

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 100807 4

ANNEE 1996

N° 163/1

**ETUDE DE LA PRODUCTION DU MONOXYDE D'AZOTE
PAR LES LIGNEES MICROGLIALES CMH5
ET PAR LES LIGNEES ASTROCYTAIRES C6
EN COCULTURE AVEC *TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI*.**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE
obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

présenté et soutenu publiquement
le 29 octobre 1996 à Limoges

par

Christelle DENIS
née le 09 Août 1967 à Limoges (Haute-Vienne)

JURY

Monsieur le Professeur Michel DUMAS
Monsieur le Docteur Bernard BOUTEILLE
Mademoiselle le Professeur Marie-Laure DARDÉ
Madame le Docteur Marie Odile JAUBERTEAU-MARCHAN
Monsieur le Professeur Jean-Albert NICOLAS
Monsieur le Professeur Philippe VINCENDEAU

Président
Juge
Juge
Juge
Juge
Juge



UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1996

N° 63

**ETUDE DE LA PRODUCTION DU MONOXYDE D'AZOTE
PAR LES LIGNEES MICROGLIALES CMH5
ET PAR LES LIGNEES ASTROCYTAIRES C6
EN COCULTURE AVEC *TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI*.**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE
obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

présenté et soutenu publiquement
le 29 octobre 1996 à Limoges

par

Christelle DENIS
née le 09 Août 1967 à Limoges (Haute-Vienne)

JURY

Monsieur le Professeur Michel DUMAS
Monsieur le Docteur Bernard BOUTEILLE
Mademoiselle le Professeur Marie-Laure DARDÉ
Madame le Docteur Marie Odile JAUBERTEAU-MARCHAN
Monsieur le Professeur Jean-Albert NICOLAS
Monsieur le Professeur Philippe VINCENDEAU

Président
Juge
Juge
Juge
Juge
Juge



UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur PIVA Claude

ASSESSEURS:

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude
Monsieur le Professeur DENIS François

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Luc (C.S)	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE B
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
BARTHE Dominique (C.S)	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE
BAUDET Jean (C.S)	CLINIQUE OBSTETRICALE ET GYNECOLOGIE
BENSAID Julien (C.S)	CLINIQUE MEDICALE CARDIOLOGIQUE
BERNARD Philippe	DERMATOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François (C.S)	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie (C.S)	DERMATOLOGIE
BORDESSOULE Dominique	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BOULESTEIX Jean (C.S)	PEDIATRIE
BOUQUIER Jean-José	CLINIQUE DE PEDIATRIE
BOUTROS-TONI Fernand	BIostatistique ET Informatique MEDICALE
BRETON Jean-Christian (C.S)	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
CAIX Michel	ANATOMIE
CATANZANO Gilbert (C.S)	ANATOMIE PATHOLOGIQUE
CHASSAIN Albert	PHYSIOLOGIE
CHRISTIDES Constantin	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre (C.S)	UROLOGIE
CUBERTAFOND Pierre (C.S)	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)	PEDIATRIE
DENIS François (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DESCOTTES Bernard (C.S)	ANATOMIE
DUDOIGNON Pierre	REEDUCATION FONCTIONNELLE
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE
DUMAS Michel (C.S)	NEUROLOGIE
DUMONT Daniel	MEDECINE DU TRAVAIL
DUPUY Jean-Paul (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
FEISS Pierre (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
GAINANT Alain	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé	REANIMATION MEDICALE
GAY Roger (C.S)	REANIMATION MEDICALE
GERMOUTY Jean	PATHOLOGIE MEDICALE ET RESPIRATOIRE
HUGON Jacques	HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE-CYTOGENETIQUE
LABROUSSE Claude (C.S)	REEDUCATION FONCTIONNELLE
LABROUSSE François	ANATOMIE PATHOLOGIQUE

LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LAUBIE Bernard (C.S)	ENDOCRINOLOGIE ET MALADIES METABOLIQUES
LEGER Jean-Marie (C.S)	PSYCHIATRIE D'ADULTES
LEROUX-ROBERT Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
LIOZON Frédéric	CLINIQUE MEDICALE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MENIER Robert (C.S)	PHYSIOLOGIE
MERLE Louis	PHARMACOLOGIE
MOREAU Jean-Jacques (C.S)	NEUROCHIRURGIE
MOULIES Dominique	CHIRURGIE INFANTILE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
OUTREQUIN Gérard	ANATOMIE
PECOUT Claude (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
PERDRISOT Rémy	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
PILLEGAND Bernard (C.S)	HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
PIVA Claude (C.S)	MEDECINE LEGALE
PRALORAN Vincent (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
RAVON Robert (C.S)	NEUROCHIRURGIE
RIGAUD Michel	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
ROUSSEAU Jacques (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
SAUTEREAU Denis	HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
SAUVAGE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
TABASTE Jean-Louis (C.S)	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
TREVES Richard (C.S)	THERAPEUTIQUE
TUBIANA-MATHIEU Nicole	CANCEROLOGIE
VALLAT Jean-Michel	NEUROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VANDROUX Jean-Claude (C.S)	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
VIDAL Elisabeth (C.S)	MEDECINE INTERNE
WEINBRECK Pierre	MALADIES INFECTIEUSES

PROFESSEUR ASSOCIE A MI-TEMPS

MOULIN Jean-Louis 3ème CYCLE DE MEDECINE GENERALE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

* C.S = Chef de Service

A notre président de thèse

Monsieur le Professeur Michel DUMAS

Professeur des Universités de Neurologie

Médecin des hôpitaux

Chef de Service

Directeur de l'Institut d'Epidémiologie Neurologique et de Neurologie Tropicale

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

Nous vous remercions de l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Soyez assuré de notre profond respect

A notre directeur de thèse

Monsieur le Docteur Bernard BOUTEILLE

Maître de Conférence des Universités de Parasitologie-Mycologie

Praticien hospitalier

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

Nous vous remercions pour votre aide, les conseils et les critiques que vous avez fournis tout au long de ce travail et votre disponibilité permanente qui nous ont permis de réaliser ce travail dans de très bonnes conditions.

Soyez assuré de notre profonde et respectueuse reconnaissance.

A Mademoiselle le Professeur Marie-Laure DARDÉ

Professeur des Universités de Parasitologie Mycologie

Praticien hospitalier

Chef de service

Nous vous sommes très reconnaissante de nous avoir accueillie dans le Service de Parasitologie-Mycologie du CHRU Dupuytren de Limoges.

Nous vous remercions pour vos conseils et votre disponibilité.

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

Nous vous exprimons nos sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Philippe VINCENDEAU

Professeur des Universités de Parasitologie Mycologie

Praticien hospitalier

Nous sommes honorée de votre présence à ce jury de soutenance.

Nous sommes très sensible à l'intérêt que vous avez porté à notre travail.

Veillez agréer l'expression de nos remerciements respectueux.

A nos juges

Madame le Docteur Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN

Maître de Conférence des Universités d'Immunologie

Praticien hospitalier

Monsieur le Professeur Jean-Albert NICOLAS

Professeur Emérite des Universités de Microbiologie

Ancien Directeur du Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherche de la Haute-Vienne.

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

Nous vous exprimons nos sincères remerciements.

A mes parents, mon petit frère, et mes grands-parents

qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance pour leur affection, leur soutien et leur patience tout au long de ces années d'études.

A Gilles, en témoignage de mon amour et de mon affection

A ma famille et mes amis

Nous exprimons à Monsieur le Professeur Michel COGNE nos sincères remerciements pour ses conseils et son aide.

Nous exprimons à Monsieur Michel DRUET-CABANAC tous nos sincères remerciements pour son aide.

A tout le personnel du Service de Parasitologie-Mycologie du CHRU Dupuytren de Limoges, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance pour leur accueil chaleureux, leur soutien et leurs conseils.

Ce travail a bénéficié du soutien de la Direction de la Recherche et de la Technologie du Ministère de la Défense (Contrat n° 94-167) et du soutien du Programme Mobilisateur sur la Trypanosomiase du Ministère de la Coopération (Projet TR-95014).

ABREVIATIONS UTILISEES

GVS : glycoprotéine variable de surface

IFN- γ : interféron gamma

Ig M : immunoglobuline de classe M

IL-1 : interleukine 1

IL-2 : interleukine 2

LCR : liquide céphalo-rachidien

LPS : lipopolysaccharide

NO : monoxyde d'azote

NOS : NO synthase

PGD2 : prostaglandine D2

PGE2 : prostaglandine E2

SNC : système nerveux central

T. b. brucei : *Trypanosoma brucei brucei*

T. b. gambiense : *Trypanosoma brucei gambiense*

T. b. rhodesiense : *Trypanosoma brucei rhodesiense*

THA : trypanosomose humaine africaine

TLTF : trypanosome-released lymphocyte triggering factor

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

PLAN

INTRODUCTION	3
CHAPITRE I : PHYSIOPATHOLOGIE DE LA THA	8
A . ASPECTS ANATOMOCLINIQUES	10
B . TROUBLES DES RYTHMES CIRCADIENS	16
C . IMMUNOLOGIE ET IMMUNOPATHOLOGIE	18
CHAPITRE II : ETUDE DE LA PRODUCTION DE MONOXYDE D'AZOTE PAR LES LIGNEES ASTROCYTAIRES ET MICROGLIALES	36
A. CONDITIONS EXPERIMENTALES DE CULTURE	38
B. ETUDE DE LA PRODUCTION DE MONOXYDE D'AZOTE	45
C. RESULTATS	51
DISCUSSION	64
ANNEXES	70
BIBLIOGRAPHIE	77
TABLE DES FIGURES	94
TABLE DES MATIERES	96

INTRODUCTION

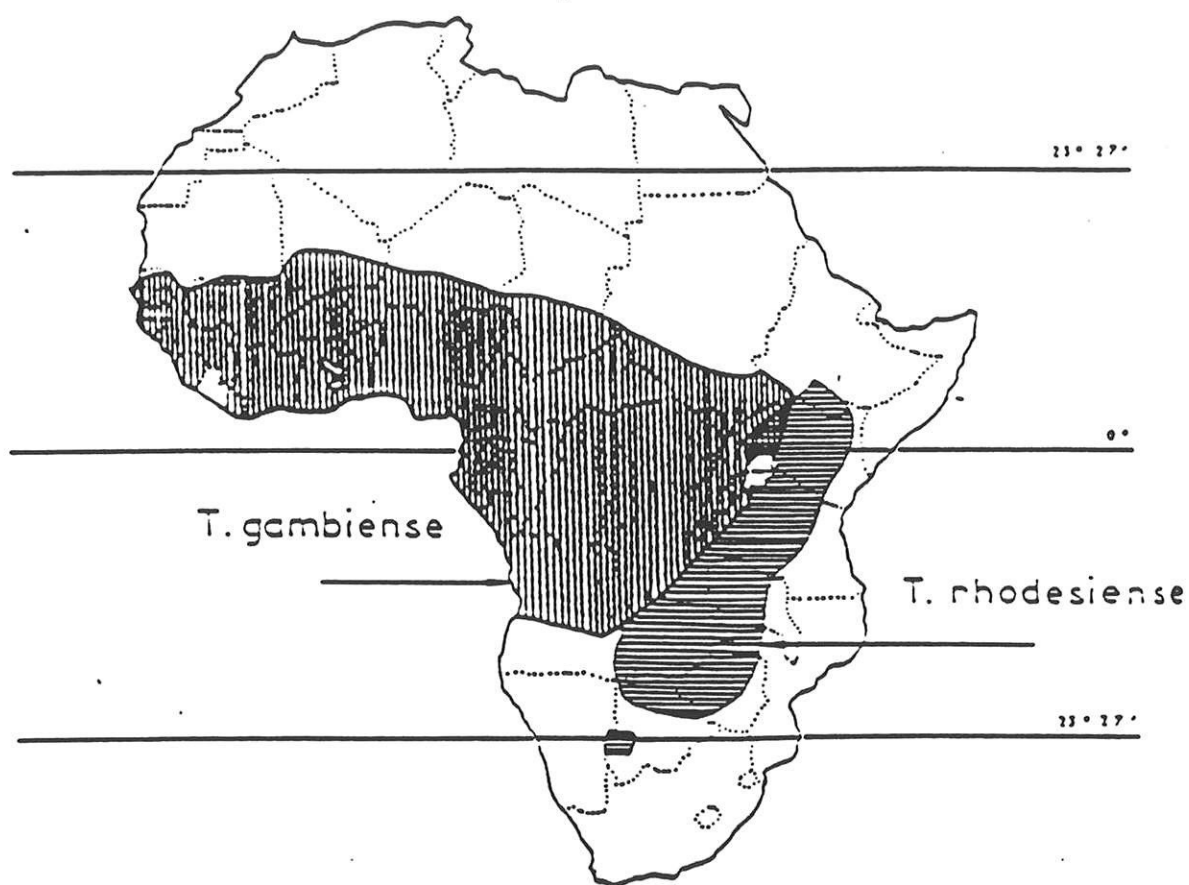
La trypanosomose humaine africaine (THA) ou maladie du sommeil est provoquée par *Trypanosoma brucei gambiense* (Afrique de l'Ouest et Centrale) et par *T. b. rhodesiense* (Afrique de l'Est), protozoaires flagellés à développement extracellulaire, inoculés à l'homme par piqûre d'une glossine (mouche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

La THA sévit en Afrique intertropicale, dans une zone délimitée entre 14° de latitude nord et 20° de latitude sud, qui correspond à la distribution géographique de son vecteur, la glossine (figure 1) (MOLYNEUX et al., 1996).

