activée par l'inflammation locale se "décroche" de la peau ou d'une muqueuse pour migrer vers un ganglion.

4- Les réponses immunitaires

a- La réponse et sa régulation

La réponse immunitaire se déroule en trois étapes.

1- Les lymphocytes qui possèdent un récepteur clonotypique spécifique de l'antigène interagissent avec celui-ci. Cette interaction conduit à un signal d'activation pour les lymphocytes concernés.

2- Les lymphocytes activés prolifèrent (ce qui permet d'augmenter le nombre de lymphocytes participant à la réaction de défense) et se différencient en lymphocytes effecteurs.

3- Les lymphocytes effecteurs sont capables d'éliminer l'antigène, directement ou indirectement.

Le développement de la réponse immunitaire nécessite que les lymphocytes concernés reçoivent une série de signaux coordonnés dans le temps. Le signal antigénique, évoqué ci-dessus, est nécessaire à la réponse : il est délivré à ceux des lymphocytes qui possèdent un récepteur clonotypique reconnaissant l'antigène, et à eux seuls, ce qui assure la spécificité de la réponse. Néanmoins, de nombreux autres signaux, sont indispensables pour que la réponse immunitaire se développe normalement. Ils résultent des multiples interactions cellulaires qui jalonnent chacune des étapes de la vie du lymphocyte.

L'intensité et la durée de la réponse immunitaire sont régulées, pour être les mieux adaptées possibles à l'importance et à la persistance ou non de l'agression. Cette régulation repose en partie sur un équilibre entre prolifération et apoptose des lymphocytes spécifiques de l'antigène. La régulation de la réponse immunitaire repose également sur des phénomènes de coopération cellulaire, qui ont des effets positifs (indispensables à la réponse) mais

également négatifs (rétro-régulation négative).

Deux grands types de réponses immunitaires, conduisant respectivement à l'immunité humorale et à l'immunité à médiation cellulaire, sont déclenchés simultanément lors de l'introduction d'un antigène dans l'organisme. Ces deux réponses jouent des rôles complémentaires : schématiquement, l'immunité humorale permet d'éliminer les antigènes extra-cellulaires, et l'immunité à médiation cellulaire permet d'éliminer les antigènes intra-cellulaires.

La première étape, commune à ces deux réponses, est la réponse des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. En effet, les lymphocytes T CD4⁺ sont les acteurs principaux des coopérations cellulaires, indispensables au développement de l'ensemble des réponses immunitaires. Il s'agit des lymphocytes T auxiliaires ou helpers.

b- Réponse des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires naïfs

Cette réponse se développe dans les organes lymphoïdes secondaires. Il est indispensable qu'un antigène introduit dans un site quelconque de l'organisme y soit acheminé par les cellules dendritiques.

Lorsqu'un antigène est introduit dans l'organisme, il est internalisé par les cellules dendritiques qui passent d'un état immature à un état mature. Cette transformation a un double effet : (i) les cellules dendritiques acquièrent une pleine capacité à présenter l'antigène ; (ii) elles quittent le site d'introduction de l'antigène pour gagner le ganglion de drainage. Une fois parvenues dans celui-ci, les cellules dendritiques matures se localisent dans la zone para-corticale (zone "T" du ganglion), où elles prennent la dénomination de cellules inter-digitées.

Dans la zone para-corticale du ganglion lymphatique, les cellules dendritiques présentent l'antigène aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs, par l'intermédiaire des molécules de classe II du CMH. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs se différencient en lymphocytes T CD4⁺ activés et en lymphocytes T CD4⁺ mémoires.

Les lymphocytes T CD4⁺ vont exercer leur fonction T auxiliaire ("T helper"), en fournissant les signaux de coopération cellulaire (par contact direct et par l'intermédiaire de

cytokines) aux autres acteurs des réponses immunitaires comme les lymphokines.

Les lymphokines sont les cytokines produites par les lymphocytes. En fonction de leur profil de production de lymphokines, on divise les lymphocytes T auxiliaires en trois populations, les Th1, les Th2 et les Th3. Les cytokines produites par les lymphocytes Th1 sont l'IL-2, l'IFN- γ , le TNF- α . Les cytokines produites par les lymphocytes Th2 sont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13. Certaines cytokines peuvent être produites à la fois par les Th1 et les Th2 : l'IL-3, le GM-CSF, le TNF- α ; les Th3 sont des cellules T régulatrices.

Par leur production d'IL-2 et d'IFN- γ les lymphocytes Th1 jouent un rôle central dans l'immunité à médiation cellulaire, que ce soit pour les réactions de type hypersensibilité retardée (action de l'IFN- γ sur les macrophages) ou de type cytotoxique (action de l'IL-2 sur les lymphocytes cytotoxiques et les cellules NK). De plus, les cytokines de la réponse Th1 oriente vers la production d'anticorps d'isotype IgG2a.

Par leur production d'IL-4 (qui stimule la production d'IgE) et d'IL-5 (qui active les éosinophiles), les lymphocytes Th2 jouent un rôle important dans les réponses de type allergique. Ils stimulent également les lymphocytes B par leur production d'IL-4, d'IL-6, d'IL-10.

Chaque sous-population possède la capacité de s'auto-amplifier : l'IL-2, produite par les Th1, stimule la prolifération des Th1 ; l'IL-4 produite par les Th2, stimule la prolifération des Th2. IL existe à l'inverse une inhibition réciproque des deux sous-populations : l'IFN- γ inhibe la génération des Th2, tandis que l'IL-4 et l'IL-10 inhibent la génération des Th1.

Des cellules autres que les lymphocytes T, immunitaires ou non (cellules endothéliales, gliales, fibroblastes, kératinocytes...) peuvent produire les cytokines précédentes. Elles peuvent également produire des cytokines affectant l'équilibre entre les lymphocytes Th1 et Th2. C'est le cas de l'IL-12, produite par les macrophages et les cellules dendritiques, qui stimule puissamment la génération des Th1. A l'inverse, les basophiles et les mastocytes produisent de l'IL-4, qui stimule les Th2.

La fonction réelle des cellules Th3 est encore mal connue, localisées au niveau des muqueuses intestinales ; elles sécrètent majoritairement du TGF- β qui stimule la production d'IgA et a une action fortement immunosuppressive. De ce fait, elles contribuent à réguler les

réponses immunes, principalement cellulaires. De plus la régulation des réponses immunes est également le fait de cellules T régulatrices, plus récemment identifiées. Il a été démontré ces dernières années que des populations de lymphocytes T encore mal individualisées, le plus souvent CD4, soit naturellement produites par le thymus (T régulateurs naturels CD4+CD25+) soit se différenciant à partir de lymphocytes T CD4 naïfs périphériques (Tr1, Th3) étaient capables de contrôler négativement les réponses immunes à l'égard d'antigènes du soi ou d'antigènes extérieurs variés, le plus souvent via une sécrétion de cytokines immunosuppressives, IL-10 et/ou TGF β .

Le TGF- β joue un rôle en tant que modulateur des cytokines de type Th1 (Barral-Netto et coll., 1992 ; Letterio et Roberts, 1997 ; Strober et coll., 1997). Ainsi, la production cytokinique des Th3 jouent un rôle important dans l'équilibre des cytokines Th1 et Th2 pour bloquer les réactions inflammatoires.

c- Immunité humorale

L'immunité humorale repose sur la production d'anticorps qui diffusent dans le sang, et éventuellement dans les fluides extra-cellulaires. Les anticorps se lient spécifiquement à l'antigène qu'ils reconnaissent. La fixation des anticorps sur l'antigène déclenche une série de mécanismes qui entraînent l'élimination de celui-ci.

La lignée B est le support de l'immunité humorale : ce sont les lymphocytes de la lignée B qui sont à l'origine de la production des anticorps, après s'être transformés en plasmocytes, cellules productrices d'anticorps. En première approximation, cette transformation consiste à modifier leur récepteur clonotypique (une immunoglobuline de membrane) pour en faire une molécule soluble, exportable à l'extérieur de la cellule (un anticorps de même spécificité que l'immunoglobuline de membrane).

Les mécanismes qui permettent aux lymphocytes B de produire des anticorps adaptés à la stimulation antigénique se déroulent de la façon suivante.

Les lymphocytes B entrent en contact avec l'antigène dans le cortex périphérique du ganglion. Ils reçoivent un signal d'activation, et internalisent l'antigène, ce qui leur permet de présenter des peptides issus de celui-ci en association avec des molécules de classe II du

CMH.

En parallèle, des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du même antigène sont activés par les cellules dendritiques dans la zone para-corticale. Une fois différenciés en lymphocytes T CD4⁺, ils quittent celle-ci, pour rejoindre les lymphocytes B. Les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires reconnaissent les peptides de l'antigène à la surface des lymphocytes B, se fixent sur ceux-ci, et leur délivrent les signaux de coopération cellulaire.

La coopération cellulaire permet la prolifération des lymphocytes B, ce qui se traduit par le développement des follicules lymphoïdes. Au sein des follicules, les lymphocytes B peuvent également modifier la classe de leur récepteur clonotypique (commutations isotypiques qui ne survient que dans un contexte de coopération T-B. Ils se différencient ensuite en plasmocytes, producteurs d'IgM (en absence de commutation) ou d'IgG, IgA ou IgE (en cas de commutation).

Une fois différenciés, les plasmocytes quittent le ganglion pour gagner des sites de production extra-ganglionnaires des anticorps, notamment la moelle osseuse. Les plasmocytes médullaires sont la source des IgG et d'une partie des IgA présentes dans le sérum normal. Leur transformation maligne correspond au myélome.

Au cours de la réponse anticorps secondaire, ces phénomènes sont complétés par la maturation d'affinité des anticorps, qui concerne essentiellement les IgG. Le centre du follicule lymphoïde se différencie en centre germinatif, au sein duquel a lieu une intense prolifération associée à une mort massive des lymphocytes B. Ce processus est sous-tendu par les mutations somatiques qui prennent place dans les régions hypervariables des gènes d'immunoglobulines. Les mutations somatiques modifient radicalement le site de liaison des récepteurs clonotypiques des lymphocytes B. Les lymphocytes B dont les récepteurs remaniés reconnaissent l'antigène avec une forte affinité sont sélectionnés positivement. Les lymphocytes B dont les récepteurs remaniés ont une faible affinité, ou ne reconnaissent plus l'antigène, sont contre-sélectionnés et meurent par apoptose. A l'issue de la réponse, les plasmocytes produits à partir des lymphocytes B sélectionnés produiront des IgG de forte affinité pour l'antigène.

Le phénomène de maturation d'affinité est particulier à la réponse humorale : les lymphocytes T, dont le TCR est incapable de réaliser des mutations somatiques, ne modifient

pas leur affinité pour l'antigène. Ainsi, la réponse immunitaire humorale présente la particularité de pouvoir améliorer le répertoire aléatoire des lymphocytes B naïfs (tel qu'il est généré dans les organes lymphoïdes centraux) en l'adaptant à l'antigène. Ce phénomène se produit dans le compartiment lymphoïde secondaire (centre germinatif) puisqu'il nécessite une sélection par l'antigène.

L'élimination des antigènes n'est pas réalisée directement par les anticorps. Ceux-ci ciblent sur l'antigène des mécanismes non spécifiques d'élimination. La classe d'immunoglobulines produites conditionne les mécanismes d'élimination. Schématiquement :

- pour les IgM : le mécanisme d'élimination est la lyse par le système du complément ;
- pour les IgG : les mécanismes d'élimination sont la lyse par le système du complément, et surtout l'opsonisation (à laquelle participe le composant C3 activé du complément) qui permet de cibler sur l'antigène la phagocytose par les granulocytes neutrophiles ;
- pour les IgE : le mécanisme d'élimination est l'activation des mastocytes/basophiles et des éosinophiles, qui libèrent des médiateurs toxiques dans le micro-environnement de l'antigène.

d- Immunité à médiation cellulaire

L'immunité à médiation cellulaire est activée par les lymphocytes T de type Th1.

Il existe deux grands types d'immunité à médiation cellulaire.

- l'immunité à médiation cellulaire basée sur le recrutement et l'activation localisée de cellules inflammatoires. Il s'agit de réponse de type hypersensibilité retardée, activatrice de macrophages qui contribuent à éliminer l'antigène et aboutissent à la formation de granulome (observé lors d'infection chronique par des agents infectieux intracellulaires ou lors de lésions tissulaires de certaines maladies auto-immunes dues à des effecteurs cellulaires) ;

- l'immunité à médiation cellulaire de type cytotoxique dont les effecteurs sont des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, qui induisent l'élimination de la cellule cible, par un

mécanisme de cytotoxicité cellulaire.

L'activation des macrophages constitue un mécanisme essentiel de défense. Les macrophages sont activés directement par certains agents pathogènes lorsqu'ils les phagocytent, ou par l'activation de récepteurs membranaires à des composants d'agents infectieux (récepteurs au LPS, récepteur de type Toll like (TLR). Néanmoins, cette activation est beaucoup plus efficace lorsqu'elle est amplifiée par les lymphocytes T CD4⁺ de type Th1. Le mécanisme de cette amplification est le suivant.

L'immunité à médiation cellulaire fait intervenir deux autres mécanismes de cytotoxicité, l'un non spécifique (la cytotoxicité NK), l'autre rendu spécifique par des anticorps (cytotoxicité dépendante des anticorps).

La cytotoxicité NK est effectuée par les lymphocytes non-T/non-B à activité NK. Les cellules NK exercent une cytotoxicité cellulaire non spécifique d'antigène, activée en permanence mais non exprimée. En effet, les cellules normales de l'organisme ont la capacité d'inhiber la cytotoxicité NK, ce qui les protège de la destruction. Certaines cellules anormales (tumoraux, infectées par des virus) perdent cette capacité à inhiber les cellules NK, qui peuvent alors les éliminer quasi-immédiatement. La cytotoxicité NK représente une première ligne de défense vis-à-vis des virus, ainsi qu'un moyen d'amplifier la réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺.

Les anticorps de classe IgG se fixent à la fois sur une cellule antigénique (par leurs fragments Fab) et sur une cellule cytotoxique (par leur fragment Fc, pour lequel celle-ci possède un récepteur, la molécule CD16). Les cellules cytotoxiques capables d'exercer l'ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) sont les macrophages et les lymphocytes NK. L'ADCC permet de conférer une spécificité à des cellules cytotoxiques non spécifiques.

e- Orientation et rôles respectifs des réponses immunitaires

Les différents types de réponses immunitaires sont préférentiellement adaptés à certaines catégories d'agresseurs.

L'immunité humorale est surtout efficace vis-à-vis des antigènes extra-cellulaires, avec

les spécialisations selon les classes d'immunoglobulines.

L'immunité à médiation cellulaire est surtout efficace vis-à-vis des antigènes intracellulaires, avec les spécialisations suivantes selon la sous-population CD4⁺ ou CD8⁺ des lymphocytes T effecteurs.

Les lymphocytes T CD4⁺ Th1 sont indispensables à l'élimination des bactéries et des parasites à développement intra-cellulaire. Ces agents pathogènes, une fois internalisés par les macrophages, s'y développent, sans que ceux-ci soient capables de les éliminer s'ils ne reçoivent pas d'aide des lymphocytes T. L'activation des macrophages par les lymphocytes T CD4⁺ accroît leur capacité de digestion des micro-organismes à développement intracellulaire. Elle déclenche également une importante production de cytokines dans le micro-environnement. Ces cytokines potentialisent les mécanismes de défense.

A côté de ce rôle essentiel dans la défense anti-infectieuse, les macrophages activés par les lymphocytes T CD4⁺ Th1 sont responsables d'une importante inflammation locale, qui joue un rôle dans de nombreux phénomènes de défense ou immunopathologiques (hypersensibilité retardée, immunité anti-tumorale, rejet aigu de greffes...).

Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques jouent un rôle essentiel dans la destruction des cellules infectées par un virus (méthode la plus efficace pour éliminer le virus) et dans celle des cellules tumorales et des cellules de greffe incompatible. Dans toutes ces circonstances, les cellules cibles de la réponse T CD8⁺ synthétisent des protéines antigéniques.

Au cours d'une réponse immunitaire, même si l'ensemble des moyens de défense est mis en jeu, l'organisme doit faire prédominer la réponse la mieux adaptée, en fonction du type d'antigène à éliminer et de sa localisation.

Cette orientation préférentielle est dictée par la gamme de cytokines produites par les lymphocytes T CD4⁺ Th1. Lorsque les lymphocytes T CD4⁺ (naïfs ou mémoires) répondent à l'antigène, ils "choisissent" de produire des cytokines qui vont faire prédominer l'immunité humorale ou l'immunité à médiation cellulaire. De la même manière, lors d'une réponse anticorps, ce sont des cytokines produites par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires qui orientent la commutation isotypique vers la production d'immunoglobulines de classe IgG, IgA ou IgE.

L'orientation des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires dépend de la nature des cytokines produites par les cellules environnantes (cellules dendritiques, (macrophages, lymphocytes NK, éosinophiles...). L'orientation vers un type Th1 est dépendante de la présence d'IL-12 et d'IL-18 alors que l'orientation vers un type Th2 dépend de la présence d'IL-4.

5- Les réponses immunitaires innées induites lors d'une infection

Les réponses immunitaires innées induites lors d'une infection dépendent essentiellement des cytokines et chémokines produites par les phagocytes ou par les cellules infectées. Elles impliquent aussi l'activation d'un type particulier de cellules lymphoïdes les cellules NK.

a- Les macrophages activés sécrètent de nombreuses cytokines ayant des effets à courte et longue distance

Après détection d'un pathogène, les macrophages sont activés et sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires ; en particulier l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 et le TNF- α sont re-larguées en grande quantité. Ces cytokines ont de multiples effets.

Lorsqu'elles sont infectées par des virus, les cellules produisent des molécules connues sous le nom d'interférons (IFN- α , IFN- β) qui ont pour effet d'induire un état de résistance à la réplication virale dans les cellules adjacentes aux cellules infectées. De plus, les interférons stimulent l'expression des molécules de CMH de classe I permettant ainsi aux cellules infectées de présenter à leur surface un plus grand nombre de complexes CMH-Antigènes viraux qui ont pour effet de stimuler plus efficacement les lymphocytes T spécifiques. A l'inverse, la stratégie de défense commune à de nombreux virus est de diminuer l'expression des molécules de CMH-I. Enfin ces cytokines permettent l'activation des cellules NK menant à la destruction des cellules infectées et au re-largage de nombreuses cytokines.

b- Les cellules "Natural Killer" (NK) défendent l'organisme contre certaines

infections intracellulaires.

Les cellules NK sont des cellules circulantes qui se développent dans la moelle osseuse à partir des cellules souches de la lignée lymphoïde. Le mécanisme d'action des cellules NK est similaire à celui des cellules T cytotoxiques. Des granules contenant des nombreuses molécules cytotoxiques (granzyme, perforines...) sont re-larguées à la surface des cellules infectées et induisent la mort de la cellule cible par apoptose.

Bien que d'origine lymphoïde, les cellules NK ne possèdent pas de récepteurs spécifiques de l'antigène et appartiennent donc à l'arsenal du système immunitaire inné. Ces cellules ont la capacité de distinguer les cellules infectées des cellules saines. Elles possèdent deux types de récepteur, activateurs ou répresseurs. Les récepteurs de type activateur (KAR, Killer Activating Receptors) reconnaissent la présence de glycoprotéines d'origine bactérienne ou virale à la surface des cellules. A l'inverse, les récepteurs de type inhibiteur (KIR : Killer Inhibiting Receptors) bloquent la lyse des cellules saines en fixant les molécules de CMH-I présentes à leur surface. La conséquence est que les cellules NK ne s'attaquent qu'aux cellules exprimant faiblement les molécules de CMH-I, suite à une infection, ou parce qu'elles sont tumorales. Les interférons (α et β) en stimulant la synthèse de CMH-I dans les cellules voisines, ont pour effet de les protéger de l'action des NK.

Les cellules NK sont activées précocement par les IFN- α et IFN- β mais aussi par les cytokines sécrétés par les macrophages comme l'IL-12 ou le TNF- α . Les NK activées ont pour effet de ralentir la propagation de l'infection des pathogènes intracellulaires qui seront ensuite complètement éliminés par cellules T cytotoxiques. Enfin, les cellules NK activées synthétisent de grandes quantités d'IFN- γ qui active les cellules T CD4⁺ de type Th1.

c- Certaines sous-populations lymphocytaires font le lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise

Il existe plusieurs sous-groupes de populations lymphocytaires qui expriment des récepteurs d'une diversité très limitée car codés par des réarrangements communs de segments géniques. Ces lymphocytes ne présentent pas d'expansion clonale avant de répondre efficacement contre l'antigène qu'ils reconnaissent. Ils présentent des caractères

intermédiaires propres à la fois à l'immunité innée et à l'immunité adaptative.

Les cellules T γ/δ représentent une sous-population intra-épithéliale des cellules T exprimant un récepteur T distinct des récepteurs T α/β classiques. Elles reconnaissent généralement leurs antigènes (antigènes du pathogène, et parfois des molécules du soi tels que des protéines issues des cellules lysées...) sans avoir besoin que l'antigène soit présenté par des molécules du CMH. Elles auraient donc un rôle de signalisation du danger (présence d'un pathogène ou de lésions des tissus) lors des étapes précoces de l'infection ou de régulateur des réponses immunitaires épithéliales lors de l'établissement des réponses adaptatives.

Les cellules B CD5 (ou B1) sont analogues aux cellules T γ/δ . En effet, elles utilisent un ensemble restreint et spécifique de segments géniques réarrangés pour générer leurs récepteurs membranaires. Elles sont présentes de façon prédominante dans la cavité péritonéale. Ces cellules produisent spontanément (en absence de cellules T CD4⁺) des anticorps spécifiques de nombreux polysaccharides microbiens. Elles participeraient aux réponses précoces lors d'infection des cavités de l'organisme.

(Source : cours d'immunologie de la Faculté de Médecine Paris-Sud, <http://www.kb.u-psud.fr/kb/niveau2/enseignements/niveau3/etudmed/cours-immunologie/cours/cours1.htm>)

III- Immunopathologie de la maladie du sommeil

1- Immunologie de la THA

a- Inoculation du trypanosome

La réponse locale au niveau de la piqûre de l'insecte correspond au premier niveau de protection de l'hôte. Cette réaction apparaît quelques jours après l'inoculation. Au niveau des vaisseaux lymphatiques les trypanosomes sont détectés dans la lymphe 1 à 2 jours avant l'apparition du chancre. Par la suite leur nombre décline pendant l'apparition du chancre. Ensuite ils sont détectés dans le sang 5 jours après l'infection. Tout d'abord on observe une prédominance de neutrophiles dans les premiers jours de l'infection, puis les lymphocytes T et B envahissent le chancre d'inoculation (Mwangi et coll., 1990). Les lymphocytes T CD8⁺ deviennent prédominants (Mwangi et coll., 1996). Au cours de ce stade, les trypanosomes expriment les antigènes variables de surface que l'on retrouve généralement quand ces derniers parasitent la mouche. Une réponse anticorps dirigée contre ces Variables Antigènes Types (VAT) se développe dans la lymphe et dans le plasma au cours de ce stade mais sans succès (Barry et Emery, 1984).

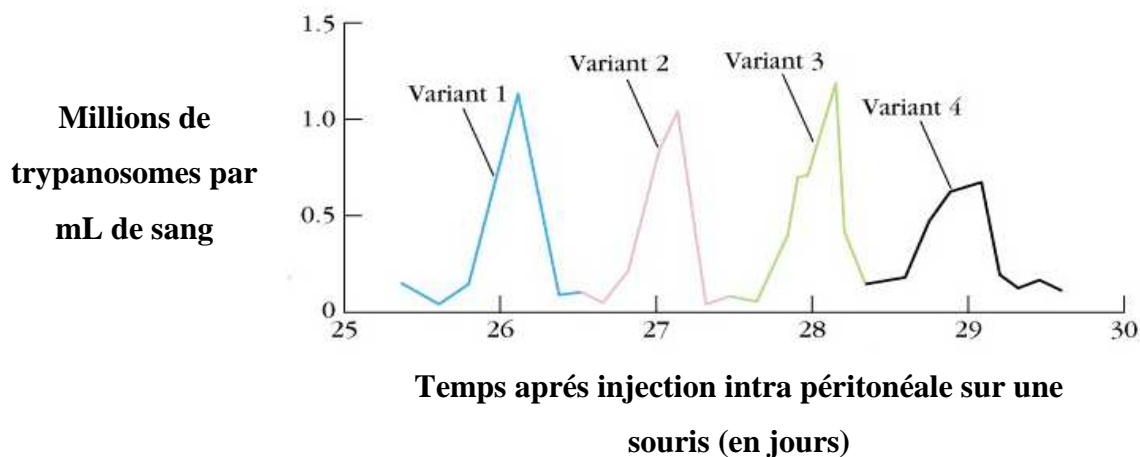


Figure 12 : Variation antigénique du trypanosome chez la souris

(Site internet : <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/vsg.htm>)

b- Le complément

Le complément est un élément important de l'immunité naturelle et spécifique. Il est constitué par un ensemble de protéines plasmatiques possédant des activités enzymatiques. Ces protéines sont mises en jeu de différentes façons, dans les réactions inflammatoires puis, plus tardivement, par l'intermédiaire des anticorps. Les différentes fractions du complément agissent en s'activant de façon séquentielle. Les dernières fractions activées du complément peuvent provoquer la lyse des cellules sur lesquelles elles se sont fixées. Le complément peut donc se fixer en l'absence d'anticorps sur les micro-organismes. Sur les trypanosomes, il ne peut se fixer qu'en l'absence de Variant Surface Glycoprotéin (VSG) à la surface du trypanosome. Cependant, la fixation des derniers éléments du complément sans lyse des trypanosomes a été décrite (Cardoso de Almeida et Turner, 1983).

Récemment, la présence de gènes ressemblant à ceux codant pour la glycoprotéine de membrane gp63 des leishmanies a été identifiée au niveau des trypanosomes. Chez les leishmanies, la présence de la gp63 a été corrélée à la résistance au complément (Bangs et coll., 2001 ; LaCount et coll., 2003).

L'activation, même incomplète, du complément entraîne l'apparition des dérivés solubles du complément, dont le C3a, le C5a (anaphylatoxines) et le complexe C5b67. Ces dérivés induisent d'une part le chimiotactisme des neutrophiles et des monocytes-macrophages et d'autre part l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

c- Evolution de la réaction immunologique

Au cours de l'infection, l'organisme développe une réaction inflammatoire contre le parasite. Le trypanosome échappe aux défenses immunitaires de l'hôte en faisant varier son manteau antigénique. En effet, la particularité du trypanosome est la présence à sa surface des VSG le protégeant contre les mécanismes de défense immunitaire non spécifiques et spécifiques (Sternberg, 1998). Le parasite change périodiquement le type de VSG qu'il exprime à sa surface, rendant la réponse anticorps inefficace. Ainsi, une modification de quelques acides aminés dans la séquence primaire de la VSG entraîne une VSG immunologiquement différente (Turner et Donelson, 1990 ; Donelson et coll., 1998). Il a été mis en évidence par Overath et coll. (1994) la présence de protéines invariables de surface,

récepteurs aux métabolites et à la transferrine, (Borst et Fairlamb, 1998) qui sont situées dans la poche flagellaire, mais sont masquées par les VSG, ce qui les rend inaccessibles aux anticorps.

Au cours de l'infection, le trypanosome sécrète le Trypanosome Lymphocyte Triggering Factor (TLTF), activateur des lymphocytes T-CD8⁺ (Olsson et coll., 1991). L'interféron- γ (IFN- γ) produit au cours de l'infection participe à l'activation de la production de monoxyde d'azote (NO) par les monocytes et active également la prolifération du parasite. Le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) est également synthétisé par les monocytes-macrophages (Paulnock, 2001), il est toxique pour les trypanosomes, et participerait aussi à la modification de la barrière hémato-encéphalique, permettant le passage des trypanosomes dans le SNC (Daulouède et coll., 1994 ; Daulouède et coll., 2001).

d- L'auto-immunité

Les relations entre parasites et hôtes peuvent être compliquées par l'existence d'auto-anticorps et de cellules T autoréactives. Leur origine est inconnue, de même que leur rôle dans les altérations tissulaires. Le parasite peut porter des antigènes qui induisent l'expression d'auto-anticorps par réaction croisée, ce mimétisme moléculaire pouvant être mis en évidence dans plusieurs situations. De plus, le parasite, en détruisant des tissus, peut entraîner le relargage d'antigènes du soi, cryptiques ou présents en très faible quantité. Ces auto-antigènes peuvent alors stimuler les cellules B et T auto-réactives. Il a également été montré une absorption de molécules d'origine parasitaire sur les molécules du soi, entraînant leur modification et la reconnaissance par le système immunitaire (Askonas et Bancroft, 1984 ; Greenwood et Whittle, 1980).

L'ensemble de ces événements peut donc participer à l'induction d'une réponse auto-immune, dont les éléments peuvent concourir aux mécanismes d'altération et de destruction tissulaire.

Il a été observé que plusieurs aspects de la physiopathologie de la THA ressemblent aux lésions observées dans la réaction d'hypersensibilité de type III (ou phénomène d'Arthus). Par exemple des taux élevés d'immunoglobulines et une grande quantité de

complexes immuns sont mesurés dans le sang et le LCR des hommes et des animaux trypanosomés. De plus, des taux élevés de kinines, des modifications de l'activité prothrombinique, du fibrinogène et du complément sont mesurés dans le sang des hommes et des animaux trypanosomés. Ces modifications ressemblent également à ce qui est observé lors du syndrome de coagulation intravasculaire disséminée, souvent présent chez les sujets ayant une trypanosomose provoquée par *T. b. rhodesiense*. Toutes ces modifications, ainsi que celles portant sur les taux de cytokines, suggèrent des mécanismes immunopathologiques responsables des lésions. Les mécanismes induisant ces troubles sont peu connus. Le rôle de toxines d'origine parasitaire n'a pas encore été établi, et il est probable qu'une grande partie des lésions tissulaires sont le résultat d'une réaction immunopathologique. Une réaction d'hypersensibilité de type immédiat peut expliquer le prurit et l'urticaire parfois constatés chez certains patients. Le développement de la macroglobulinémie et d'une réponse B polyclonale est également constaté. Des anticorps dirigés contre le parasite et les auto-anticorps sont présents dans le sérum des patients et contribuent à l'hypergammaglobulinémie à IgM (Greenwood et Whittle, 1973 ; Kirrstetter, 2004).

De très nombreux auto-anticorps ont été mis en évidence chez l'homme et l'animal infectés. Des anticorps contre les hématies, les muscles lisses, le muscle cardiaque, le foie, les cardiolipides, la thyroglobuline, l'ADN et l'ARN, les filaments intermédiaires, ainsi que les facteurs rhumatoïdes ont été détectés pendant la THA (Kobayakawa et coll., 1979). Des auto-anticorps dirigés contre les constituants du SNC ont également été notés. Des auto-anticorps contre les glycosphingolipides de la myéline, des galactocérebrosides, ont été mis en évidence dans le sérum de patients trypanosomés de Côte d'Ivoire et d'animaux infectés expérimentalement (Jauberteau et coll. 1991, Amevigbé et coll. 1992, Girard et coll., 2000 ; Bisser et coll., 2000). Au cours de l'évolution de la maladie, on observe une augmentation de la production d'immunoglobulines, IgM et IgG (taux 8-16 fois supérieures à la normale), dont certains sont des autoanticorps dirigés contre les neurofilaments (protéines spécifiques des filaments intermédiaires du neurone, qui s'étendent tout au long de l'axone et forment le composant principal du cytosquelette constitué de 3 sous-unités 68 kDa, 160 kDa et de 200 kDa). Il apparaît que l'augmentation du taux de ces anticorps dans le LCR est associée à l'atteinte nerveuse (Amevigbe, 1992 ; Amevigbe et coll., 1992 ; Jauberteau et coll., 1994 ; Ayed et coll., 1997 ; Ayed, 1999 ; Girard, 2000 ; Girard et coll., 2000 ; Bisser et coll., 2000 ; Bisser, 2001).

D'autres anticorps dirigés contre des protéines non caractérisées, contre la protéine basique de la myéline, contre des gangliosides ont été également détectés. De même des anticorps dirigés contre un épitope L-tryptophane, un précurseur de la sérotonine qui fait partie des neurotransmetteurs (Okomo-Assoumou et coll., 1995). Le taux de ces derniers anticorps est spécialement augmenté quand le malade présente des troubles neurologiques.

La détection d'auto-anticorps dans le sérum et le LCR peut ainsi contribuer à une meilleure définition de l'atteinte neurologique de la THA.

Le répertoire physiologique des anticorps contient les auto-anticorps naturels. Ils sont habituellement polyréactifs, de titre et d'affinité faible, et reconnaissent des épitopes qui ont été conservés durant l'évolution, tels que les composants du cytosquelette et des acides nucléiques. Ces auto-anticorps sont considérés comme non pathogènes. Ils joueraient un rôle important dans l'homéostasie du système immunitaire et dans les mécanismes de défense immédiate contre des agents infectieux. Ces anticorps naturels pré-existent à toute activation immunitaire, sont codés par des gènes de lignée germinale, non ou peu mutés ce qui les différencie des anticorps induits porteurs de nombreuses mutations somatiques dans les régions hypervariables du site anticorps induites par la pression de l'antigène.