Cette maladie mortelle en l'absence de traitement constitue un problème majeur de santé publique en Afrique, où selon l'organisation mondiale de la santé plus de 60 millions de personnes sont exposées au risque de contamination. Actuellement, on note une recrudescence de cette affection avec, dans certaines zones endémiques, plus de 10% de la population atteinte (KUZOE, 1993 ; CATTAND, 1994).

Les manifestations de la maladie du sommeil en Afrique sont connues depuis longtemps, le Soudan occidental constitue l'un des foyers historiques connus parmi les plus anciens (BADO, 1993). Les descriptions cliniques remontent au XVIIème siècle, et soulignent le symptôme le plus caractéristique, le sommeil ou plutôt un état léthargique situé entre veille et sommeil.

La THA évolue en quatre stades parfois difficiles à séparer (DUMAS et BOUTEILLE, 1996) : le premier stade fait suite à l'inoculation du trypanosome par la glossine, il correspond à une induration locale au point de piqûre avec apparition



**Figure 1 : Répartition géographique de la maladie du sommeil à
T. gambiense et *T. rhodesiense*
(VINCENDEAU et al, 1996b).**

d'adénopathies satellites et dure de quelques jours à trois semaines selon l'agent causal. Le second stade correspond à la phase lymphatico-sanguine avec envahissement de l'organisme par le trypanosome. Ce stade est caractérisé par l'importance des signes généraux, l'atteinte préférentielle du coeur, la réponse du système réticulo-endothélial ; un début d'atteinte du système nerveux central (SNC) peut être noté dès ce stade. Le troisième stade ou phase de polarisation cérébrale avec méningoencéphalite se développe lentement et insidieusement pendant des mois ou même des années après l'inoculation ; son diagnostic repose encore de nos jours sur la présence de trypanosomes dans le liquide céphalo-rachidien ou d'une cytorachie > 5 éléments/mm³. Elle correspond à une aggravation des signes neurologiques et à l'apparition de troubles du cycle veille-sommeil (BUGUET et al., 1994 ; VILLANUEVA, 1994). Sans traitement, survient le stade de démyélinisation et la mort du patient, souvent due à une infection intercurrente (cachexie terminale) (DUMAS, 1995).

Les mécanismes physiopathologiques de la THA ne sont pas encore complètement élucidés, mais ils semblent liés à l'incapacité du système immunitaire à éliminer le trypanosome de l'organisme hôte.

Des vagues de parasitémie se succèdent, liées à l'apparition de parasites portant des glycoprotéines variables de surface (GVS) antigéniquement différentes. Cette variation est un des moyens permettant au trypanosome d'échapper aux défenses immunitaires, le nouveau variant n'étant pas reconnu par les anticorps produits contre les GVS antérieurement exprimées.

De plus, le trypanosome peut agir directement ou indirectement sur les cellules du système immunitaire provoquant la synthèse de cytokines, de monoxyde d'azote (NO) et

d'autres médiateurs (OLSSON et al., 1992). Le NO joue un rôle primordial dans les processus de neurotransmission (DAWSON et SNYDER, 1994) et dans les phénomènes de défense immunitaire ; il pourrait donc représenter un médiateur commun à l'interaction entre le trypanosome, le système immunitaire et le système nerveux. Le NO est impliqué dans les mécanismes physiopathologiques de la trypanosomose expérimentale du rat où son augmentation cérébrale coïncide avec sa baisse concomitante dans le sang périphérique (BUGUET et al., 1996). L'augmentation du NO cérébral pourrait ainsi participer à la perméabilisation de la barrière hémocéphalique et permettre une infiltration de cellules immunocompétentes qui pourraient activer les cellules astrocytaires et microgliales cérébrales.

Le but de notre travail est de mettre en évidence une production de NO par des cellules du SNC en présence de trypanosomes et/ou de cytokines. Pour atteindre cet objectif, nous avons mis en place un modèle d'étude *in vitro* en réalisant des cultures de cellules astrocytaires et microgliales, infestées ou non par une souche de *T.b. brucei* . Puis nous avons mesuré la production de NO, dans le surnageant des cultures, sous diverses conditions expérimentales.

CHAPITRE I

PHYSIOPATHOLOGIE DE LA THA

SOMMAIRE

A . ASPECTS ANATOMOCLINIQUES

B . TROUBLES DES RYTHMES CIRCADIENS

1. Trouble du sommeil
2. Troubles hormonaux

C . IMMUNOLOGIE ET IMMUNOPATHOLOGIE

1. Rôle du trypanosome
 - 1.1 Les glycoprotéines variables de surface
 - 1.2 Facteurs libérés par le trypanosome
2. Dysrégulation du système immunitaire
 - 2.1 Implication des lymphocytes B
 - 2.2 Implication des lymphocytes T
 - 2.3 Rôle des macrophages
3. Atteinte immunopathologique du système nerveux
 - 3.1 Modifications du liquide céphalo-rachidien
 - 3.2 Rôle des astrocytes et de la microglie
 - 3.3 Encéphalopathie réactionnelle

A . ASPECTS ANATOMOCLINIQUES.

Les trypanosomes appartiennent à la famille des Trypanosomatidae (figure 2). Ce sont des protozoaires flagellés sanguicoles à développement extracellulaire. Deux espèces du genre *Trypanosoma* sont pathogènes pour l'homme : *T. b. gambiense*, et *T. b. rhodesiense* (BAKER, 1995). L'infection est plus sévère et d'évolution plus rapide avec atteinte cardiaque préférentielle et méningoencéphalite aiguë dans la trypanosomose à *T. b. rhodesiense* ; elle est d'évolution chronique avec méningoencéphalite dans la trypanosomose à *T. b. gambiense* (DUMAS et BOUTEILLE, 1996).

Leur passage dans le SNC définit classiquement la phase méningo encéphalitique de la THA (POLTERA, 1985). Cette phase se caractérise par un syndrome neuropsychiatrique riche et complexe associant des troubles moteurs (troubles du tonus, atteinte de la mobilité et mouvements anormaux), des troubles sensoriels, psychiques et des troubles de la conscience et du sommeil (sommolence diurne et insomnie nocturne) (DUMAS et GIRARD, 1978).

Ces signes cliniques sont en partie liés à la pénétration des trypanosomes dans le SNC. Les trypanosomes pénètrent le SNC par des voies encore mal définies, mais il semblerait que les plexus choroïdiens puissent constituer une voie d'entrée (PENTREATH, 1991). Les plexus choroïdiens ont une structure vasculaire et sont issus des parois des ventricules du cerveau (figure 3). Ils sont responsables de l'élaboration du LCR. Chaque plexus choroïdien est constitué de réseaux capillaires volumineux, à paroi fine et fenêtrée.

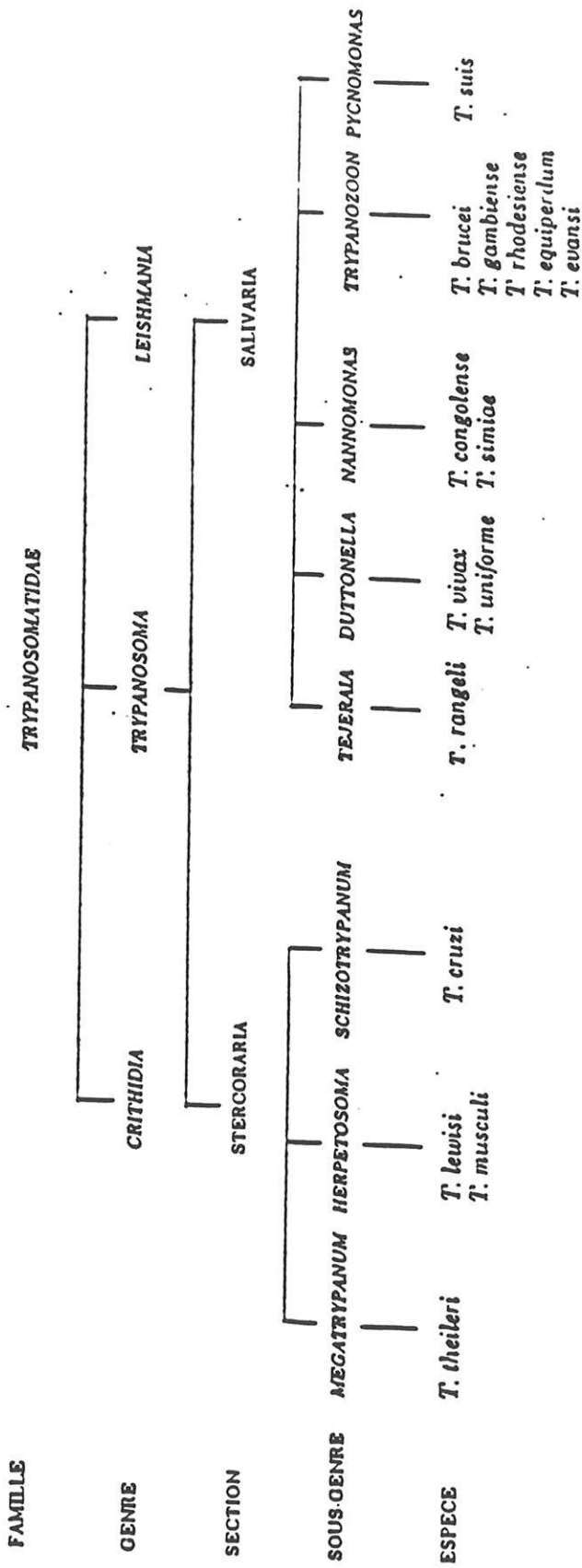


Figure 2 : Famille des Trypanosomatidae et genre *Trypanosoma* (HOARE, 1972).

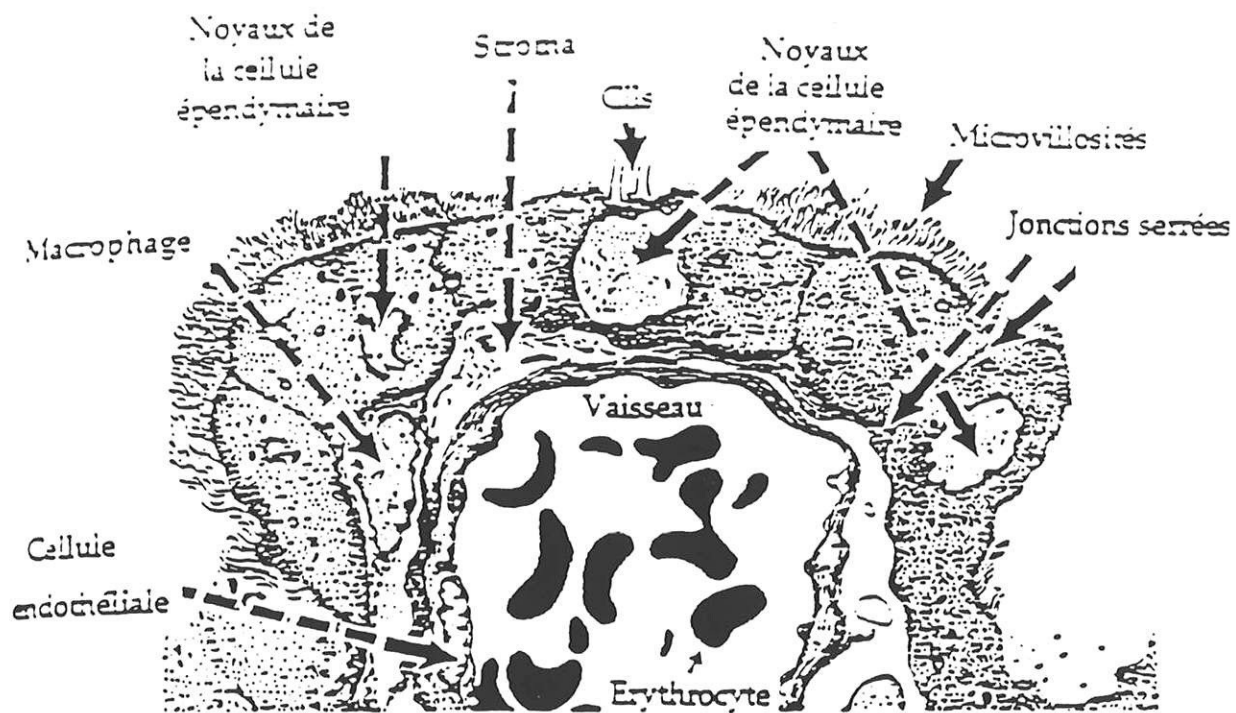


Figure 3 : Structure des plexus choroïdiens
(ABOLARIN et al., 1986).