La tolérance immunitaire des lymphocytes B aux auto-antigènes s'effectue à différents niveaux. Pendant la différenciation des lymphocytes B dans la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes périphériques. Ainsi, physiologiquement les clones des cellules B autoréactives subissent une sélection négative par différents mécanismes dépendants de l'affinité de liaison, de la concentration de l'autoantigène et du degré de maturation des cellules B. Il s'agit d'apoptose (mort cellulaire programmée), d'édition du récepteur ou d'inactivation fonctionnelle des lymphocytes B matures, naïfs. Cette sélection intervient également en périphérie et concerne les clones B autoréactifs de forte affinité qui sont éliminés dans les centres germinatifs des tissus lymphoïdes secondaires. Cependant, les cellules B peuvent échapper à la tolérance établie et produire des auto-anticorps qui peuvent contribuer aux dommages tissulaires dans les phénomènes immunopathologiques. (Lambert, 1981 ; Rose, 1982 ; Kazyumba, 1986).

Une dérégulation à différents niveaux peut entraîner cette auto-immunité B. L'activation des cellules B thymo-dépendantes dépend de deux signaux, l'un venant de

l'antigène, et l'autre des cellules T. L'interaction de ces deux signaux est importante pour le devenir des cellules B. Les mécanismes moléculaires qui altèrent cette interaction peuvent contribuer à une augmentation de l'activation des cellules B ou à une diminution de l'apoptose. Par exemple une dérégulation de l'activation B dépendant des cellules T, une altération de la synthèse des corécepteurs impliqués dans la signalisation induite par l'antigène, une dérégulation dans le contrôle de l'apoptose des cellules B peuvent être incriminées. Cependant, même en l'absence d'anomalie de la cellule B, des autoanticorps peuvent être générés par une réponse B normale dirigée contre des super antigènes ou des déterminants antigéniques d'agents infectieux par un mimétisme moléculaire avec des auto-antigènes (Davies, 1997). Le mimétisme moléculaire peut induire différentes réactions croisées, responsables de réponses auto-immunes dirigées contre des protéines de l'hôte chez certains individus et peut ainsi modifier l'équilibre de la réponse immunitaire d'un état de tolérance vers un état de réponse auto-immune, favorisant une maladie auto-immune.

Même si un épitope est responsable d'une réaction croisée *in vitro*, sa capacité à induire une maladie auto-immune *in vivo* dépend de la présentation appropriée de l'antigène de l'hôte ressemblant dans le tissu cible. Dans le cas des épitopes reconnus par les cellules T, elle est fonction de la capacité de ces épitopes à induire une réponse proliférative plutôt qu'un état d'anergie. La présentation de l'antigène étranger par les cellules B aux cellules T est un mécanisme possible d'induction d'une réponse auto-immune aux antigènes du soi qui peut conduire à des désordres auto-immuns dans certaines conditions (Olsson et coll., 1991).

Dans la THA, les anticorps anti-galactocérobrosides et anti-neurofilament reconnaissent chacun un antigène localisé sur la membrane du trypanosome et commun aux différentes espèces de trypanosomes. L'immunisation de souris avec ces antigènes induit la production d'anticorps qui présentent une réaction croisée avec les galactocérobrosides et le neurofilament. Malheureusement, ces antigènes n'entraînent aucune protection contre l'infection ultérieure par *T. b. brucei*. Les anticorps anti-neurofilaments que l'on retrouve comme les anticorps anti-galactocérobrosides dans le LCR des malades sont caractéristiques du stade neurologique de la THA. Toutes ces données sont en faveur d'une induction par mimétisme moléculaire avec un antigène parasitaire (Ayed et coll., 1997 ; Girard et coll., 2000 ; Bisser et coll., 2000). Le rôle pathogène des auto-anticorps est souvent démontré par la reproduction des symptômes après transfert passif des immunoglobulines purifiées de patients ou des modèles animaux. Cependant, certaines cibles à l'intérieur du SNC ne peuvent être

atteintes si la barrière hémato-méningée (BHM) est intacte. Une altération de cette BHM est alors requise pour l'accès des auto-anticorps aux antigènes présents dans le SNC. Certains anticorps pourraient cependant entrer dans le SNC à partir des microvaisseaux, en particulier dans les zones où la BHM est perméable (région périvasculaire, plexus choroïdes, éminence médiane, hypothalamus hypophyse, épiphyse) (Philip et coll., 1994).

Des cellules T activées auto-réactives peuvent passer à travers une BHM intacte, mais n'induisent pas de réaction inflammatoire locale si l'auto-antigène n'est pas présenté par des cellules résidentes *via* les molécules de classe II du système majeur d'histocompatibilité. Les modèles animaux et la sclérose en plaques ont permis de vérifier certaines hypothèses. La BHM représente une barrière importante pour l'immunité humorale. Son altération par les lymphocytes T activés est une étape importante dans la réalisation d'une réaction inflammatoire locale. La réaction immunologique dans le SNC dépend de nombreux paramètres tels que l'intégrité de la BHM, présence de l'antigène, présentation de l'antigène aux cellules T adéquates, présence d'anticorps activant le complément, présence de cellules B ou de plasmocytes. Le rôle des anticorps dans la survenue de lésions démyélinisantes a été démontré dans le modèle expérimental de sclérose en plaques, l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE). En effet, les lymphocytes T autoréactifs spécifiques d'antigènes myéliniques (MBP, MOG, protéolipide) induisent des infiltrations cellulaires. La démyélinisation est induite par des autoanticorps spécifiques des glycolipides de la myéline, dont le galactocéramide qui en est le composant majeur. Ce modèle démontre l'effet synergique des auto-anticorps dans la survenue de la démyélinisation. Dans la sclérose en plaques, la rupture de la BHM est un événement précoce, crucial qui permet le passage des auto-anticorps anti-myéline et du complément, et initie la démyélinisation. Des souris transgéniques pour des gènes d'immunoglobulines spécifiques valident ce concept. Ces animaux ne développent pas de maladies auto-immunes malgré des taux élevés d'auto-anticorps (Gran et coll., 2001 ; Vergelli et coll., 2001). Cependant après sensibilisation avec des protéines myéliniques pour induire une encéphalomyélite expérimentale auto-immune et une rupture de la BHM, ces souris transgéniques développent une maladie et une démyélinisation plus sévère que les souris contrôles. Cette étude montre que la présence de cellules B auto-réactives et d'anticorps n'est pas suffisante chez les individus avec une BHM intacte, mais qu'une modification de la perméabilité de la BHM peut considérablement modifier l'évolution d'une maladie inflammatoire du système nerveux central. La présence

d'anticorps anti-myéline chez un individu normal n'est donc pas corrélée à leur rôle pathogénique.

Dans la THA, les auto-anticorps anti-galactocérobrosides peuvent avoir un rôle opsonisant, entraîner la phagocytose par les macrophages et la démyélinisation. Le rôle de molécules impliquées dans le recrutement et la persistance de cellules B au niveau du système nerveux central, en particulier les chémokines et les molécules d'adhésion, n'est pas encore défini.

Des études expérimentales montrent que des cellules B activées spécifiques d'un antigène passent dans le système nerveux central à travers une BHM intacte et y persistent (Anthoons et coll., 1989).

La détection et l'identification des auto-anticorps ayant un rôle pathogénique a plusieurs conséquences thérapeutiques. Tout d'abord, l'élimination des auto-anticorps de la circulation ou un traitement immunosuppresseur actif sur les cellules B peuvent être efficaces. Ensuite, la présence de ces auto-anticorps permet une classification des patients. La classification des patients entre répondeurs et non répondeurs peut permettre des traitements mieux adaptés. On comprend alors l'intérêt d'une approche thérapeutique immunologique.

2- Rôles des cytokines

Une profonde dérégulation du réseau des cytokines est observée dans les trypanosomoses. La première évidence d'une surproduction de TNF- α a été observée chez le lapin infecté par *T. b. brucei* avec fièvre, asthénie, cachexie et hypertriglycémie. Des taux élevés de TNF- α sont associés à la présence de signes inflammatoires dans la première phase de la THA, et à la présence de signes neurologiques sévères dans la phase tardive de la THA (Nakamura, 1998).

Une augmentation persistante du TNF- α peut contribuer à l'hypergammaglobulinémie observée dans la THA en raison du rôle du TNF- α sur l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules B. Cependant, le TNF- α participe au mécanisme conduisant à l'élimination des trypanosomes. Il peut agir soit directement sur les parasites par ses propriétés cytotoxiques, soit indirectement, par une cascade d'événements entraînant

l'activation de plusieurs mécanismes effecteurs. Chez la souris infectée par *T. b. brucei*, le contrôle du début de l'infection est diminué par l'injection d'anticorps d'anti-TNF- α (Lucas et coll., 1993 ; Daulouède, 1994 ; Magez, 1999).

Les VSG déclenchent la production de TNF- α par les macrophages (Paulnock et Collier, 1981). De plus la production de TNF- α peut être stimulée par l'IFN- γ . IFN- γ et TGF- β sont produites par les cellules T CD8⁺ activées par un facteur lui-même activé par une molécule synthétisée par les trypanosomes, le TLTF. Le TGF- β possède des propriétés immunosuppressives. Un fait intéressant est que l'IFN- γ stimule la croissance du parasite. La liaison de l'epidermal growth factor (EGF) sur *T. b. brucei* favorise aussi la croissance du parasite, ce qui est une des premières interactions cytokine-parasite observée (Hamadien et coll., 1999, 2000 ; Bakhiet et coll., 2002 ; Nishimura et coll., 2004).

Toutes ces données montrent que, en interférant avec le réseau des cytokines et en utilisant les cytokines comme facteurs de croissance, les trypanosomes modifient les fonctions effectrices du système immunitaire. De plus, les effets des cytokines peuvent être complètement différents selon la présence de facteurs costimulateurs et la période pendant laquelle elles sont produites au cours de l'infection par les trypanosomes. Les cytokines sont également impliquées dans la physiopathologie du système nerveux. Les souris infectées par *T. b. brucei* développent des lésions inflammatoires du SNC après un traitement à la suramine à doses subcuratives. Des transcrits du TNF- α sont détectés dans le cerveau de ces souris, suggérant que le TNF- α joue un rôle dans les lésions. Le TNF- α et d'autres cytokines contribuent également à la production de molécules somnogéniques comme l'IL-1 β . Des taux élevés d'IL-10 sont mesurés dans le sérum de patients atteints de THA (Hunter et coll., 1991).

Par ailleurs, les cytokines jouent un rôle essentiel dans la synthèse de monoxyde d'azote (NO) dont les effets sur la réponse immunitaire ont été mis en évidence depuis quelques années (Lee et coll., 1993 ; Kong et coll., 2000).

3- Le rôle du monoxyde d'azote (NO) dans les infections à trypanosome

Les mécanismes de régulation mis en jeu dans la diminution du NO sanguin ont été abordés par l'étude des cytokines stimulantes (TNF- α et IFN- γ) et inhibitrices (IL-10, IL-4,

TGF- β) de la NOS inductible (iNOS) des macrophages des patients atteints de THA avant traitement et après une cure de mélarsoprol. Le TNF- α et l'IFN- γ sont augmentés avant traitement, mais cette augmentation de cytokines stimulatrices de la iNOS est contrebalancée par celle de l'IL-10, alors que l'IL-4 et le TGF- β ne varient pas. L'IL-10 agit comme inhibiteur à deux niveaux, celui du TNF- α et celui de la iNOS. Les taux plasmatiques de TNF- α et d'IL-10 reviennent à la normale dès la première cure de mélarsoprol (MacLean et coll., 2001). L'inhibition de la iNOS des macrophages activés pourrait donc en partie provenir de l'action de l'IL-10. Par ailleurs, la voie de la iNOS macrophagique est délaissée dans la THA, au profit de celle du cycle de l'urée. Le substrat de la iNOS, la L-arginine, est fortement diminué dans le sang de souris trypanosomées. La restauration de la production de NO et de l'action trypanolytique des macrophages est obtenue par l'injection intrapéritonéale de L-arginine. La diminution de l'arginine plasmatique est en fait due à l'augmentation importante de l'activité de l'arginase. Celle-ci utilise l'arginine comme substrat, pour lequel elle a une plus grande affinité que la iNOS (Gobert et coll., 2000 ; Duleu et coll., 2004). L'arginase augmente dans les premiers jours suivants l'inoculation des parasites. L'induction de l'arginase représente un nouveau mécanisme d'échappement élaboré par les parasites. Elle entraîne une diminution de la L-arginine circulante. La concentration en L-arginine résultante pour la iNOS est insuffisante à assurer une production suffisante de NO. L'arginine est métabolisée pour produire de l'urée et des métabolites comme l'ornithine. Ces métabolites sont utilisés par le trypanosome pour la synthèse de l'ADN et du trypanothion. La iNOS, déjà inhibée par l'IL-10, ne peut donc plus induire de production de NO, puisqu'elle ne dispose plus du substrat nécessaire à cette production.

L'origine du NO produit au niveau du cerveau est liée à l'activation de la iNOS. L'augmentation du NO cérébral d'origine inductible peut avoir un rôle délétère sur ces fonctions et sur la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Enanga et coll., 2002 ; Viswambharan et coll., 2003).

Au cours de la THA les études sur le dosage du taux de NO dans le système nerveux central montrent divers résultats, ainsi pour Sternberg et coll. (1998), le taux de NO augmente au cours de l'infection du vervet par *T. brucei*, mais pour MacLean et coll. (2001), il n'y a pas de modification du taux de NO dans le LCR lors de l'infection chez l'homme.

4- Passage du parasite dans le SNC

Les mécanismes par lesquels les parasites franchissent les vaisseaux sanguins cérébraux et pénètrent dans le parenchyme cérébral sont fondamentaux pour le neuropathogénie de la THA. Sur les animaux infectés par *brucei* les parasites envahissent les plexus choroïdes, la région périventriculaire et les organes de l'éminence médiane dépourvus de BHM (Schultzberg et coll., 1988). Ensuite, les parasites pénètrent la BHM et envahissent le parenchyme cérébral (Mulenga et coll., 2001). Un plus grand nombre de parasites apparaissent dans la substance blanche et au niveau des noyaux septaux plutôt que dans le néo-cortex cérébral.

L'intégrité de la BHM du système nerveux central constitue une protection contre l'infiltration de cellules inflammatoires, grâce aux cellules endothéliales et aux astrocytes (Rubin et coll., 1999) et à leurs membranes basales (Sixt et coll., 2001). Deux membranes basales sont associées aux vaisseaux sanguins dans le cerveau : une membrane basale endothéliale et une membrane basale parenchymateuse. Cette dernière est produite principalement par les astrocytes et délimite la frontière du parenchyme cérébral (Sixt et coll., 2001). Les composants principaux de toutes les membranes basales appartiennent à la famille des laminines qui sont des glycoprotéines, dont tous les membres sont des hétéro-trimères composés de chaînes α , β , γ . Jusqu'ici les chaînes 5α , 4β , et 3γ ont été décrites ; les chaînes de la laminine α portent des domaines d'interaction et représentent donc l'unité fonctionnelle de chaque laminine. Les membranes basales endothéliales du système nerveux central contiennent la laminine $\alpha4$ et la laminine $\alpha5$. La transmigration de cellules T se produit seulement aux emplacements où la laminine $\alpha4$ existe, et non pas au niveau de la laminine $\alpha5$ (Sixt et coll., 2001). Ceci laisse penser que la laminine $\alpha4$ favorise la transmigration des leucocytes, et que la laminine $\alpha5$ inhibe cette migration. L'expression des laminines endothéliales est influencée par des cytokines proinflammatoires (Sixt et coll., 2001), tels que l'IFN- γ , IL-12, et TNF- α qui règlent également l'invasion des cellules inflammatoires dans le parenchyme cérébral. Ces cytokines modulent l'expression des molécules d'adhérence cellulaire, et stimulent la synthèse de chémokines dans le système nerveux central. L'IFN- γ , sécrété par les cellules immunitaires innées et adaptatives après stimulation par l'IL-12 et IL-18, est essentiel pour le contrôle des microorganismes pathogènes intracellulaires (Boehm et

coll., 1997). En plus de la régulation de l'expression des isoformes de la laminine, l'IFN- γ induit différents mécanismes microbicides, augmente l'expression des molécules et des chémokines d'adhérence, et stimule la présentation d'antigène (Boehm et coll., 1997).

Différentes études ont montré que les réponses anticorps induites par les cellules B et les réponses de type Th1 induisant la production d'IFN- γ sont nécessaires pour la résistance aux trypanosomes chez les souris (Hertz et coll., 1998). Paradoxalement, l'IFN- γ favorise les infections à *T. brucei* en jouant sur l'immunosuppression (Darji et coll., 1993 ; Shi et coll., 2003) et en augmentant la prolifération du parasite (Olsson et coll., 1993). Les parasites infiltrant le parenchyme cérébral sont susceptibles de rencontrer les mêmes barrières et membranes basales cellulaires produites que les leucocytes lors d'une inflammation, c'est à dire d'abord la barrière comprenant l'endothélium et sa membrane basale, puis le parenchyme et les astrocytes. En outre, les infections à *T. brucei* sont associées à des infiltrations de cellules B et de T. La présence de laminine $\alpha 4$, et non celle de laminine $\alpha 5$, sur la membrane basale endothéliale est associée au passage de *T. brucei* au travers de celle ci de même que l'IFN- γ facilite la transmigration du parasite (Masocha et coll., 2004).

Un autre mécanisme a été mis en évidence par Girard et coll. (2003) qui ont montré que des facteurs pro apoptotiques tels que FasL soluble (sFasL) ainsi que des anticorps anti-Fas étaient présents dans le LCR des malades en stade 2. Ces facteurs sont connus pour jouer un rôle dans l'apoptose des cellules microgliales et participer à la rupture de la BHM et donc au passage du parasite dans le système nerveux central. Ce mécanisme permettant au parasite d'échapper au système immunitaire de l'hôte est similaire à celui observé pour les infections à *T. cruzi* ou maladie de Chagas (Lopes et Dos Reis, 1995 ; Lopes et coll., 1995 ; Zuniga et coll., 2000 et Reina-San-Martin et coll., 2000).

Parallèlement, on sait qu'il y a une production au cours de la réponse immunitaire de cytokines pro inflammatoires telles que le TNF- α (Cerami et Beutler, 1988), l'IL1- β , l'IL-6, produites par les astrocytes ou oligodendrocytes ou dans le sang. Elles jouent un rôle dans la modification de l'activation des cellules endothéliales (de Vries et coll., 1996; Brochu et coll., 1999).

TRYPANOSOMOSE AFRICAINE ET IMMUNOLOGIE

Boda C, **Courtioux B**, Jauberteau-Marchan MO, Bisser S. Immunity to African Trypanosomiasis. In: O. Garraud, Ed. Update in Tropical Immunology. Transworld Research Network, Fort P.O., Trivandrum, Kerala, India. *In press*.

Résumé:

La trypanosomose africaine est due à un protozoaire extra-cellulaire qui infecte à la fois l'homme et les animaux dans les pays sub-sahariens. L'état immunologique est marqué par l'activation polyclonale de lymphocytes B, un état inflammatoire et une immunosuppression. Les trypanosomes s'adaptent à leur hôte par une interaction complexe avec le système immunitaire basée sur leur capacité à échapper aux réactions immunitaires. Trois mécanismes sont impliqués : variation du manteau antigénique, relargage de facteurs favorisant un environnement salubre pour leur croissance et possibilité pour le parasite de se dissimuler en particulier dans le système nerveux central. Le mécanisme de neuro-invasion n'est pas bien connu mais pourrait être dû à des facteurs apoptotiques provenant du parasite et à l'IFN- γ qui pourraient interagir avec les cellules endothéliales présentant la laminine $\alpha 4$.

La réponse immune précoce induite par le parasite conduit à une production d'IFN- γ qui à une double fonction, croissance du parasite mais aussi activation de facteurs trypanocides par les cellules de l'hôte. En conséquence, ce mécanisme conduit à des lésions inflammatoires et altère l'activation des cellules T. Ainsi, le « switch » vers un profil Th2 (IL-4, IL-10) semble être favorable pour l'hôte en diminuant l'état inflammatoire. Classiquement et de manière alternative l'activation des macrophages joue un rôle crucial dans la régulation de ce mécanisme qui crée un équilibre entre le parasite et la survie de l'hôte.

Les patients peuvent probablement développer une immunité dirigée contre le trypanosome. C'est pourquoi la recherche d'un vaccin est importante. Des progrès ont été observés avec la recherche sur les protéines associées aux microtubules du trypanosome et nécessitent d'autres investigations.

OBJECTIFS

L'objectif principal de cette thèse est l'étude des mécanismes inflammatoires au cours de la trypanosomose humaine africaine et leurs applications en diagnostic et en thérapeutique.

Les objectifs secondaires sont :

- Etudier les types lymphocytaires et leur état d'activation dans le sang et le LCR de malades aux différents stades de la maladie ;
- Etudier le franchissement de la barrière hémato-méningée par les cellules immunes des patients en stade neurologique ;
- Détecter de façon spécifique et sensible les anticorps anti-galactocérebrosides et anti-neurofilament qui sont des marqueurs du stade neurologique de la THA ;
- Analyser les structures glycolipidiques du trypanosome vraisemblablement responsables de la synthèse de certains anticorps spécifiques du stade neurologique et envisager une thérapeutique.

PATIENTS ET MÉTHODES

I- Les prélèvements chez les patients atteints de THA

Au cours de notre travail de thèse, nous avons pu participer à différentes enquêtes de prospection en Angola, en République Centrafricaine et au Gabon afin de recueillir les échantillons biologiques nécessaires à notre étude cytométrique, au dosage des chémokines et à la validation du test de diagnostic de stade par recherche d'anticorps dirigés contre les constituants du système nerveux central.

Les prélèvements biologiques ont été réalisés après la mise en évidence des trypanosomes soit dans le sang, soit dans la lymphe, soit dans le LCR. Chaque patient retenu pour l'étude était informé de l'utilisation des prélèvements et son consentement était demandé (ou celui des parents dans le cas de mineurs).

Les patients ont été dépistés par CATT sur sang total. En cas de positivité, un CATT sur sérum était réalisé pour confirmer cette positivité. La confirmation parasitologique a été réalisée par l'examen du suc ganglionnaire en cas d'adénopathie cervicale et/ou la recherche du parasite dans le sang après concentration.

En cas de présence du trypanosome dans le sang et/ou la lymphe, une ponction lombaire était effectuée afin de déterminer le stade de la maladie et mettre en place le traitement adapté.

Les sérums, les cellules du sang et du LCR recueillis après l'examen ont été stockées soit à -20°C (sérums, LCR) soit dans l'azote (cellules) avant leur acheminement dans les laboratoires de l'Université de Limoges (EA 3174, Dr Bernard BOUTEILLE ; EA 3842, Pr Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN) et au Centre International de Recherche Médicale de Franceville au Gabon (Dr Sylvie BISSER, chef du département de Parasitologie ; Pr Philippe BLOT, directeur) où nous avons réalisé notre travail.

Classiquement sur le terrain un patient était considéré en stade 2 de la maladie lors de la découverte d'un trypanosome dans le LCR. Cette découverte est aléatoire et l'OMS

recommande l'adoption des critères suivants (OMS, 1998) :

- une cytorachie supérieure à 5 éléments/ μ L dans le LCR et présence de trypanosome dans le système lymphatico-sanguin,
- une protéinorachie supérieure à 450 mg/L avec présence de trypanosomes dans le système lymphatico-sanguin (OMS, 1998).

Dans notre étude pour l'analyse des résultats, nous avons considéré que la cytorachie comme seul examen déterminant le stade est une pratique discutable avec le risque de considérer en stade 2 des patients sans atteinte neurologique.

De ce fait l'analyse des résultats est effectuée en introduisant dans cette étude une phase "intermédiaire", comme cela a déjà été réalisé par d'autres auteurs (Doua et coll., 1987 ; Girard et coll., 2000 ; Bisser, 2001). Ce stade se caractérise par une cytorachie comprise entre 5 et 20 éléments par μ L de LCR.

1- Mission en République Centrafricaine

Au cours de cette mission nous avons participé à l'enquête réalisée sous la direction du PNLTHA (Programme National de Lutte contre la THA) dirigé à l'époque par le Dr Auguste Nangouma.

La mission s'est déroulée du 15 mars 2001 au 30 avril 2001 dans la région de Batangafo (comprenant 4 communes : Bakassa, Bede, Ouaki et Batangafo) qui se trouve à 500 km de piste au nord de Bangui. Il s'agit d'une population rurale dont les activités dominantes sont l'agriculture et la pêche.



Figure 13 : Carte géographique de la RCA indiquant le lieu de la prospection

La sensibilisation de la population se faisait quelques jours avant le dépistage proprement dit.

Le dépistage actif s'est déroulé dans 15 quartiers de Batangafo et dans les villages limitrophes. Les villageois ont été visités et évalués par le test CATT. Chaque patient retenu pour l'étude était informé de l'utilisation des prélèvements.

Les patients étaient considérés sérologiquement positifs pour la THA après avoir été déclarés positifs par le test CATT, mais également parasitologiquement positif par le test mAECT. Une ponction ganglionnaire était également réalisée lorsque le patient présentait une adénopathie.

Chaque patient sérologiquement positif pour la THA et confirmé par la présence du trypanosome dans le sang et/ou dans la ponction ganglionnaire était examiné par un médecin du PNLTHA. Puis était réalisé un examen clinique général et un examen neurologique sur chaque sujet.

La stratégie du PNLTHA à Bangui était de déterminer la cytorachie sur cellule de Nageotte et de considérer comme stade 2 les patients dont la cytorachie est supérieure à 5 cellules/ μ L. La mise en évidence du trypanosome a été une découverte fortuite au cours du comptage, aucune technique de concentration n'a été réalisée.

Un prélèvement sanguin sur tube sec au pli du coude était réalisé pour effectuer des analyses biochimiques et sérologiques. Les prélèvements (LCR, sérum) étaient stockés à -20°C, dans les congélateurs du PEV (Programme Elargi de Vaccination), mis à notre disposition par l'hôpital communautaire. Puis les prélèvements ont été acheminés à Limoges en respectant la chaîne du froid.

C'est au cours de cette étude en RCA que nous avons testé pour la première fois sur le terrain la recherche d'auto-anticorps anti-neurofilament et anti-galactocérobrosides en tant que diagnostic de stade de la THA.

2- Mission en Angola

Au cours de cette mission nous avons participé à l'enquête réalisée sous la direction de l'ICCT (Instituto de Combate e Controlo das Tripanossomias) situé à Luanda et dirigé par le Pr Théophile JOSENANDO.

La prospection conduite par le Dr Sylvie BISSER s'est déroulée du 02 novembre 2002 au 02 décembre 2002, à Tabi, une région située à 250 Km de piste au nord de Luanda. C'est une zone semi-désertique où la présence des mouches tsé-tsé est très importante, notamment à proximité des rivières. La population visitée est une population rurale dont les activités dominantes sont l'agriculture et la pêche.

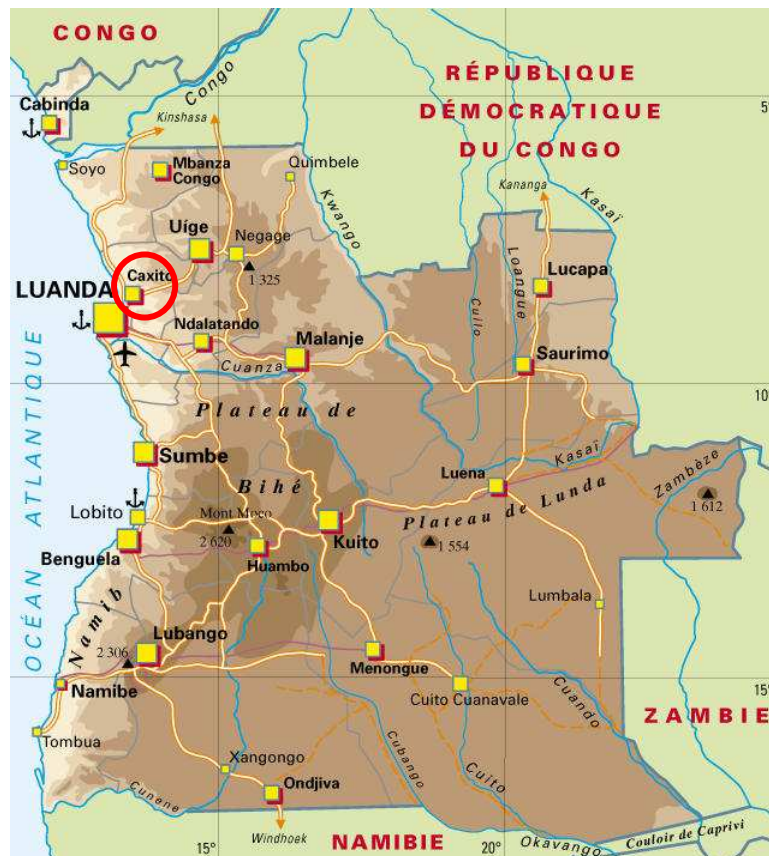


Figure 14 : Carte géographique de l'Angola indiquant le lieu de la prospection

Les prélèvements réalisés au cours de cette étude ont permis une partie de l'étude

cytométrique mais également le dosage des chémokines dans le sérum et LCR des patients.

Les patients étaient considérés positifs pour la THA après avoir été déclarés positifs par le test CATT, mais également parasitologiquement positifs par le test mAECT. Une ponction ganglionnaire était également réalisée lorsque le patient présentait une adénopathie.

Chaque patient sérologiquement positif pour la THA et confirmé par la présence du trypanosome dans le sang et/ou dans la ponction ganglionnaire était examiné par un médecin de l'ICCT ou le Dr Sylvie BISSER. Puis était réalisé examen clinique général et un examen neurologique sur chaque patient.

La stratégie de l'ICCT était de déterminer la cytorachie sur cellule de Nageotte et de considérer comme stade 2 les patients dont la cytorachie était supérieure à 5 cellules/ μ L. La mise en évidence du trypanosome était systématiquement effectuée sur chaque LCR après une double centrifugation .

Un prélèvement sanguin sur tube sec ou sur EDTA, en fonction de son utilisation, au pli du coude était réalisé pour effectuer des analyses biochimiques et sérologiques. Les prélèvements (LCR, sérum) étaient stockés d'abord à -20°C , dans les congélateurs, puis dans de l'azote liquide à -196°C .

Les cellules étaient conservées dans un milieu adapté au transport après leurs marquages pour la cytométrie en flux.

Les prélèvements ont été acheminés à Limoges ou à Franceville en respectant la chaîne du froid.

En Angola nous avons également recueilli des échantillons provenant du dépistage passif des patients à l'hôpital de Viana.

D'autres missions en Angola ont été réalisées (Bengo, novembre 2002 ; Zala, juin 2004).

3- Mission au Gabon

Une prospection conduite par le PNLTHA du Gabon, sous la direction du Dr Paulette MENGUE M'EYI et la participation du Dr Sylvie BISSER (CIRMF), s'est déroulée au cours du mois de mai 2004 dans la région de Coco Beach (Département de la Noya) qui se trouve à proximité de Libreville. C'est une zone rurale à la frontière fluvio-maritime avec la Guinée Equatoriale.



Figure 15 : Carte géographique du Gabon indiquant le lieu de la prospection

Les sérums, les LCR et les cellules du sang et du LCR recueillis par Mademoiselle

Lynda PERVIEUX, étudiante de l'EA 3174 en stage de DEA et par le Dr Caroline BODA, docteur de l'Université de Limoges, nous ont permis de compléter l'étude cytométrique et le dosage des chémokines initiées en Angola.

Les patients étaient considérés positifs pour la THA après avoir été déclarés positifs par le test CATT, mais également parasitologiquement positifs par le test mAECT. Une ponction ganglionnaire était également réalisée lorsque le patient présentait une adénopathie.

Chaque patient sérologiquement positif pour la THA et confirmé par la présence du trypanosome dans le sang et/ou dans la ponction ganglionnaire était examiné par un médecin du PNLTHA. Puis était réalisé un examen clinique général et un examen neurologique sur chaque patient.

La stratégie du PNLTHA à Libreville était de déterminer la cytorachie sur cellule de Nageotte et de considérer comme stade 2 les patients dont la cytorachie est supérieure à 5 cellules/ μ L. La mise en évidence du trypanosome était systématiquement effectuée sur chaque LCR après une double centrifugation.

Un prélèvement sanguin sur tube sec ou EDTA, en fonction de son utilisation, au pli du coude était réalisé pour effectuer des analyses biochimiques et sérologiques.

Les cellules étaient conservées dans un milieu adapté au transport après leurs marquages pour la cytométrie en flux.

Les prélèvements (LCR, sérum) étaient stockés à -20°C . Puis les prélèvements ont été acheminés à Limoges ou à Franceville en respectant la chaîne du froid.

4- Origines des sérums et LCR contrôles

Pour chacune des études que nous avons menées, des échantillons sanguins et des LCR contrôles ont été utilisés. Tous les contrôles présentaient un CATT négatif et une cytorachie inférieure à 5 cellules/ μ L. Pour chaque contrôle une ponction lombaire avait été réalisée dans le cadre de leur bilan biologique nécessaire au diagnostic de leur maladie.

Pour le typage lymphocytaire et le dosage des chémokines nous nous sommes servis de sérum et le LCR contrôles obtenus de la même façon lors de prospections précédemment

décrites en Angola et au Gabon. Au total en Angola et au Gabon 37 contrôles ont pu être réunis.

Pour le test de diagnostic de stade par recherche des anticorps anti-neurofilament et anti-galactocérébrosides nous nous sommes servis de 13 contrôles provenant du service de neurologie du CHRU de Limoges. Parmi ces patients 5 étaient HIV positif.

| Pays | Date de mission | Contrôles | Nombre de total de patients | | | | | Etudes réalisées |
|---------------|------------------------------------|-----------|-----------------------------|---------------------|---------|-----------|------------------|---|
| | | | Stade 1 | Stade intermédiaire | Stade 2 | Age moyen | Sexe ratio (M/F) | |
| RCA | 15 mars 30 avril 2001 | - | 39 | 59 | 21 | 24 ans | 0,9 | Etude sur le diagnostic de stade |
| Angola | 02 novembre 02 décembre 2002 | - | 4 | 6 | 11 | 25 ans | 1,6 | Etude sur le diagnostic de stade |
| | 01 avril 15 avril 2003 | - | 1 | 3 | 7 | 30 ans | 1,4 | Etude sur les chémokines et la cytométrie |
| | 10 juin 2004 25 juin 2004 | 10 | 8 | 1 | 8 | 30 ans | 2 | Etude sur les chémokines et la cytométrie |
| Gabon | Janvier 2003 | 9 | - | - | 1 | 46 ans | - | Etude sur les chémokines et la cytométrie |
| | Mai 2004 | 28 | 19 | - | 5 | 44 ans | 1,1 | Etude cytométrique |
| | Février-mars 2005 | 10 | - | - | - | 32 ans | 1.8 | Etude cytométrique |
| France | 2001 | 13 | - | - | - | - | - | Etude sur le diagnostic de stade |

Tableau 3 : Récapitulatif des différentes missions organisées pour le diagnostic de stade, le dosage des chémokines et le typage lymphocytaire.

II- Le matériel biologique

1- Les trypanosomes

a- Origine

Les souches *T. b. brucei* AnTat 1.9, *T. b. gambiense* MBA et *T. b. rhodesiense* II Tat 1.1 avaient été gracieusement données au Dr Bernard BOUTEILLE par l'Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold (Anvers, Belgique). Elles avaient été fournies sous forme de cryostabilat dans l'azote liquide et conservées sous cette forme au laboratoire. Le nombre de passage sur animal étant restreint au strict minimum afin de conserver les caractéristiques de ces souches.

b- Culture de *T. b. brucei* AnTat 1.9, *T. b. gambiense* MBA et *T. b. rhodesiense* II Tat 1.1.

Nous avons cultivé les trypanosomes au laboratoire dans un milieu liquide dit Milieu de Baltz (Baltz et coll., 1985): MEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Gibco) supplémenté par 10 % de sérum de cheval décomplémenté (Gibco), L-glutamine (2 mM, Gibco), HEPES (25 mM, Gibco), glucose (0,2 %, Sigma), pyruvate de sodium (2 mM, Gibco), pénicilline (150 UI/L, Gibco), thymidine (0,1 mM, Sigma), 2-mercaptoéthanol (0,5 mM, Sigma), L-cystéine (15 mM, Sigma), et bathocuproïne sulfate (0,0001 %, Sigma) à 37°C en atmosphère à 5 % de CO₂. Le milieu est renouvelé par moitié tous les jours.

2- Les souris

Nous avons utilisé des souris Swiss femelles de 20 à 25g provenant de l'élevage Dépré (France) pour le passage des souches de trypanosomes mais également pour les différents tests *in vivo*. Une période d'adaptation de 7 jours était observée avant le début de toute expérimentation. Elles recevaient alimentation et boisson *ad libitum*.

III- Les méthodes

1- Cytométrie en flux pour le typage lymphocytaire

a- Marquage des lymphocytes du sang total

Nous avons marqué les lymphocytes du sang à partir du sang total pour l'analyse par cytométrie en flux. Pour chaque patient, deux combinaisons de trois anticorps ont permis le marquage. Le sang a été prélevé sur tube EDTA chez les patients. Le sang a été dilué au demi dans un milieu de conservation (Cytocheck, Dako). Au moment du marquage, le sang était 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)) étaient ajoutés dans chaque tube selon la combinaison voulue. Le contenu des tubes était 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 (NH₄CO₃H 0,9mM, NH₄Cl 131mM) était ajouté dans chaque tube. Après addition du tampon de lyse, les cellules étaient incubées durant 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière, puis centrifugées. Le culot était ensuite lavé deux fois en PBS. En cas de lyse incomplète (coloration rouge persistante), une deuxième lyse était pratiquée selon le même protocole. Le culot de lymphocytes était ensuite fixé en présence de 250 µL de PBS à 4% de Cellfix (Becton Dickinson, France). Tous les anticorps étaient fournis par Becton Dickinson. Une série de contrôles isotypiques adaptés a été réalisée par jour de prélèvement (Tableaux 3 et 4).

Les échantillons étaient ensuite analysés au cytomètre en flux au CIRMF à Franceville (Facs Calibur, Becton Dickinson, France) dans un délai compris entre 24 heures et 5 jours.

b- Marquage des lymphocytes du LCR

Immédiatement après prélèvement et lecture de la cytorachie, les lymphocytes du LCR ont été marqués en vue des analyses cytométriques. Pour cela, des anticorps couplés à des fluorochromes ont été ajoutés à 100 µL de LCR incubés 15 minutes à +4°C. Les échantillons ont été fixés par du CellFix (Becton Dickinson) 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 (Tableau 4).

c- Marqueurs utilisés sur les cellules du sang et du LCR

Les anticorps monoclonaux utilisés pour l'analyse des lymphocytes T et B du sang et du LCR étaient conjugués à :

- l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (IgG1, anti-CD19, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RA, anti-CD95),
- phycoérythrine (PE) (IgG1, anti-CD56, anti-CD25, anti-CD62L, anti-CD28, anti-HLA-DR, anti-CD16),
- péricidin-chlorophylle-a-protéine (PerCP) (IgG1, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD69),
- phycocyanine (PC5) (IgG1, anti-CD3, anti-CD8),
- allophycocyanine (APC) (IgG1, anti-CD3, anti-CD19, anti-CD8).

Ces anticorps ont été fournis par Becton Dickinson (Becton-Dickinson immunocytometry system, France) :

Les lymphocytes T ont été recherchés par le marqueur CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ et CD3⁺CD8⁺ (Tableau 3).

Les lymphocytes T naïfs ont été recherchés par CD62L⁺ et CD45RA⁺.

Les cellules mémoires ont été recherchées par les marqueurs CD45RA⁻CD62L⁺.

Les lymphocytes T activés ont été recherchés par les marqueurs HLA-DR⁺, CD25⁺, CD69⁺ et CD14⁺.

Les pré effecteurs CD8 ont été recherchés par les marqueurs CD8⁺CD45RA⁻CD62L⁻.

Les effecteurs CD8 T ont été recherchés par les marqueurs CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻.

Les NK ont été recherchés par les marqueurs CD56⁺, CD16⁺ et CD8⁺CD3⁻ T.

Les NK-T ont été recherchés par les marqueurs CD56⁺CD3⁺ et CD16⁺CD8⁺ T (Resino

et coll., 2003).

Les lymphocytes B ont été recherchés par les marqueurs CD19⁺ (Tableau 3).

Les lymphocytes B activés ont été recherchés par les marqueurs CD14⁺, HLA-DR⁺, CD69⁺ et CD95⁺ B.

| Lymphocytes | Marqueurs lymphocytaires | Etats d'activation lymphocytaire | Marqueurs d'activation lymphocytaire |
|--------------------|---|---|--|
| T | CD3 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ | T naïfs | CD62L ⁺ CD45RA ⁺ |
| | | T mémoires | CD45 ⁻ CD62L ⁺ |
| | | T activés | HLA-DR ⁺ CD25 ⁺ CD69 ⁺ CD14 ⁺ |
| | | T CD8 effecteurs | CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁻ |
| | | NK-T | CD56 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD3 ⁺ |
| NK | CD56 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD3 ⁻ CD8 ⁺ CD3 ⁻ | | |
| B | CD19 ⁺ . | B activés | CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ CD69 ⁺ CD95 ⁺ |

Tableau 4 : Récapitulatif des marqueurs utilisés pour le typage lymphocytaire

d- Réalisation de contrôles isotypiques

Les contrôles isotypiques ont été réalisés à chaque série de marquage (sang, LCR). Ils consistent à marquer les lymphocytes étudiés avec des anticorps dirigés contre des immunoglobulines irrelevantes isotypiques identiques à celui des anticorps primaires de façon à apprécier le taux de fixation non spécifique. Pour cela, une série de combinaisons a été utilisée en fonction des marquages à réaliser. Les contrôles isotypiques ont également permis

d'effectuer les réglages individuels pour chaque fluorochrome (Tableau 4).

| | FITC | PerCP/PC5 | APC | PE |
|----------|-------------|------------------|-------------|-------------|
| 1 | IgG1 souris | IgG1 souris | IgG1 souris | IgG1 souris |
| 2 | CD19 | IgG1 souris | IgG1 souris | IgG1 souris |
| 3 | IgG1 souris | IgG1 souris | IgG1 souris | CD4 |
| 4 | IgG1 souris | CD8 | IgG1 souris | IgG1 souris |
| 5 | IgG1 souris | IgG1 souris | CD3 | IgG1 souris |

Tableau 5 : Séries de contrôles isotypiques utilisés lors des marquages des lymphocytes du sang et du LCR de patients infectés.

e- Lecture des échantillons au cytomètre en flux

Les lymphocytes du sang et du LCR marqués comme décrits précédemment ont été caractérisés au cytomètre en flux (FacsCalibur, Becton Dickinson) en adaptant les réglages selon les contrôles isotypiques. En résumé, un premier graphique 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. 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 (Tableau 5) :

| a | | b | |
|---------------------|------------------|--------------|-------------|
| Fluorochrome | Ampérages | % FL1 - %FL2 | 0,1 à 0,5 % |
| FITC | 620 à 650 A | % FL2 - %FL1 | 25 à 28 % |
| PerCP | 600 à 635 A | % FL2 - %FL3 | 2,4 à 2,8 % |
| PC5 | 550 à 580 A | % FL3 - %FL2 | 12 à 15% |
| APC | 480 à 520 A | % FL3 - %FL4 | 5 à 7 % |
| | | % FL4 - %FL3 | 7 à 9% |

Tableau 6 : 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)

f- Analyse des résultats de la cytométrie en flux

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

Tous les graphiques ont ensuite été centrés sur R. La barre de statistiques a été positionnée sur les graphiques 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 marqueur ont été définis dans les

cadrons statistiques (Figure 16).

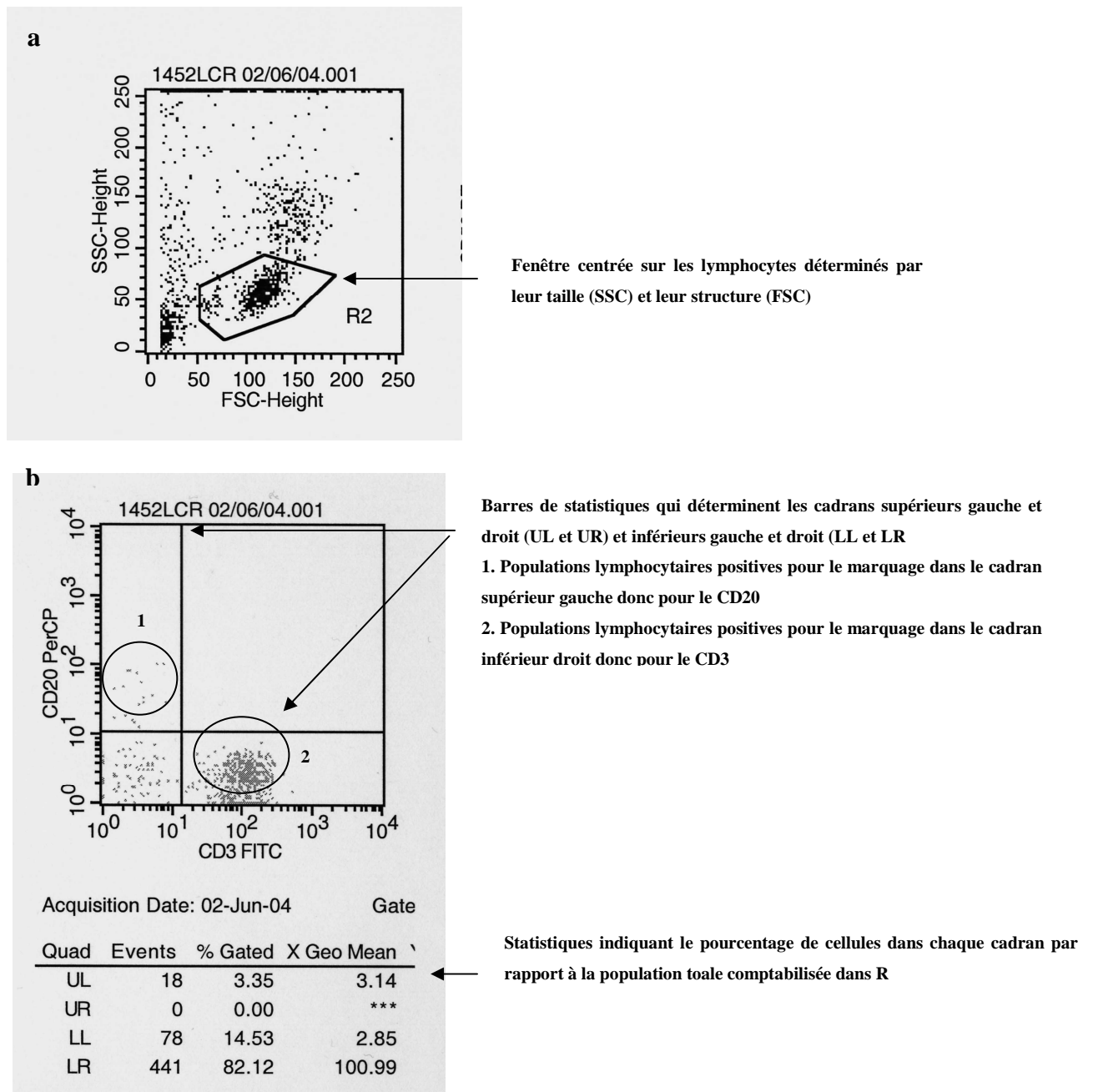


Figure 16 : (a) Fenêtre d'identification des lymphocytes lors de l'analyse des résultats de cytométrie. (b) exemple de résultats obtenus après marquage des lymphocytes dans le LCR de patients infecté par *T. b. gambiense* et lecture au cytomètre en flux.

2- Dosage des chémokines et d'IL-1 β dans le sérum et le LCR des patients

Les taux d'IL-1 β , d'IL-8, de « monocyte chemotactic protein-1 » (MCP-1), de « macrophage inflammatory protein-1 α » (MIP-1 α) et de « regulated upon activation T cell expressed and secreted » (RANTES) ont été mesurés dans le sérum et le LCR des malades et des contrôles. Lors des prospections les échantillons de sérums étaient prélevés sur des tubes secs, puis centrifugés et le sérum recueilli. Le LCR et le sérum étaient stockés à -20°C puis -80°C ; la réaction ELISA a été faite selon les instructions du fabricant (R&D Systems, Minneapolis, USA). Chaque trousse de dosage contenait une courbe étalon réalisée à partir de cytokine humaine recombinante et des contrôles négatifs. Chaque échantillon de sérum et de LCR était analysé en duplicate et la valeur moyenne a été utilisée pour l'analyse. La limite de détection était de 0,1 pg /mL pour IL-1 β , 8 pg /mL pour IL-8, 10 pg /mL pour MCP-1, 10 pg /mL pour MIP-1 α et 5 pg /mL pour RANTES.

3- Recherche des auto-anticorps anti-galactocérébrosides et anti-neurofilament

a- ELISA

Pour le dosage des anticorps anti-NF (anti-neurofilament), nous avons utilisé des plaques Maxisorb Nunc 96 puits, alors que pour le dosage des anticorps anti-GalC (anti-galactocérébrosides), nous nous sommes servis de plaques Immunosorb Nunc 96 puits (dont le support plastique hydrophobe ne fixe que les lipides). Dans tous les cas on ne se sert pas des puits en bordure de la plaque.

Deux cent cinquante nanogrammes de NF (Sigma, Saint Louis, MO) par puits (dans 50 μ L de PBS) sont incubés une nuit à +4°C, permettant leur absorption au support plastique. Après un lavage en PBS, les plaques sont saturées en PBS-BSA (Bovine Sérum Albumine) 3% (200 μ L/puits) à 37°C pendant 1 heure. Après un nouveau lavage en PBS, 100 μ L/puits d'échantillon dilués en PBS-BSA 3% sont ajoutés (LCR au 1:50) durant 1 nuit à +4°C. Après 6 lavages en PBS-0,05% Tween 20, des anticorps anti-Ig horse radish peroxydase (Dako, Glostrup, Danemark) sont ajoutés durant 1 heure à 37°C (avec 100 μ L/puits dilués au 1:2000 en PBS). Après 6 derniers lavages, la solution de révélation est ajoutée (OPD, Ortho-Phénylène Diamine, 0,6 mg/mL, dans du tampon citrate, en présence de H₂O₂-30% 100 μ L).

Une réaction colorée se développe et est stoppée par l'addition de H₂SO₄ 8N (30µL). La DO (Densité Optique) est lue à 492 nm. Chaque échantillon est analysé en duplicate.

Un bruit de fond (BDF) qui correspond à l'accrochage non spécifique des anticorps au support en plastique a été déterminé pour chacun des échantillons. Des LCR ont été incubés dans des puits sans l'antigène, puis traités comme précédemment. La DO corrigée est calculée en faisant la différence entre la DO obtenue avec antigènes et la DO du BDF.

Pour le dosage des anticorps anti-GalC, on dépose 1 µg de GalC (Sigma, Saint Louis, MO) par puits (dans 50 µL d'un mélange d'éthanol et de méthanol), et après évaporation des solvants, les plaques sont saturées et traitées comme précédemment. Les lavages sont réalisés avec du PBS seul, le Tween étant un détergent risquant de d'éliminer l'antigène lipidique.

b- Dot blot

Cette technique a été développée par Chabroui et coll. (1993), afin de rechercher des anticorps anti-gangliosides. La technique d'immunodot-blot est simple, rapide et bien adaptée en pratique quotidienne à la recherche de la spécificité des anticorps anti-galactocérebrosides.

Nous avons adapté cette technique pour la recherche des autoanticorps dirigés contre les galactocérebrosides et contre les neurofilaments.

Le choix de la membrane immobilon-NC (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) a été fait en raison de ses propriétés physico-chimiques bien adaptées aux conditions opératoires : elle présente une grande résistance aux solvants organiques et une forte capacité de fixation des molécules par interactions hydrophobes.

La membrane est tout d'abord plongée 5 secondes dans un mélange d'isopropanol et d'eau (2/1, v/v), puis séchée avant d'être découpée en bandelettes de dimensions appropriées (1 X 2 cm) pouvant contenir les galactocérebrosides et le neurofilament. Le GalC solubilisé dans un mélange isopropanol et eau (2/1, v/v) est déposé sous forme de gouttes à l'aide d'une micropipette à raison de 10 µg/bandelette.

Après séchage, la membrane est plongée 5 secondes dans du PBS puis à l'aide d'un Dot Blotter (Schleicher et Schuell, Aubervilliers, France) le neurofilament est déposé à raison de 3 µg. A ce stade les bandelettes peuvent être stockées pendant plusieurs mois à l'abri de la

lumière et de l'humidité. Le tampon de saturation utilisé pour bloquer les sites libres de la membrane est le PBS contenant 10 % de sérum de cheval. La saturation dure 1h sous agitation. Les bandelettes sont mises à incuber dans du PBS-sérum de cheval avec les LCR au 1/10 pendant 3 heures à température ambiante, sous agitation. Après 3 séries de lavages de 5 min dans le tampon PBS-0,05 %-Tween 20, les bandelettes sont incubées pendant 1 heure avec les anticorps secondaires au 1/100 dans du Sérum de cheval 10 %. Les bandelettes sont rincées 3 fois 5 minutes dans le tampon PBS-0,05 %-Tween 20. La révélation de la fixation d'auto-anticorps anti-GalC et anti-NF est réalisée par utilisation du 4-chloro-1-naphtol (10 mg de 4-chloro-1-naphtol dans 5 mL d'éthanol auquel on ajoute 45 mL de PBS + 50 µL de H₂O₂-30%). Les bandelettes sont mises à incuber jusqu'à l'apparition d'une coloration (environ 15 min) à l'obscurité et rincées avec de l'eau puis séchées sur papier filtre. La lecture se fait immédiatement, par observation de la coloration de la bandelette.

4- Dosage des protéines dans les sérums et les LCR

Le dosage des protéines a été réalisé par néphélométrie sur BNA (Behring Diagnostic, Rueil-Malmaison, France) au CHRU de Limoges, service de biochimie. La limite de détection pour les IgM était de 2,4 mg/mL.

5- Analyse glycolipidique

Ce travail de thèse nous a permis d'effectuer plusieurs stages au sein d'une équipe brésilienne spécialisée dans le travail et l'analyse des constituants glycolipidiques des parasites (Laboratoire de Glycobiologie, Institut de Biophysique Carlos Chagas Filho, Université Fédérale de Rio de Janeiro) dans le cadre de notre co-tutelle de thèse avec le Pr Lucia MENDONÇA-PREVIATO, directrice de ce laboratoire. Ces stages ont été effectués grâce au projet de recherche bilatéral franco-brésilien CAPES-COFECUB n° 405/02 coordonné par le Pr Lucia MENDONÇA-PREVIATO et le Dr Bernard BOUTEILLE.

a-Extraction des glycolipides de *Trypanosoma b. brucei*, *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*.

Nous avons préparé des culots de trypanosomes de culture lyophilisés, environ 2×10^7 parasites par échantillon de chaque souche de trypanosomes. Au total 10 échantillons de

chaque souche ont été préparés.

L'analyse des glycosphingolipides neutres purifiés a été faite par spectrométrie de masse et a permis de caractériser les lipides, les sucres et la base issus de la purification des échantillons.

Nous avons étudié les glycosphingolipides de la manière suivante. Une première extraction selon la méthode de Folch et coll. (1957), en chloroforme : méthanol (v/v, 3/2), a été réalisée, le surnageant a été séché par évaporation sous azote. Le surnageant séché a été repris en chloroforme : méthanol (v/v, 2/1), puis une chromatographie en couche mince a été réalisée (plaque HPTLC, Merck). Le matériel a été entièrement repris et solubilisé pendant une nuit par sonication en chloroforme : méthanol (v/v, 3/2), avec 5% d'H₂O. Les glycolipides ont été visualisés par coloration avec l'orcinol (Sigma).

L'analyse des glycosphingolipides neutres purifiés a été faite par spectrométrie de masse et a permis de caractériser les lipides, les sucres et la base issus de la purification des échantillons.

L'échantillon de glycolipides pour l'analyse a subi une méthanolyse dans un mélange méthanol, HCl 0,5 M, pendant 18 heures à 80°C. Puis l'acide gras est extrait avec de l'heptane. La fraction méthanolique du glycolipide est traitée avec du carbonate d'argent, et de l'acide acétique anhydre pendant une nuit. La phase méthanolique est ensuite évaporée sous azote. Cette fraction est traitée à la pyridine/bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (Sigma) pendant 1 h à température ambiante, pour une hydroxylation des hydroxyles libres.

b- Purification des glycolipides de *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*.

Nous avons utilisé une colonne de silice (silice gel 60, Merck) traitée d'abord avec du méthanol, puis par un mélange chloroforme : méthanol 2:1, et rincée plusieurs fois avec du chloroforme. Le culot de glycolipides précédemment obtenu a été séché sous azote, repris dans du chloroforme à 2 % de méthanol, puis déposé sur la colonne. L'élution a été réalisée d'abord avec du chloroforme pur puis avec du chloroforme à 2 % de méthanol. Différentes fractions ont été ainsi obtenues. La pureté des aliquotes a été vérifiée par migration sur une plaque de silice (VWR, USA).

6- Détection de la glucosylcéramide synthase par immunofluorescence indirecte

Après centrifugation des trypanosomes de culture (*T. b. brucei* AnTat 1.9), nous avons remis le culot en suspension dans du PBS et réalisé des étalements sur lames de verre. Les parasites sont fixés avec du paraformaldéhyde 4% dans du PBS pendant 30 min. Après saturation avec du sérum d'agneau 10% dans du PBS durant 30 min, les lames sont mises à incuber une heure à température ambiante avec un des anticorps anti-glucosylcéramide synthase de lapin (1/100), gracieusement mis à notre disposition par le Dr D. MARKS (Mayo Clinic And Foundation, Rochester, MN, USA). Après un lavage en PBS, des anti-Ig de lapin couplés à un fluorochrome (Alexa fluor, Molecular Probs, PoortGebouw, Pays Bas) sont ajoutés durant 30 min, dilué dans du sérum d'agneau à 10 %. Après un lavage en PBS les lames sont séchées et lues au microscope à fluorescence (Carl Zeiss S.A.S., LSM 510, Jena, Allemagne ; ou Leika DMRX, Reuil-Malmaison, France).

Des témoins négatifs sont réalisés de la même façon mais sans être incubés avec l'anticorps primaire, ceci afin de déterminer les fixations non spécifiques des anticorps conjugués.

Des contrôles isotypiques ont été réalisés en incubant des anticorps anti-Ig irrelevantes de lapin (Dako) identiques à ceux de l'anticorps primaire.

7- Dosage de la β -glucosidase dans les trypanosomes

Cette réaction a été décrite pour la première fois par Wenger et al. (1978). Nous avons réalisé une gamme étalon à partir du 4 méthylumbelliférol à différentes concentrations (0, 0,25, 0,50, 0,80 et 1 ng/mL) dans une solution d'eau et de glycine-carbonate (0,2 M, pH 10,5).

Le dosage en lui-même consistait à traiter 25 et 50 μ g de trypanosomes avec du taurocholate de sodium (0,5 M) et du Triton X-100 dans un mélange chloroforme méthanol 2:1 (v/v) et du 4 méthylumbelliférol β -D glucoside (5 mM) pendant 1 heure à 37°C et sous agitation. La réaction a été bloquée dans un bain de glace et la lecture de la fluorescence a été faite avec une excitation à 365 nm et une émission à 448 nm (FLx800 Microplate Fluorescence Reader, San Francisco, CA, USA).

8- Tests *in vitro* des inhibiteurs de la glucosylcéramide synthase

Nous avons testé différentes molécules inhibitrices de la glucosylcéramide synthase *in vitro* avant d'effectuer des tests *in vivo*. Ces molécules inhibitrices sont le kétoconazole (Sigma), le vérapamil (Sigma), la mifépristone (Sigma) et la ciclosporine (Sandimmun®, Novartis, Rueil-Malmaison, France).

Pour chaque molécule, dans 32 puits d'une plaque de 96 puits, 100 µL de milieu de Baltz modifié et supplémenté, ont été utilisés. Cent microlitres de chaque solution ont été ajoutés au premier puits et une série de 10 dilutions de raison 2 a été réalisée. Les 100 µL en excès du dernier puits ont été jetés. Deux puits contrôles ont été utilisés uniquement avec le solvant utilisé pour la dilution des molécules inhibitrices (eau stérile pour la mifépristone ou bien DMSO pour les autres molécules testées) et ont servi de contrôle de croissance des parasites (Tableau 6).

| Molécules inhibitrices | solvant | Dilutions testées (µg/mL) | | | | | | | | | | |
|------------------------|------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-----|------|-----|
| | | 1500 | 750 | 375 | 200 | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 6 | 3 | 1,5 |
| Kétoconazole | DMSO | 1500 | 750 | 375 | 200 | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 6 | 3 | 1,5 |
| Vérapamil | DMSO | 400 | 200 | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 6,25 | 3 | 1,5 | 1,25 | 1 |
| Mifépristone | H ₂ O | 800 | 400 | 200 | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 6,25 | 3 | 1,5 | 1 |
| Cyclosporine | DMSO | 1500 | 750 | 375 | 200 | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 6 | 3 | 1,5 |

Tableau 7 : Solvant de chaque molécule testée et dilutions employées pour la détermination de l'IC50

Ensuite, 100 µL de milieu contenant 10⁴ trypanosomes ont été ajoutés à chaque puits. Chaque plaque a été mise à incuber à 37°C pendant 48 h en atmosphère humide sous 5% de CO₂. Puis les trypanosomes ont été comptés dans chaque puits à l'aide d'une cellule de Malassez. Le nombre de parasites par µL a été évalué pour chaque puits contenant la solution de molécule inhibitrice et a été soustrait au nombre de parasite compté dans les puits contrôles. Le pourcentage d'inhibition a ainsi pu être évalué de la façon suivante :

$$[(\text{Nbre de trypanosomes contrôles} - \text{Nbre de trypanosomes molécules testées}) / \text{Nbre de trypanosomes contrôles}] \times 100$$

Chaque expérimentation a été réalisée trois fois. L'IC 50 a été déterminée grâce au logiciel Graphpad Prism (GraphPad Software, San Diego, USA) et grâce à la représentation

suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = f(\text{concentration en molécule testée})$$

9- Infection des souris

Les cryostabilats conservés dans l'azote liquide à -196°C et 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 des sels d'Earles, complété ou milieu de Baltz comme décrit précédemment. Les souris ont été infectées par injection intra-péritonéale de milieu contenant environ 10^4 trypanosomes par inoculum. 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.

a- Tests *in vivo* des inhibiteurs de la glucosylcéramide synthase

Nous avons infecté des souris par injection intra-péritonéale de 10^4 trypanosomes obtenus à partir du sang d'une souris préalablement infectée par *T. b. brucei* AnTat 1.9 comme décrit précédemment. Vingt quatre heures après infection des lots de 6 souris ont été traitées avec une molécule inhibitrice, un lot n'a reçu que l'excipient et a servi de contrôle. La parasitémie a été mesurée tous les jours par prélèvement de sang au niveau de la queue de l'animal.

b- Immunisation de souris

Nous avons vérifié l'effet protecteur des anticorps anti-glucosylcéramides en immunisant des souris avec l'antigène, le glucosylcéramide et le galactocébroside à titre de comparaison, en les infectant ensuite avec des formes sanguines de *T. b. brucei* AnTat 1.9 (10^4 trypanosomes/souris).

- Préparation des liposomes

Compte tenu la structure lipidique du glucosylcéramide, nous avons du immuniser les souris à l'aide de liposomes.

Vingt huit milligrammes de cholestérol (Sigma), dans 1 % d'éthanol, ont été mélangés avec 2,2 mL d'eau distillée sous une forte agitation, et 0,4 mL de glucosylcéramides (mélange de type 1 et 2 à 1 mg/mL d'éthanol) ont ensuite été ajoutés aux liposomes formés par agitation au vortex. Après addition de 6,2 mL de NaCl à 0,15 M, les liposomes ont été laissés à température ambiante durant 30 min, puis centrifugés à 500 g durant 30 min, le surnageant a été retiré puis les liposomes ont été immédiatement injectés aux animaux par voie intra péritonéale.

- Protocole d'immunisation et suivi

Pour chaque essai, 5 souris Swiss femelles âgées de 6 à 8 semaines ont reçu une première injection avec la suspension d'antigène, 50 µg, diluée au demi dans de l'adjuvant complet de Freund (Sigma), les injections suivantes étant réalisées avec de l'adjuvant incomplet de Freund (Sigma) dans les mêmes proportions. Au total 4 injections espacées de 15 jours, intra péritonéales, ont été réalisées. Le même nombre de souris contrôles recevaient les mêmes suspensions sans antigènes.

Les classes d'anticorps spécifiques (IgG ou IgM) ont ensuite été déterminées par ELISA. Vint nano-grammes de glucosylcéramide (Sigma) par puits (dans 50 µL de méthanol, éthanol ; v/v) ont été incubés + 37°C jusqu'à évaporation des solvants. Les plaques sont ensuite saturées en PBS-BSA (Bovine Sérum Albumine) 3% (200 µL/puits) à 37°C pendant 1 heure. Après un lavage en PBS, 100µL/puits de sérum de souris dilués en PBS-BSA 3% sont ajoutés durant 1 nuit à +4°C. Après 6 lavages en PBS-0,05%- Tween 20, des anticorps anti-IgG de souris ou anti-IgM de souris horse radish peroxidase (Dako, Glostrup, Danemark) sont ajoutés durant 1 heure à 37°C (100µL/puits dilution au 1:2000 en PBS). Après 6 derniers lavages, la solution de révélation est ajoutée (Ortho-Phénylène Diamine, 0,6 mg/mL, dans du tampon citrate, en présence de H₂O₂-30% ; 100 µL). Une réaction colorée se développe et est stoppée par l'addition de H₂SO₄ 8N (30µL). La DO (Densité Optique) est lue à 492 nm. Chaque échantillon est analysé en duplicate.

c- Infection des souris et suivi.

Après avoir vérifié la synthèse des anticorps correspondants (10 à 15 jours après la dernière injection), les souris immunisées et les souris contrôles ont été infectées par la forme sanguine de *T. b. brucei* AnTat 1.9 par injection intra-péritonéale de 10^4 parasites (dilués en PBS).

La parasitémie a été ensuite suivie tous les jours en prélevant au bout de la queue de la souris une goutte de sang examinée au microscope.