De cette manière, les trypanosomes se répandent dans le LCR occupant l'espace sous arachnoïdien à partir duquel ils gagnent les espaces périvasculaires qui pénètrent le cerveau (figure 4). Ainsi, les trypanosomes envahissent les méninges et le parenchyme cérébral, expliquant l'apparition d'une méningoencéphalite avec développement d'un infiltrat périvasculaire (DUMAS et GIRARD, 1978 ; GREENWOOD et WHITTLE, 1980).

Dans les modèles expérimentaux, chez les rats infestés par *T. b. brucei*, la pénétration des parasites dans le SNC se fait grâce à l'altération de la barrière hémocéphalique et se produit en priorité dans les zones les plus fragiles que sont les plexus choroïdiens et les régions périventriculaires (POLTERA, 1985 ; SCHULTZBERG et al., 1988). Il semblerait que les signes neurologiques observés au cours de la THA soient liés à ces localisations électives : troubles du sommeil par atteinte des noyaux supraoptiques, syndrome extrapyramidal par atteinte des aires striées, troubles des sensibilités subjectives par atteinte du thalamus, troubles des fonctions endocriniennes par atteinte de la région hypophysaire sous-hypothalamique (DUMAS et BOA, 1988). Cette pénétration du SNC se fait précocement dans la maladie (PHILIP et al., 1994). Dans les plexus choroïdiens, la localisation des trypanosomes est controversée, mais ils restent extracellulaires bien que des formes amastigotes aient été décrites dans les cellules épendymales (ABOLARIN et al., 1982, 1986 ; ORMEROD et HUSSEIN, 1986) et pourraient être à l'origine de rechutes (JENNINGS et al., 1979).

Sur le plan immunohistochimique, au stade méningoencéphalitique on observe chez l'homme la présence d'une réaction inflammatoire avec un important infiltrat cellulaire périvasculaire. Ces infiltrats se retrouvent surtout au niveau du système veineux sous forme d'épais manchons engainant les vaisseaux et diffusant aussi en plein parenchyme nerveux (PENTREATH, 1995). Ces infiltrats sont constitués de lymphocytes, de plasmocytes, des

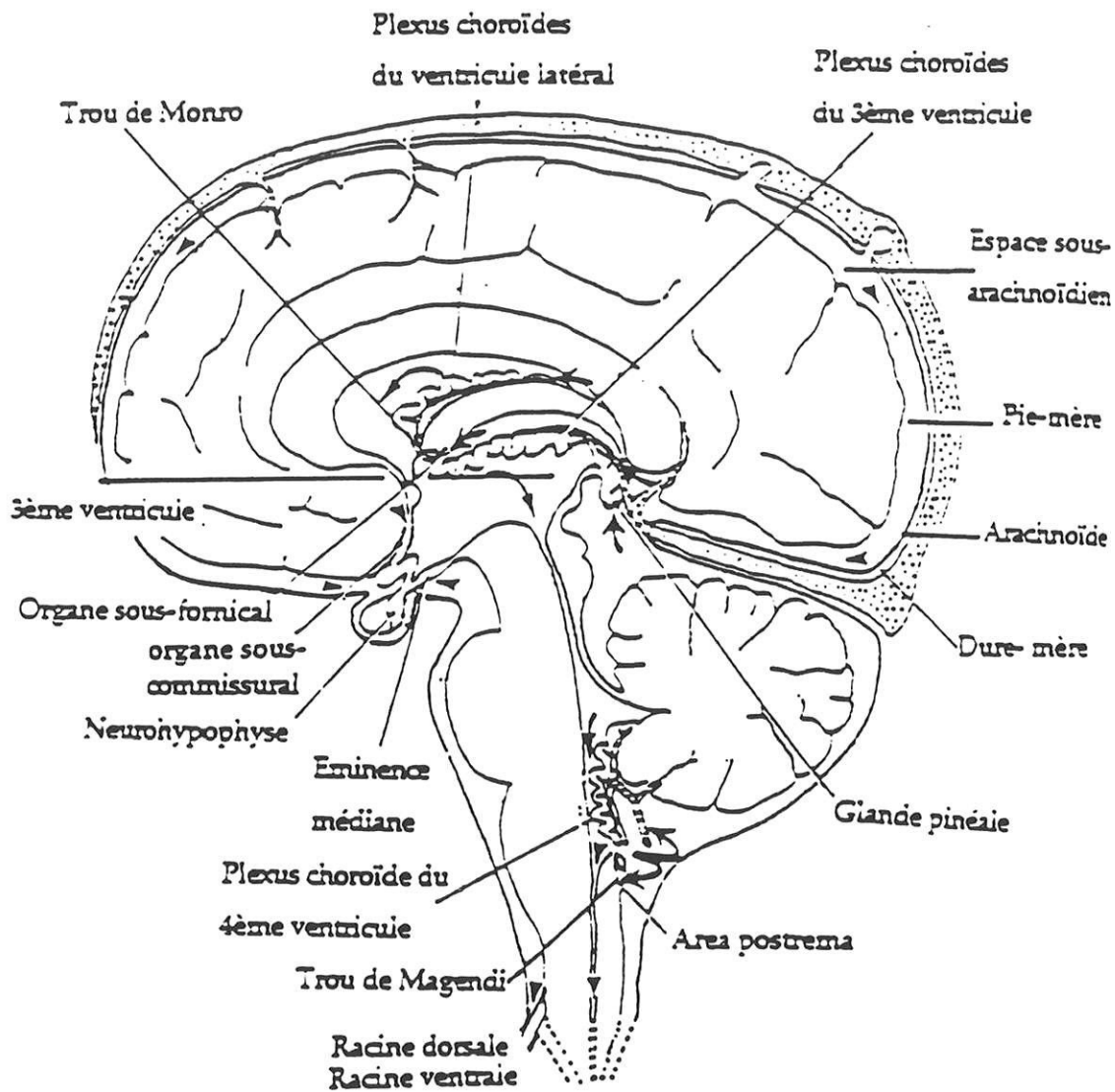


Figure 4 : Localisation des organes périventriculaires et voies empruntées par les trypanosomes dans le SNC

(SCHULTZBERG et al., 1988).

cellules de Mott caractéristiques et de rares polynucléaires (GREENWOOD et al., 1976). Les lésions atteignent les méninges, le cortex cérébral mais aussi la substance blanche sous corticale surtout autour du 3ème ventricule et du cervelet. A ces infiltrats s'ajoute une réaction gliale avec activation astrocytaire et prolifération de la microglie. Progressivement apparaît une démyélinisation secondaire aux lésions inflammatoires (DUMAS et BOUTEILLE, 1996).

Sur les modèles animaux, l'infiltrat cellulaire, composé de plasmocytes, de cellules de Mott, de lymphocytes T, forme des manchons périvasculaires et peut être accompagné de dégénérescence neuronale (POLTERA, 1980). Parallèlement à ces infiltrats et à la présence des trypanosomes, on note une infiltration de lymphocytes T CD8+ et de macrophages dans les structures périventriculaires, ainsi que l'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I sur les cellules de ces structures et sur les cellules neuronales des noyaux hypothalamiques supraventriculaires et supraoptiques (BENTIVOGLIO et al., 1994a ; PHILIP et al., 1994). Ces neurones seraient activés par voie rétrograde à partir de leurs terminaisons dans la neurohypophyse et l'éminence médiane exposées aux trypanosomes.

La réaction inflammatoire initiale peut entraîner des réactions immunitaires avec destruction des antigènes du soi, réaction croisée avec des antigènes communs aux trypanosomes et au système nerveux, suivies du développement d'une réponse de type autoimmun.

B. TROUBLES DES RYTHMES CIRCADIENS DANS LA THA.

1. Troubles du sommeil.

Dans la phase méningoencéphalitique, les troubles du sommeil soulignés depuis les plus anciennes descriptions sont au premier plan. La trypanosomose réalise des atteintes plus ou moins complètes, dissociées ou globales de la fonction vigile (COLLOMB, 1957). Tous les états intermédiaires entre vigilance parfaite et état comateux peuvent s'observer. La maladie du sommeil a eu à tort, pendant des années une connotation d'hypersomnie, cette impression venant du fait que les patients étaient agités la nuit et somnolents le jour (BUGUET et al., 1994).

L'organisation du sommeil normal présente 3 états de vigilance représentés par l'éveil, le sommeil orthodoxe (4 stades, les stades 3 et 4 formant le stade lent profond) et le sommeil paradoxal. L'enregistrement polyhypnographique représente le seul moyen de différencier avec certitude les états de vigilance. Cette technique comporte au minimum le recueil de l'électroencéphalogramme, de l'électromyogramme des muscles du menton et de l'électrooculogramme.

L'enregistrement polyhypnographique de 24 heures peut en effet préciser le trouble de la distribution veille-sommeil au cours de la THA ; ceci a été réalisé en 1989 sur un patient en phase terminale au Niger puis en Côte d'Ivoire et au Congo (BUGUET et al., 1994). Cette étude a retrouvé les perturbations du rythme circadien du cycle veille sommeil. Le sujet atteint de THA s'endort fréquemment mais peu de temps à la fois. Le sommeil et

l'éveil tendent à être répartis de façon homogène la nuit et le jour. Il existe une alternance veille sommeil en cycles d'autant plus courts que les malades sont gravement atteints. Le sommeil débute le plus souvent par du sommeil paradoxal. Malgré ces altérations, la durée totale du sommeil reste normale.

2. Troubles hormonaux.

Au stade avancé de la THA, d'autres rythmes circadiens sont perturbés, notamment les rythmes de sécrétion d'hormones comme le cortisol, la prolactine (RADOMSKI et al., 1994, 1995). Contrairement aux rythmes hormonaux précédents, la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale n'est pas affectée et reste semblable à celle des sujets sains, c'est-à-dire produite la nuit et inhibée le jour (BUGUET et al., 1995). Cette constatation est conforme à la notion que la glande pinéale paraît peu atteinte lors de la THA. Par ailleurs, chez la souris infestée par *T. b. brucei*, on remarque une perturbation de la synthèse des neurotransmetteurs au niveau cérébral, avec une augmentation du taux de dopamine et de noradrénaline au 50^{ème} jour de l'infestation (AMOLE et al., 1989).

La maladie du sommeil constitue un trouble majeur des rythmes hormonaux et du cycle veille sommeil proportionnel à la gravité de l'atteinte. Cette altération des rythmes circadiens, réversible sous traitement, et l'absence de perturbation de la sécrétion de mélatonine considérée comme le synchroniseur endogène des rythmes circadiens sont en faveur d'une altération de l'oscillateur circadien principal : les noyaux suprachiasmatiques ou une voie efférente (BUGUET et al., 1995).

C. IMMUNOLOGIE ET IMMUNOPATHOLOGIE DE LA THA.

Lors de la trypanosomose africaine, on observe une profonde dysrégulation du système immunitaire avec hypergammaglobulinémie, présence d'autoanticorps et immunodépression. D'autre part, on remarque des vagues de parasitémie successives, liées à l'apparition de trypanosomes antigéniquement différents.

1. Rôle du trypanosome.

1.1 Les glycoprotéines variables de surface (GVS).

Les trypanosomes possèdent un manteau d'environ 15 nm d'épaisseur qui les recouvre presque entièrement. Ce manteau est homogène et constitué d'une glycoprotéine de surface qui peut varier de structure en donnant naissance à une glycoprotéine différente d'où son nom de GVS. Ainsi, les trypanosomes peuvent changer la composition de leur GVS pour échapper à la réaction immunitaire. Cette caractéristique est rendue possible par l'expression sélective d'un gène codant pour des GVS immunologiquement distinctes qui entraîne l'apparition de parasites antigéniquement différents, les variants antigéniques (VICKERMAN, 1985). L'organisme élabore des anticorps contre le type majoritaire de GVS qui favorise la destruction successive des variants antigéniques. Cependant cette variation antigénique empêche l'acquisition d'une véritable immunité protectrice (limitant la

conception d'un vaccin) et stimule de façon permanente le système immunitaire entraînant son dérèglement.