10- Analyses statistiques

Pour les études cytométriques et le dosage des chémokines, nous avons comparé les résultats en fonction des stades de la maladie (stade 1, stade intermédiaire et stade 2) ou par rapport aux résultats obtenus pour la population contrôle. Pour cela, un test de Mann-Withney a été utilisé pour chacun des sous-types lymphocytaires et a été considéré comme significatif pour $p < 0,05$.

Un test de Spearman a été réalisé pour comparer deux variables quantitatives 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).

Pour le test Dot Blot et ELISA, la sensibilité et spécificité des tests ont été évaluées à l'aide du logiciel EpiInfo 6.8 (CDC, Atlanta, USA).

RÉSULTATS

1- Analyse lymphocytaire dans le sang et le LCR des patients atteints de THA

a- Protocole

La méthode de cytométrie en flux a été initiée chez des patients atteints de THA, lors des travaux de thèse du Dr BODA (2005). Lors de cette étude préalable la faisabilité a été validée 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.

De la même façon, des patients des différentes prospections auxquelles nous avons participé ont été inclus dans l'étude et classés en stade selon les critères précédemment décrits. Ainsi, nous avons pu disposer du sang de 17 patients et de 13 contrôles gabonais. Pour l'étude sur les cellules du LCR 8 patients en stade 1, 8 patients en stade intermédiaire, 13 patients en stade 2 et 4 patients contrôles gabonais ont été retenus. 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 dans la THA, nous avons choisi des marqueurs 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 NK (cellules Natural Killer, CD56) afin de suivre leurs variations 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.

b- Population étudiée

Notre étude cytométrique a été réalisée sur une population de 33 patients (1 gabonais et 32 angolais) atteints de THA. Nous avons retenu les patients qui présentaient des trypanosomes dans le sang ou dans la ponction ganglionnaire et sans autre co-infections. Ces patients ont été dépistés lors de campagne de prospection en Angola (Bengo, novembre 2002 ; Zala, juin 2004) et au Gabon (Coco Beach, mai 2004) ou bien en dépistage passif à l'hôpital de Viana (Angola).

Vingt sept contrôles (19 gabonais et 8 angolais) qui ne présentaient aucune infection, ont été retenus pour cette étude.

c- Analyse du profil lymphocytaire dans le sang

Au cours de l'étude cytométrique, nous avons recherché les différents sous types lymphocytaires exprimés. Le typage lymphocytaire montre une grande variation des résultats à la fois chez les patients mais également chez les contrôles.

Le taux de lymphocytes totaux ne présente pas de différence significative entre le groupe des patients ($4392,7 \pm 1190,7$ lymphocytes/ μL) et le groupe contrôle ($4315,3 \pm 1858,6$ lymphocytes/ μL). La distribution des sous types lymphocytaires chez les patients et les contrôles est présentée dans le tableau suivant :

| Marqueurs lymphocytaires | Contrôles (n = 27) | | Patients (n = 33) | |
|--------------------------|--------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| | % de cellules | Valeurs absolues (Cellules/ μ L) | % de cellules | Valeurs absolues (cellules/ μ L) |
| CD3 | 70,64 \pm 10,33 | 3150 \pm 276 | 63,85 \pm 11,23 | 2816 \pm 198 |
| CD4 | 36,95 \pm 11,25 | 1581 \pm 136 | 34,26 \pm 10,03 | 1487 \pm 118 |
| CD8 | 23,49 \pm 11,85 | 912 \pm 87 | 23,52 \pm 17,19 | 954 \pm 117 |
| NK | 14,44 \pm 7,74 | 631 \pm 87 | 8,80 \pm 5,63 | 373 \pm 52 |
| NK-T | 8,55 \pm 4,69 | 391 \pm 53 | 4,22 \pm 3,47 | 183 \pm 32 |
| CD19 | 6,57 \pm 3,09 | 332 \pm 45 | 16,42 \pm 7,37 | 742 \pm 73 |

Tableau 8 : Répartition des types et sous types lymphocytaires dans le sang chez un groupe de patients (n = 33) atteints de THA et chez un groupe contrôle (n = 27).

Nous avons constaté une différence significative entre les valeurs des cellules trouvées chez les patients et les contrôles pour les lymphocytes T CD3⁺, les lymphocytes B CD19⁺ et pour les cellules NK ($p < 0,05$). Les valeurs de lymphocytes T CD3⁺ diminuent dans le sang des patients alors que les valeurs de lymphocytes B augmentent. En revanche, les proportions des sous populations de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sont similaires chez le groupe des contrôles et les groupes des patients (Tableau 8 et Figure 17).

Pourcentage de lymphocytes
et de NK dans le sang

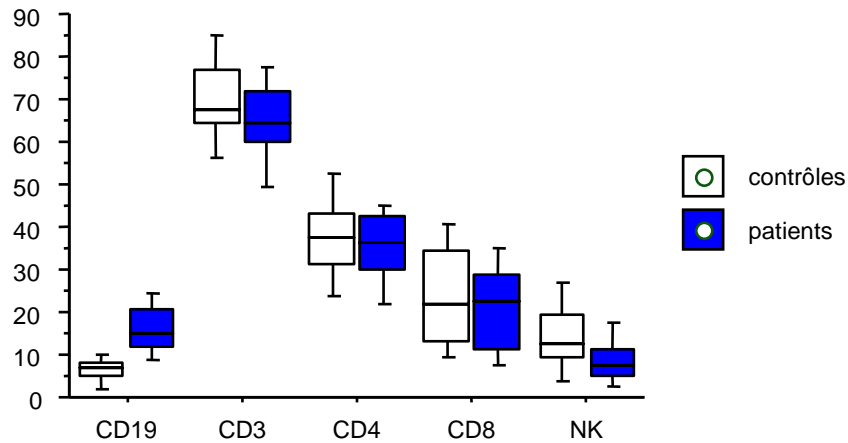


Figure 17: Représentation du taux de lymphocytes B (CD 19) et T (CD 3 et sous types CD 4 et CD 8) et des NK dans le sang de 33 patients trypanosomés (en bleu) par rapport à 27 patients contrôles africains (en blanc).

Sur la population des lymphocytes T nous avons fait une étude de l'état d'activation des sous types lymphocytaires par la présence du CD25, du CD14 et du CD69.

Pour des raisons pratiques, parmi les 27 contrôles nous avons retenu dans la suite de l'étude 13 personnes et chez les patients nous avons retenu 17 patients sur les 33 de départ.

Entre le groupe contrôle et le groupe des patients, une différence significative est observée pour les taux de CD4⁺ CD25⁺ ($p < 0,05$). On constate une diminution de l'expression de CD25 sur les CD4⁺ des patients par rapport aux contrôles. En revanche,

aucune modification de l'état d'activation des CD8⁺ n'a été observée chez les patients (pas de modification de l'expression du CD25). De même, l'expression des marqueurs CD14 et CD69 sur les lymphocytes T CD8⁺ n'a pas présenté de différence significative entre les patients et les contrôles. Dans les deux groupes, les valeurs retrouvées pour ces sous populations (CD8⁺CD14⁺, CD8⁺CD69⁺) sont inférieures à 1,3% et ont été considérées comme négligeables par rapport aux autres populations lymphocytaires (Figure 18).

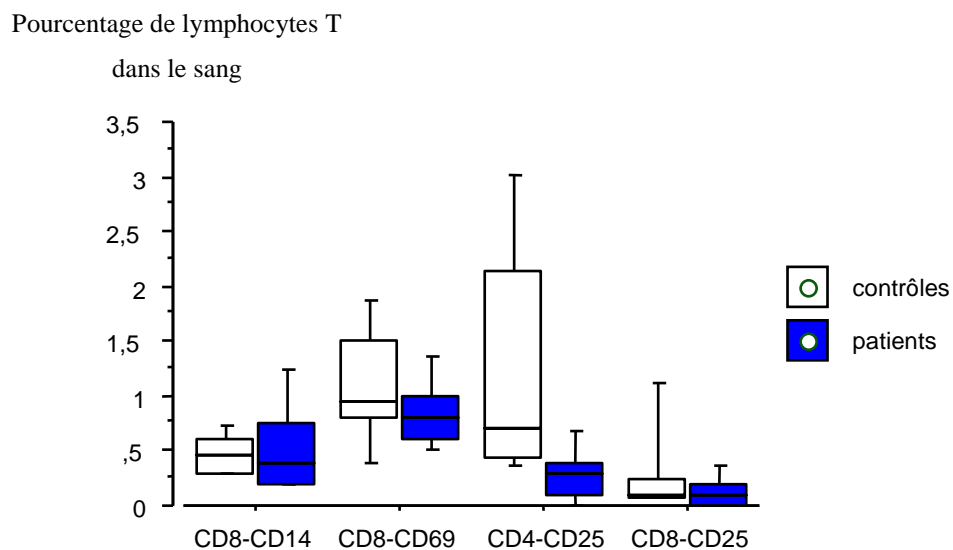


Figure 18 : Etat d'activation des lymphocytes T (marquage CD25, CD14 et CD69) entre un groupe contrôle (n =13, en blanc) et un groupe de patients atteints par la THA (n = 17, en bleu).

Une différence significative est à noter entre les contrôles et les patients pour CD4⁺ CD25⁺ (p = 0,0008). Aucune différence n'a été notée entre les deux groupes pour le CD8⁺CD25⁺.

Concernant le taux de cellules T naïves et mémoires, les taux de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves (CD45RA⁺) ne présentent pas de différence significative entre le groupe des contrôles et le groupe des patients. Néanmoins le pourcentage de lymphocytes CD4⁺CD45RA⁺ et de CD8⁺CD45RA⁺ exprimant le marqueur CD62L⁺ est plus important que le nombre de contrôles. En revanche, le taux de cellules T CD4⁺ naïves (CD45RA⁺) exprimant le CD62L⁺ (1037,4 ± 528,4 cellules/mm³ et 1474,3 ± 823,7 cellules/mm³ respectivement valeur absolu dans le groupe des contrôles et le groupe des patients) et les CD4⁺ mémoires (CD45RA⁻, 1341,0 ± 597,5 cellules/mm³ et 1909,9 ± 948,4 cellules/mm³ respectivement dans le groupe des contrôle et le groupe des patients) ne présente pas de différences significatives entre les deux groupes (Tableau 8).

| | Cellules-T (%) | | Cellules-T (cellules/μL) | |
|--|----------------|--------------|--------------------------|----------------|
| | Contrôles | Patients | Contrôles | Patients |
| CD4 ⁺ CD45RA ⁺ | 12,9 ± 6,9 | 10,3 ± 5,6 | 739,8 ± 429,9 | 416,8 ± 199,0 |
| CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ de CD4 ⁺ CD45RA ⁺ | 19,9 ± 9,0 | 30,1 ± 12,8* | 1037,4 ± 528,4 | 1474,3 ± 823,7 |
| CD8 ⁺ CD45RA ⁺ | 48,3 ± 21,1 | 41,9 ± 15,6 | 2743,6 ± 1388,6 | 1842,5 ± 757,8 |
| CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ de CD8 ⁺ CD45RA ⁺ | 12,2 ± 11,6 | 23,3 ± 12,3* | 667,6 ± 633,7 | 1072,8 ± 648,2 |
| CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁺ de CD8 ⁺ CD45RA ⁺ | 15,2 ± 12,3 | 21,2 ± 11,2 | 848,3 ± 669,1 | 988,0 ± 590,8 |
| CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁺ de CD4 ⁺ CD45RA ⁺ | 24,7 ± 12,2 | 42,8 ± 15,7* | 1341,0 ± 597,5 | 1909,9 ± 948,4 |

Tableau 9 : Différences entre les types et sous types lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ mémoires et naïfs dans le sang chez dans un groupe contrôle (n = 13) et un groupe de patients (n = 17) atteints par la THA.

(Les différences significatives avec le groupe contrôle sont notées * quand p < 0,05 par le test Mann-Whitney).

Puis nous avons recherché les sous populations de lymphocytes B et plus précisément l'expression des marqueurs CD5 et CD95 à leur surface. Les lymphocytes B exprimant le CD5 sont connus pour produire des auto-anticorps et donc participer aux phénomènes auto-immuns. Le CD95 marque une voie d'activation qui aboutit souvent à l'apoptose de la cellule. Une différence significative est observée entre les patients et les contrôles pour le CD95 qui est plus fortement exprimé sur les lymphocytes B des patients alors que les taux de cellules B CD5⁺ sont identiques dans les deux groupes (Figure 19).

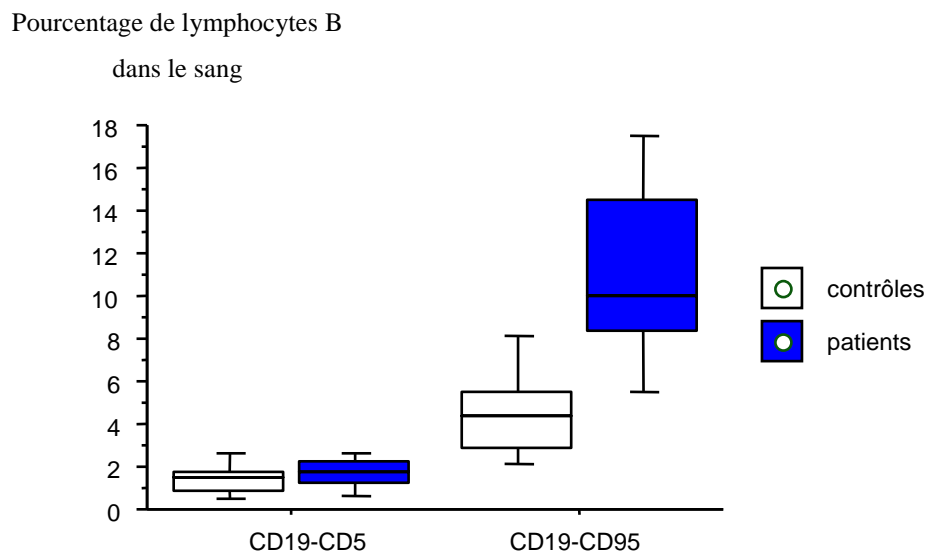


Figure 19 : Etat d'activation des lymphocytes B par le CD5 et CD19, entre un groupe contrôle (n =13, en blanc) et un groupe de patients atteints par la THA (n = 17, en bleu).

Nous avons également recherché l'état d'activation des lymphocytes B par la présence des antigènes de surface HLA-DR et CD69 (Tableau 10). Afin d'effectuer une comparaison avec l'activation des lymphocytes T précédemment étudiée, nous avons regroupé l'ensemble des valeurs obtenues pour les lymphocytes B et T dans le tableau 10. Le groupe des patients présente un taux de cellules B CD19⁺ activées (CD19⁺HLA-DR⁺, CD19⁺HLA-DR⁺CD69⁺) plus important que le taux observé chez le groupe des contrôles. Ainsi, on observe une différence dans l'état d'activation des lymphocytes B et T sanguins avec une activation préférentielle des cellules B et une diminution de l'activation des cellules T chez les patients par rapport aux contrôles.

| | Cellules T et B (%) | | Cellules T et B (cellules/ μ L) | |
|---|---------------------|-----------------|-------------------------------------|--------------------|
| | Contrôles | Patients | Contrôles | Patients |
| CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ | 23,0 \pm 4,2 | 26,9 \pm 5,0 | 1281,7 \pm 261,1 | 1233,1 \pm 480,5 |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ | 1,3 \pm 1,0 | 0,3 \pm 0,2* | 38,5 \pm 23,6 | 13,2 \pm 9,2 |
| CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ | 45,5 \pm 14,8 | 45,9 \pm 12,6 | 2527,7 \pm 791,8 | 2062,5 \pm 862,7 |
| CD8 ⁺ CD69 ⁺ | 1,2 \pm 0,5 | 1,0 \pm 0,4 | 61,4 \pm 22,8 | 37,8 \pm 10,0 |
| CD8 ⁺ CD14 ⁺ | 0,5 \pm 0,2 | 0,7 \pm 0,5 | 27,1 \pm 11,1 | 21,3 \pm 8,9 |
| CD19 ⁺ HLA-DR ⁺ CD69 ⁺ | 2,4 \pm 1,5 | 2,3 \pm 3,0* | 137,6 \pm 84,5 | 53,8 \pm 46,2 |
| CD19 ⁺ HLA-DR ⁺ | 8,7 \pm 2,3 | 17,2 \pm 5,6* | 482,7 \pm 138,4 | 822,5 \pm 341,8 |
| CD19 ⁺ CD95 ⁺ | 4,8 \pm 1,8 | 11,3 \pm 3,8* | 268,9 \pm 108,1 | 542,1 \pm 268,2 |

Tableau 10 : Différences d'activation des lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et des lymphocytes B (CD19⁺) sanguins entre un groupe contrôle (n = 13) et groupe de patients (n = 17) atteints pas la THA.

(Les différences significatives avec le groupe contrôle sont notées * quand $p < 0.05$ par le test Mann-Whitney).

Nous avons ensuite étudié la population de cellules natural killer (NK) mais aussi la sous population de lymphocytes NK-T. Ces deux types cellulaires sont impliqués dans de nombreux phénomènes de défense immunitaire innée et semblent jouer un rôle important dans la maladie de Chagas.

Le groupe des patients présente des taux de NK et NK-T ($CD8^-CD16^+$ et $CD8^+CD16^+$) plus faibles que les taux observés chez le groupe des contrôles. En revanche, les NK-T ne semblent pas particulièrement plus activés chez les patients, chez lesquels on observe un taux de $CD8^+CD16^+CD69^+$ similaire à celui du taux des contrôles (Tableau 11).

| | Cellules NK et NK-T (%) | | Cellules NK et NK-T (cellules/ μ L) | |
|---------------------|-------------------------|----------------|---|-------------------|
| | Contrôles | Patients | Contrôles | Patients |
| $CD8^-CD16^+$ | 14,4 \pm 6,1 | 8,8 \pm 4,3* | 631,9 \pm 372,7 | 373,5 \pm 195,4 |
| $CD8^+CD16^+$ | 8,6 \pm 3,6 | 4,2 \pm 3,0* | 391,0 \pm 217,1 | 241,1 \pm 194,6 |
| $CD8^+CD16^+CD69^+$ | 2,9 \pm 1,2 | 3,8 \pm 2,7 | 165,5 \pm 77,7 | 136,0 \pm 75,9 |

Tableau 11 : Différences entre les cellules NK, les cellules NK-T et les NK-T activés chez des contrôles (n = 13) et chez des patients (n = 17) atteints par la THA.

(Les différences significatives avec le groupe contrôle sont notées * quand $p < 0.05$ par le test Mann-Whitney).

En ce qui concerne le taux de cellules T CD8⁺ pré effecteurs (CD8⁺CD45RA⁻CD62L⁻), on observe des valeurs similaires dans le sang des patients et celui du groupe des contrôles. En revanche, le taux de lymphocytes T effecteurs (CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻) est significativement diminué chez les patients par rapport au taux observé chez les contrôles (Tableau 12).

| | Cellules-T (%) | | Cellules-T (cellules/ μ L) | |
|---|-----------------|------------------|--------------------------------|----------------------|
| | Contrôles | Patients | Contrôles | Patients |
| CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁻ | 87,8 \pm 11,6 | 76,7 \pm 12,4* | 4937,4 \pm 1186,7 | 3552,8 \pm 1346,1* |
| CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁻ | 84,8 \pm 12,4 | 78,7 \pm 11,1 | 4754,5 \pm 1089,4 | 3638,1 \pm 1221,6 |

Tableau 12 : Différences entre les effecteurs T CD8⁺ dans le sang d'un groupe contrôle (n = 13) et d'un groupe de patients (n = 17) atteints de THA.

(Les différences significatives avec le groupe contrôle sont notées * quand $p < 0.05$ par le test Mann-Whitney).

d- Analyse du profil lymphocytaire dans le LCR

L'analyse du profil lymphocytaire dans le LCR des patients a été comparée ici en fonction des 3 stades de la maladie : stade 1 (S-1), stade intermédiaire (S-int) et stade 2 (S-2).

Dans cette étude nous avons pu analysé 4 LCR de contrôles et 25 LCR de patients.

Statistiquement des différences ont été trouvées pour les marqueurs CD8 et CD19 entre le stade 2 de la THA et entre tous les autres stades de la maladie mais également avec la population contrôle. On constate qu'au cours de l'évolution de la maladie le taux de CD19 augmente dans le LCR des patients alors que le taux de CD8 diminue de façon très nette (Tableau 13 et Figure 20).

| | Cellules B et T (%) | | | |
|-------------------------|----------------------------|--------------------|----------------------|---------------------------|
| | Contrôles (n = 4) | S-1 (n = 8) | S-int (n = 4) | S-2 (n = 13) |
| CD3⁺ | 15 ± 6,9 | 27,9 ± 20,3* | 53,8 ± 19,6* | 40,6 ± 18,9 |
| CD19⁺ | 0,7 ± 0,5 | 4 ± 5 | 5,9 ± 5,8* | 41,1 ± 23,3* [⊠] |

Tableau 13 : Pourcentage des types lymphocytaires dans le LCR d'un groupe de contrôles (n = 4) et d'un groupe de patients atteints de THA (n = 25 patients).

(Les différences significatives avec le groupe contrôle sont notées * quand $p < 0,05$ par le test Mann-Whitney ; Les différences significatives avec le groupe S-1 sont notées \boxtimes quand $p < 0,05$ par le test Mann-Whitney ; Les différences significatives avec le groupe S-int sont notées • quand $p < 0,05$ par le test Mann-Whitney)

Pourcentage de lymphocytes
dans le LCR

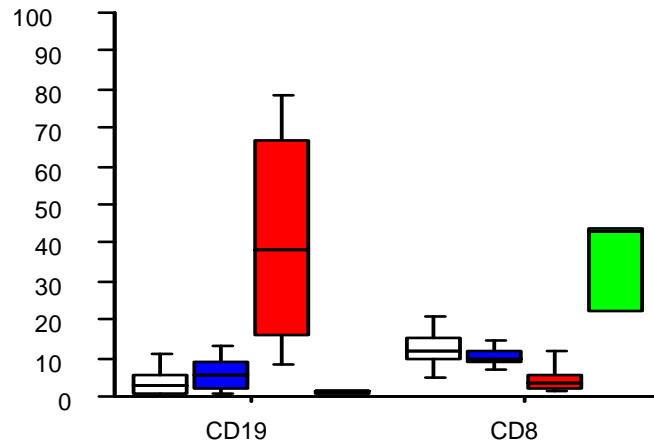


Figure 20: Représentation du taux de lymphocytes B et T dans le LCR de 8 patients en stade 1 (blanc), 4 patients en stade intermédiaire (bleu), 13 patients en stade 2 (rouge) et 4 patients contrôles (vert).

2- Analyse des chémokines et d'IL-1 β au cours de la THA

(Ces travaux font l'objet d'un manuscrit, annexe 3, soumis à Journal of infectious diseases, **Courtioux B**, Boda C, Vatunga G, Pervieux L, Josenando T, Mengue M'Eyi P, Bouteille B, Jauberteau-Marchan MO, Bisser S. Chemokine pattern in relation to disease stage in human African trypanosomiasis).

a- Population d'étude

Le dosage de chémokines a été réalisé sur une population de 57 patients provenant d'Angola et du Gabon lors de prospections réalisées en 2003 et 2004. L'âge moyen de la population était de 32 ans (de 12 à 61 ans). Vingt patients ont été classés en stade 1 (cytorachie ≤ 5 cellules/ μ L de LCR), 18 en stade intermédiaire (cytorachie comprise entre 6 et 19 cellules/ μ L de LCR) et 19 patients en stade 2 (cytorachie ≥ 20 cellules/ μ L de LCR) (Tableau 14).

Lors de ces prospections 4 patients ne présentaient aucune pathologie après examen du sang et du LCR et ont été considérés comme contrôle. L'âge moyen des contrôles était de 37 ans (de 12 à 61 ans).

| Stade | Contrôles (n = 4) | S-1 (n = 20) | S-int (n = 18) | S-2 (n = 19) |
|--|----------------------|-----------------|-------------------|---------------------|
| Cytorachie (cellules/ μ L) | 1,75 \pm 0,5 | 2,60 \pm 1,59 | 10,07 \pm 3,77 | 400,57 \pm 375,18 |
| Nombres moyen de trypanosome/ μ L de LCR | - | 0 | 2 | 9 |

Tableau 14 : Cytorachie et nombre moyen de trypanosomes dans le LCR des contrôles et de patients en fonction du stade de la maladie.

b- Détection des chémokines d'IL-8, MCP-1, MIP-1 α et RANTES et de IL-1 β chez les patients

Tous stades confondus, MIP-1 α et RANTES ont pu être détectées dans tous les sérums des patients. En revanche, IL-8 n'a pu être détectée que chez un patient (1,92%). MCP-1 et IL-1 β se sont révélés indétectables dans le sang de 20 patients (39,21%) et 23 patients (44,23%) respectivement.

Tous stades confondus, dans les LCR, MCP-1, MIP-1 α , RANTES et IL-1 β n'ont pas été détectés respectivement chez 20 patients (32,7%), 1 patient (1,63%), 12 patients (19,6%) et 12 patients (19,6%). Seule IL-8 a été détectée dans tous les LCR des patients.

c- Taux d'IL-1 β , MCP-1, MIP-1 α , IL-8 et RANTES dans les sérums des patients

Les résultats de ces chémokines et cytokines sont résumés dans le tableau 15 suivant. Dans les sérums des patients, les taux d'IL-1 β , MCP-1, MIP-1 α et IL-8 ne présentaient pas de différences significatives quel que soit le stade de la maladie.

Le taux de RANTES diminue de façon significative entre les contrôles et les patients en stade intermédiaire ($p = 0,0195$) et entre les contrôles et les patients en stade 2 ($p = 0,035$).

d- Taux d'IL-1 β , MCP-1, MIP-1 α , IL-8 et RANTES dans les LCR des patients

Les résultats de ces chémokines et cytokines sont résumés dans le tableau 15 suivant. La comparaison des concentrations en chémokines du LCR, par rapport aux sérums, des patients et des contrôles présente plus de différences significatives.

Le taux de chémokines chez les patients en stade 1 est comparable à celui des patients en stade intermédiaire.

Le taux de RANTES dans le LCR des patients ne montre pas de différence significative

quel que soit le groupe. Ce taux reste stable au cours des différents stades de la maladie.

En revanche les taux de MCP-1, IL-8, MIP-1 α et IL-1 β augmentent de façon significative entre les patients en stade 1 et les patients en stade 2 (respectivement $p = 0,013$, $p < 0,0001$, $p = 0,0004$ et $p = 0,0438$).

D'autre part les taux de MCP-1 et MIP-1 α étaient significativement plus élevés entre les patients en stade intermédiaire et les patients en stade 2 ($p = 0,0167$ et $p = 0,0005$) alors que ces taux étaient comparables entre les contrôles, les patients en stade 1 et ceux en stade intermédiaire.

Enfin, entre les contrôles et les patients en stade 2, les taux de MCP-1 et MIP-1 α augmentent de façon significative ($p = 0,0167$ et $0,0005$) (Figure 21).

| | MCP-1 (pg/mL) | | IL-8 (pg/mL) | | MIP-1 α (pg/mL) | | RANTES (pg/mL) | | IL-1 β (pg/mL) | |
|-------------------------------|------------------|---------------------|-----------------|----------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|-------------------|-------------------------|---------------------|
| | sérums | LCR | Sérums | LCR | Sérums | LCR | Sérums | LCR | Sérums | LCR |
| Stade 1 (n = 20) | 445 (0-5059) | 1857 (1139-2513) | 550 (0-2012) | 12 (0-173) | 278 (0-1132) | 0,11 (0-2,12) | 105688 (57-211550) | 0 | 2,60 (0,41-8,20) | 0,32 (0,01-0,78) |
| Stade int (n = 18) | 82 (0-371) | 2102 (1519-2949) | 450 (0-1660) | 25 (0-198) | 248 (0-1704) | 013 (0-2,41) | 65335 (74-185300) | 0 | 1,23 (0,31-2,40) | 0,32 (0-1,07) |
| Stade 2 (n = 19) | 26 (0-149) | 3187 (701-4565) | 176 (0-993) | 170 (0-351) | 206 (0-1226) | 34,08 (0-187,41) | 74198 (0-209050) | 5,04 (0-95,82) | 0,95 (0,70-2,09) | 1,28 (0-9,52) |
| Contrôles (n = 4) | 28 (0-115) | 1974 (701-4565) | 37 (0-118) | 0 | 62 (7-178) | 0 | 166675 (128300-188425) | 75 (0-300) | 1,03 (0,42-1,43) | 0,23 (0,21-0,25) |

Tableau 15 : Taux de MCP-1, IL-8, MIP-1 α , RANTES et IL-1 β dans le sérum et LCR de patients en fonction du stade de la THA, et chez 4 patients contrôles.

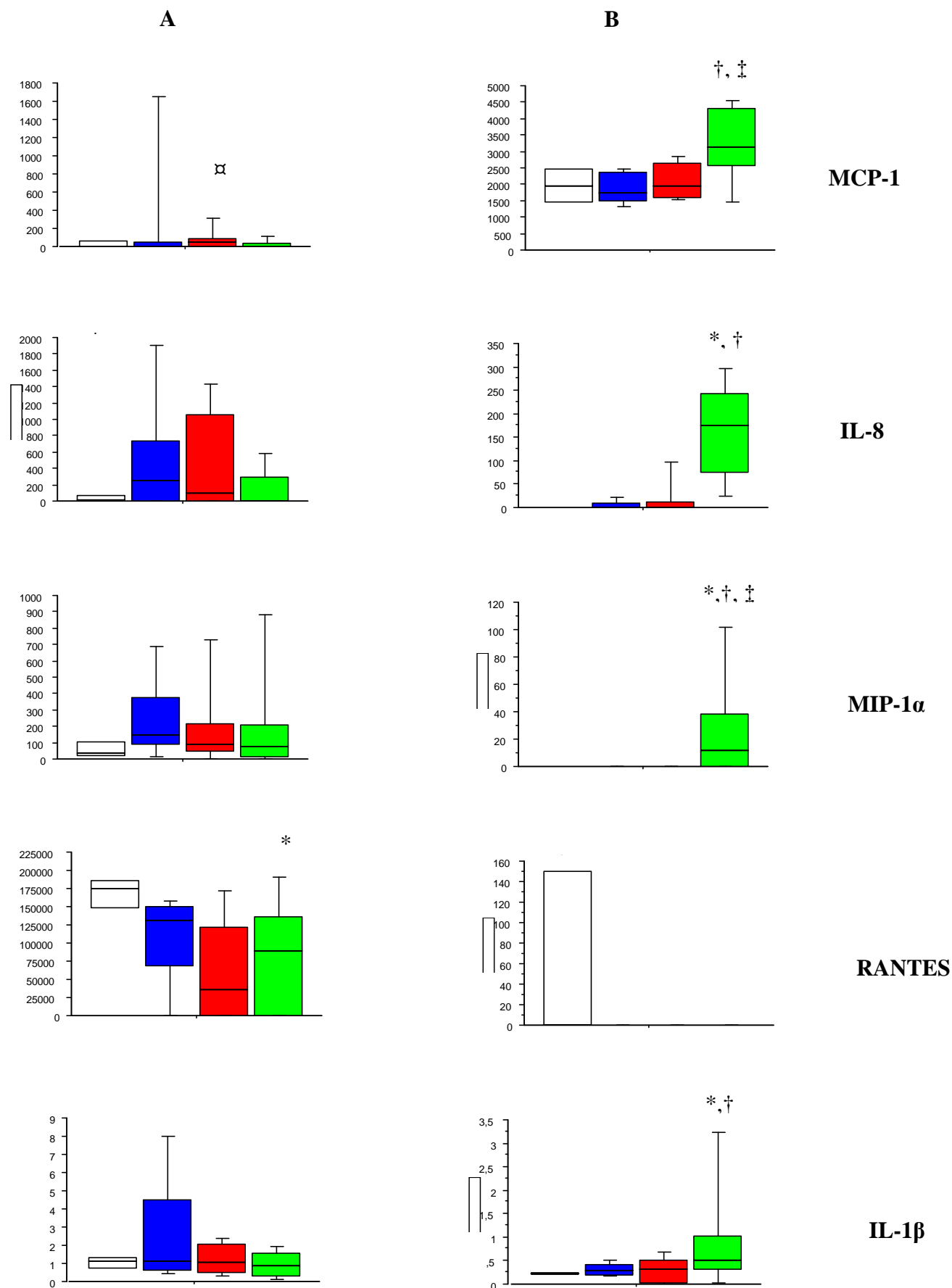


Figure 21 : Taux de chémokines dans le sérum (A) et LCR (B) en fonction du stade de la maladie.

En blanc figure les contrôles, en bleu les stades 1, en rouge les stades intermédiaires et en vert les stades 2. stade 1 (bleu), stade intermédiaire (rouge), stade 2 (vert) et groupe contrôle (blanc). Les valeurs sont exprimées en pg/mL. A-Dans le sérum, B-Dans le LCR.

* différence significative entre les contrôles et S-2, α différence significative entre les contrôles et S-int, † différence significative entre S-1 et S-2, ‡ différence significative entre S-int et S-2.

e- Corrélation entre le taux de chémokines et la présence du parasite dans le LCR

En fonction de la présence ou non du parasite, lorsque sa recherche a été effectuée, nous avons cherché si le taux de chémokines dans le LCR des patients était modifié. Ainsi le taux d'IL-8 est augmenté dans le LCR des patients qui présentent des parasites ($p = 0,0034$). Il en est de même pour la cytokine IL-1 β ($p = 0,0003$). Nous ne notons pas de corrélation entre les taux de MCP-1, MIP-1 α , RANTES et la présence du parasite dans le LCR (Figure 22).