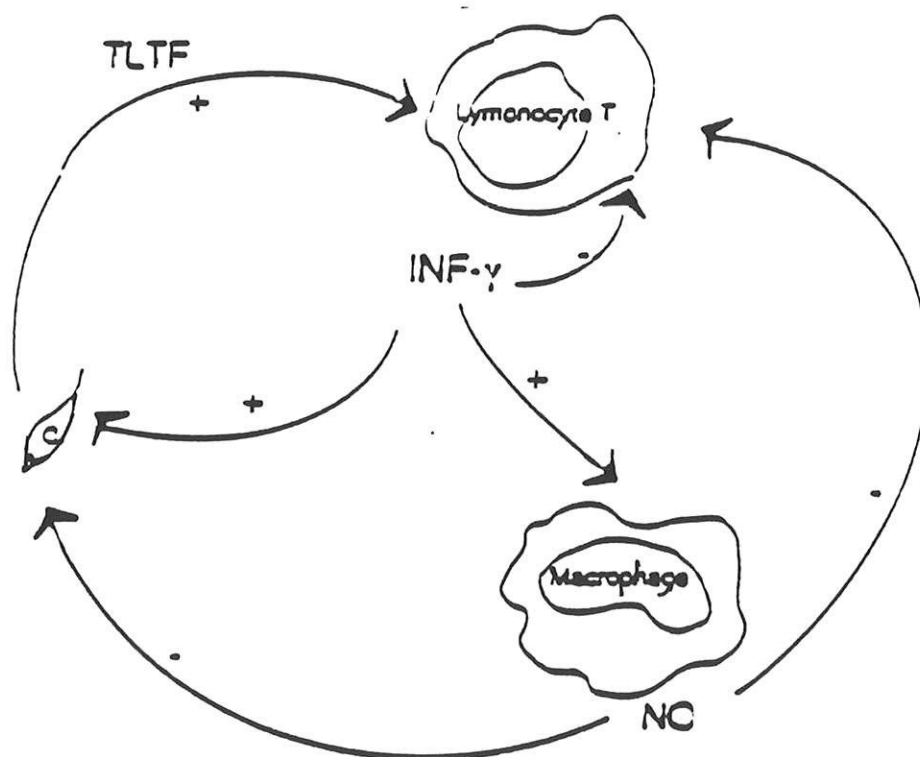
Les GVS possèdent la propriété d'induire la synthèse de certaines cytokines comme l'interleukine 1 (IL-1) ou le « Tumor Necrosis Factor α » (TNF- α) par les macrophages. Le TNF- α favorise l'immunosuppression mais possède aussi des propriétés trypanostatiques, limitant une prolifération trop rapide des trypanosomes (LUCAS et al., 1993). D'autre part, chez les patients atteints de THA, on observe une augmentation des taux sériques de TNF- α qui sont corrélés avec l'intensité des signes cliniques (OKOMO-ASSOUMOU et al., 1995).

1.2 Facteurs libérés par le trypanosome.

Le trypanosome peut agir indirectement sur le système immunitaire par ses produits de sécrétion ou de dégradation. Ainsi, une molécule de poids moléculaire compris entre 41 et 46 kDa, appelée «Trypanosome-released Lymphocyte Triggering Factor» (TLTF) induirait la synthèse d'interféron gamma (IFN- γ) par les lymphocytes T CD8+, cet IFN- γ favorise la croissance du parasite (figure 5) (OLSSON et al., 1992).

Récemment, des études chez des souris infestées par *T. b. brucei* ont montré l'implication de l'IFN- γ dans l'immunosuppression observée lors de l'infection (DARJI et al., 1996).

Figure 5 : Rôle du TLTF dans l'immunopathologie de la trypanosomose
(VINCENDEAU et al., 1996)



2. Dysrégulation du système immunitaire.

2.1. Implication des lymphocytes B.

Dans la THA, on observe une activation polyclonale des lymphocytes B avec hypergammaglobulinémie et production d'autoanticorps. La stimulation antigénique permanente (due aux GVS) induit une production constante non spécifique d'immunoglobulines de classe M (Ig M) dans le sérum et le LCR (par synthèse intrathécale et passage de protéines plasmatiques par augmentation de la filtration) (PHILIP et al., 1994). Leur concentration sérique atteint au minimum 4 fois le taux normal, ce qui fait du dosage des Ig M un moyen diagnostique et de dépistage (MATTERN, 1968 ; VAN MEIRVENNE et LE RAY, 1985). Une faible partie des anticorps est dirigée contre les antigènes parasitaires.

De nombreux autoanticorps ont été décrits dans la THA parmi lesquels des anti-érythrocytes, des anti-noyaux, anti-muscles lisses et striés, anti-immunoglobulines et des anticorps dirigés contre les constituants du système nerveux. Chez des souris infestées, on retrouve des anticorps anti-neurones de l'hippocampe, du thalamus et du cortex cérébral (POLTERA, 1980).

Chez l'homme on retrouve des taux sériques élevés d'anticorps contre une protéine myélinique cérébrale non caractérisée (ASONGANYI et al., 1989), d'anticorps anti-galactocérobrosides (composant lipidique de la myéline) (AMEVIGBE et al., 1992) et d'anticorps anti-neurofilaments (AYED et al., 1996). Ces anticorps sont plus fréquents chez les patients avec atteinte cérébrale. Il a été mis aussi en évidence des anticorps anti-tryptophane-« like » dont le taux augmente avec l'évolution de la maladie et la présence de

signes neurologiques ; ces anticorps n'ont pas été décelés dans d'autres maladies (Parkinson, Chagas) (OKOMO-ASSOUMOU et al., 1995).

La présence d'anticorps dirigés contre des constituants du système nerveux central pourrait contribuer à la physiopathologie de l'encéphalite de la THA et leur apparition pourrait être due à :

- une réactivité croisée entre des déterminants antigéniques du parasite et des constituants du SNC, entraînant une rupture de la tolérance au soi et l'apparition de ces anticorps (VINCENDEAU et al., 1996a).

- la libération d'autoantigènes due à des phénomènes cytotoxiques (induits par le parasite lui-même, ou par réaction inflammatoire) ; ces autoantigènes traverseraient la barrière hémocéphalique altérée. Ce passage à travers la barrière hémocéphalique aboutirait à la mise en présence des autoantigènes et des effecteurs de la réponse immunitaire (PENTREATH, 1995).

Cependant, la responsabilité du rôle de cette réponse auto-immune dans la neuropathologie n'est pas clairement établie.

Des complexes immuns circulants, formés par des antigènes parasitaires et des anticorps (produits par activation polyclonale des lymphocytes B), circulent dans le sang et peuvent se déposer dans de nombreux tissus et entraîner des réactions immunopathologiques (POLTERA, 1980). Ces complexes peuvent activer le système du complément, entraîner des lésions vasculaires et une coagulation intravasculaire disséminée (GREENWOOD et WHITTLE, 1980). On retrouve des taux élevés de complexes immuns dans le sang et le LCR de patients atteints de THA. Certaines études ont montré le dépôt

d'immunoglobulines et de C3 au niveau des plexus choroïdiens et de plusieurs zones cérébrales chez des souris infestées (POLTERA, 1980).

Cependant, aucune infiltration de polynucléaires neutrophiles caractéristique des maladies à immuns complexes n'a été retrouvée dans la THA (GREENWOOD et WHITTLE, 1980).

2.2 Implication des lymphocytes T.

Lors de l'infection à *T. b. brucei* chez la souris, on observe une diminution de la production d'interleukine 2 (IL-2), cytokine jouant un rôle crucial dans la régulation de la prolifération lymphocytaire T, ainsi qu'une baisse de l'expression du récepteur spécifique de l'IL-2. Le déficit du récepteur de l'IL-2 a pour conséquence une baisse de la réponse proliférative des lymphocytes T et donc une immunodépression. Cette immunodépression est révélée par une plus grande sensibilité aux autres maladies infectieuses et parasitaires qui représentent des facteurs d'aggravation de l'évolution de la trypanosomose (VINCENDEAU et al., 1996a).

Il semblerait que l'événement initial soit une activation macrophagique directe par contact avec le trypanosome, entraînant une modification du réseau des cytokines produites par les lymphocytes T avec une hyperproduction d'IFN- γ et une baisse de l'IL-2 (SILEGHEM et al., 1994).

Récemment, on a montré qu'un facteur soluble provenant de *T. b. brucei* était capable de supprimer l'expression du récepteur à l'IL-2 sur des cellules mononucléées sanguines humaines (OLSSON et al., 1992).

Pendant la trypanosomose expérimentale chez les rats, on note une infiltration lymphocytaire T CD8+ dans de nombreux tissus (ganglions de la racine postérieure et organes périventriculaires). La déplétion des lymphocytes T CD8+ par un anticorps monoclonal anti-CD8 entraîne une diminution de la parasitémie et une augmentation de la survie des rats infestés (OLSSON et al., 1992). On sait que *T. b. brucei* interagit avec les lymphocytes T CD8+ par l'intermédiaire d'une molécule, le TLTF. Sous l'action du TLTF, les lymphocytes produisent de l'IFN- γ favorisant la croissance des trypanosomes. De plus, le TLTF induirait la synthèse d'une molécule IFN- γ « like » par les neurones situés dans les ganglions des racines postérieures, molécule qui stimulerait la croissance du trypanosome (BENTIVOGLIO et al., 1994b). Des trypanosomes sont situés dans les ganglions sensoriels, ce qui explique l'hyperalgie à la chaleur des rats infestés (WIESENFELD-HALLIN et al., 1991). L'injection intrathécale d'IFN- γ chez le rat détermine une phase prolongée de facilitation du réflexe nociceptif en flexion, qui peut être partiellement bloqué par l'ester de nitro-L-arginine, un inhibiteur de la NO synthase. Ceci montre que les effets nociceptifs de l'IFN- γ sont une médiation liée à l'activation de la voie métabolique L-arginine-monoxyle d'azote (NO) (KRISTENSSON et al., 1994).

Chez l'homme, l'IFN- γ recombinant humain stimule la croissance de souches de *T. gambiense* et *T. rhodesiense* isolées chez des patients (BAKHIET et al., 1996).

A part son rôle direct sur la croissance des trypanosomes, l'IFN- γ pourrait affecter indirectement la survie du parasite chez l'hôte. En effet, une hyperproduction d'IFN- γ induit une immunosuppression lors des réactions du greffon contre l'hôte (CREPEL et LEMAIRE, 1995) et peut aussi inhiber la prolifération lymphocytaire T.

2.3 Rôle des macrophages.

Les macrophages jouent un rôle déterminant dans la réponse de l'hôte aux infections par des protozoaires (BLACKWELL et ALEXANDER, 1983 ; ASH, 1991). Les macrophages activés peuvent sécréter de nombreux médiateurs, incluant des cytokines proinflammatoires ou cytotoxiques, des prostaglandines, des dérivés actifs de l'oxygène et de l'azote.

Par leur abondance, leur distribution et leur mobilité, les macrophages peuvent influencer presque chaque aspect des réponses inflammatoires et immunitaires (LASKIN et PENDINO, 1995). Ils peuvent détruire les parasites directement par phagocytose et lyse par production de dérivés oxygénés.

Mais ils peuvent agir indirectement par synthèse de cytokines, parmi lesquelles le TNF- α . Lors des infections expérimentales à *T. b. brucei* chez la souris, on retrouve une hyperproduction de TNF- α . Le TNF- α a une action trypanolytique, ainsi, le traitement de souris infestées avec des anticorps anti-TNF- α a pour conséquence une augmentation significative du nombre de parasites (LUCAS et al., 1993). L'induction du TNF- α par les trypanosomes semble paradoxale, mais en fait le TNF- α pourrait représenter un mécanisme d'autoprotection contre une croissance trop rapide du parasite et la mort précoce de l'hôte.

Chez les patients atteints de THA, on constate une augmentation importante des taux de TNF- α sériques et il existe une corrélation entre l'intensité des signes cliniques et l'augmentation des taux de TNF- α (OKOMO-ASSOUMOU et al., 1995). Le TNF- α est aussi impliqué dans la physiopathologie de la maladie de Chagas provoquée par *Trypanosoma cruzi* (SILVA et al., 1995 ; FONTT et VRAY, 1995). Le TNF- α est

responsable de la cachexie observée dans les maladies chroniques inflammatoires (TRUYENS et al., 1995).

D'autre part, le TNF- α a la propriété d'être pyrogène par action directe et par induction de la synthèse d'IL-1. Récemment, des études *in vitro*, ont montré que le TNF- α jouait un rôle dans la synthèse de l'IFN- γ par les lymphocytes T CD8+, et qu'en synergie avec d'autres facteurs macrophagiques, il inhibait les réponses prolifératives lymphocytaires T CD4+ et CD8+ (DARJI et al., 1996).

Lors de l'activation macrophagique, une enzyme induite la NO synthase (NOS), métabolise la L-arginine en citrulline et en NO qui possède des propriétés antitumorales et antiparasitaires (JAMES et HIBBS, 1990 ; SHELLITO et al., 1996). Il existe 3 isoformes essentielles de NOS (FUKUTO et CHAUDHURI, 1995) :

- deux isoformes constitutives, cytosoliques, calcium dépendantes, trouvées dans les neurones (NOS-I) et les cellules endothéliales (NOS-III), interviennent dans les processus physiologiques ;

- une isoforme inductible (NOS-II), cytosolique, indépendante de l'entrée de calcium dans la cellule mais activée par certaines cytokines, trouvée dans les macrophages et les cellules microgliales, intervient dans les phénomènes pathologiques en produisant de grandes quantités de NO (DING et al., 1988 ; MONCADA et al., 1991 ; ZHANG et SNYDER, 1995).

Cette voie métabolique a été bien caractérisée dans les macrophages murins, un des mécanismes d'action du NO passe par une liaison avec le fer de la cellule cible qui aboutit à la formation de complexes nitrosylés inactivant les enzymes contenant du fer.