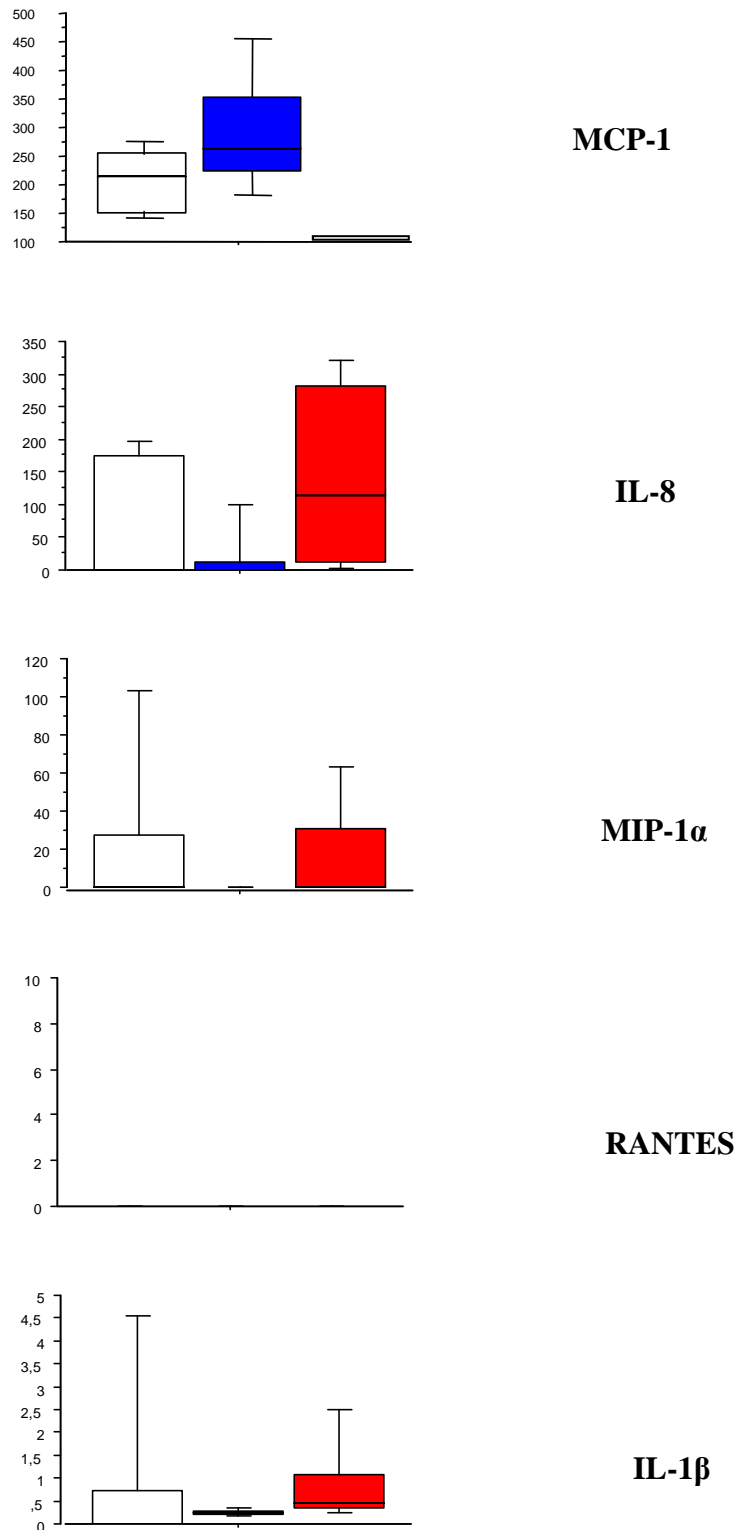


Figure 22 : Comparaison du taux de chemokines, MCP-1, IL-8, MIP-1 α , RANTES, IL-1 β chez les patients en stade 2, en fonction de la présence (rouge) ou non (bleu) du trypanosome dans le LCR.

En blanc figure le taux de chemokines chez les patients pour qui le parasite n'a pu être recherché. Les valeurs sont exprimées en pg/mL.

f- Etude de la corrélation des chémokines dans le sang et le LCR des patients

Les résultats des corrélations pour chaque chemokine et entre chaque stade de la maladie sont présentés dans les tableaux suivants.

- Dans le sérum (Tableau 16) :

Au cours de stade 1, nous observons que le taux d'IL-8 corrèle de façon significative avec les taux d'IL-1 β ($r = 0,7$, $p = 0,02$), de MCP-1 ($r = 0,68$, $p = 0,03$). De plus, le taux de MCP-1 corrèle avec le taux de MIP-1 α ($r = 0,6$, $p = 0,04$).

En stade intermédiaire le taux d'IL-8 corrèle avec le taux de MIP-1 α ($r = 0,54$, $p = 0,04$).

Au cours du stade 2, aucune corrélation n'est observée.

| contrôles | IL-1 β | IL-8 | MCP-1 | MIP-1 α | RANTES |
|----------------|--------------|--------------|--------------|----------------|--------|
| IL-1 β | 1 | | | | |
| IL-8 | 0,95 0,09 | 1 | | | |
| MCP-1 | 0,80 0,16 | 0,85 0,14 | 1 | | |
| MIP-1 α | 1 0,08 | 0,95 0,09 | 0,80 0,16 | 1 | |
| RANTES | 0,40 0,48 | 0,25 0,66 | 0 > 0,99 | 0,40 0,48 | 1 |

| Stade 1 | IL-1 β | IL-8 | MCP-1 | MIP-1 α | RANTES |
|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------|
| IL-1 β | 1 | | | | |
| IL-8 | 0,7 0,02 | 1 | | | |
| MCP-1 | 0,5 0,05 | 0,68 0,03 | 1 | | |
| MIP-1 α | 0,13 0,66 | 0,34 0,21 | 0,60 0,04 | 1 | |
| RANTES | 0,20 0,52 | - 0,36 0,19 | 0,20 0,50 | - 0,45 0,09 | 1 |

| Stade int | IL-1 β | IL-8 | MCP-1 | MIP-1 α | RANTES |
|----------------|--------------|--------------|--------------|----------------|--------|
| IL-1 β | 1 | | | | |
| IL-8 | 0,35 0,42 | 1 | | | |
| MCP-1 | 0,71 0,11 | 0,61 0,13 | 1 | | |
| MIP-1 α | 0,41 0,35 | 0,54 0,04 | 0,58 0,15 | 1 | |
| RANTES | 0,48 0,27 | 0,28 0,30 | 0,17 0,66 | 0,33 0,23 | 1 |

| Stade 2 | IL-1 β | IL-8 | MCP-1 | MIP-1 α | RANTES |
|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------|
| IL-1 β | 1 | | | | |
| IL-8 | 0,57 0,13 | 1 | | | |
| MCP-1 | 0,38 0,31 | 0,40 0,25 | 1 | | |
| MIP-1 α | 0,60 0,11 | 0,43 0,06 | 0,04 0,89 | 1 | |
| RANTES | 0,16 0,65 | - 0,32 0,17 | 0,18 0,60 | 0,06 0,79 | 1 |

Tableau 16 : Corrélacion entre les taux de IL-1 β , IL-8, MCP-1, MIP-1 α et RANTES pour chaque groupe (contrôles, S-1, S-int, S-2).

- Dans le LCR (Tableau 17) :

Pour les contrôles le taux de chemokine MIP-1 α corrèle avec les taux de 4 autres : IL-1 β ($r = 0,56$, $p = 0,01$), IL-8 ($r = 0,49$, $p = 0,01$), RANTES ($r = 0,86$, $p < 0,0001$) et MCP-1 ($r = 0,5$, $p = 0,02$). Le taux d'IL-8 corrèle avec le taux de RANTES ($r = 0,49$, $p = 0,01$).

Au cours de stade 1 les corrélations sont identiques à celles retrouvées chez le groupe des contrôles.

En stade intermédiaire, le taux d'IL-8 corrèle avec le taux d'IL-1 β ($r = 0,7$, $p = 0,01$) et le taux de RANTES ($r = 0,61$, $p = 0,01$).

Enfin, en stade 2, le taux d'IL-8 corrèle avec les taux de MCP-1 ($r = 0,62$, $p = 0,04$) et de RANTES ($r = 0,47$, $p = 0,04$) et le taux de MIP-1 α corrèle avec le taux de IL-1 β ($r = 0,81$, $p = 0,001$) et de MCP-1 ($r = 0,66$, $p = 0,03$).

| contrôles | IL-1 β | IL-8 | MCP-1 | MIP-1 α | RANTES |
|----------------|---------------|--------------|--------------|------------------|--------|
| IL-1 β | 1 | | | | |
| IL-8 | 0,07 0,73 | 1 | | | |
| MCP-1 | -0,01 0,94 | 0,24 0,28 | 1 | | |
| MIP-1 α | 0,56 0,01 | 0,49 0,01 | 0,50 0,02 | 1 | |
| RANTES | 0,40 0,07 | 0,49 0,01 | 0,36 0,10 | 0,86 < 0,0001 | 1 |

| Stade 1 | IL-1 β | IL-8 | MCP-1 | MIP-1 α | RANTES |
|----------------|----------------|--------------|--------------|------------------|--------|
| IL-1 β | 1 | | | | |
| IL-8 | 0,07 0,73 | 1 | | | |
| MCP-1 | - 0,17 0,94 | 0,24 0,28 | 1 | | |
| MIP-1 α | 0,56 0,01 | 0,49 0,01 | 0,50 0,02 | 1 | |
| RANTES | 0,40 0,07 | 0,49 0,01 | 0,36 0,10 | 0,86 < 0,0001 | 1 |

| Stade int | IL-1 β | IL-8 | MCP-1 | MIP-1 α | RANTES |
|----------------|----------------|--------------|--------------|----------------|--------|
| IL-1 β | 1 | | | | |
| IL-8 | 0,70 0,01 | 1 | | | |
| MCP-1 | - 0,45 0,22 | 0,17 0,05 | 1 | | |
| MIP-1 α | 0,22 0,44 | 0,47 0,05 | 0,50 0,13 | 1 | |
| RANTES | 0,50 0,07 | 0,61 0,01 | 0,50 0,13 | 0,50 0,13 | 1 |

| Stade 2 | IL-1 β | IL-8 | MCP-1 | MIP-1 α | RANTES |
|----------------|---------------|--------------|--------------|----------------|--------|
| IL-1 β | 1 | | | | |
| IL-8 | 0,35 0,16 | 1 | | | |
| MCP-1 | 0,50 0,15 | 0,62 0,04 | 1 | | |
| MIP-1 α | 0,81 0,001 | 0,45 0,54 | 0,66 0,03 | 1 | |
| RANTES | 0,42 0,10 | 0,47 0,04 | 0,50 0,11 | 0,49 0,03 | 1 |

Tableau 17 : Corrélacion entre les taux de IL-1 β , IL-8, MCP-1, MIP-1 α et RANTES dans le LCR pour chaque groupe (contrôles, S-1, S-int, S-2).

3- Induction de l'apoptose *in vitro* sur des cellules microgliales et endothéliales par le LCR de patients atteints de THA

Au cours de notre travail de recherche nous avons contribué à la compréhension des mécanismes apoptotiques induits par le LCR des malades en stade 2.

Girard M, Bisser S, **Courtioux B**, Vermot-Desroches C, Bouteille B, Wijdenes J, Preud'homme JL, Jauberteau MO. *In vitro* induction of microglial and endothelial cell apoptosis by cerebrospinal fluids from patients with human African trypanosomiasis. *Int J Parasitol.* 2003 ; 33 : 713-720.

Résumé :

Au cours de la trypanosomose humaine africaine, les trypanosomes se développent d'abord dans le sang et la lymphe (stade 1), puis envahissent le système nerveux central (stade 2). La rupture de la barrière hémato-méningée, mal connue, se produit au cours du stade 2 de la maladie. L'hypothèse que le liquide céphalo rachidien (LCR) des patients africains trypanosomés pourraient contenir un (des) facteur(s) capable d'induire l'apoptose sur des cellules endothéliales nous a menés à évaluer cet effet par deux méthodes, la méthode TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling) et la mesure des nucléosomes solubles par ELISA. L'induction de l'apoptose par les LCR a été étudiée avec les cellules microgliales et des macrophages qui participent à la protection de la barrière hémato-méningée dans la région périvasculaire. Contrairement aux LCR contrôles, le LCR des patients africains trypanosomés induit l'apoptose des cellules microgliales et endothéliales. Les résultats obtenus avec les deux méthodes corrélerent, et ont prouvé que des LCR en stade 2 induisent l'apoptose avec des cellules microgliales, tandis que le stade de la maladie n'influe pas sur l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales. Nous avons mesuré le ligand soluble de Fas (sFasL) et le taux d'anticorps anti-Fas (deux inducteurs potentiels de la voie de signalisation de Fas conduisant à l'apoptose) dans le LCR de patients africains trypanosomés et de contrôles. Le LCR des patients en stade 2 contient plus de sFasL que les patients en stade 1, et les anticorps anti-Fas ont été détectés uniquement chez les patients en stade 2. L'effet inhibiteur de la caspase-8 et les données statistiques suggèrent que d'autres facteurs pro-apoptotiques seraient impliqués dans les effets apoptotiques de certains LCR. L'induction de l'apoptose participerait à la pathogénie de la trypanosomose africaine, et la présence de sFasL et d'anti-Fas pourraient fournir de nouveaux outils pour le diagnostic et le pronostic de la maladie.

4- Activation des cellules endothéliales en présence de trypanosome africain

Au cours de notre travail de thèse nous avons contribué au travail portant sur le rôle de certaines molécules parasitaires sur l'activation des cellules constitutives de la barrière hémato-méningée.

Girard M, Giraud S, **Courtioux B**, Jauberteau-Marchan MO, Bouteille B. Endothelial cell activation in the presence of African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 2005 ; 139 : 41-49.

Résumé :

Au cours de la trypanosomose humaine africaine, les trypanosomes (*Trypanosoma brucei gambiense* et *T. b. rhodesiense*) envahissent le système nerveux central (SNC). Les mécanismes de rupture de la barrière hémato-méningée demeurent inconnus. Pour comprendre la relation entre les trypanosomes et les cellules endothéliales qui sont les principales cellules de ces barrières, nous avons cultivé une lignée humaine de cellules endothéliale de moelle osseuse (HBMEC) avec et sans *T. b. gambiense* pour étudier leurs activations. Comme l'indique la translocation de NF-kappaB vers le noyau, les cellules ont été activées en présence des trypanosomes. L'expression des molécules d'adhérence ICAM-1, E-sélectine et VCAM-1 sont augmentées dans la co-culture. Les parasites induisent la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6, l'IL-8 et monoxyde d'azote (NO) par les HBMEC. Des cellules ont été également cultivées en présence des glycoprotéines variables de surfaces de parasite (VSG) ; une augmentation du TNF- α , d'IL-6, d'IL-8, et de NO a également été observée. Les VSGs solubles induisent la translocation de NF-kappaB et l'expression des molécules d'adhérence indiquent qu'elles pourraient probablement être les facteurs solubles moléculaires responsables de l'activation des cellules endothéliales. Le coefficient de perméabilité des HBMEC a augmenté quand les cellules ont été cultivées en présence des trypanosomes, du surnageant de culture de parasite, ou de VSG. Ainsi, *T. b. gambiense* peut activer les cellules endothéliales *in vitro*, par le relargage de facteurs solubles. Les conséquences de l'activation endothéliale des cellules par des produits du parasite peuvent inclure une potentialisation de la réaction inflammatoire, le recrutement de leucocytes, le passage des trypanosomes dans le SNC, et le dysfonctionnement de la barrière durant le stade neurologique de la THA.

5- Tests ELISA et Dot Blot.

Dot-ELISA for a more reliable human African trypanosomiasis staging

Courtioux B, Bisser S, M'belesso P, Ngoungou E, Girard M, Nangouma A, Josenando T, Jauberteau-Marchan MO, Bouteille B. Dot enzyme-linked immunosorbent assay for more reliable staging of patients with Human African trypanosomiasis. *J Clin Microbiol.* 2005 ; 43 : 4789-4795.

Résumé :

La trypanosomose humaine africaine ou maladie du sommeil est une pathologie caractérisée par un stade hémolympatique (stade 1) suivi d'un stade méningo-encéphalitique qui est fatal en l'absence de traitement spécifique. En outre, en raison de la toxicité des traitements utilisés en stade 2 (en particulier le mélarsoprol) le diagnostic de stade doit être précis. Les anticorps anti-neurofilament (NF) et anti-galactocébroside (GalC) ont été identifiés dans le LCR comme des marqueurs potentiels du stade nerveux de la maladie. Nous avons développé une technique de dot-ELISA pour détecter ces anticorps anti-GalC et anti-NF et étudier leur valeur dans le diagnostic de stade. Les membranes de nitrocellulose sensibilisées aux NF et aux GalC ont été développées en laboratoire. Ensuite elles ont été testées sur le terrain en Angola et en République Centrafricaine sur 140 échantillons. Par rapport à nos critères de stade (*i.e.* cytorachie ≥ 20 cellules/ μ L, concentration en IgM dans le LCR ≥ 100 mg/L et/ou présence de trypanosomes dans le LCR), la détection des deux anticorps anti-NF et anti-GalC dans le LCR par dot-ELISA montre 83,2% de sensibilité et 100% de spécificité. Le dot ELISA pourrait être très utile pour la détermination du stade nerveux de la THA dans les campagnes de prospection où le personnel médical de terrain est peu équipé.

6- Résultats de l'analyse de la structure glycolipidique du trypanosome

a- Mise en évidence du sucre et de la base

La chromatographie en couche mince nous a permis de mettre en évidence un monohéxosylcéramide et un dihexosylcéramide. La concentration du dihexosylcéramide semble être plus importante chez *T. b. brucei* AnTat 1.9 que chez *T. b.gambiense* MBA (Figure 23).

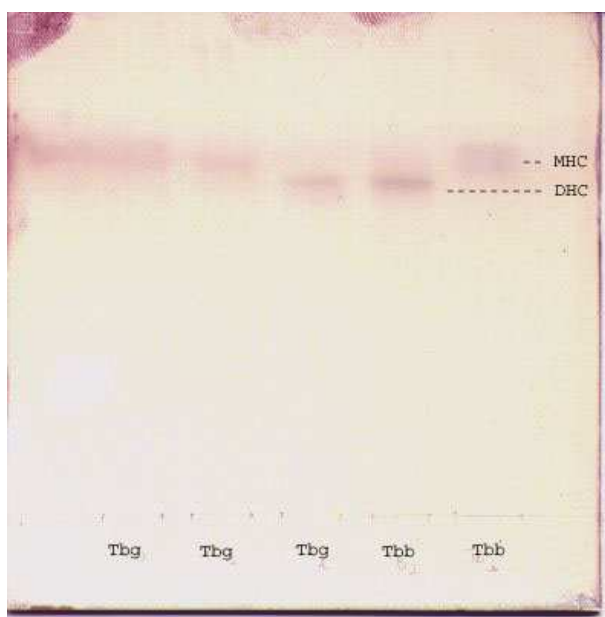


Figure 23 : Chromatographie en couche mince des glycolipides purifiés extraits de *T. b. brucei* AnTat 1.9 (*Tbb*) et de *T. b. gambiense* MBA (*Tbg*).

MHC : monohéxosylcéramides ; DHC : dihexosylcéramides

Nous avons ensuite déterminé la masse et la composition des échantillons de glycolipides respectivement par spectrométrie de masse et par chromatographie gazeuse. La masse des échantillons à cette étape a été déterminée et a donné pour chaque échantillon : *T. b. gambiense* : 687 m/z, *T. b. rhodesiense* : 659 m/z, *T. b. brucei* : 687 m/z, et pour le contrôle que nous avons utilisé *T. cruzi* : 778 m/z. Ces masses moléculaires ne correspondent pas à la masse moléculaire classique d'un sucre et de sa base et nous pouvons en conclure que les

échantillons n'étaient pas purs et qu'ils devaient être contaminés par la présence de phospholipides (Figure 24).

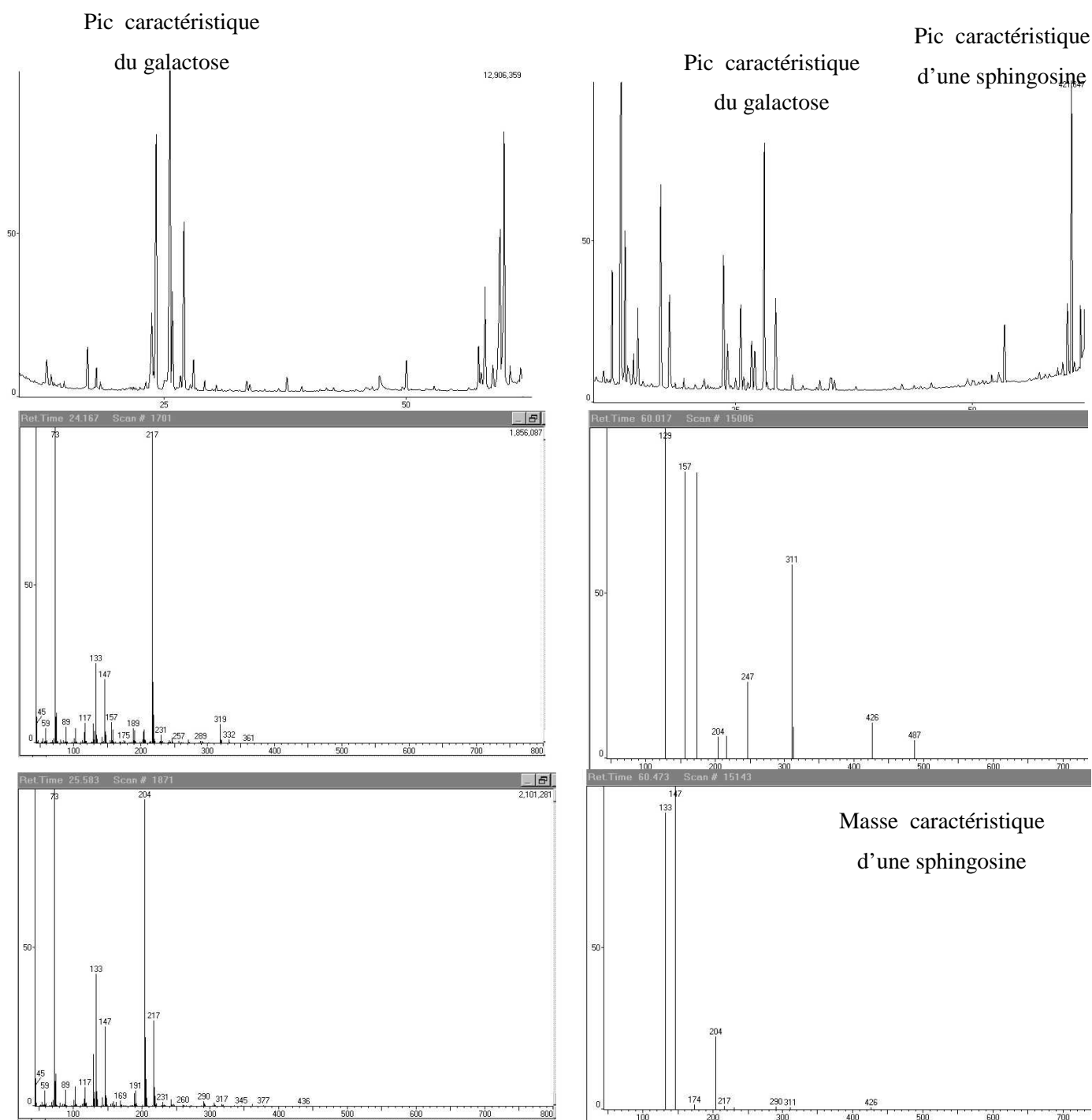


Figure 24: Résultats de la spectrométrie de masse d'échantillons de *T. b. b. AnTat 1.9*

A ce stade nous pouvions conclure que le lipide majoritaire était un acide myristique, la base glycolipidique semblait être une sphingosine et que les deux sucres majoritaires étaient du glucose et du galactose.

b- Marquage par immunofluorescence indirecte de la glucosylcéramide synthase

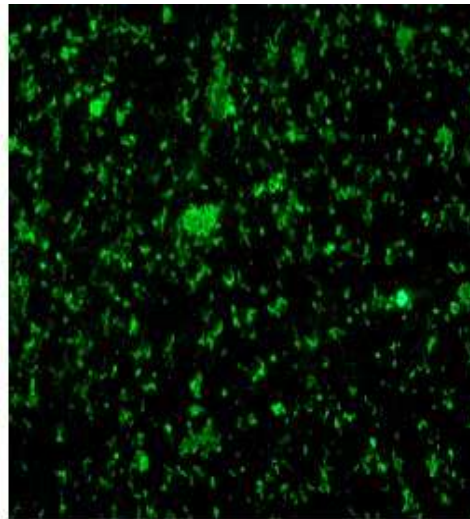
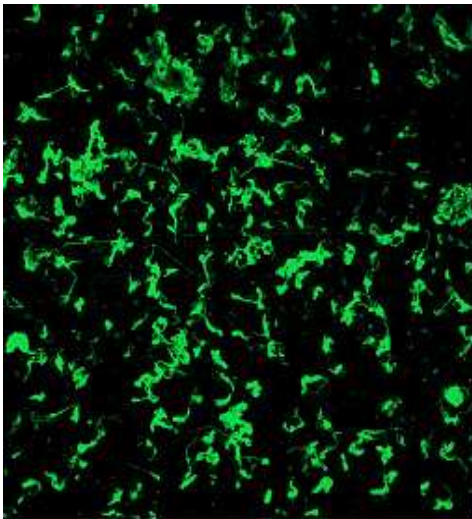
Nous avons utilisé deux types d'anticorps anti-glucosylcéramide synthase :

- GCS 1.2, qui reconnaît la partie carboxy-terminale de la glucosylcéramide synthase humaine.
- GCS 5.2, qui reconnaît la partie N-terminale de la glucosylcéramide synthase humaine.

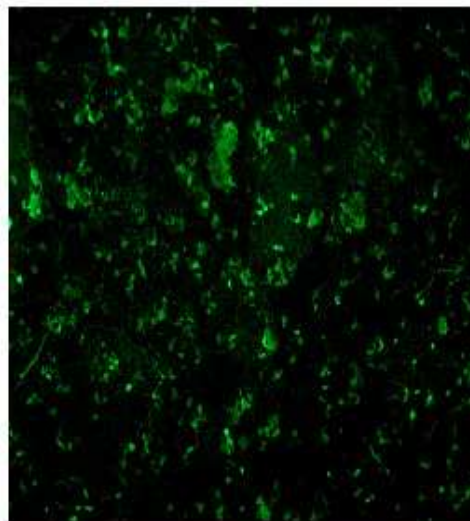
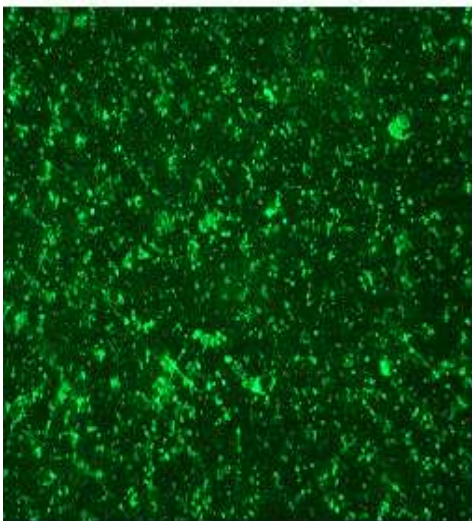
Pour tester ces anticorps sur *T. b. brucei* AnTat 1.9, nous avons procédé à deux traitements, avec et sans perméabilisation au méthanol glacial de la membrane du parasite. Le marquage que nous avons obtenu est plus intense lorsque la membrane du parasite a été perméabilisée avec du méthanol glacial. L'anticorps qui reconnaît le mieux les constituants de la membrane est GCS 5.2 (Figure 25, (Grossissement par microscopie confocale X 400)).

Membrane du parasite

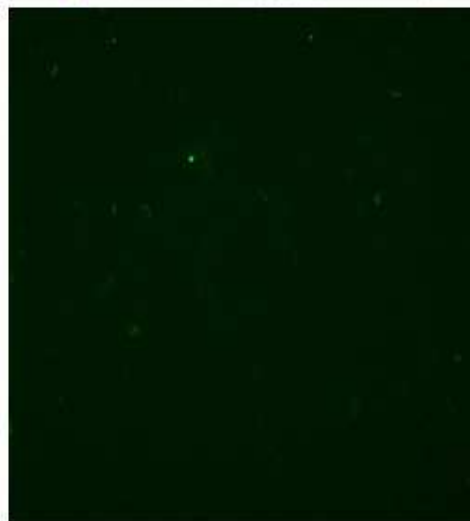
Membrane du parasite non perméabilisée



Anticorps
anti-GCS 5.2



Anticorps
anti-GCS 1.2



Contrôles conjugués

Figure 25 : Immunofluorescence indirecte sur *T. b. brucei* AnTat 1.9 avec des anticorps anti-glucosylcéramide synthase (GCS 5.2) révélés par des anticorps anti Ig de lapin marqués FITC.

Lorsque nous observons à plus fort grossissement le marquage, nous constatons que certaines zones du parasite sont plus marquées que d'autres. Ce marquage semble correspondre aux crêtes mitochondriales du trypanosome (Figure 26).

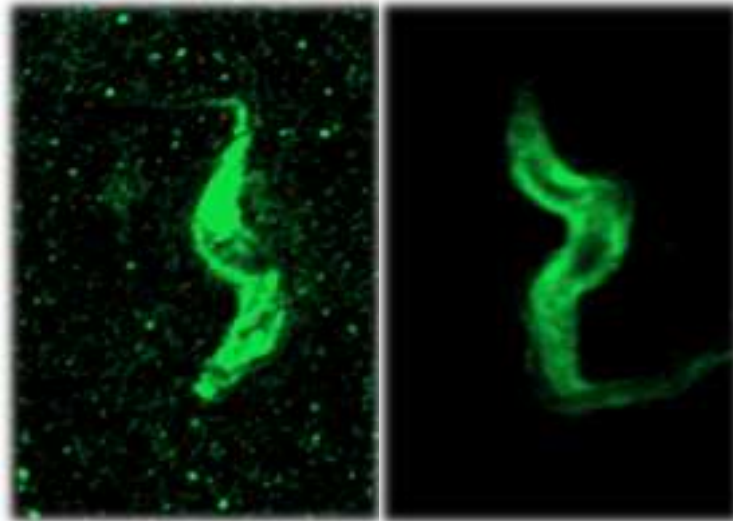


Figure 26 : Immunofluorescence indirecte sur *T. b. brucei* AnTat 1.9 avec l'anticorps anti-glucosylcéramide synthase (GCS 5.2) révélés par des anticorps anti Ig de lapin.

(Grossissement par microscopie confocale X 600).

c- Dosage de l'activité de la glucosylcéramide synthase

Nous avons réalisé le dosage de l'activité glucosylcéramide synthase grâce à un produit émettant une fluorescence lorsqu'il n'est pas couplé à une molécule de glucose. Ainsi le 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucoside lorsqu'il est métabolisé par la glucosylcéramide synthase donne le 4 méthylumbelliférol. Ce dernier excité à 365 nm émet une fluorescence à 448 nm.

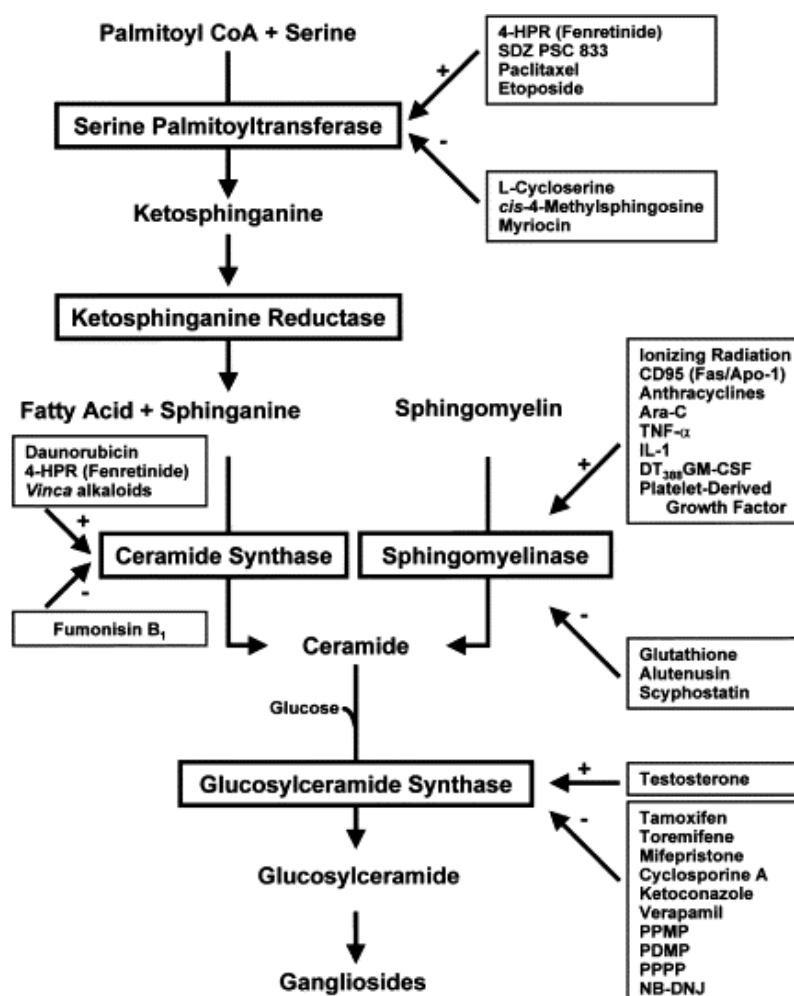
Ainsi lors des différents dosages nous avons obtenu respectivement 1,25 ; 2,30 et 0,95 nmol de glucosylcéramide / heure / mg de trypanosome *T. b. brucei* AnTat 1.9. Soit une moyenne de 1,50 nmol de glucosylcéramide / heure / mg de trypanosome.

Ce dosage a permis de mettre en évidence une activité enzymatique glucosylcéramide synthase chez *T. b. brucei* AnTat 1.9.

d- Inhibition de la synthèse du glucosylcéramide

Parmi les inhibiteurs reconnus de la glucosylcéramide synthase nous en avons testé quatre, tout d'abord *in vitro* puis *in vivo* sur des souris infectées par *T. b. brucei* AnTat 1.9 (Figure 27).

Figure 27 : Voie de synthèse des gangliosides, et inhibiteurs potentiels de chaque étape d'après Bleicher et Cabot, 2002.



Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à quelques inhibiteurs agissant directement sur la glucosylcéramide synthase : le vérapamil, le kétoconazole, la mifépristone et la ciclosporine A. Chaque molécule testée *in vitro* nous a permis de déterminer son IC50 avec *T.b. brucei* AnTat 1.9 (Figure 28).

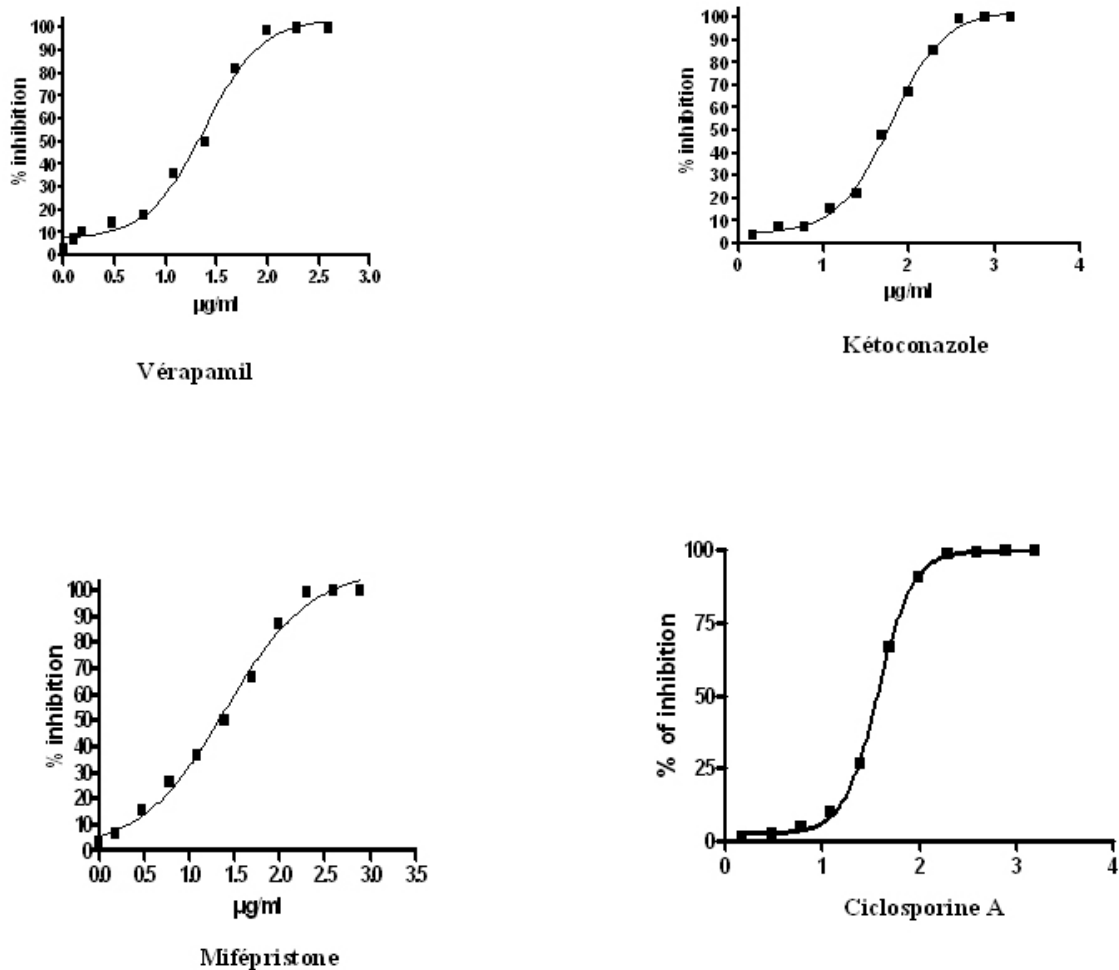


Figure 28 : Représentation de la concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de Vérapamil, Kétoconazole, Mifépristone et ciclosporine A en fonction du pourcentage d'inhibition de la croissance de parasites *T. b. brucei* AnTat 1.9.

Les IC50 pour chaque inhibiteurs ont été calculées de la même façon que pour les travaux auxquels nous avons participé sur le bleu de méthylène (Annexe : Trypanocidal activity of methylene blue: evidence for *in vitro* efficacy and *in vivo* failure in trypanocidal activity, Boda et coll., *soumis*)

Dans notre étude nous avons obtenu les IC50 suivantes (en μM):

L'IC50 correspondant au vérapamil avec des cultures de *T. b. brucei* AnTat 1.9 est de 239,6 $\mu\text{g/mL}$ soit $0,48 \pm 0,077\mu\text{M}$.

L'IC50 correspondant au kétoconazole avec des cultures de *T. b. brucei* AnTat 1.9 est de 621,1 $\mu\text{g/mL}$ soit $0,13 \pm 0,033 \mu\text{M}$.

L'IC50 correspondant à la mifépristone avec des cultures de *T. b. brucei* AnTat 1.9 est de 252 mg/mL soit $0,586 \pm 0,09 \mu\text{M}$.

L'IC50 correspondant à la ciclosporine A avec des cultures de *T. b. brucei* AnTat 1.9 est de 376 $\mu\text{g/mL}$ soit $0,312 \pm 0,04 \mu\text{M}$.

e- Effet des inhibiteurs de la synthèse du glucosylcéramide *in vivo*

Des lots de 6 souris ont été traités par voie intra-péritonéale avec les différents inhibiteurs testés *in vivo*. Seule la ciclosporine A à 50 $\mu\text{g/mL}$ a présenté un effet intéressant, malgré la mauvaise tolérance observée. Chez les souris infectées et traitées à la ciclosporine, après une augmentation de la parasitémie comparable à celle des souris contrôles, les parasites du sang ont progressivement disparu après bout de la deuxième injection intra-péritonéale. Pendant 4 semaines, aucun parasite n'a été observé dans le sang. A la 5^{ème} semaine post-infection des parasites sont réapparus dans le sang des animaux (Tableau 18).

| Molécules inhibitrices | IC50 | Doses employées chez la souris en IP | Nombre de jours de survie après traitement |
|------------------------|----------------|--------------------------------------|--|
| Kétoconazole | 0,13 ± 0,03 µM | 25 µg/mL | 5 jours |
| Vérapamil | 0,48 ± 0,07 µM | 30 µg/mL | 5 jours |
| Mifépristone | 0,58 ± 0,09 µM | 50 µg/mL | 5 jours |
| Ciclosporine A | 0,31 ± 0,04 µM | 50 µg/mL | 30 jours |

Tableau 18 : Résultats *in vitro* et *in vivo* des inhibiteurs de la glucosylcéramide synthase.

f- Résultats de l'immunisation des souris par du glucosylcéramide et de galactocérebrosides

Un lot de 5 souris a été immunisé avec des liposomes de glucosylcéramide commercial et un deuxième lot contrôle a été immunisé uniquement avec des liposomes de cholestérol (sans antigène) qui constituait l'excipient. A la fin des séries d'injections, la titration du taux d'IgG et IgM dans le sérum des souris a été réalisée. Au bout d'un mois et demi, on note une très forte production d'IgM dans les sérums des souris immunisées par les glucosylcérebrosides et galactocérebrosides par rapport aux contrôles. Ceci est révélateur d'un possible effet protecteur du glucosylcéramide (Figure 29).

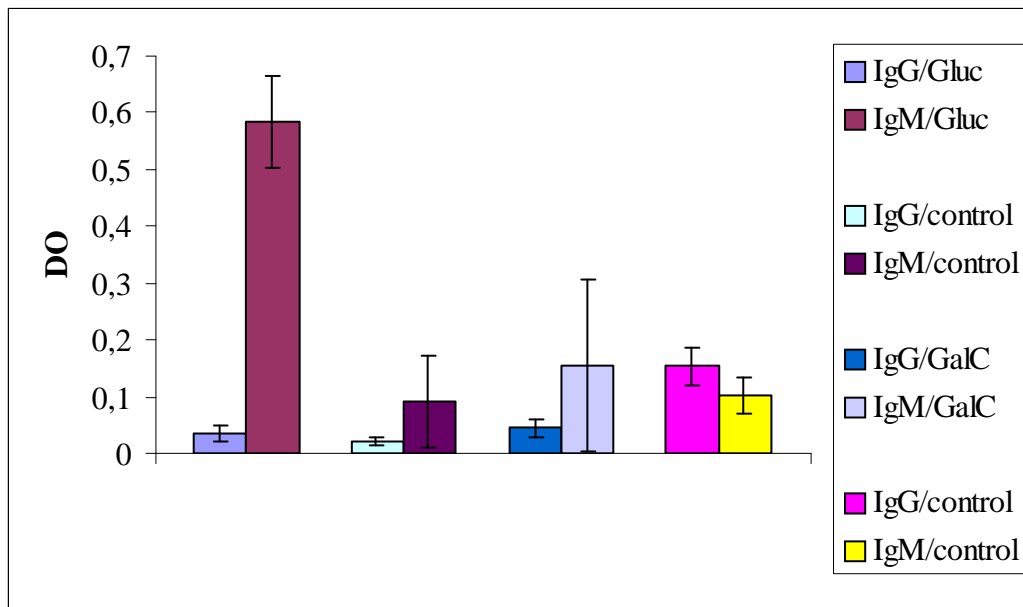


Figure 29 : Les deux types d'Ig testées dosés (IgG et IgM) après immunisation par deux antigènes, glucosylcéramides (GluC) et galactocérébrosides (GalC) et leurs contrôles respectifs sur des lots de 5 souris.

(DO = densité optique)

g- Suivi de l'immunisation des souris par du glucosylcéramide

Deux souris du lot immunisé avec du glucosylcéramide ont été choisies au hasard pour être infectées par *T. b. brucei* AnTat 1.9. Ces deux souris, après avoir présenté une parasitémie comparable à celles des souris infectées contrôles, ont montré 5 jours *post*-infection une disparition des parasites du sang. Dix mois après l'infection ces deux souris sont encore vivantes et ne présentent aucun symptôme de la maladie.

DISCUSSION

L'objectif principal de notre travail de thèse était l'étude des mécanismes inflammatoires au cours de la trypanosomose humaine africaine et leurs applications en diagnostic et en thérapeutique. Pour comprendre ces mécanismes nous avons eu pour objectifs secondaires l'étude des types lymphocytaires et leur état d'activation dans le sang et le LCR de malades aux différents stades de la maladie, l'étude du franchissement de la barrière hémato-méningée par les cellules immunes des patients en stade neurologique, la détection de façon spécifique et sensible d'anticorps au stade neurologique de la THA et enfin l'analyse des structures glycolipidiques du trypanosome vraisemblablement responsable de la synthèse de certains anticorps spécifiques du stade neurologique.

A l'heure actuelle, le seul critère de certitude du diagnostic de stade neurologique de la THA est la présence du parasite dans le LCR. Néanmoins, la difficulté et l'inconstance de cette détection chez les malades en stade 2 avéré, a conduit à définir un autre critère, moins spécifique, basé sur la cytorachie supérieure à 5 ou 19 éléments/ μL de LCR. L'augmentation du taux de lymphocytes dans le LCR fait suite à une activation du système immunitaire par la présence des parasites dans le sang, puis dans le LCR. En revanche, aucun élément n'est actuellement connu au sujet des types lymphocytaires qui sont spécifiquement produits ou activés au cours de l'infection. Dans ce travail, nous avons réalisé pour la première fois une étude du phénotypage cellulaire dans le sang et le LCR afin de mieux comprendre la physiopathologie de l'infection mais aussi de distinguer une spécificité cellulaire de la maladie susceptible d'aboutir à un critère de stade. Pour cela, nous avons utilisé une technique d'étude très précise, la cytométrie en flux, suffisamment sensible pour analyser des fluides biologiques contenant 1 cellule/ μL .

Par cette technique nous avons montré que dans le sang des malades, tous stades confondus, le taux de lymphocytes B augmentent de façon significative ($p < 0,0001$). En revanche, le taux de lymphocyte T diminue de façon significative ($p < 0,0018$), de même que le taux de NK ($p < 0,0226$). Ces phénomènes ont déjà été décrits mais sont donc confirmés

dans ce travail par la technique de cytométrie en flux (Hudson et coll., 1976 ; Corsini et coll., 1977; Jayawardena et Waksman, 1977). Ils ont été mis en évidence expérimentalement chez la souris mais également récemment dans une étude chez le primate (Boda, 2005).

D'autre part, l'augmentation des lymphocytes B permet d'expliquer la grande diversité d'anticorps produits chez les patients atteints de THA.

Par cette étude nous montrons l'implication des différents types cellulaires dans la réponse immune contre le parasite mais les modifications qui surviennent dans le sang ne permettent pas de distinguer précisément les stades de la maladie. Ainsi l'analyse du LCR reste l'outil indispensable au diagnostic de phase. En revanche, nous ne retrouvons pas de caractère d'activation des lymphocytes T CD8⁺ avec les marqueurs que nous avons utilisés et la population activée de lymphocytes T CD4⁺ (CD4/CD25) se trouve diminuée chez les patients. Ceci confirme le caractère immunosuppresseur de la maladie sur les lymphocytes T. Ils ne constituent donc pas une population lymphocytaire intéressante à étudier pour le diagnostic de la THA. Aussi, dans la suite de notre étude qui a porté sur l'analyse du LCR, nous n'avons pas recherché précisément les différentes sous-populations de lymphocytes T ni leur activation, mais nous avons plutôt cherché à dénombrer le taux de lymphocytes B en fonction du stade.

Les taux de T CD4⁺ et de CD8⁺ (HLA-DR⁺) naïfs sont similaires dans le sang des malades et des contrôles. Cependant, l'utilisation de l'isoforme du CD45 pour la discrimination entre les cellules naïves et mémoires n'est pas suffisante puisque la population de CD45RA⁺ regroupe des cellules qui présentent un phénotype mémoire tel que l'absence du marqueur CD62L (Roederer et coll., 1995 ; Zimmermann et coll., 1996). Les cellules T CD8 englobent au moins trois sous-populations de cellules mémoires (cellules exprimant seulement le CD45RA ou le CD62L, et celles n'exprimant ni l'un ni l'autre) et une sous-population de cellules naïves (cellules exprimant à la fois le CD45RA et le CD62L). Les cellules T CD4 ont deux sous-populations principales de cellules mémoires : dans les deux cas les cellules n'expriment pas le CD45RA, mais dans un groupe elles expriment le CD62L et dans l'autre pas. Les cellules T CD4⁺ naïves quant à elles, expriment le CD45RA mais pas nécessairement le CD62L (Roederer et coll., 1995). Dans notre étude, le sang des patients trypanosomés montre des valeurs plus élevées de T CD4⁺ et de T CD8⁺ exprimant à la fois le CD62L et le CD45RA que les valeurs observées dans le sang du groupe contrôle. Ceci traduit

une augmentation des cellules T naïves dans le sang des patients. Ceci peut indiquer la stimulation continue du système immunitaire avec de nouveaux variants antigéniques comme il est généralement décrit au cours de l'infection à trypanosomes. Or, on sait que les lymphocytes T naïfs, une fois stimulés par un antigène, se différencient en lymphocytes mémoires puis en lymphocytes effecteurs qui sont indispensables à une protection rapide, efficace et durable (Fearon et coll., 2001; Ahmed et coll., 1996). Ainsi l'augmentation de cellules naïves dans le sang des patients peut traduire un défaut de cellules mémoires et effectrices et pourrait expliquer la réponse immune inefficace et non-protectrice observée au cours des THA. De plus, l'expression de CD62L sur des cellules T, qui est le récepteur du recrutement cellulaire dans les ganglions lymphatiques, contribue au recrutement des lymphocytes dans le système lymphatique où le parasite prolifère.

L'immunosuppression du système immunitaire au cours de la THA est connue mais n'a pas encore été caractérisée au niveau lymphocytaire. L'activation immunitaire peut être altérée pendant l'infection mais peut également changer l'homéostasie des sous-populations T (Ho et coll., 1995; Mohri et coll., 1998). Les résultats de notre étude montrent des valeurs très basses des cellules T $CD4^+CD25^+$ dans le sang des patients par rapport au groupe contrôle. On sait que parmi les cellules T $CD4^+CD25^+$ s'individualise une sous-population de lymphocyte T régulateurs qui expriment constitutivement le CD25 (Cabrera et coll., 2004; Takahata et coll., 2004). Les cellules T $CD4^+CD25^+$ sont les cellules régulatrices qui diminuent la réponse immune de type T et jouent un rôle dans la prévention de l'autoimmunité. Par un mécanisme de contact cellulaire, les cellules T $CD4^+CD25^+$ empêchent l'immunostimulation des cellules de T en sécrétant des cytokines immunosuppressives tels que l'IL-10 et le TGF- β . La diminution des cellules T régulatrices pourrait mener au développement de réactions auto-immunes comme c'est le cas dans le lupus érythémateux (Crispin et coll., 2003). Dans la trypanosomose, la diminution des cellules T $CD4^+CD25^+$ peut expliquer les réactions auto-immunes qui sont bien connues dans cette pathologie au cours de laquelle on a identifié des auto-anticorps dirigés contre des constituants du tissu cardiaque, des érythrocytes, du neurofilament des galactocérobrosides. D'autre part, aucune activation n'a pu être mise en évidence sur les cellules T des patients, (absence de phénotype $CD14^+$, $CD69^+$, $CD8^+CD25^+$ et taux de HLA-DR $^+$ comparable à celui des contrôles), suggérant une immunosuppression des cellules T.

En revanche, les valeurs des cellules B activées (CD19⁺HLA-DR⁺) se sont révélées bien plus élevées dans le sang des patients que dans celui des contrôles. De plus, le marqueur Fas (CD95) est surexprimé sur les cellules B, ce qui suggère une activation cellulaire par le CD95 suivie d'une apoptose des lymphocytes B. Or, la THA se caractérise d'un point de vue de la réponse immune par une activation polyclonale des lymphocytes B qui prolifèrent spontanément et produisent des grandes quantités d'anticorps. Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence qu'une activation des cellules B marquée par la surexpression de l'antigène HLA-DR se produit au cours de l'infection à *T. b. gambiense* et qu'elle est concomitante d'un état immunosuppresseur en faveur de l'apoptose des lymphocytes B. Ces deux phénomènes ont précédemment été décrits au cours de la phase aiguë de l'infection à *T. cruzi* (Minoprio et coll., 1989; Zuniga et coll., 2000). Les lymphocytes B qui ne peuvent échapper à l'apoptose ne se différencient pas ensuite en cellules mémoires qui constituent le pool de lymphocytes B mémoires. Une fois encore, ces mécanismes empêchent le système immunitaire de mettre en place une défense efficace et durable contre les parasites. Des études précédentes réalisées chez la souris infectée par *T. cruzi* montrent que la cytokine IL-4 est capable de réduire le phénomène d'apoptose sur les lymphocytes B mais aussi de favoriser leur différenciation en cellules mémoires, ce qui améliore la réponse protectrice de l'organisme hôte (Acosta Rodriguez, 2003).

Dans cette partie nous avons pu faire une analyse discriminative du profil lymphocytaire en fonction du stade de la maladie. En effet en stade 1 ou hémolympatique, la cytorachie étant normale, elle ne permet pas de traduire un état pathologique ou une altération du système nerveux central. En revanche lors du stade neurologique, la cytorachie devient suffisamment élevée pour étudier le profil lymphocytaire.

Au cours de l'évolution de la maladie, le taux de CD19 augmente de façon significative dans le LCR des patients, permettant de distinguer les patients en stade intermédiaire qui sont les plus difficiles à classer d'un point de vue du stade d'évolution où ils se trouvent. Cette augmentation de CD19 chez les patients en stade 2, pourrait constituer un critère de stade plus précis et surtout plus précoce que la cytorachie ; elle permet d'envisager un test permettant le diagnostic du stade de la maladie. Il faudrait compléter ces résultats par une étude identique mais sur un effectif plus large. De plus, il serait intéressant de préciser les

sous-populations de lymphocytes B présents dans le LCR et leur état d'activation afin de déterminer si un sous-type particulier pourrait constituer un critère de spécificité.

Le recrutement de ces lymphocytes dans le système nerveux central pourrait être le fait de facteur chimio-attractant produit localement à l'origine de la migration des cellules vers les foyers inflammatoires qui s'y développent en stade 2 de la maladie.

Pour la première fois à notre connaissance, nous avons pu réaliser une étude du profil chémokinique sur des patients atteints de THA à différents stades de la maladie. Cette étude a été réalisée à la fois dans le sérum des malades mais également dans le LCR.

Dans le sérum des patients quel que soit le stade de la maladie, on ne note pas de modifications significatives du taux de MIP-1 α , MCP-1, IL-8 ou bien de IL-1 β . Seul le taux de RANTES semble diminué lors de l'évolution de la maladie de manière significative entre les contrôles et les patients en stade intermédiaire et entre les contrôles et les patients en stade 2 (respectivement $p = 0,01$ et $0,03$). Cette différence de concentration entre le début hémolympatique de la maladie et son stade neurologique semble traduire une diminution progressive de la réaction inflammatoire tout du moins en dehors du système nerveux central.

Afin de comprendre la relation entre les différentes chémokines impliquées dans cette réponse inflammatoire, nous avons cherché des corrélations entre les taux de chémokines et le taux de cytokine IL-1 β . Pour les sérums des patients en stade 1, une corrélation est évidente entre le taux d'IL-1 β et le taux d'IL-8 seulement. Pour les sérums des patients en stade intermédiaire seule une corrélation entre IL-8 et MIP-1 α a été mise en évidence.

Les chémokines dans le sérum ne semble pas être de bon marqueur de stade de la maladie, puisque aucune d'entre elles ne semblent prédominer par rapport aux taux que l'on trouve chez les contrôles.

Dans le LCR des patients on note une différence significative entre les taux contrôles, ceux des patients en stade 1 ou en stade intermédiaire et celui des patients en stade 2 pour IL-1 β , IL-8, MCP-1, RANTES et MIP-1 α . Cette différence est la plus importante pour IL-8, MCP-1 et MIP-1 α qui sont des cytokines chimiotactiques impliquées dans le mécanisme de recrutement des lymphocytes dans le système nerveux central.

Le taux de MCP-1 α dans le LCR est 10 fois supérieur au taux dans le sérum. Ce taux élevé a déjà été identifié dans les méningites purulentes, la tuberculose et certaines maladies virales (Mastroianni et coll., 1998 ; Press et coll., 2003 ; Grygorczuk et coll., 2004 ; Moller et coll., 2005). Cette chémokine est impliquée dans l'infiltration des monocytes dans le LCR. IL-8 de la même façon est retrouvée en très grande quantité dans le LCR des patients en stade neurologique. IL-8, en plus de son action sur les neutrophiles, est également un chémoattractant sur différentes sous-populations de lymphocytes. RANTES n'a pu être mis en évidence dans le LCR des malades malgré sa présence dans celui des contrôles tout comme dans certaines méningites d'origine bactérienne ou virale (Sprenger, 1996). Comme dans le sérum, le rôle de cette chemokine peut être très fugace car son taux peut décliner rapidement après le début de l'inflammation. Ou bien de façon plus simple cette chemokine n'a peu ou pas de rôle dans le recrutement des lymphocytes dans le système nerveux central. Enfin, IL-1 β , qui favorise l'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales et la libération de différentes chémokines, facilite l'entrée de leucocytes dans les espaces subarachnoïdaux. De plus le rôle d'IL-1 β est très important car c'est un des facteurs impliqués dans la synthèse des chémokines (Aloisi et coll., 1992).

Au cours de la THA on note une forte migration des lymphocytes dans le LCR des patients en stade 2. Le mécanisme exact du passage de ces cellules à travers la barrière hémato-meningée n'est pas clairement établi chez l'homme. Actuellement il est certain que des cellules ont la capacité de franchir cette barrière encore intacte (Hickey et coll., 1978; Lawson et coll., 1992). L'invasion massive des lymphocytes au cours de la THA n'est pas uniquement la conséquence de l'état inflammatoire induit par l'altération de la barrière hémato-meningée et l'action des chémokines produites dans le système nerveux central : le TNF- α , les facteurs apoptotiques et le parasite lui-même contribuent à ce phénomène en étant les initiateurs de la rupture de la barrière.

La production de chémokines par des cellules du système nerveux central tels les astrocytes, la microglie et les oligodendrocytes a été démontrée par Benveniste en 1992 et Mucke en 1993. Les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β sont capables d'induire la production d'IL-8 directement par les astrocytes (Aloisi et coll., 1992) et même d'induire MCP-1 dont la production serait d'origine astrocytaire (Ransohoff et coll., 1993).

Lors d'infection du système nerveux central, les astrocytes entrent généralement en contact avec les cellules endothéliales et avec les cellules de la microglie ; elles sont les premières cellules à lutter contre l'infection. L'induction de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 β , qui induit l'adhésion moléculaire sur les cellules endothéliales et la production de chémokines, facilite l'entrée de lymphocytes dans le système nerveux central. Par la suite la production massive de chémokines dans le LCR amplifie le phénomène de migration lymphocytaire dans le système nerveux central.

D'après nos résultats, MCP-1 pourrait donc être un marqueur de stade en raison des taux élevés trouvés dans le LCR des patients en stade 2 que nous avons étudié. De plus, cette augmentation significative est corrélée avec les propriétés connues de cette chemokine dans les processus infectieux.

La présence de ces chémokines dans le LCR des patients n'est pas le seul facteur avancé pour décrire le passage des cellules immunitaires dans le système nerveux central des malades.

Le mécanisme précis d'induction de l'apoptose des cellules microgliales et endothéliales par le LCR des patients trypanosomés africains reste à déterminer, et pourrait différer d'un type cellulaire à l'autre.

Les LCR de patients en stade 2 induisent l'apoptose sur les cellules endothéliales et les cellules microgliales. Les LCR des patients en stade 2 contiennent du sFasL et des anticorps anti-Fas, à des taux plus élevés que dans le LCR des patients en stade 1 et que dans celui des contrôles. Ceci suggère que sFasL et/ou les anticorps anti-Fas pourraient être des facteurs pro-apoptotiques dans la THA. Le ligand soluble FasL présent dans le LCR des patients en stade 2 pourrait être impliqué dans le mécanisme de l'apoptose, en particulier au niveau des cellules microgliales. En effet, les cellules de la microglie sont plus sensibles que les cellules endothéliales à l'induction de l'apoptose par le LCR des patients qui contiennent des taux élevés de sFasL

La présence de facteurs et l'activité pro-apoptotique est associée à l'évolution de la maladie, à certaines lésions et participent à la rupture de la barrière hémato-méningée. Le dosage de sFasL et des anticorps anti-Fas peut ainsi servir de marqueur de la rupture de la barrière hémato-méningée et donc au diagnostic de stade de la maladie.

En effet l'apoptose des cellules microgliales pourrait participer à la rupture de la barrière hémato-méningée et permettre aux trypanosomes d'échapper à la réaction immunitaire, de la même façon que *T. cruzi* induit l'apoptose des cellules T et de B dans la maladie de Chagas (Lopes et Dos Reis, 1995 ; Lopes et coll., 1995 ; Zuniga et coll., 2000 ; Reina-San-Martin et coll., 2000).

L'apoptose des cellules microgliales a été fréquemment rapportée *in vitro* et *in vivo* dans des modèles expérimentaux de sclérose en plaques où la voie de Fas/FasL est impliquée (Frigeiro et coll., 2000 ; Spanaus et coll., 2000 ; Lee et coll., 2000 ; Badie et coll., 2000).

Les résultats obtenus avec les cellules endothéliales diffèrent de manière significative, suggérant un mécanisme d'induction apoptotique différent. L'apoptose des cellules endothéliales ne semble pas être associée à la rupture de barrière hémato-méningée. Les cellules vasculaires endothéliales expriment FasL et l'expression de Fas est augmentée par l'interféron IFN- γ et le TNF- α . Cependant, elles peuvent résister à l'induction de l'apoptose induite par la voie de Fas. La voie de signalisation Fas n'est pas le mécanisme dominant induit par le LCR des malades, ceci confirme l'hypothèse que le LCR contient d'autres facteurs pro-apoptotiques.

Fas seul n'induit pas l'apoptose des cellules vasculaires endothéliales. Des facteurs additionnels, tels que les lipoprotéines de faible densité oxydées sont nécessaires (Sata et Walsh, 1998). Les sphingolipides peuvent également induire l'apoptose des cellules endothéliales en activant la voie de la sphingomyélinase (Hisano et coll., 1999).

La participation hypothétique de TNF- α dans l'effet apoptotique du LCR, peut être discutée. En effet, le TNF- α a été détecté à des niveaux très bas dans le LCR des patients avec ou sans propriétés apoptotiques. En outre, comme dans notre étude, aucune différence significative des niveaux de TNF- α dans le LCR n'a été détectée entre les stades 1 et 2 de la THA. Ces données présument que le TNF- α n'a pas un rôle essentiel dans l'effet apoptotique du LCR sur les cellules en culture.

L'origine du sFasL dans le LCR des patients africains atteints de THA est inconnu et peut résulter d'un épissage alternatif et d'un clivage par une métalloprotéase d'une protéine de membrane (Mitsiedas et coll., 1998). Par conséquent, la présence d'anticorps anti-Fas dans le

LCR des patients africains atteints de THA peut être liée à la réaction inflammatoire et pourrait bloquer ou activer l'apoptose.

Quant à la présence des anticorps anti-Fas, elle a été rarement rapportée dans la littérature : taux faible dans le sérum des sujets normaux et au cours d'une maladie neurodégénérative, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Prasad et coll., 1998 ; Yi et coll., 2000). Il existe une relative spécificité cellulaire dans le caractère agoniste de ces auto-anticorps. Ceux des sujets normaux sont apoptotiques au niveau lymphocytaire, ceux des patients atteints de SLA sont apoptotiques au niveau des motoneurones. Ces données rejoignent celles de notre étude où nous observons des différences d'effets apoptotiques au niveau cellulaire entre la microglie et les cellules endothéliales. La signalisation intracellulaire et notamment l'expression d'inhibiteurs, ainsi que des modifications post-traductionnelles de Fas permet d'expliquer ces différences fonctionnelles selon le type cellulaire. L'origine de l'induction de ces anticorps est également à discuter et pourrait résulter d'un mécanisme de mimétisme moléculaire avec le trypanosome, ce qui reste à déterminer.

L'apoptose des cellules pourrait participer aux lésions de la barrière hémato-méningée et pourrait jouer un rôle dans les lésions de cérébrales observées lors du stade nerveux de la maladie. Les rôles et les origines du sFasL de LCR et les anticorps anti-Fas restent à étudier, pour déterminer leur implication dans la pathologie.

Le trypanosome a la capacité d'augmenter l'expression des molécules impliquées dans l'adhérence des cellules, et la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires. Cette activation des cellules passe par la voie d'activation de NF- κ B comme le montre la translocation de la sous-unité active de NF- κ B vers le noyau en présence du parasite. Dans la cellule, cette activation est probablement suivie de la transcription de divers gènes, y compris les gènes des cytokines TNF- α et IL-1 β ou de la NO synthase (Goldfeld et coll., 1990 ; Kopp et Ghosh, 1995), dont la transcription est sous le contrôle du facteur NF- κ B.

L'activation des cellules endothéliales en présence des trypanosomes a également été montrée par une augmentation de l'expression des molécules d'adhérence. Leur expression peut être une conséquence de l'activation de NF- κ B (Chen et Manning, 1995). Les HBMEC exprime ICAM-1 en condition basale, tandis que l'expression de cette protéine augmente

fortement en présence des parasites. Les E-selectine et VCAM-1 ont été détectées à la surface des cellules après des co-cultures de 12 h. Il est établi qu'ils sont habituellement absentes des cellules endothéliales non stimulées, et que leur expression est importante en réponse aux médiateurs inflammatoires tels que TNF- α , IL-1 β et IFN- γ (Lee et Benveniste, 1997 ; Lum et Roebuck, 2001).