Ainsi le NO a une activité trypanostatique sur *T. gambiense* et *T. b. brucei* (VINCENDEAU et al., 1992). Chez le rat infesté, on retrouve une diminution du NO sanguin probablement d'origine macrophagique, laissant ainsi le trypanosome se multiplier (BUGUET et al., 1996). Récemment, le rôle du NO a été mis en évidence dans l'activité leishmanicide des macrophages humains, prouvant que cette voie existe bien chez l'homme (MOSSALAYI et al., 1995). Le NO semble aussi jouer un rôle dans la physiopathologie du paludisme à la fois chez les souris et chez les hommes (JACOBS et al., 1995, 1996 ; KREMSNER et al., 1996 ; COT et al., 1996). Par ailleurs, l'inhibition de la croissance de *Toxoplasma gondii* semble liée à l'activation de la voie du NO dans les macrophages de souris (DAUBENER et al., 1996)

La régulation de la synthèse du NO par les macrophages est en partie liée à l'action de l'IFN- γ et du TNF- α (JACOBS et al., 1996). Les infections à trypanosomes stimulent les cellules immunitaires à produire de l'IFN- γ et du TNF- α qui, en retour, activent les macrophages à produire du NO (DAULOUEDE et al., 1994). D'autre part, outre son rôle cytostatique, le NO inhibe la prolifération lymphocytaire T et participe donc à l'immunosuppression (STERNBERG et MABBOTT, 1996).

3. Atteinte immunopathologique du système nerveux.

3.1 Modifications du liquide céphalorachidien.

L'atteinte du SNC est un événement précoce dans la physiopathologie de la trypanosomose. Cependant, le LCR n'est pas un environnement favorable pour la survie des parasites, surtout dans la phase méningoencéphalitique où il contient de nombreux lymphocytes et une importante quantité d'immunoglobulines, surtout des IgM

(PENTREATH, 1995). L'augmentation des IgM est due à leur synthèse intrathécale locale et à une augmentation du passage des protéines plasmatiques (PHILIP et al., 1994).

Dans le LCR de patients atteints de trypanosomose, à la phase cérébrale on observe aussi une perturbation de la production des médiateurs lipidiques inflammatoires que sont les prostaglandines. Les prostaglandines agissent comme des régulateurs locaux de la réponse inflammatoire et des autres composants de la réponse immunitaire. Ainsi, on retrouve une augmentation de la production de PGD2 dans le LCR de patients à la phase méningoencéphalitique (PENTREATH et al., 1990). *In vitro*, des études ont montré la production de PGD2 par les fibroblastes et les astrocytes de rat en présence de lysats de *T. b. brucei* (ALAFIATAYO et al., 1994). Chez les souris infestées par *T. b. brucei*, la sécrétion de prostaglandines par les macrophages est responsable en partie de la diminution de synthèse de l'IL-2 et donc joue un rôle dans l'immunosuppression (SILEGHEM et al., 1991). Les perturbations de la production des prostaglandines pourraient être impliquées dans les modifications du réseau des cytokines dans la THA et dans les troubles du sommeil (en effet, les récepteurs spécifiques de PGD2 se trouvent dans l'aire cérébrale préoptique qui est un des centres régulateurs du sommeil) (ALAFIATAYO et al., 1994).

D'autre part, chez les souris infestées (PENTREATH, 1994) et chez les patients en phase cérébrale on observe des taux élevés d'endotoxines dans le sérum et le LCR (PENTREATH et al., 1996). L'origine de cette hyperproduction n'est pas clairement définie et pourrait être une conséquence de lésions intestinales ou hépatiques et du parasite lui-même (ALAFIATAYO et al., 1993). L'augmentation des endotoxines doit certainement contribuer aussi à la physiopathologie de la maladie.

3.2 Rôle des astrocytes et de la microglie.

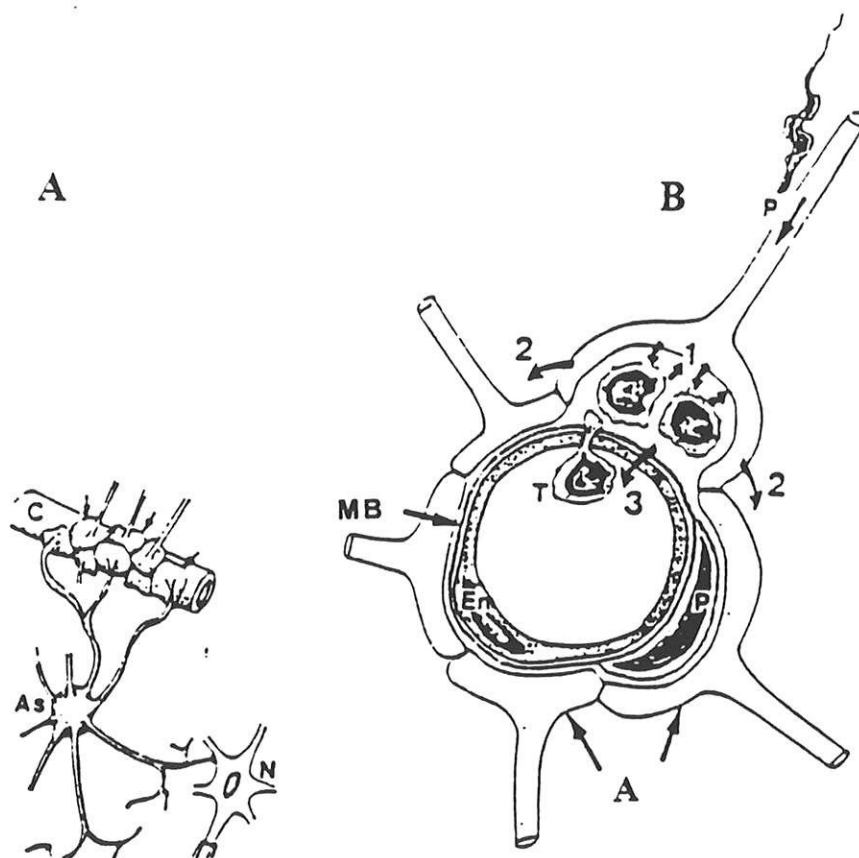
Au stade méningoencéphalitique chez l'homme, on observe une réponse inflammatoire importante caractérisée par une infiltration cellulaire non spécifique et diffuse des leptoméniges et des espaces périvasculaires du parenchyme cérébral périventriculaire (BENTIVOGLIO et al. , 1994b).

Actuellement, le SNC n'est plus considéré comme un site privilégié sur le plan immunologique, protégé des réactions immunitaires par la barrière hémocéphalique et l'absence de drainage lymphatique (SELMAJ, 1996).

Il est certain que les lymphocytes T activés peuvent traverser la barrière hémocéphalique et que les cellules gliales comme les astrocytes sont des éléments essentiels dans l'interaction entre le système nerveux et le système immunitaire (figure 6) (PENTREATH, 1989). Dans le SNC, la première réponse à une agression est une activation astrocytaire (EDDLESTON et MUCKE, 1993). Dans le SNC, il est essentiel qu'un agent infectieux soit éliminé rapidement, mais aussi que la réaction immunitaire soit restreinte au minimum.

Les astrocytes répondent à de nombreux stimuli au niveau cérébral (invasion par des agents infectieux, des substances toxiques ou des traumatismes) par un phénomène appelé astrogliose. Cette réponse n'est pas stéréotypée mais varie en durée et en importance en fonction du stimulus (NORTON et al., 1992). L'activation des astrocytes se caractérise par des modifications de leur phénotype avec augmentation de la synthèse de nombreuses enzymes et cytokines (EDDLESTON et MUCKE, 1993). Les astrocytes agissent comme des cellules immunitaires accessoires, en collaboration avec la microglie et d'autres types cellulaires et entraînent une réaction inflammatoire dans le SNC (HERTZ, 1990).

Figure 6 : Implication des astrocytes dans la réponse inflammatoire
(PENTREATH, 1989)



A : Figure représentant les relations entre les astrocytes (A), les capillaires cérébraux (C) et les neurones (N). Les flèches montrent les prolongements cytoplasmiques terminaux des astrocytes.

B : Figure représentant l'interface sang / système nerveux central.

Les pericytes (P) peuvent être des précurseurs de cellules microgliales. Les prolongements cytoplasmiques des astrocytes (A) forment une couche continue autour des vaisseaux sanguins cérébraux. Les lymphocytes T activés (T) peuvent traverser l'endothélium (En) et la membrane basale (Mb) et sont alors directement en contact avec les astrocytes. La synthèse de médiateurs (IL-1, IFN, PGE) par les astrocytes et les lymphocytes peut : (1) entretenir une réponse inflammatoire locale avec prolifération lymphocytaire, (2) induire localement la prolifération astrocytaire ou (3) pénétrer dans le système sanguin et favoriser l'entrée d'autres lymphocytes.

Dans la trypanosomose humaine et expérimentale (STEVENS et MOULTON, 1977) une astrogliose marquée a été souvent mise en évidence. Les astrocytes en tant que cellules présentatrices d'antigènes et productrices de cytokines pourraient initier et réguler la réponse inflammatoire cérébrale observée à l'interface sang/cerveau lors de la trypanosomose (PENTREATH, 1989). Chez les souris infestées par *T. b. brucei*, on note une astrogliose importante apparaissant avant tout autre signe de réaction inflammatoire cérébrale, suggérant que les astrocytes pourraient initier la réaction inflammatoire (HUNTER et al., 1992). L'activation astrocytaire est accompagnée par une augmentation de la synthèse d'IL-1, de TNF- α et d'IL-6, cytokines proinflammatoires et de « granulocyte macrophage colony stimulating factor » (GM-CSF) (GUILLEMIN et al., 1996). *In vitro*, les astrocytes répondent à la présence de *T. b. brucei* par des modifications morphologiques, une augmentation de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et l'augmentation du taux de la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP), indicateur de l'activation astrocytaire en culture (PENTREATH, 1994 ; LEE et al., 1995). D'autres études ont montré une hyperproduction de PGD2 et PGE2 par les astrocytes en présence de lysats de *T. b. brucei* (ALAFIATAYO, 1994). L'augmentation des prostaglandines D2 et de l'IL-1, élaborées par les astrocytes, peut en partie expliquer les troubles du sommeil de la THA puisque ces molécules ont des propriétés somnogéniques. Par ailleurs, la capacité des astrocytes à synthétiser des prostaglandines est importante pour réguler la réponse inflammatoire dans le SNC.

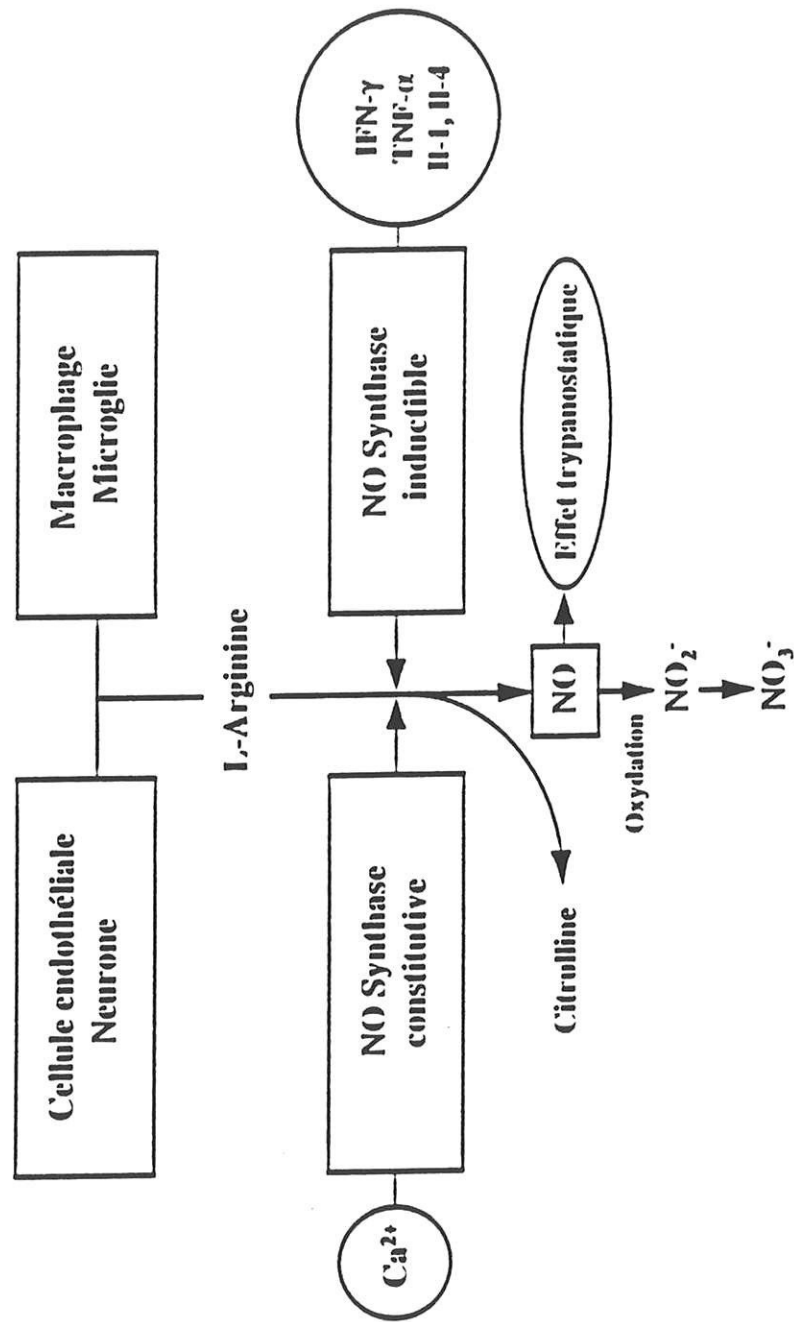
Les astrocytes activés favorisent la croissance des cellules microgliales et leur différenciation (LEE et al., 1995). La microglie est l'équivalent physiologique cérébral des macrophages tissulaires. Les cellules microgliales se différencient et prolifèrent dans les sites

inflammatoires cérébraux. Ces cellules paraissent jouer un rôle dans la défense de l'hôte, elles ont en effet de nombreux caractères communs avec les macrophages périphériques comme la production de cytokines, la phagocytose, l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, et la synthèse de NO après activation par des cytokines (CHAO et al., 1992 ; GIULIAN et CORPUZ, 1993). Les cellules microgliales produisent de IL-1 et du TNF- α , cytokine dont l'action est impliquée dans les complications cérébrales du paludisme (BANATI et al., 1993). D'autre part, IL-1 et TNF- α contribuent de façon synergique (par activation de la voie du NO) à la neurotoxicité observée dans plusieurs maladies inflammatoires neurologiques (CHAO et al., 1995).