In vitro les trypanosomes peuvent activer la synthèse de tels facteurs dans le milieu de culture, qui, en retour, activent l'expression de ces molécules d'adhérence. Nos observations sont confirmées par une étude réalisée sur le cerveau des rats infectés par *T. b. brucei*. Il a été mis en évidence une augmentation de l'expression de ICAM-1 et VCAM-1, sans rupture des jonctions serrées, quand les parasites sont au contact de la BHM (Mulenga et coll., 2001). Nous pouvons présumer que l'expression des molécules d'adhérence est liée à la présence des parasites qui activent de façon très précoce les cellules endothéliales voisines avant l'inflammation.

Les conséquences de cette expression sont nombreuses, car le rôle des molécules d'adhérence est modifié et peut altérer la réponse endothéliale pendant l'inflammation. Les E-sélectines (et également P et L-sélectines), ICAM-1 et VCAM-1 stimulent la prolifération de leucocytes, l'activation de cellules, et la synthèse de cytokine (principalement TNF- α , IL-8). Ces molécules interagissent avec la matrice extracellulaire et le cytosquelette, pour initier les mécanismes cellulaires d'activation (Granger et Kubes, 1994 ; Lorenzon et coll., 1998 ; Krieglstein et Granger, 2001 ; Radi et coll., 2001 ; Vestweber et coll., 2002).

Nos expériences ont prouvé que les trypanosomes induisent la synthèse d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- α par des facteurs solubles présents dans les surnageants de culture. Le TNF- α produit au cours de la THA, stimule la synthèse d'IL-6, la perméabilité endothéliale, et les astrocytes (Cavaillon et coll., 1993 ; Munoz-Fernandez et Fresno, 1998 ; Pentreath, 1999). Des taux élevés d'IL-8 sont retrouvés dans le LCR des patients présentant des lésions cérébrales, en corrélation avec le dysfonctionnement de la BHM (Cavaillon et coll., 2003). Par conséquent, l'activation endothéliale de cellules en présence des trypanosomes peut augmenter l'inflammation par la synthèse de ces cytokines pro-inflammatoires. Ils peuvent aider à recruter les cellules immunisées, et participent à la perméabilisation des barrières.

Les HBMEC en présence des trypanosomes produisent également du NO, par l'activation de la NO synthase, comme le montre l'inhibition par L-NAME. La synthèse du NO fait partie de la réponse des cellules endothéliales aux agents infectieux. Nos résultats signalent que les trypanosomes modifient la perméabilité des cellules HBMEC *in vitro*.

De nombreux facteurs du parasite peuvent être responsables de l'activation des HBMEC dans les co-cultures cellules-parasites, et les VSGs solubles semblent être de bons candidats. Dans nos expériences, les VSGs ont les mêmes effets sur les cellules que les trypanosomes. Ils ont un effet déjà connus pour l'induction de la NO synthase des macrophages, et pour leur rôle modulateur de l'activation des macrophages en réponse à l'IFN- γ . Le surnageant de culture de *T. b. gambiense* induit également l'activation endothéliale de cellules, probablement par l'intermédiaire de VSGs soluble. Ces résultats confirment la présence *in vivo*, de médiateurs et de molécules inflammatoires impliqués dans l'adhérence, et prouvent que les parasites peuvent avoir un effet direct sur les cellules endothéliales, indépendamment de l'inflammation accompagnant la maladie. Les cellules endothéliales peuvent également participer à la réaction immunitaire pendant la THA. Le mécanisme de l'activation endothéliale de cellules reste à définir. Il serait intéressant de déterminer si les glycoprotéines du trypanosome peuvent agir sur les sélectines ou sur les molécules cellulaires d'adhérence des cellules endothéliales afin de les activer.

Une des caractéristiques de la THA est la production d'anticorps, dans le LCR des malades, spécifiques du stade neurologique. Ceci est d'autant plus intéressant qu'un des problèmes de la THA, à l'heure actuelle, est la détermination du stade de la maladie. En effet, les critères utilisés pour cette détermination, la cytorachie et la présence du parasite dans le LCR des malades ne sont pas des critères suffisamment sensibles et spécifiques. Il faut rechercher de nouveaux marqueurs d'atteinte neurologique de la maladie. C'est ce que nous avons tenté de faire en développant deux techniques diagnostiques basées sur la recherche d'anticorps spécifiques du stade neurologique de la maladie. Ainsi nous avons adapté la technique ELISA et le Dot ELISA à la recherche des anticorps anti-NF et anti-GalC dans le LCR des patients. Pour les deux techniques nous avons comparé la sensibilité et la spécificité d'abord en laboratoire puis nous avons retenu la meilleur des deux techniques pour des études sur le terrain.

En laboratoire, 42 LCR de patients angolais ont été analysés pour rechercher des anticorps anti-GalC et anti-NF à la fois par ELISA et par Dot ELISA. C'est cette dernière technique qui a présenté le meilleur degré de sensibilité et spécificité. De plus la technique ELISA présentait l'inconvénient de nécessiter beaucoup de matériel dont un spectrophotomètre inadapté aux campagnes de dépistage sur le terrain loin de tout laboratoire, contrairement au dot-ELISA qui ne nécessite aucun matériel spécifique.

Lors de l'analyse des LCR des patients, sur les 43 patients en stade 1, un seul a présenté un test dot-ELISA positif, à la fois pour le test anti-GalC mais également pour le test anti-NF. Néanmoins ce faux positif ne peut être considéré strictement comme une erreur de diagnostic. En effet, avec les critères classiques de faux positifs ont été fréquemment rapportées, par exemple avec les enregistrements polysomnographiques, et ils se traduisent par des échecs au traitement à la pentamidine (Buguet et coll., 2005). Ces remarques confirment le fait que les critères classiquement utilisés pour le diagnostic du stade de la maladie (cytorachie, présence du parasite) ne sont pas de bons critères de stade de la maladie, et soulignent donc l'urgence de trouver de véritable marqueur de stade de la THA.

Cependant, la détection des anticorps anti-NF et anti-GalC chez un patient en stade 1 peut très bien traduire des réactions croisées avec d'autres pathologies dont le patient souffre et qui ont échappé à l'examen du clinicien.

Plus généralement nous pouvons considérer qu'un patient en stade 1 avec le dot-ELISA c'est à dire pour qui le test est négatif à la fois pour la recherche des anticorps anti-NF et anti-GalC pourraient être traité sans risque de rechute avec de la pentamidine. Des essais cliniques thérapeutiques sont nécessaires pour confirmer notre hypothèse.

Les résultats les plus surprenants étaient pour les patients en stade intermédiaire c'est à dire ceux dont le cytorachie était comprise entre 5 et 20 cellules/ μ L de LCR. Sur les 65 patients en stade intermédiaire, 43 d'entre eux ont présenté un test positif pour les anti-NF et parmi ceux ci 32 ont présenté un test anti-GalC positif par dot-ELISA. De la même façon que pour les tests en laboratoire, les tests qui étaient positifs pour les anti-GalC l'étaient également pour les anti-NF, l'inverse n'étant pas systématiquement le cas.

Pour les patients classés en stade neurologique (cytorachie > 20 cellules/ μ L ou présence du trypanosome dans le LCR), 25 des 32 patients présentaient des anticorps anti-

GalC et tous présentaient des anticorps anti-NF. Une fois encore tous les patients présentant des anti-GalC étaient positifs pour les anti-NF, l'inverse n'étant pas observé. Le dot-ELISA a présenté les meilleurs résultats de sensibilité et spécificité pour les patients classés en stade 2 : 83,2% et 100% respectivement.

Nous avons également réalisé un dosage du taux d'IgM dans le LCR des patients mais la sensibilité du test dot-Blot n'est pas corrélée au taux d'IgM qui, en stade neurologique de la maladie, est classiquement supérieur à 100 mg/L.

Pour cette étude, le test a été exploité avec deux populations, des angolais et des centrafricains. Nous avons également recherché une corrélation entre la détection des anticorps et la présence des trypanosomes dans le LCR. Sur la population d'Angola, seulement 5 patients présentaient des trypanosomes dans le LCR. Sur ces 5 patients, tous présentaient un test anti-NF et anti-GalC positif. Malheureusement cette recherche du parasite ne se fait pas systématiquement en RCA mais 2 patients chez lesquels les trypanosomes avaient été observés dans le LCR présentaient également un test positif pour les deux antigènes.

La corrélation entre la présence du trypanosome dans le LCR et la positivité du test est excellente même si le nombre de patients chez qui on a mis en évidence le parasite est faible. Cette détection du parasite reste difficile car les techniques à notre disposition sont peu sensibles. Un examen parasitologique doit être effectué de façon plus approfondie sur le LCR du patient qui présente un test anti-NF et anti-GalC positif.

Mais le diagnostic de stade de la THA a besoin de nouveaux marqueurs biologiques car la recherche du parasite, la cytorachie ou le dosage des IgM, ne semblent pas être de bons indicateurs de stade de la trypanosomose. En revanche la recherche des anticorps spécifiques du stade neurologique de la maladie semble prometteuse car quand on compare les anticorps à la cytorachie des patients en stade 2 (> 20 cellules), le test présente une bonne sensibilité et une bonne spécificité. De même ce test permettrait d'éviter un traitement à risque à environ 50 % des patients en stade intermédiaire. Maintenant ce test doit être validé et comparé aux autres tests en développement (Lejon et coll., 2002) et ceci sur des enquêtes de prospection de grande ampleur afin de pouvoir en faire un outil de diagnostic fiable.

En recherchant un nouveau marqueur de stade, plus sensible et spécifique que le galactocérébroside, nous avons mis en évidence une enzyme la glucosylcéramide synthase déjà étudiée dans la maladie de Gaucher. Au cours de cette maladie, le glucosylcéramide s'accumule en raison d'une anomalie de la glucosidase, enzyme qui normalement le métabolise. Les signes cliniques sont une hépatosplénomégalie, une anémie, des malformations squelettiques, et des désordres hématologiques (Pregun et Tulassay, 2004). Cette enzyme est associée au métabolisme intracellulaire des céramides. Elle transfère un UDP-glucose à un céramide pour former le glucosylcéramide qui est un des composés principaux d'une majorité des glycosphingolipides (Bleicher et Cabot, 2002).

Classiquement la glucosylcéramide synthase a un rôle déterminant dans certains mécanismes cellulaires comme la prolifération (Hannun et Bell, 1989), la transformation oncogénique (Hakomori, 1981 ; Morton et coll., 1994), la différenciation (Schwarz, 1995 ; Babia et coll., 1993), et dans les métastases tumorales (Morton, 1994 ; Thurin, 1986). Récemment, il a été montré que de nombreuses résistances médicamenteuses sont associées à cette enzyme (Lavie et coll., 1996 ; Cabot et coll., 1996).

Un des rôles de cette enzyme qui pourrait permettre de comprendre le passage du parasite dans le système nerveux central, est son implication dans les mécanismes de l'apoptose. Il est clairement établi que les céramides activent Raf-1, une kinase extracellulaire, une protéine phosphatase et la c-Jun kinase N-terminale (JNK) qui est une molécule effectrice de l'apoptose (Laurent et Jaffrézou, 2001).

En ce qui concerne le trypanosome nous avons montré par spectrométrie de masse la présence de glucose à la surface du parasite. Le dosage enzymatique de l'enzyme révèle une activité équivalente à 1,5 nmol de glucosylcéramide/heure/mg de trypanosome. Les marquages par IFI avec deux anticorps anti-glucosylcéramide mettent en évidence des structures internes du parasite, ces structures semblent correspondre aux crêtes mitochondriales du parasite. Cette enzyme semble être essentielle à la survie du parasite puisque lorsque nous traitons ces derniers par des inhibiteurs de la glucosylcéramide synthase, les parasites meurent rapidement. En revanche *in vivo*, les souris ne sont pas complètement protégées de l'infection expérimentale puisque la survie va de quelques jours à un mois pour le traitement à la ciclosporine A. Dans tous les cas une rechute puis la mort surviennent : ces traitements ne font que prolonger la survie des souris. Enfin lors d'essais d'immunisation

d'animaux avec ce glycolipide nous obtenons une production d'Ig spécifiquement dirigées contre le glucosylcéramide mais également on note une protection des animaux infectés expérimentalement par *T. brucei brucei*.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

Ce travail a permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs de stade de la maladie du sommeil. Par la technique de cytométrie en flux nous avons montré que dans le LCR, les lymphocytes B marqués par le CD19 caractérisent le stade 2 de la maladie. Il reste à adapter au terrain un moyen simple et peu coûteux permettant de rechercher ce marqueur dans le LCR des malades en stade neurologique. Une des méthodes que nous avons envisagée et une méthode de détection directe de ce marqueur lymphocytaire par agglutination de billes de latex sensibilisées par un anti-CD19.

L'étude des chémokines impliquées dans le recrutement des lymphocytes sur le lieu de l'inflammation permet de mieux comprendre comment les lymphocytes envahissent le SNC. Cette production de chémokines pourrait là encore servir à la détermination du stade neurologique des malades. En effet une chémokine, MCP-1, semble prédominer sur les autres lors de l'évolution de la maladie et est présente à des taux élevés dans le LCR des patients en stade 2 par rapport aux autres stades de la maladie.

Nous proposons pour la discrimination du stade un test reposant sur la détection des anticorps anti-NF et anti-GalC. Ce dernier antigène ne semble pas être le plus adapté à la détermination du stade car ce n'est pas essentiellement du galactocérebroside qui est présent à la surface du parasite mais un glycosphingolipide dont la structure est le glucosylcéramide.

Par ailleurs la présence de la glucosylcéramide synthase responsable de la synthèse du glucosylcéramide pourrait bien expliquer le passage du parasite dans le SNC. Des études doivent être conduites pour déterminer la séquence de l'enzyme, sa structure et son rôle dans le passage du parasite et éventuellement l'inhiber pour bloquer ce passage.

D'autre part, l'amélioration des thérapeutiques actuelles est un axe de recherche important à étudier. Les essais que nous avons conduit *in vitro* nous ont permis de distinguer l'activité trypanocide de deux molécules, la ciclosporine A et le bleu de méthylène. Cependant, l'efficacité de ces deux molécules à traiter des infections chez la souris doit être améliorée. Le bleu de méthylène, qui n'a permis la guérison d'aucun animal infecté, devrait

être testé par voie locale intra-cérébrale afin de contourner les effets du métabolisme sanguin, qui est sûrement l'origine de son échec *in vivo*. Le traitement par la ciclosporine A devrait être adapté d'un point de vue du dosage et du rythme d'administration, ce qui permettrait peut-être des guérisons définitives. Il pourrait alors être envisagé une association entre la ciclosporine A et un trypanocide de la phase 2 à dose réduite pour le traitement des infections nerveuse à trypanosomes.

BIBLIOGRAPHIE

Acosta-Rodriguez EV, Montes CL, Motran CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, Gruppi A. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 2004 ; 172 : 493-502.

Aert D, Truc P, Penchenier L, Claes Y, Le Ray D. A kit for *in vitro* isolation of trypanosomoses in the field : first trial with sleeping sickness patients in the Congo Republic. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992 ; 8 : 394-395.

Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. Science. 1996 ; 272 : 54-60.

Aloisi F, Care A, Borsellino G, Gallo P, Rosa S, Bassani A, Cabibbo A, Testa U, Levi G, Peschle C. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. J Immunol. 1992 ; 149 : 2358-2366.

Alter A, Duddy M, Hebert S, Biernacki K, Prat A, Antel JP, Yong VW, Nuttall RK, Pennington CJ, Edwards DR, Bar-Or A. Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. J Immunol. 2003 ; 170 : 4497-4505.

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

Amevigbe MMD. Les anticorps anti-galactocérébrosides au cours de la trypanosomose humaine africaine et expérimentale du mouton (*Ovis aries*). Thèse de Doctorat. Université de Limoges. Limoges ; 1992. 185p.

Ancelle T, Barret B, Flachet L, Moren A. 2 epidemics of arsenical encephalopathy in the treatment of trypanosomiasis, Uganda, 1992-1993. *Bull Soc Path Ex.* 1994 ; 87 : 341-346.

Anthoons JA, Van Marck EA, Gigase PL, Stevens WJ. Immunohistochemical characterization of the mononuclear cells in the brain of the rat with an experimental chronic *Trypanosoma brucei gambiense* infection. *Parasitol Res.* 1989; 75 : 251-256.

Artzrouni M et Gouteux JP. Control strategies for sleeping sickness in Central Africa : a model based-approach. *Trop Med Int Health.* 1996 ; 1 : 753-764.

Askonas BA, Bancroft GJ. Interaction of African trypanosomes with the immune system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1984 ; 307 : 41-49.

Ayed Z, Brindel I, Bouteille B, Van Meirvenne N, Doua F, Houinato D, Dumas M, Jauberteau MO. Detection and characterization of autoantibodies directed against neurofilament proteins in human African trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 ; 57 : 1-6.

Ayed Z. Trypanosomose humaine africaine : détection d'autoanticorps anti-neurofilaments et anti-tubulines. Essais d'immunisation contre la trypanosomose expérimentale. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. Limoges ; 1999. 178 p.

Babia T, Kok JW, Hulstaert C, de Weerd H, Hoekstra D. Differential metabolism and trafficking of sphingolipids in differentiated versus undifferentiated HT29 cells. *Int J Cancer.* 1993 ; 54 : 839-845.

Badie B, Schartner J, Vorpahl J, Preston K. Interferon-gamma induces apoptosis and augments the expression of Fas and Fas ligand by microglia *in vitro*. *Exp Neurol.* 2000 ; 162 : 290-296.

Bafort JM, Schmidt H, Molyneux DH. Development of *Trypanosoma brucei* in suckling mouse brain following intracerebral injection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987 ; 81 : 487-490.

Bakhiet M, Hamadien M, Tjernlund A, Mousal A, Seiger A. African trypanosomes activate human fetal brain cells to proliferation and IFN-gamma production. *Neuroreport*. 2002 ; 13 : 53-56.

Balaban N, Waithaka HK, Njogu AR, Goldman R. Intracellular antigens (microtubule-associated protein copurified with glycosomal enzymes) possible vaccines against trypanosomiasis. *J Infect Dis*. 1995 ; 172 : 845-850.

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

Bangs JD, Ransom DA, Nimick M, Christie G, Hooper NM. *In vitro* cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. *Mol Biochem Parasitol*. 2001 ; 114 : 111-117.

Barrett MP, Fairlamb AH. The biochemical basis of arsenical-diamidine crossresistance in African trypanosomes. *Parasitol Today*. 1999 ;15 : 136-140.

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

Benveniste EN. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol*. 1992 ; 52 : 106-153.

Bisser S, Ayed Z, Bouteille B, Stanghellini A, Breton JC, Dumas M, Jauberteau MO. Central Nervous system involvement in African trypanosomiasis : presence of anti-galactocerebroside antibodies in patient's cerebrospinal fluid. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000 ; 94 : 225-226.

Bisser S. Le diagnostic de l'atteinte nerveuse dans la maladie du sommeil. Réévaluation des critères de terrain et apport des marqueurs neuro-immunologiques. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. Limoges ; 2001. 227 p.

Bleicher RJ, Cabot MC. Glucosylceramide synthase and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2002 ; 1585 : 172-178.

Blum J, Nkunku S, Burri C. Clinical description of encephalopathic syndromes and risk factors for their occurrence and outcome during melarsoprol treatment of human African trypanosomiasis. *Trop Med Int Health*. 2001 ; 6: 390-400.

Boda C, Enanga B, Dumet H, Chauviere G, Labrousse F, Couquet C, Saivin S, Houin G, Perie J, Dumas M, Bouteille B. Plasma kinetics and efficacy of oral meglazol treatment in *Trypanosoma brucei brucei*-infected sheep. *Vet Parasitol*. 2004 ; 121: 213-223.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997 ; 15 : 749-795.

Borst P, Fairlamb AH. Surface receptors and transporters of *Trypanosoma brucei*. *Annu Rev Microbiol*. 1998 ; 52 : 745-778.

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

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

Bray PG, Barrett MP, Ward SA, de Koning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol*. 2003 ; 19 : 232-239.

Brochu S, Olivier M, Rivest S. Neuronal activity and transcription of proinflammatory cytokines, IkappaBalpha, and iNOS in the mouse brain during acute endotoxemia and chronic infection with *Trypanosoma brucei brucei*. *J Neurosci Res*. 1999 ; 57 : 801-816.

Buguet A, Bert J, Tapie P, Bogui P, Doua F, Mouanga G, Stanghellini A, Sarda J, Tabaraud F, Gati R, Montmayeur A, Chauffard F, Lonsdorfer J, Dumas M. Distribution de la veille et du sommeil dans la trypanosomose humaine africaine. *Bull Soc Path Ex*. 1994 ; 87 : 362-367.

Buguet A, Bisser S, Josenando T, Chapotot F, Cespuglio R. Sleep structure: a new diagnostic tool for stage determination in sleeping sickness. *Acta Trop.* 2005 ; 93 : 107-117.

Buguet A, Bourdon L, Bouteille B, Cespuglio R, Vincendeau P, Radomski MW, Dumas M. The duality of sleeping sickness: focusing on sleep. *Sleep Med Rev.* 2001 ; 5 : 139-153.

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

Cabot MC, Giuliano AE, Volner A, Han TY. Tamoxifen retards glycosphingolipid metabolism in human cancer cells. *FEBS Lett.* 1996 ; 394 : 129-131.

Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2004 ; 40 : 1062-1071.

Cardoso de Almeida ML, Turner MJ. The membrane form of variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. *Nature.* 1983 ; 302 : 349-352.

Cattand P. Trypanosomiase humaine africaine, situation épidémiologique actuelle, une recrudescence alarmante de la maladie. *Bull Soc Path Ex.* 1994 ; 87 : 307-310.

Cattand P, de Raadt P. Laboratory diagnosis of trypanosomiasis. *Clin Lab Med.* 1991 ; 11 : 899-908.

Cattand P, Jannin J, Lucas P. Sleeping sickness surveillance : an essential step towards elimination. *Trop Med Int Health.* 2001 ; 6 : 348-361.

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

Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis.* 2003 ; : 535-544.

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

Chabraoui F, Derrington EA, Mallié-Didier F, Confavreux C, Quincy C, Caudie C. Dot-blot immunodetection of antibodies against GM1 and other gangliosides on PVDF-P membranes. *J Immunol Methods*. 1993 ; 165 : 225-230.

Chen CC, Manning AM. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: a dominant role for NF-kappa B. *Agents Actions Suppl*. 1995 ; 47 : 135-141.

Chimelli L, Scaravilli F. Trypanosomiasis. *Brain Pathol*. 1997 ; 7 : 599-611.

Corsini AC, Clayton C, Askonas BA, Ogilvie BM. Suppressor cells and loss of B-cell potential in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Clin Exp Immunol*. 1977 ; 29 : 122-131.

Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varel J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmun*. 2003 ; 21 : 273-276.

Darji A, Sileghem M, Heremans H, Brys L, De Baetselier P. Inhibition of T-cell responsiveness during experimental infections with *Trypanosoma brucei*: active involvement of endogenous gamma interferon. *Infect. Immun*. 1993 ; 61 : 3098-3102.

Daulouède PS, Okomo-Assoumou MC, Labassa M, Fouquet C, Vincendeau P. Mécanismes de défense au cours des trypanosomoses. *Bull Soc Path Ex*. 1994 ; 87 : 330-332.

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

Davies JM. Molecular mimicry: can epitope mimicry induce autoimmune disease? *Immunol Cell Biol*. 1997 ; 75 : 113-126.

de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, van Oosten M, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD, Kuiper J. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier *in vitro*. *J Neuroimmunol*. 1996 ; 64 : 37-43.

Denise H, Barrett MP. Uptake and mode of action of drugs used against sleeping sickness. *Biochem Pharmacol.* 2001 ; 61 : 1-5.

Donelson JE, Hill KL, El-Sayed NHMA. Multiple mechanisms of immune evasion by African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 1998 ; 91 : 51-66.

Doua F, Boa FY, Schechter PJ, Miezian TW, Diali D, Sanon SR, De Raadt P, Haegele KD, Sjoerdsma A, Konian K. Treatment of human late stage *gambiense* trypanosomiasis with alpha-difluoromethylornithine (eflornithine) : efficacy and tolerance in 14 cases in Côte d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg.* 1987 ; 37 : 525-533.

Doua F, Boa Yapo F. Actualités thérapeutiques de la trypanosomiase. *Bull Soc Path Ex.* 1994 ; 87 : 337-340.

Ducloux M. "Eugène Jamot (1879-1937): un fils du Limousin". *Ann Soc Belg Med Trop* 69 (Suppl 1). 1989 ; 217-220.

Duleu S, Vincendeau P, Courtois P, Semballa S, Lagroye I, Daulouede S, Boucher JL, Wilson KT, Veyret B, Gobert AP. Mouse strain susceptibility to trypanosome infection: an arginase-dependent effect. *J Immunol.* 2004 ; 172 : 6298-6303.

Dumas M, Bisser S. Clinical aspect of human African trypanosomiasis (Chapter 13). In Dumas M, Bouteille B, Buguet A. *Progress in human African trypanosomiasis, Sleeping Sickness.* Paris, France : Springer-Verlag ; 1999, 1 vol., 344 p., 215-249.

Dumas M, Bouteille B. Treatment of human African trypanosomiasis. *Bull World Health Organ.* 2000; 78: 1474.

Dumas M. La maladie du sommeil, maladie réémergente. *Bull Acad Nat Méd* 2000 ; 184 : 1867-1885.

Dumas M. The history of tropical neurology. In "Tropical Neurology" RA Shakir, PK Newman, CM Poser Eds., Balliere division of W.B. Saunders Company Limited, 1995, 1 vol., 485 p. 276-286.

Enanga B, Burchmore RJ, Stewart ML, Barrett MP. Sleeping sickness and the brain. *Cell Mol Life Sci.* 2002 ; 59 : 845-858.

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

Engelhardt B, Conley FK, Butcher EC. Cell adhesion molecules on vessels during inflammation in the mouse central nervous system. *J Neuroimmunol*. 1994 ; 51 : 199-208.

Enyaru JC, Matovu E, Akol M, Sebikali C, Kyambadde J, Schmidt C, Brun R, Kaminsky R, Ogwal LM, Kansime F. Parasitological detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in serologically negative sleeping-sickness suspects from north-western Uganda. *Ann Trop Med Parasitol*. 1998 ; 92 : 845-850.

Fearon DT, Manders P, Wagner SD. Arrested differentiation, the self-renewing memory lymphocyte, and vaccination. *Science*. 2001 ; 293 : 248-250.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957 ; 226 : 497-509.

Frézil JL, Coulm J, Alary JC. L'immunofluorescence indirecte dans le diagnostic de la trypanosomose humaine africaine. Note préliminaire. *Bull Soc Path Ex*. 1978 ; 71 : 440-445.

Frézil JL, Cuisance D. Trypanosomiasis, maladies d'avenir : leurs perspectives et leurs inconnues. *Bull Soc Path Ex*. 1994 ; 87 : 391-393.

Frigerio S, Silei V, Ciusani E, Massa G, Lauro GM, Salmaggi A. Modulation of fas-ligand (Fas-L) on human microglial cells: an *in vitro* study. *J. Neuroimmunol*. 2000 ; 105 : 109-114.

Garcia A, Jamonneau V, Magnus E, Laveissière C, Lejon V, N'Guessan P, N'Dri L, Meirvenne N, Büscher P. Follow-up of card agglutination trypanosomiasis test (CATT) positive but apparently aparasitemic individuals in Cote d'Ivoire : evidence for a complex and heterogeneous population. *Trop Med Int Health*. 2000 ; 5 : 786-793.

Gastellu-Etchegorry M, Legros D. Maladie du sommeil : danger indifférence. *Med Trop*. 1999 ; 59 : 347-348.

Girard M, Bisser S, Büscher P, Preud'homme JL, Jauberteau MO. Cross-reactivity of anti-galactocerebroside autoantibodies with a Trypanosoma brucei proteolipidic epitope. Clin Exp Immunol. 2000 ; 119 : 516-522.

Girard M, Bisser S, Courtioux B, Vermot-Desroches C, Bouteille B, Wijdenes J, Preud'homme JL, Jauberteau MO. *In vitro* induction of microglial and endothelial cell apoptosis by cerebrospinal fluids from patients with human African trypanosomiasis. Int J Parasitol. 2003 ; 33 : 713-720.

Girard M, Giraud S, Courtioux B, Jauberteau-Marchan MO, Bouteille B. Endothelial cell activation in the presence of African trypanosomes. Mol Biochem Parasitol. 2005 ; 139 : 41-49.

Girard M. Contribution à l'étude des mécanismes immunopathogéniques de l'atteinte neurologique de la trypanosomose humaine africaine. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. Limoges; 2000. 185 p.

Gobert AP, Daulouède S, Lepoivre M, Boucher JL, Bouteille B, Buguet A, Cespuglio R, Veyret B, Vincendeau P. L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. Infect Immun. 2000 ; 68 : 4653-4657.

Goldfeld AE, Doyle C, Maniatis T. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation by virus and lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 ; 87 : 9769-9773.

Gran B, Rostami A. T cells, cytokines, and autoantigens in multiple sclerosis. Curr Neurol Neurosci Rep. 2001 ; 1 : 263-270.

Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. J Leukoc Biol. 1994 ; 55 : 662-675.

Green CH. The effect of colour on trap- and screen-orientated responses in *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Glossinidae). Bull Entomol Res. 1988 ; 78 : 591-604.

Green CH. The use of two-coloured screens for catching *Glossina palpalis* Robineau-Desvoidy (Diptera: Glossinidae). Bull Entomol Res. 1989 ; 79 : 81-93.

Greenwood BM, Whittle HC. Cerebrospinal fluid IgM in patients with sleeping sickness. *Lancet*. 1973 ; 2 : 525-527.

Greenwood BM, Whittle HC. The pathogenesis of sleeping sickness. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980 ; 74 : 716-725.

Grygorczuk S, Pancewicz S, Zajkowska J, Kondrusik M, Rwiezbinska R, Hermanowska-Szpakowicz T. Concentrations of macrophage inflammatory proteins MIP-1alpha and MIP-1beta and interleukin 8 (IL-8) in lyme borreliosis. *Infection*. 2004 ; 32 : 350-355.

Hakomori S. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu Rev Biochem*. 1981 ; 50 : 733-764.

Hamadien M, Bakhiet M, Harris RA. Interferon-gamma induces secretion of trypanosome lymphocyte triggering factor via tyrosine protein kinases. *Parasitology*. 2000 ; 120 : 281-287.

Hamadien M, Lycke N, Bakhiet M. Induction of the trypanosome lymphocyte-triggering factor (TLTF) and neutralizing antibodies to the TLTF in experimental African trypanosomiasis. *Immunology*. 1999 ; 96 : 606-611.

Hannun YA, Bell RM. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*. 1989 ; 243 : 500-507.

Hertz CJ, Filutowicz H, Mansfield JM. Resistance to the African trypanosomes is IFN-gamma dependent. *J Immunol*. 1998 ; 161 : 6775-6783.

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

Hisano N, Yatomi Y, Satoh K, Akimoto S, Mitsumata M, Fujino MA, Ozaki Y. Induction and suppression of endothelial cell apoptosis by sphingolipids: a possible *in vitro* model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Blood*. 1999 ; 93 : 4293-4299.

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995 ; 373 : 123-126.

Hudson KM, Byner C, Freeman J, Terry RJ. Immunodepression, high IgM levels and evasion of the immune response in murine trypanosomiasis. *Nature*. 1976 ; 264 : 256-258.

Hunter CA, Gow JW, Kennedy PG, Jennings FW, Murray M. Immunopathology of experimental African sleeping sickness: detection of cytokine mRNA in the brains of *Trypanosoma brucei brucei*-infected mice. *Infect Immun*. 1991 ; 59 : 4636-4640.

Jamonneau V, Ravel S, Garcia A, Koffi M, Truc P, Laveissiere C, Herder S, Grebaut P, Cuny G, Solano P. Characterization of *Trypanosoma brucei* s.l. infecting asymptomatic sleeping-sickness patients in Cote d'Ivoire: a new genetic group? *Ann Trop Med Parasitol*. 2004 ; 98 : 329-337.

Jamonneau V, Truc P, Garcia A, Magnus E, Büscher P. Preliminary evaluation of LATEX/*T.b. gambiense* and alternative versions of CATT/*T.b. gambiense* for serodiagnosis of human trypanosomiasis of a population at risk in Côte d'Ivoire : considerations for mass-screening. *Acta Trop*. 2000 ; 76 : 175-183.

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

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

Jayawardena AN, Waksman BH. Suppressor cells in experimentally trypanosomiasis. *Nature*. 1977 ; 265 : 539-541.

Jennings FW, Urquhart GM, Murray M. *Trypanosoma brucei* infections in mice : studies on the anaemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1972 ; 66 : 342.

Kazyumba G, Berney M, Brighthouse G, Cruchaud A, Lambert PH. Expression of the B cell repertoire and autoantibodies in human African trypanosomiasis. *Clin Exp Immunol.* 1986 ; 65 : 10-18.

Keiser J, Ericsson O, Burri C. Investigation of the metabolites of the trypanocidal drug melarsoprol. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 ; 67 : 478-488.

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

Kirrstetter M, Lerin-Lozano C, Heintz H, Manegold C, Gross WL, Lamprecht P. Trypanosomiasis in a woman from Cameroon mimicking systemic lupus erythematosus. *Dtsch Med Wochenschr.* 2004 ; 129 : 1315-1317.