Le monoxyde d'azote joue un rôle important dans la physiologie des systèmes cardio-vasculaire, nerveux et de la réponse immunitaire (MONCADA et al., 1991 ; DAWSON et SNYDER, 1994). Le NO peut être impliqué dans les mécanismes physiopathologiques de la THA au niveau cérébral. Le NO, synthétisé à partir de L-arginine, est oxydé sous forme de nitrites (NO_2^-) ou nitrates (NO_3^-) avec libération de citrulline. Cette réaction est catalysée par les trois isoformes de la NOS, les constitutives et l'inductible.

Chez l'homme et le rat, les astrocytes possèdent 2 isoformes de la NOS, une constitutive et une inductible (MURPHY et al., 1993). Mais il semblerait que les cytokines induisant l'expression de la NOS inductible soient différentes pour ces deux espèces (BROSNAN et al., 1994 ; LEE et al., 1995). Les cellules microgliales comme les macrophages possèdent une NOS inductible et sont capables de produire du NO après stimulation par de l'IFN- γ (ZIELASEK et al., 1992 ; MURPHY et al., 1993) (figure 7).

Figure 7 : Implication du monoxyde d'azote (NO) dans la trypanosomose (DUMAS et BOUTEILLE, 1996)



Dans la trypanosomose expérimentale du rat, on trouve une augmentation du NO, mesurée par voltamétrie (CESPUGLIO et al., 1996 ; BUGUET et al., 1996) au niveau du cortex cérébral. Cette augmentation est proportionnelle à la durée d'évolution de la maladie et pourrait être impliquée dans la perméabilisation de la barrière hémocéphalique, permettant l'infiltration de cellules immunocompétentes, l'entretien de la réaction inflammatoire et la pérennisation des dysfonctionnements intervenant dans la symptomatologie clinique de la maladie (figure 8).

3.3 Encéphalopathie réactionnelle.

L'étiologie de l'encéphalopathie post-thérapeutique, survenant chez 5 à 10% des sujets traités par le mélarsoprol, dérivé arsenical, reste mal connue. Ce produit traverse la barrière hémocéphalique et est utilisé en phase de polarisation cérébrale, permettant l'élimination des trypanosomes du SNC. Le traitement semble provoquer une subite aggravation des lésions inflammatoires et l'apparition d'une encéphalopathie oedémateuse avec suffusions hémorragiques qui entraîne très fréquemment le décès du patient (ARROZ, 1987 ; PEPIN et al., 1994).

Cette complication thérapeutique pourrait être due à la libération massive d'antigènes parasitaires provenant de la lyse des trypanosomes dans le SNC et provoquant une violente réponse immunitaire (PENTREATH, 1995 ; SCHMIDT et BAFORT, 1985).

D'autres auteurs considèrent que cette complication serait provoquée par l'élimination rapide des trypanosomes dans le sang périphérique et à leur persistance dans le SNC, permettant ainsi aux cellules immunitaires de se concentrer sur l'élimination des parasites cérébraux (JENNINGS et al., 1989).

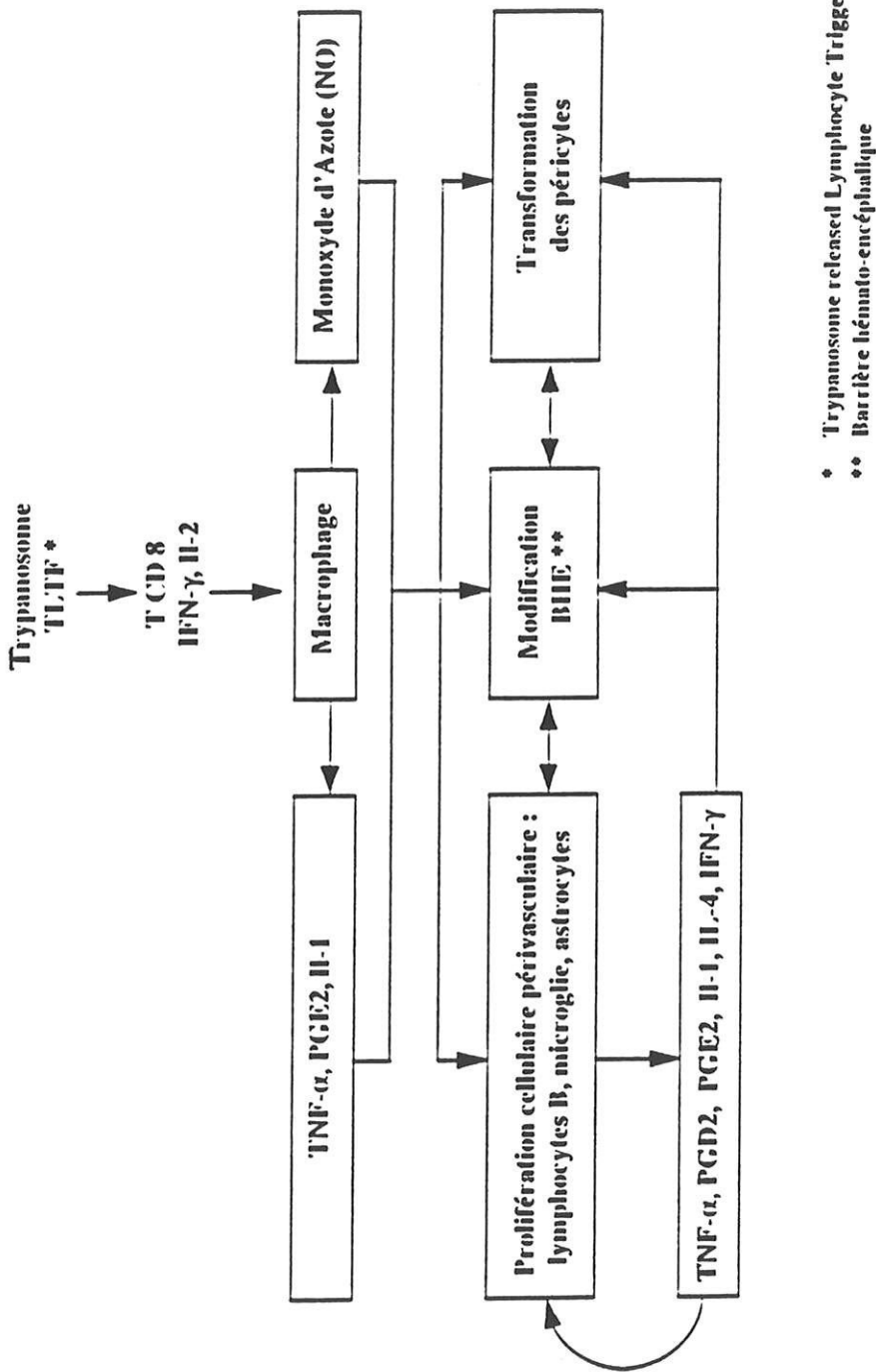


Figure 8 : Immunopathologie dans la trypanosomose africaine (DUMAS et BOUTELLE, 1996)

CHAPITRE II

**ETUDE DE LA PRODUCTION DE MONOXYDE
D'AZOTE PAR LES
LIGNEES ASTROCYTAIRES ET MICROGLIALES**

SOMMAIRE

A. CONDITIONS EXPERIMENTALES DE CULTURE

1. Culture des trypanosomes

1.1 Composition du milieu

1.2 Adaptation en culture des trypanosomes

2. Culture des lignées

2.1 Composition du milieu

2.2 Mise en culture

3. Cocultures des lignées et de trypanosomes

3.1 Adaptation des trypanosomes au milieu des lignées

3.2 Coculture directe des lignées et des trypanosomes

B. ETUDE DE LA PRODUCTION DE MONOXYDE D'AZOTE

1. Dosage des nitrites dans le surnageant de cultures

2. Immunohistochimie

C. RESULTATS

1. Dosage des nitrites dans le surnageant de cultures

2. Immunohistochimie

A. CONDITIONS EXPERIMENTALES DE CULTURE.

1. Culture des trypanosomes.

Nous avons travaillé avec la souche de *T. b. brucei* AnTat 1-9 fournie par l'Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold d'Anvers (Belgique) et conservée au laboratoire sous forme de cryostabilat dans l'azote liquide.

Cette souche a été adaptée en culture dans un milieu semi synthétique acellulaire (BALTZ et al., 1985). Ce milieu permet une multiplication des trypanosomes qui conservent leurs caractères biochimiques, morphologiques et leur pouvoir infectieux. Récemment, l'addition de bathocuproïne sulfate et de L-cystéine s'est révélée intéressante dans le maintien *in vitro* à long terme des trypanosomes (HIRUMI et HIRUMI, 1989). La bathocuproïne limite les effets toxiques du peroxyde d'hydrogène produit par l'autooxydation de la L-cystéine (HIRUMI, 1994).

1.1 Composition du milieu.

- Minimum essential medium avec sels de Earle (MEM, laboratoire Flow).....	9,6g
- L-Glutamine (Flow).....	300mg
- Acides aminés non essentiels (Flow) x100.....	10ml
- Hepes poudre (Flow).....	5,95g
- Glucose (Prolabo).....	2g
- NaHCO ₃ (Merck).....	2,2g
- Pyruvate de sodium(2mM finale) (Serva).....	220,10mg
- Hypoxanthine(0,1mM finale) (Aldrich).....	13,61mg
- Thymidine (0,01mM finale) (Aldrich).....	3,90mg
- H ₂ O PPI.....	1100ml

Ajuster le pH à 7,3 avec du NaOH 5N.

Puis filtrer de façon stérile sur filtres à pores de diamètre 0,22 μ m (Falcon)

Au moment de l'emploi, ajouter :

- Pénicilline G.....150 UI/l
- 2 Mercaptoéthanol 100mM (0,5 mM finale).....50 μ l/10ml
- Sérum stérile de cheval (Gibco).....20% (v/v)

Modification du milieu de Baltz par adjonction au moment de l'emploi de :

- Bathocuproïne sulfate 50mM (0,05mM finale) (Sigma).....10 μ l/10ml
- L-cystéine 300mM (1,5mM finale) (Sigma).....50 μ l/10ml

Les solutions de mercaptoéthanol, agent réducteur nécessaire à la croissance des trypanosomes, ne sont pas stables. Il convient donc de réaliser des solutions stocks à 100mM, de les conserver à +4°C et de les renouveler tous les mois.

1.2 Adaptation en culture des trypanosomes sanguins.

Les trypomastigotes de *T. b. brucei* AnTat 1-9 nécessitent une phase d'adaptation sur des macrophages péritonéaux de souris avant leur culture continue en milieu semi synthétique acellulaire.

1.2.1 Isolement et maintien en culture des macrophages péritonéaux de souris.

Des souris, indemnes de toutes infections sont endormies à l'éther. Elles sont exsanguinées par décapitation. La cavité péritonéale est lavée par 4 ml d'une solution stérile de saccharose 0,34M contenant 150UI/l d'héparine. Le lavage péritonéal est ensuite centrifugé 10 minutes à 3000 tr/min. Le culot est repris par du milieu de culture.

Après comptage des macrophages en cellule de Malassez, la suspension est ajustée à 10^5 macrophages par ml. Des plaques à 24 puits pour culture cellulaire (Multiwell Falcon) sont utilisées. Chaque puits est rempli avec 1 ml de la suspension de macrophages. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C sous 5% CO₂. Douze heures plus tard, les puits sont lavés pour ne laisser que les cellules adhérentes, 1 ml de milieu neuf est ajouté. Après douze heures d'une nouvelle incubation, un tapis de macrophages est obtenu et les puits peuvent être infestés par des trypanosomes.

1.2.2 Mise en culture des trypanosomes.

Des souris infestées depuis 48 heures par injection intrapéritonéale de 10^5 trypanosomes *T. b. brucei* AnTat 1-9 dans un volume de 0,5 ml sont endormies à l'éther. Le sang parasité est recueilli sur héparine par ponction du sinus rétroorbitaire. Le sang est dilué au tiers dans du milieu de culture et centrifugé ; les trypanosomes sont comptés dans le surnageant à la cellule de Malassez. Le surnageant est ajusté à 10^5 trypanosomes par ml. Les puits contenant les macrophages sont infestés par 50µl de cette suspension soit environ 5000 parasites par puits. Les cultures sont ensuite incubées à 37°C sous 5%CO₂.

Quand le nombre de trypanosomes atteint 1 à 5. 10^5 par puits, les $\frac{3}{4}$ du milieu de culture sont changés par du milieu neuf après homogénéisation. Après quelques jours d'adaptation sur macrophages, des subcultures sont réalisées sur des puits sans macrophages contenant le milieu de culture. Les subcultures donnant une croissance convenable des trypanosomes contiennent des parasites adaptés au milieu semi synthétique acellulaire.

En milieu acellulaire, un inoculum de 10^5 trypanosomes donne en moyenne 2 à 3.10^6 parasites par ml en 48 heures et 5 à 6.10^6 par ml en 72 heures. Si le milieu n'est pas changé, les trypanosomes meurent rapidement après 72 heures. Il semble, en effet, que des métabolites toxiques s'accumulent dans le milieu, induisant la dégradation ou l'inactivation de certaines enzymes clés du fonctionnement du trypanosome (BRUN, 1985 ; HESSE, 1995).

La souche *T. b. brucei* AnTat 1-9 est maintenue en culture acellulaire continue par passages répétés tous les 2 jours.

2. Culture des lignées astrocytaire de rat C6 et microgiale humaine CMH5.

Les lignées astrocytaire de rat C6 et microgiale humaine CMH5 nous ont été fournies par le laboratoire de parasitologie de l'Université de Bordeaux II (Professeur Vincendeau).

2.1 Composition du milieu.

- Dulbeccos minimum essential medium	
- with non essential amino acid (DMEM, Gibco)x10.....	50ml
- L-Glutamine 200mM (2mM finale) (Gibco).....	5ml
- Hepes solution 1M (25mM finale) (Gibco).....	12,5ml
- NaHCO ₃ (Merck).....	1,25g
- Pyruvate de sodium (2mM finale) (Serva).....	0,11g
- Polymyxine B 1mg/ml (10µg/ml finale) (Sigma).....	5ml
- Streptomycine 200mg/ml(100µg/ml finale) (Diamant).....	0,25ml
- Pénicilline 200 000UI/ml(100UI/ml finale).....	0,25ml
- L-cystéine 300mM (0,2mM finale) (Sigma).....	335µl
- 2-Mercaptoéthanol 1mM (0,0001mM finale) (Merck).....	50µl
- Sérum de veau foetal stérile (Boehringer).....	10%
- H ₂ O PPI.....	450ml

Ajuster le pH à 7,3 avec NaOH 5N et filtrer stérilement sur filtres à pores de diamètre 0,22 μm .

Modification du milieu pour les cocultures de lignées et des trypanosomes par addition au moment de l'emploi de :

Bathocuproïne sulfate 50mM (0,05mM finale).....	10 μl /10ml
L-cystéine 300mM (1,5mM finale).....	50 μl /10ml

2.2 Entretien des lignées.

L'entretien des lignées se fait sur des plaques à 24 puits pour culture cellulaire. La densité cellulaire est ajustée à 10^5 cellules par ml et par puits. Tous les deux jours, quand les cellules arrivent à confluence, les trois quarts du milieu de culture sont renouvelés. Les cellules sont décollées des puits par plusieurs aspirations et refoulements à la pipette Pasteur et inoculées dans de nouveaux puits dans 1 ml de milieu neuf. Les plaques sont incubées à 37°C sous 5% CO_2 . Les lignées sont maintenues en culture par passages répétés tous les trois ou quatre jours.

3. Coculture directe des lignées et des trypanosomes.

3.1 Adaptation des trypanosomes dans le milieu des lignées.

Nous avons utilisé le milieu des lignées préalablement modifié pour les trypanosomes. Des puits sans cellules sont inoculés avec environ 5000 trypanosomes par puits. Les cultures sont réalisées sur des plaques à 24 puits et sont incubées à 37°C sous 5% CO_2 . Ce milieu nous a permis d'obtenir une croissance convenable des trypanosomes. Quand le nombre de trypanosomes atteint 1 à $5 \cdot 10^5$ par puits, les trois quarts du milieu sont

changés par du milieu neuf après homogénéisation. Nous avons pu maintenir en culture acellulaire, dans ce milieu, les trypanosomes pendant plusieurs jours par passages répétés tous les 2 jours.

3.2 Mise en place des cocultures directes des lignées et des trypanosomes.

Après avoir adapté la souche de trypanosomes au milieu, nous avons pu infecter des puits contenant les cellules astrocytaires ou microgliales par des trypanosomes. Nous avons pu montrer que les trypanosomes s'adaptent sur les cellules astrocytaires et microgliales de la même façon que sur des cellules fibroblastiques (NICOLAS et al., 1987). Les cocultures sont réalisées sur plaques à 24 puits et sont incubées à 37°C sous 5% CO₂.

Nous avons réalisé des cocultures de 48 à 72 heures, avec 10⁵ cellules CMH5 ou C6 ou plus, toujours infestées par 10⁵ parasites, chaque puits contenant 1 ml de milieu en volume final. Parallèlement à t₀, certains puits ont reçus de l'IFN-γ humain (200U/ml) et/ou du lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* sérotype O111.B4 (LPS, 1μg/ml) (Sigma) ; nous avons aussi utilisé un inhibiteur spécifique des NOS, la N^GMéthyl-L-Arginine (NMMA, Sigma) (100 μM/ml finale).

Les cocultures sont vérifiées tous les jours au microscope inversé, il n'a pas été observé de modification morphologique des cellules infestées.

Les différents schémas expérimentaux réalisés ont été regroupés dans le tableau suivant :

nombre de cellules à t0	lignée seule : CMH5 ou C6	lignée avec trypanosomes	lignée seule avec NMMA	lignée avec trypanosomes et NMMA
* mesure des nitrites après 48 heures d'incubation				
100 000			NF	NF
>100 000			NF	NF
* mesure des nitrites après 72 heures d'incubation				
100 000				
100 000	+ LPS	+ LPS	+ LPS	+ LPS
100 000	+ IFN- γ	+ IFN- γ	+ IFN- γ	+ IFN- γ
100 000	+LPS +IFN- γ	+LPS +IFN- γ	+LPS +IFN- γ	+LPS +IFN- γ

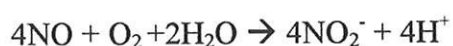
NF : non fait

Après 48 à 72 heures d'incubation, les surnageants de chaque puits sont recueillis, centrifugés 10 minutes à 3000 tr/mn. Les surnageants de centrifugation sont congelés à -20°C. Le dosage de la forme stable du monoxyde d'azote, les nitrites, est effectué pour chaque modèle de coculture réalisé.

B. ETUDE DE LA PRODUCTION DE MONOXYDE D'AZOTE.

1. **Dosage des nitrites : réaction colorimétrique de Griess** (figure 9)
(HAGEMAN et REED, 1980).

Le NO est mesuré de façon indirecte, dans le surnageant de cultures selon la méthode de Griess. Le NO, en présence d'eau, est rapidement oxydé et forme des nitrites (NO_2^-) selon la réaction :



Les nitrites NO_2^- s'accumulent dans les milieux et sont facilement détectables chimiquement.

***Réactifs utilisés :**

- Griess A : Sulfanilamide 1% (1g/100ml d'HCl 1,2N) (Sigma).
- Griess B : N-Naphtyl 1 éthylène diamine dichlorhydrate 0,3% (0,3g/100ml H₂O distillée) (Sigma).
- Gamme de dilution à partir d'une solution mère de 1g/l de NaNO₂ (Sigma) avec le milieu de culture.

***Méthode :** Dosage réalisé sur plaque de culture à 96 puits à fond plat, chaque échantillon est testé dans 2 puits.

- Avant tout dosage, centrifuger l'échantillon à doser.

- A 90µl de Griess A et 30µl de Griess B, on ajoute 50µl de surnageant de culture.

- Mélanger par passage sur un Micro Shaker de Dynatech

- La réaction colorimétrique se développe à l'obscurité pendant 10 minutes. les densités optiques (DO) obtenues à 540 nm sont corrigées par la soustraction des DO obtenues sur les puits contenant le milieu de culture seul. Les valeurs obtenues sont reportées sur la courbe étalon ($DO = f[NO_2^-]$) (figure 10) et exprimées en µM.

Lecture des DO sous spectrophotomètre pour plaque de microtitration Multiskan RC de Labsystems et recueil des résultats sur logiciel Biolise version 1.65 (Life Sciences International).

2. Immunohistochimie.

La mise en évidence des enzymes NOS constitutive et/ou inductible dans les lignées C6 et CMH5 est recherchée par une technique immunocytochimique.

- Sédimentation :

Culture des cellules CMH5 et C6 sur lamelle de verre dans les puits de plaque de culture (10^5 cellules par puits). Laisser les cellules se fixer sur lamelles dans des plaques de culture à 24 puits, pendant 24 à 72 heures. Laver avec de l'eau physiologique stérile.

- Fixation :

Fixer au paraformaldéhyde 4% (4g dans 100ml de tampon phosphate (PBS) 0,1 M pH = 7,4 ; chauffer à 80°C puis refroidir rapidement) pendant 10 mn ; faire suivre de 2

lavages dans du PBS. Fixer pendant 1mn avec du méthanol glacial ; laver 2 fois avec du PBS

- Préincubation :

Incuber les lames pendant 30 mn dans une solution de PBS contenant 30% de sérum de veau foetal (SVF).

- Première incubation :

Laisser une nuit en présence de l'anticorps (Ac) primaire, à 4°C, en chambre humide. Selon l'enzyme recherchée, utiliser :

- soit Ac de lapin anti-NOS inductible (Transduction laboratories) utilisé au 1/2000 dans PBS-SVF 1%

- soit Ac de souris anti-NOS constitutive (Département de Médecine expérimentale, Université Claude Bernard, Lyon I (Mme Léger)) utilisé au 1/2000 dans PBS-SVF 1%

2 lavages de 5 mn en PBS

- Seconde incubation :

Incuber 1 heure à température ambiante, en chambre humide avec l'Ac secondaire :

- soit Ac de chèvre(IgG) anti-lapin (NOS inductible) marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF) (Diagnostic Pasteur) dilué au 1/100 dans du PBS contenant 1/10000 de bleu d'Evans.

- soit Ac de mouton anti-souris (NOS constitutive) marqué à l'ITCF (Diagnostic Pasteur) dilué au 1/20 dans du PBS contenant 1/10000 de bleu d'Evans.

2 lavages de 5mn

Sécher les lamelles, monter les lamelles sur lames avec du Fluoprep (Biomérieux) et lecture au microscope à fluorescence.

Le cytoplasme des cellules apparaît fluorescent (jaune-vert) en cas de réaction positive (= présence de NOS).