Kjeldsberg CR, Knight JA. Cerebrospinal fluid. In *Body fluids*. KD Johnson, ed American Society of Clinical Pathologists; 1993. p 65-167.

Kobayakawa T, Louis J, Izui S, Lambert PH. Autoimmune response to DNA, red blood cells, and thymocyte antigens in association with polyclonal antibody synthesis during experimental African trypanosomiasis. *J Immunol.* 1979 ; 122 : 296-301.

Kong GY, Peng ZC, Costanzo C, Kristensson K, Bentivoglio M. Inducible nitric oxide synthase expression elicited in the mouse brain by inflammatory mediators circulating in the cerebrospinal fluid. *Brain Res.* 2000 ; 878 : 105-118.

Kopp EB, Ghosh S. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol.* 1995 ; 58 : 1-27.

Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens.* 2001 ; 14 : 44S-54S.

Kuzoe FA. Current situation of African trypanosomiasis. *Acta Trop* 1993 ; 54 : 153-162.

LaCount DJ, Gruszynski AE, Grandgenett PM, Bangs JD, Donelson JE. Expression and function of the *Trypanosoma brucei* major surface protease (GP63) genes. J Biol Chem. 2003 ; 278 : 24658-24664.

Lambert PH, Berney M, Kazyumba G. Immune complexes in serum and in cerebrospinal fluid in African trypanosomiasis. Correlation with polyclonal B cell activation and with intracerebral immunoglobulin synthesis. J Clin Invest. 1981 ; 67 : 77-85.

Lancien J, Gouteux JP. Le piège pyramidal à mouche tsetse (Diptera: Glossinidae). Afrique médicale, 1987, 258 : 647-652.

Laurent G, Jaffrezou JP. Signaling pathways activated by daunorubicin. Blood. 2001 ; 98 : 913-924.

Laveissière C, Grébaud P. Recherches sur les pièges à glossine (Diptera: *Glossinidae*). Mise au point d'un modèle économique: le piège "Vavoua". Trop Med Parasitol. 1990 ; 41 : 185-192.

Lavie Y, Cao H, Bursten SL, Giuliano AE, Cabot MC. Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells. J Biol Chem. 1996 ; 271 : 19530-19536.

Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. Neuroscience. 1992 ; 48 : 405-415.

Lee SC, Dickson DW, Liu W, Brosnan CF. Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma. J Neuroimmunol. 1993 ; 46 : 19-24.

Lee SJ, Benveniste EN. Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. J Neuroimmunol. 1999 ; 98 : 77-88.

Lee SJ, Zhou T, Choi C, Wang Z, Benveniste EA. Differential regulation and function of Fas expression on glial cells. J Immunol. 2000 ; 164 : 1277-1285.

Legros D, Fournier C, Gastellu-Etchegorry M, Maiso F, Szumilin E. Echecs thérapeutiques du mélarsoprol parmi des patients traités au stade tardif de trypanosomose humaine africaine à *Trypanosoma brucei gambiense* en Ouganda. Bull Soc Path Ex. 1999 ; 92 : 171-179.

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. IgM quantification in the cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients by a latex card agglutination test. Trop Med Int Health. 2002 ; 7: 685-692.

Lemesre JL, Noireau F, Makoundou ML, Louembe MT, Frézil JL. Apport des techniques sérologiques dans l'analyse du liquide céphalo-rachidien de patients congolais atteints de la maladie du sommeil. Bull Soc Path Ex. 1988 ; 81 : 506-510.

Ley K. Arrest chemokines. Microcirculation. 2003 ; 10 : 289-295.

Lim HW, Hillsamer P, Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. J Clin Invest. 2004 ; 114 : 1640-1649. Erratum in: J Clin Invest. 2005 ; 115 : 195.

Liu Y, Li Z, Bakhiet M. Upregulation of the chemokines Rantes, MCP-1, MIP-1 α and MIP-2 in early infection with *Trypanosoma brucei brucei* and inhibition by sympathetic denervation of the spleen. Trop Med Int Health. 1999 ; 4 : 85-92.

Lopes MF, da Veiga VF, Santos AR. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. J Immunol. 1995 ; 154 : 744-752.

Lopes MF, Dos Reis GA. Apoptosis as a cause of T-cell unresponsiveness in experimental Chagas' disease. Braz J Med Biol Res. 1995 ; 28 : 913-918.

Lorenzon P, Vecile E, Nardon E, Ferrero E, Harlan JM, Tedesco F, Dobrina A. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. J Cell Biol. 1998 ; 142 : 1381-1391.

Lubega GW, Byarugaba DK, Prichard RK. Immunization with a tubulin-rich preparation from *Trypanosoma brucei* confers broad protection against African trypanosomiasis. *Exp Parasitol.* 2002 ; 102 : 9-22.

Lucas R, Magez S, Songa B, Darji A, Hamers R, de Baetselier P. A role for TNF during African trypanosomiasis: involvement in parasite control, immunosuppression and pathology. *Res Immunol.* 1993 ; 144 : 370-376.

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

Magez S, Radwanska M, Beschin A, Sekikawa K, De Baetselier P. Tumor necrosis factor alpha is a key mediator in the regulation of experimental *Trypanosoma brucei* infections. *Infect Immun.* 1999 ; 67 : 3128-3132.

Magnus E, Van Meirvenne N, Vervoort T, Le Ray D, Wéry M. Use of freeze-dried trypanosome in the indirect fluorescence antibody test for the serodiagnosis of sleeping sickness. *Ann Soc Belg Med Trop.* 1978 ; 58 : 103-109.

Magnus E, Vervoort T, Van Meirvenne N. A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of the *T. gambiense* trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop.* 1978 ; 58 : 169-176.

Marie-Daragon A, Rouillard MC, Bouteille B, Bisser S, de Albuquerque C, Chauvière G, Périé J, Dumas M. Essais d'efficacité sur *Trypanosoma brucei brucei* de molécules franchissant la barrière hémato-méningée et du mégazol. *Bull Soc Path Ex.* 1994 ; 87 : 347-352.

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

Mastroianni CM, Lancella L, Mengoni F, Lichtner M, Santopadre P, D'Agostino C, Ticca F, Vullo V. Chemokine profiles in the cerebrospinal fluid (CSF) during the course of pyogenic and tuberculous meningitis. *Clin Exp Immunol.* 1998 ; 114 : 210-214.

Mathieu-Daude F, Stevens J, Welsh J, Tibayrenc M, McClelland M. Genetic diversity and population structure of *Trypanosoma brucei* : clonality versus sexuality. Mol Biochem Parasitol. 1995 ; 72 : 89-101.

Matovu E, Stewart ML, Geiser F, Brun R, Maser P, Wallace LJ, Burchmore RJ, Enyaru JC, Barrett MP, Kaminsky R, Seebeck T, de Koning HP. Mechanisms of arsenical and diamidine uptake and resistance in *Trypanosoma brucei*. Eukaryot Cell. 2003 ; 2 : 1003-1008.

Mbati PA, Hirumi K, Inoue N, Situakibanza NH, Hirumi H. Suggested dosage rates of melarsoprol in the treatment of mice experimentally infected with *Trypanosoma brucei gambiense*. Onderstepoort J Vet Res. 2000 ; 67 : 71-74.

Miézan TW, Meda HA, Doua F, Dje NN, Lejon V, Büscher P. Single centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000 ; 94 : 293.

Miézan TW, Meda HA, Doua F, Yapo FB, Baltz T. Assessment of central nervous system involvement in *gambiense* trypanosomiasis : value of the cerebro-spinal white cell count. Trop Med Int Health. 1998 ; 3 : 571-575.

Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. Immunol Rev. 1989 ; 112 : 183-207.

Mitsiedas N, Poulaki V, Kotoula V, Leone A, Tsokos M. Fas ligand is present in tumors of the Ewing's sarcoma family and is cleaved into a soluble form by a metalloproteinase. Am J Pathol. 1998 ; 153 : 1947-1956.

Mohri H, Bonhoeffer S, Monard S, Perelson AS, Ho DD, 1998. Rapid turnover of T lymphocytes in SIV-infected rhesus macaques. Science. 279:1223-7.

Moller AS, Bjerre A, Brusletto B, Joo GB, Brandtzaeg P, Kierulf P. Chemokine patterns in meningococcal disease. J Infect Dis. 2005; 191: 768-775.

Moore A, Richer M. Re-emergence of epidemic sleeping sickness in southern Sudan. *Trop Med Int Health*. 2001 ; 6 : 342-347.

Moore AC. Prospects for improving african trypanosomiasis chemotherapy. *J Infect Dis*. 2005 ; 191 : 1793-1795.

Morton DL, Ravindranath MH, Irie RF. Tumor gangliosides as targets for active specific immunotherapy of melanoma in man. *Prog Brain Res*. 1994 ; 101 : 251-275.

Mucke L, Eddleston M. Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system. *FASEB J*. 1993 ; 7 : 1226-1232.

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

Munoz-Fernandez MA, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1998 ; 56 : 307-340.

Mwangi DM, Hopkins J, Luckins AG. Cellular phenotypes in *Trypanosoma congolense* infected sheep: the local skin reaction. *Parasite Immunol*. 1990 ; 12 : 647-58.

Mwangi DM, Hopkins J, Luckins AG. *Trypanosoma congolense* infection in sheep : cellular phenotypes in lymph and lymph nodes associated with skin reactions. *J Comp Pathol*. 1996 ; 114 : 51-61.

Nakamura Y. Alterations of serum lipid, lipoprotein and inflammatory cytokine profiles of rabbits infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Vet Parasitol*. 1998 ; 80 : 117-25.

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

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

Nishimura K, Hamashita K, Okamoto Y, Kawahara F, Ihara H, Kozaki S, Ohnishi Y, Yamasaki S. Differential effects of interferon-gamma on production of trypanosome-derived lymphocyte-triggering factor by *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. J Parasitol. 2004 ; 90 : 740-745.

Okomo-Assoumou MC, Daulouède S, Lemesre JL, N'Zila-Mouanda A, Vincendeau P. Correlation of high serum levels of tumor necrosis factor-alpha with disease severity in human African trypanosomiasis. Am J Trop Med Hyg . 1995 ; 53 : 539-543.

Olsson T, Bakhiet M, Edlund C, Hojeberg B, Van der Meide PH, Kristensson K. Bidirectional activating signals between *Trypanosoma brucei* and CD8+ T cells: a trypanosome-released factor triggers interferon-gamma production that stimulates parasite growth. Eur J Immunol. 1991 ; 21 : 2447-2454.

Olsson T, Bakhiet M, Hojeberg B, Ljungdahl A, Edlund C, Andersson G, Ekre HP, Fung-Leung WP, Mak T, Wigzell H, Kristensson K. CD8 is critically involved in lymphocyte activation by a *T. brucei brucei*-released molecule. Cell. 1993 ; 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. Trypanosomiase africaine. Progrès de la recherche 1989-90. X^{ème} rapport du programme. OMS Genève 1991.

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

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

Paquet C, Ancelle T, Gastellu-Etchegory M, Castilla J, Hardnt I. Persistence of antibodies to *Trypanosoma brucei gambiense* after treatment of human trypanosomiasis in Uganda. (Letter to the editor) Lancet. 1992 ; 340-350.

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

Pays E. Antigenic variation and the problem of vaccines against African trypanosomes. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 1995 ; 50 : 123-131.

Pentreath VW. Cytokines and the blood-brain barrier in human and experimental African trypanosomiasis In: M. Dumas, B. Bouteille and A. Buguet, Editors, *Progress in human African trypanosomiasis, sleeping sickness* vol. 6, Springer-Verlag, Paris (France) (1999), pp. 105–118.

Pépin J, Ethier L, Kazadi C, Milord F, Ryder R. The impact of human immunodeficiency virus infection on the epidemiology and treatment of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Nioki, Zaire. *Am J Trop Med Hyg.* 1992 ; 47 : 133-140.

Pépin J, Meda HA. The epidemiology and control of human African trypanosomiasis. *Adv Parasitol.* 2001 ; 49 : 71-132.

Philip KA, Dascombe MJ, Fraser PA, Pentreath VW. Blood-brain barrier damage in experimental African trypanosomiasis. *Ann Trop Med Parasitol.* 1994 ; 88 : 607-616.

Poli P, Aline de Mello M, Buschini A, Mortara RA, Northfleet de Albuquerque C, da Silva S, Rossi C, Zucchi TM. Cytotoxic and genotoxic effects of meglumine antimoniate, an anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests. *Biochem Pharmacol.* 2002 ; 64 : 1617-1627.

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

Poltera AA. Pathology of human African trypanosomiasis with reference to experimental African trypanosomiasis and infections of the central nervous system. *Brit Med Bull.* 1985 ; 41 : 169-174.

Prasad NK, Papoff G, Zeuner A, Bonnin E, Kazatchkine MD, Ruberti G, Kaveri SV. Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway. *J Immunol.* 1998 ; 161 : 3781-3790.

Pregun I, Tulassay Z. Gaucher's disease: pathogenesis, diagnosis and therapy. *Orv Hetil.* 2004 ; 145 : 1883-1890.

Press R, Pashenkov M, Jin JP, Link H. Aberrated levels of cerebrospinal fluid chemokines in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Clin Immunol.* 2003 ; 23 : 259-267.

Radi ZA, Kehrli ME Jr, Ackermann MR. Cell adhesion molecules, leukocyte trafficking, and strategies to reduce leukocyte infiltration. *J Vet Intern Med.* 2001 ; 15 : 516-529.

Ransohoff RM, Hamilton TA, Tani M, Stoler MH, Shick HE, Major JA, Estes ML, Thomas DM, Tuohy VK. Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J.* 1993 ; 7 : 592-600.

Rasooly R, Balaban N. Trypanosome microtubule-associated protein p15 as a vaccine for the prevention of African sleeping sickness. *Vaccine.* 2004 ; 22 : 1007-1015.

Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N., Cordeiro-Da-Silva A, Arala-Chaves M, Coutinhi A and Minoprio P. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med.* 2000 ; 6 : 890-897.

Resino S, Galan I, Bellon JM, Navarro ML, Leon JA, Munoz-Fernandez MA. Characterizing the immune system after long-term undetectable viral load in HIV-1-infected children. *J Clin Immunol.* 2003 ; 23 : 279-289.

Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J Clin Invest.* 1995 ; 95 : 2061-2066.

Roffi J, Dedet JP, Garre MT. Diagnostic immunoenzymatique de la trypanosomiase en phase nerveuse par mise en évidence d'anticorps spécifiques dans le liquide céphalorachidien. *Med Mal Inf.* 1979 ; 9 : 306-312.

Rogers DJ, Randolph SE. Population ecology of tsetse. *Annu Rev Entomol.* 1985 ; 30 : 197-216.

Rose LM, Goldman M, Lambert PH. Simultaneous induction of an idiotypic, corresponding anti-idiotypic antibodies, and immune complexes during African trypanosomiasis in mice. *J Immunol.* 1982 ; 128 : 79-85.

Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci.* 1999 ; 22 : 11-28.

Ryan L, Molyneux DH, Kuzoe FA, Baldry DA. Traps to control and estimate populations of *Glossina* species. *Tropenmed Parasitol.* 1981 ; 32 : 145-148.

Sata M and Walsh K. Oxidized LDL activates Fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest.* 1998 ; 102 : 1682–1689.

Schmid C, Richer M, Bilenge CM, Josenando T, Chappuis F, Manthelot CR, Nangouma A, Doua F, Asumu PN, Simarro PP, Burri C. Impamel II study. Effectiveness of a 10-day melarsoprol schedule for the treatment of late-stage human African trypanosomiasis: Confirmation from a multinational study (Impamel II). *J Infect Dis.* 2005 ; 191 : 1922-1931.

Schofield CJ, Maudlin I. Trypanosomiasis control. *Int J Parasitol.* 2001 ; 31 : 614-619.

Schultzberg M, Ambatsis M, Samuelsson EB, Kristensson K, van Meirvenne N. Spread of *Trypanosoma brucei* to the nervous system: early attack on circumventricular organs and sensory ganglia. *J Neurosci Res.* 1988 ; 21 : 56–61.

Schwarz A, Rapaport E, Hirschberg K, Futerman AH. A regulatory role for sphingolipids in neuronal growth. Inhibition of sphingolipid synthesis and degradation have opposite effects on axonal branching. *J Biol Chem.* 1995 ; 270 : 10990-10998.

Sedgwick JB, Menon I, Gern JE, Busse WW. Effects of inflammatory cytokines on the permeability of human lung microvascular endothelial cell monolayers and differential eosinophil transmigration. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 ; 110 : 752-756.

Seed JR. African trypanosomiasis research: 100 years of progress, but questions and problems still remain. *Int J Parasitol.* 2001 ; 31 : 434-442.

Sharafeldin A, Eltayeb R, Pashenkov M, Bakhiet M. Chemokines are produced in the brain early during the course of experimental African trypanosomiasis. *J Neuroimmunol.* 2000 ; 103 : 165-170.

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

Simarro PP, Sima FO, Mir M, Mateo MJ, Roche J. La lutte contre la trypanosomiase humaine africaine dans le foyer de Luba en Guinée équatoriale : bilan de trois méthodes. *Bull World Health Organ.* 1991 ; 69 : 451-457.

Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM. Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol.* 2001 ; 153 : 933-946.

Smith DH, Bailey JW, Welde BT. Immunodiagnostic tests on cerebrospinal fluid in the diagnosis of meningoencephalitic *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection. *Ann Trop Med Parasitol.* 1989 ; 83 : 91-97.

Smith DH, Pépin J, Stich AHR. Human African trypanosomiasis: an emerging public health crisis. *Br Med Bull.* 1998 ; 54 : 341-355.

Spanaus KS, Schlapbach R, Fontana A. TNF-alpha and IFN-gamma render microglia sensitive to Fas ligand-induced apoptosis by induction of Fas expression and down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL. *Eur J Immunol.* 1998 ; 28 : 4398–4408.

Sprenger H, Rosler A, Tonn P, Braune HJ, Huffmann G, Gemsa D. Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996 ; 80: 155–161.

Stanghellini A, Josenando T. The situation of sleeping sickness in Angola : a calamity. *Trop Med Int Health.* 2001 ; 6 : 330-334.

Stanghellini A, Josse R, Cattand P, Bopang T, Tirandibaye N, Emery P, Millieliri JM, Cordoliani G. Aspects épidémiologiques de la trypanosomiase humaine africaine dans le sud du Tchad. *Med Trop.* 1989 ; 49 : 395-400.

Sternberg JM, Njogu Maina N, Gickhuki CW, Ndung'U JM. Nitric oxide production in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) infected with *Trypanosoma brucei*. *Parasite Immunol.* 1998 ; 20 : 395-397.

Sternberg MJ. Human African trypanosomiasis: clinical presentation and immune response. *Parasite Immunol.* 2004 ; 26 : 469-476.

Sternberg MJ. Immunology of African trypanosomiasis. *Chem Immunol.* 1998 ; 70 : 186-199.

Sturk LM, Brock JL, Bagnell CR, Hall JE, Tidwell RR. 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.* 2004 ; 91 : 131-143.

Tait A. Sexual processes in the Kinetoplastida. *Parasitology.* 1983 ; 86 : 29-57.

Takahata Y, Nomura A, Takada H, Ohga S, Furuno K, Hikino S, Nakayama H, Sakaguchi S, Hara T. CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol.* 2004 ; 32 : 622-629.

Thurin J, Thurin M, Herlyn M, Elder DE, Steplewski Z, Clark WH Jr, Koprowski H. GD2 ganglioside biosynthesis is a distinct biochemical event in human melanoma tumor progression. *FEBS Lett.* 1986 ; 208 : 17-22.

Turner MJ, Donelson JE. Molecular parasite biology, cellular, immunological and molecular aspects. Edited by Wyler DJ Ed. WH Freeman and Company 1990 ; p 51-63.

Uemura A, Watarai S, Kushi Y, Kasama T, Ohnishi Y, Kodama H. Isolation and characterization of gangliosides from *Trypanosoma brucei*. *J Parasitol.* 2004 ; 90 : 123-127.

Vergelli M, Mazzanti B, Traggiati E, Biagioli T, Ballerini C, Parigi A, Konse A, Pellicano G, Massacesi L. Short-term evolution of autoreactive T cell repertoire in multiple sclerosis. *J Neurosci Res.* 2001 ; 66 : 517-524.

Vestweber D. Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 ; 14 : 587-593.

Vickerman K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br Med Bull* 1985 ; 41 : 105-114.

Vincendeau P, Daulouède S, Veyret B, Dardé ML, Bouteille B, Lemesre JL. Nitric oxide-mediated cytostatic activity on *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp Parasitol.* 1992 ; 75 : 353-60.

Vincendeau P, Okomo-Assoumou MC, Semballa S, Fouquet C, Daulouède S. Immunologie et immunopathologie de la trypanosome africaine. *Med Trop.* 1996 ; 56 : 73-78.

Viswambharan H, Seebeck T, Yang Z. Enhanced endothelial nitric oxide-synthase activity in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol.* 2003 ; 33 : 1099-1104.

Vreysen MJ, Saleh KM, Ali MY, Abdulla AM, Zhu ZR, Juma KG, Dyck VA, Msangi AR, Mkonyi PA, Feldmann HU. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *J Econ Entomol.* 2000 ; 93 : 123-135.

Walsh JF, Molyneux DH, Birley MH. Deforestation: effects on vector-borne disease. *Parasitology.* 1993 ; 106 : 137-149.

Watanabe Y, Tamura M, Osajima A, Anai H, Kabashima N, Serino R, Nakashima Y. Integrins induce expression of monocyte chemoattractant protein-1 via focal adhesion kinase in mesangial cells. *Kidney Int.* 2003 ; 64 : 431-440.

Wenger DA, Clark C, Sattler M, Wharton C. Synthetic substrate beta-glucosidase activity in leukocytes: a reproducible method for the identification of patients and carriers of Gaucher's disease. *Clin Genet.* 1978 ; 13 : 145-153.

Wéry M, Wéry-Paskoff, Van Wettere P, Van Meirvenne N, Mesatewa M. The diagnosis of human African trypanosomiasis (*T. gambiense*) by the use of the fluorescent antibody test (II). *Ann Soc Belg Med Trop.* 1970a ; 50 : 711-730.

Wéry M, Wéry-Paskoff, Van Wettere P. The diagnosis of human African trypanosomiasis (*T. gambiense*) by the use of the fluorescent antibody test (I). *Ann Soc Belg Med Trop.* 1970b ; 50 : 613-634.

Whittle HC, Greenwood M, Bidwell DE, Bartlett DE, Bartlett A, Voller A. IgM and antibody measurement in the diagnosis and management of Gambian trypanosomiasis. *Am J Trop Hyg* 1977 ; 26 : 1129-1134.

Woo PTK. The hematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop.* 1970 ; 74 : 676-684.

Zimmermann C, Brduscha-Riem K, Blaser C, Zinkernagel RM, Pircher H. Visualization, characterization, and turnover of CD81 memory T cells in virus-infected hosts. *J Exp Med.* 1996 ; 183 : 1367–1375.

Zuniga E, Motran C, Montes CL, Diaz FL, Bocco JL, Gruppi A. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. *Clin Exp Immunol.* 2000 ; 119 : 507–515.

Yi FH, Lautrette C, Vermot-Desroches C, Bordessoule D, Couratier P, Wijdenes J, Preud'homme JL, Jauberteau MO. *In vitro* induction of neuronal apoptosis by anti-Fas antibody-containing sera from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2000 ; 109 : 211-220.

SITES INTERNET CONSULTÉS

<http://www.micromacro.co.uk/science/html/parasitology/sc3006.htm>

<http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biologie/photossq1/photos>

<http://www.kb.u-psud.fr/kb/niveau2/enseignements/niveau3/etudmed/cours-immunologie/cours/cours1.htm>

<http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/vsg.htm>

ANNEXES

Annexe 1 : Exemple de consentement éclairé d'un patient.

Annexe 2 : Boda C, Enanga B, **Courtioux B**, Breton C, Bouteille B. Methylene Blue: evidence for *in vitro* efficiency and *in vivo* failure in trypanocidal activity. *Soumis*

Annexes 1

DOENÇA DO SONO

FORMULARIO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu Senhor(a)morador(a) do
Município de... BairroRua.....
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 Dr. *Vatunga*....., 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~~ filha ~~parente, filho ou~~ 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. *27/11-2009*.....

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

Annexes 2

Boda C, Enanga B, **Courtioux B**, Breton C, Bouteille B.

Methylene Blue: evidence for *in vitro* efficiency and *in vivo* failure in trypanocidal activity. *In press*

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|----|
| REMERCIEMENTS | 4 |
| SOMMAIRE | 19 |
| INTRODUCTION..... | 30 |
| ETAT ACTUEL DE LA QUESTION | 32 |
| I- La maladie du sommeil..... | 32 |
| 1- Données épidémiologiques | 32 |
| a- Un peu d'histoire..... | 32 |
| b- Epidémiologie actuelle..... | 33 |
| 2- Les acteurs..... | 37 |
| a- Les parasites | 37 |
| b- Tsé-tsé : " la mouche qui tue" | 43 |
| - Le vecteur..... | 43 |
| - La lutte anti-vectorielle | 45 |
| 3- Clinique de la THA | 47 |
| 4- Diagnostic de la maladie | 49 |
| a- Méthode de détection dans le sang et dans les prélèvements ganglionnaires | 49 |
| - Méthodes par concentration..... | 50 |
| - Méthodes immunologiques..... | 51 |
| - Méthodes indirectes | 52 |
| b- Méthodes de détection dans le LCR | 53 |
| 5- Critères actuels classant les patients en stade II..... | 56 |
| 6- Le traitement | 57 |
| a- Les médicaments actuels..... | 57 |
| b- Les traitements de l'avenir..... | 60 |
| 7- Le vaccin : rêve ou réalité | 60 |
| 8- Les interrogations actuelles..... | 61 |
| II- Rappels d'immunologie | 64 |
| 1- Généralités..... | 64 |

| | | |
|------|--|----|
| a- | Le système immunitaire reconnaît des antigènes..... | 64 |
| b- | La cellule responsable de la reconnaissance de l'antigène est le lymphocyte..... | 64 |
| c- | La réponse immunitaire..... | 65 |
| d- | La mémoire immunitaire..... | 65 |
| e- | Immunité innée et immunité acquise | 66 |
| 2- | Les cellules et organes immunitaires | 66 |
| a- | Les lymphocytes..... | 66 |
| b- | Les cellules non-lymphocytaires..... | 70 |
| c- | Organes lymphoïdes centraux et maturation des lymphocytes | 72 |
| d- | Organes et structures lymphoïdes secondaires | 72 |
| 3- | Les chémokines et les migrations lymphocytaires..... | 73 |
| a- | Le recrutement tissulaire des leucocytes à partir du sang | 73 |
| b- | La migration intra-tissulaire du leucocyte | 73 |
| c- | Les chémokines | 73 |
| d- | Les récepteurs de chémokines | 75 |
| 4- | Les réponses immunitaires | 76 |
| a- | La réponse et sa régulation..... | 76 |
| b- | Réponse des lymphocytes T CD4 ⁺ auxiliaires naïfs | 77 |
| c- | Immunité humorale | 79 |
| d- | Immunité à médiation cellulaire | 81 |
| e- | Orientation et rôles respectifs des réponses immunitaires | 82 |
| 5- | Les réponses immunitaires innées induites lors d'une infection..... | 84 |
| a- | Les macrophages activés sécrètent de nombreuses cytokines ayant des effets à courte et longue distance | 84 |
| b- | Les cellules "Natural Killer" (NK) défendent l'organisme contre certaines infections intracellulaires. | 84 |
| c- | Certaines sous-populations lymphocytaires font le lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise | 85 |
| III- | Immunopathologie de la maladie du sommeil..... | 87 |
| 1- | Immunologie de la THA | 87 |
| a- | Inoculation du trypanosome..... | 87 |
| b- | Le complément..... | 88 |
| c- | Evolution de la réaction immunologique | 88 |

| | |
|--|-----|
| d- L'auto-immunité | 89 |
| 2- Rôles des cytokines | 94 |
| 3- Le rôle du monoxyde d'azote (NO) dans les infections à trypanosome | 95 |
| 4- Passage du parasite dans le SNC..... | 97 |
| OBJECTIFS | 123 |
| PATIENTS ET MÉTHODES | 125 |
| I- Les prélèvements chez les patients atteints de THA | 125 |
| 1- Mission en République Centrafricaine..... | 127 |
| 2- Mission en Angola | 129 |
| 3- Mission au Gabon | 131 |
| 4- Origines des sérums et LCR contrôles | 132 |
| II- Le matériel biologique | 136 |
| 1- Les trypanosomes..... | 136 |
| a- Origine..... | 136 |
| b- Culture de <i>T. b. brucei</i> AnTat 1.9, <i>T. b. gambiense</i> MBA et <i>T. b. rhodesiense</i> Il Tat 1.1..... | 136 |
| 2- Les souris | 136 |
| III- Les méthodes | 137 |
| 1- Cytométrie en flux pour le typage lymphocytaire..... | 137 |
| a- Marquage des lymphocytes du sang total | 137 |
| b- Marquage des lymphocytes du LCR..... | 137 |
| c- Marqueurs utilisés sur les cellules du sang et du LCR..... | 138 |
| d- Réalisation de contrôles isotypiques | 139 |
| e- Lecture des échantillons au cytomètre en flux | 140 |
| f- Analyse des résultats de la cytométrie en flux | 141 |
| 2- Dosage des chémokines et d'IL-1 β dans le sérum et le LCR des patients..... | 143 |
| 3- Recherche des auto-anticorps anti-galactocérebrosides et anti-neurofilament | 143 |
| a- ELISA | 143 |
| b- Dot blot | 144 |
| 4- Dosage des protéines dans les sérums et les LCR..... | 145 |
| 5- Analyse glycolipidique..... | 145 |
| a-Extraction des glycolipides de <i>Trypanosoma b. brucei</i> , <i>T. b. gambiense</i> et <i>T. b. rhodesiense</i> | 145 |
| | 269 |

| | |
|--|-----|
| b- Purification des glycolipides de <i>T. b. brucei</i> , <i>T. b. gambiense</i> et <i>T. b. rhodesiense</i> . | 146 |
| 6- Détection de la glucosylcéramide synthase par immunofluorescence indirecte | 147 |
| 7- Dosage de la β -glucosidase dans les trypanosomes | 147 |
| 8- Tests <i>in vitro</i> des inhibiteurs de la glucosylcéramide synthase | 148 |
| 9- Infection des souris | 149 |
| a- Tests <i>in vivo</i> des inhibiteurs de la glucosylcéramide synthase | 149 |
| b- Immunisation de souris | 149 |
| - Préparation des liposomes | 149 |
| - Protocole d'immunisation et suivi | 150 |
| c- Infection des souris et suivi | 151 |
| 10- Analyses statistiques | 151 |
| RÉSULTATS | 153 |
| 1- Analyse lymphocytaire dans le sang et le LCR des patients atteints de THA | 153 |
| a- Protocole | 153 |
| b- Population étudiée | 154 |
| c- Analyse du profil lymphocytaire dans le sang | 154 |
| d- Analyse du profil lymphocytaire dans le LCR | 163 |
| 2- Analyse des chémokines et d'IL-1 β au cours de la THA | 165 |
| a- Population d'étude | 165 |
| b- Détection des chémokines d'IL-8, MCP-1, MIP-1 α et RANTES et de IL-1 β chez les patients | 166 |
| c- Taux d'IL-1 β , MCP-1, MIP-1 α , IL-8 et RANTES dans les sérums des patients | 166 |
| d- Taux d'IL-1 β , MCP-1, MIP-1 α , IL-8 et RANTES dans les LCR des patients | 166 |
| e- Corrélation entre le taux de chémokines et la présence du parasite dans le LCR | 171 |
| f- Etude de la corrélation des chémokines dans le sang et le LCR des patients | 173 |
| - Dans le sérum (Tableau 16) | 173 |
| - Dans le LCR (Tableau 17) | 175 |
| 3- Induction de l'apoptose <i>in vitro</i> sur des cellules microgliales et endothéliales par le LCR de patients atteints de THA | 177 |
| 4- Activation des cellules endothéliales en présence de trypanosome africain | 186 |
| 5- Tests ELISA et Dot Blot | 196 |
| 6- Résultats de l'analyse de la structure glycolipidique du trypanosome | 204 |
| | 270 |

| | |
|---|-----|
| a- Mise en évidence du sucre et de la base | 204 |
| b- Marquage par immunofluorescence indirecte de la glucosylcéramide synthase | 206 |
| c- Dosage de l'activité de la glucosylcéramide synthase | 208 |
| d- Inhibition de la synthèse du glucosylcéramide | 209 |
| e- Effet des inhibiteurs de la synthèse du glucosylcéramide <i>in vivo</i> | 211 |
| f- Résultats de l'immunisation des souris par du glucosylcéramide et de galactocérobrosides | 212 |
| g- Suivi de l'immunisation des souris par du glucosylcéramide | 213 |
| DISCUSSION | 215 |
| CONCLUSION - PERSPECTIVES | 230 |
| BIBLIOGRAPHIE | 232 |
| SITES INTERNET CONSULTÉS | 258 |
| ANNEXES | 259 |
| Annexes 1 | 260 |
| Annexes 2 | 261 |
| TABLE DES MATIÈRES | 267 |