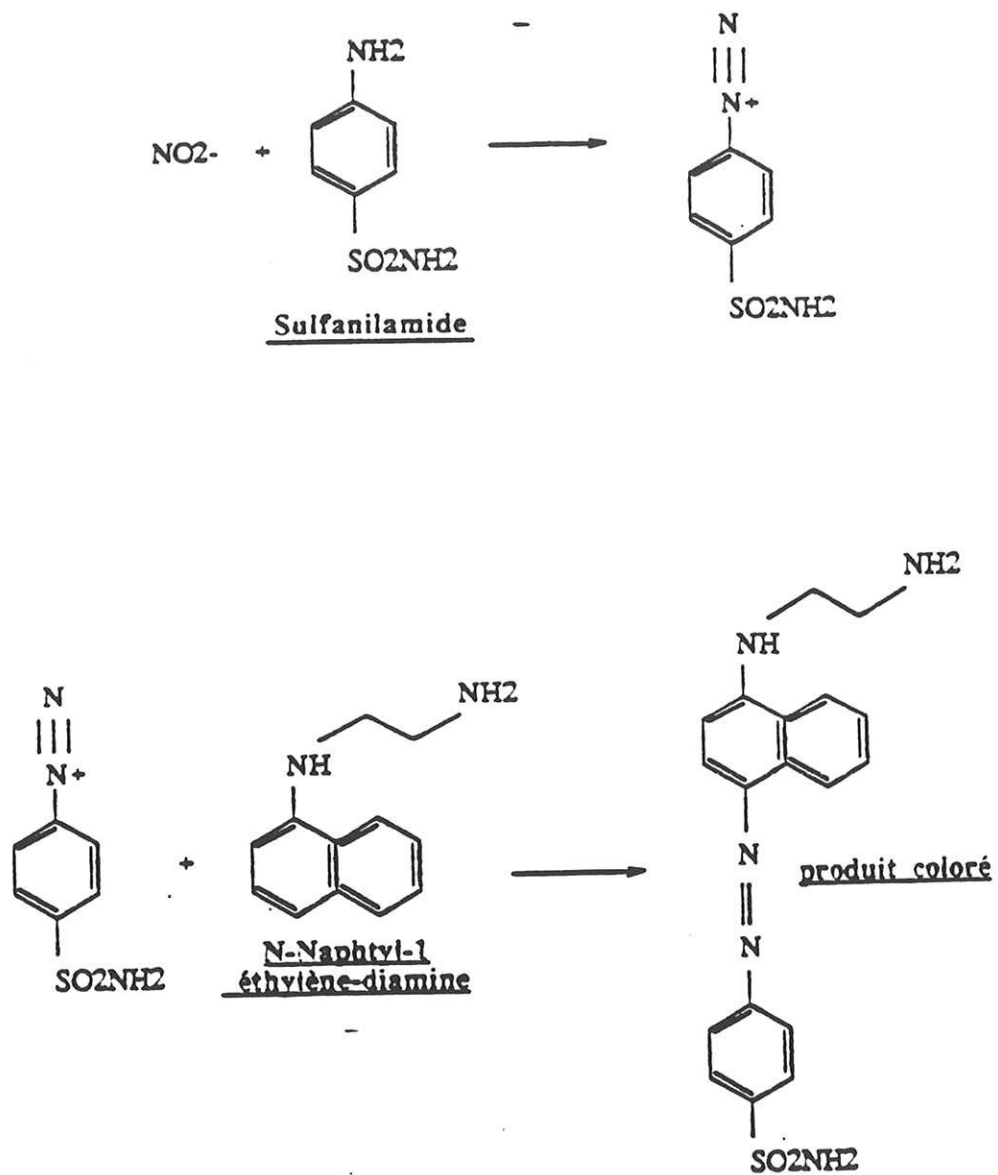
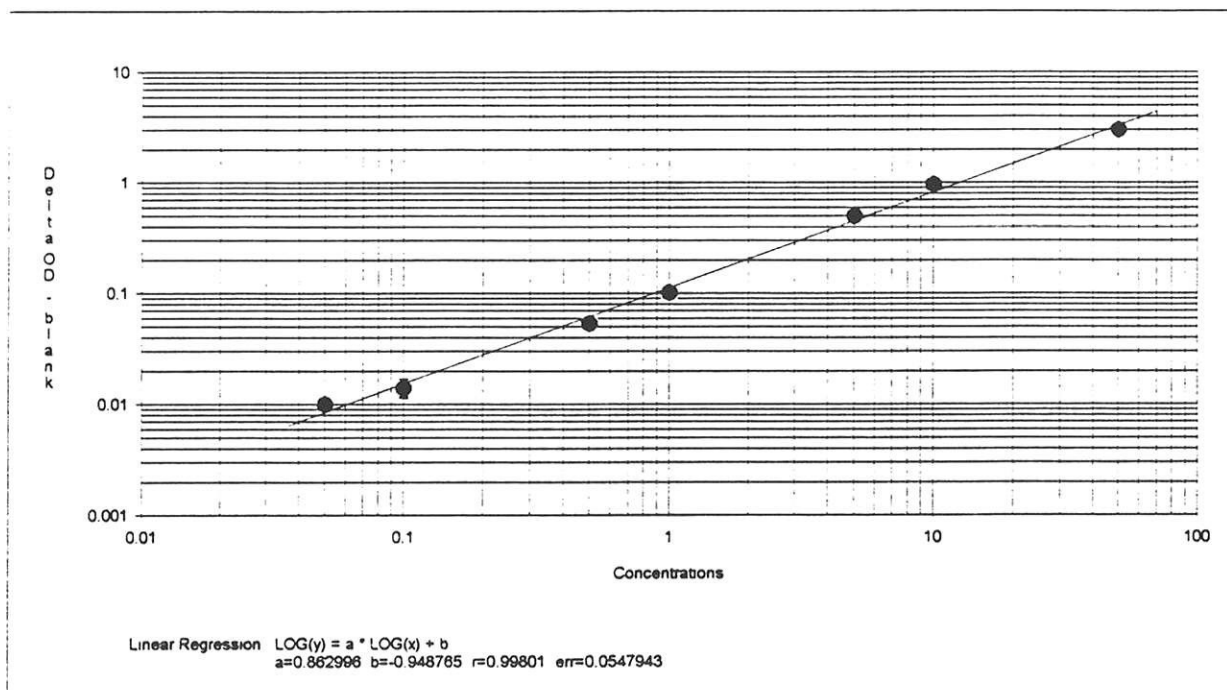


Figure 9 : Dosage des nitrites : réaction colorimétrique de Griess (HAGEMAN et REED, 1980)

Figure 10 : Courbe d'étalonnage réalisée pour chaque dosage de nitrites



C. RESULTATS.

1. Production de nitrites par les lignées.

1.1 Lignée microgliale humaine CMH5.

Sur 48 heures, nous obtenons une faible production de nitrites (NO_2^-), comme le montre la figure 11 et l'annexe 1 (lignée seule = $2,33 \pm 0,15 \mu\text{M}$). La présence de *T. b. brucei* et l'augmentation du nombre de cellules par puits ne modifient pas de façon importante la production de NO_2^- (lignée + trypanosomes = $3,22 \pm 0,46 \mu\text{M}$).

L'allongement du temps d'incubation à 72 heures permet d'obtenir une augmentation nette et significative de la quantité de NO_2^- dans les surnageants de culture (lignée 48 h = $2,33 \pm 0,15 \mu\text{M}$; lignée 72h = $6,89 \pm 0,68 \mu\text{M}$, $p < 0,05$: test U de Mann-Whitney, différence significative quand $p < 0,05$). On n'observe pas de différence entre les cellules seules et les cellules infestées par les trypanosomes pendant 72 heures. La production de NO_2^- par la lignée CMH5 à 72 heures est supérieure à la quantité de NO_2^- mesurée dans le milieu seul incubé dans les mêmes conditions pendant 72 heures (lignée CMH5 = $6,89 \pm 0,68 \mu\text{M}$; milieu seul = $1,62 \pm 0,51 \mu\text{M}$, $p < 0,05$). Les nitrites sont donc produits par les cellules microgliales *in vitro* et s'accumulent dans le surnageant de culture.

La stimulation de la lignée pendant 72 heures par de l'IFN- γ humain et/ou du LPS et/ou des trypanosomes est reportée sur la figure 12 et l'annexe 2. Comme précédemment, il n'y a pas de différence entre les cellules seules et les cellules infestées par *T. b. brucei* et la

Figure 11 :
Production de nitrites par la lignée microgliale humaine CMH5.
Valeur pour 100000 parasites et moyenne sur 5 expériences.

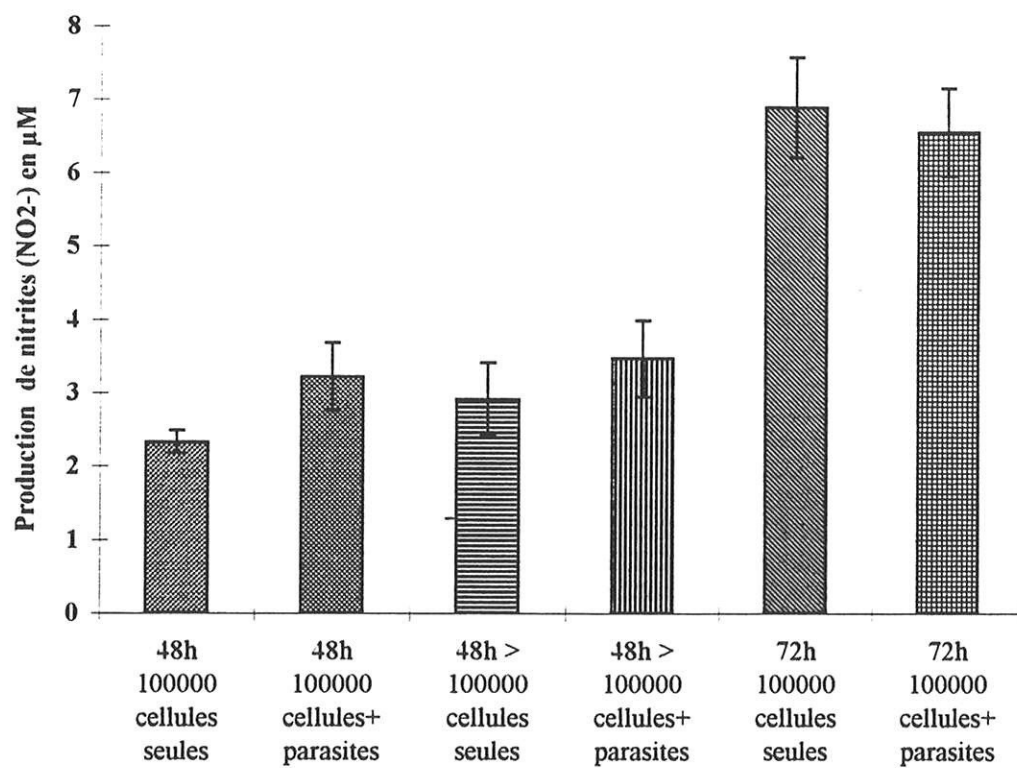
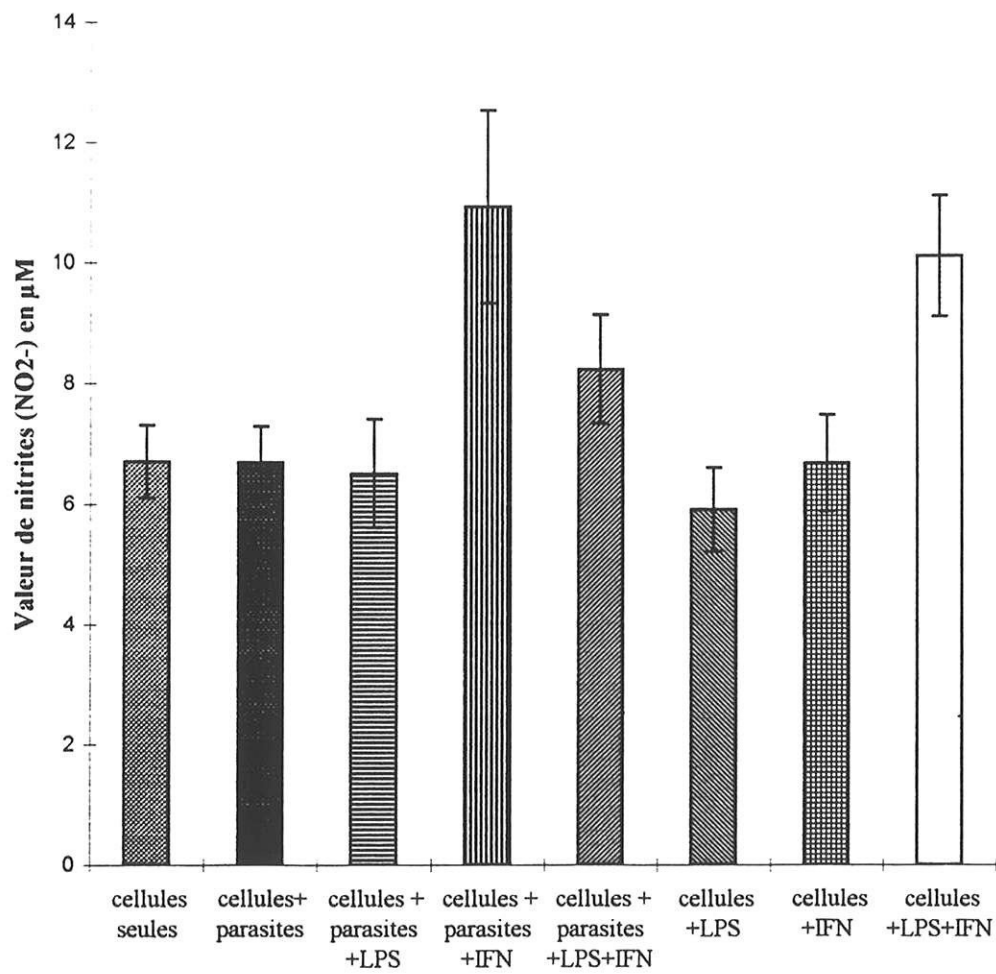


Figure 12 :
Production de nitrites par la lignée microgiale CMH5
après 72 heures d'incubation.
Valeur pour 100000 parasites et moyenne sur 4 expériences.



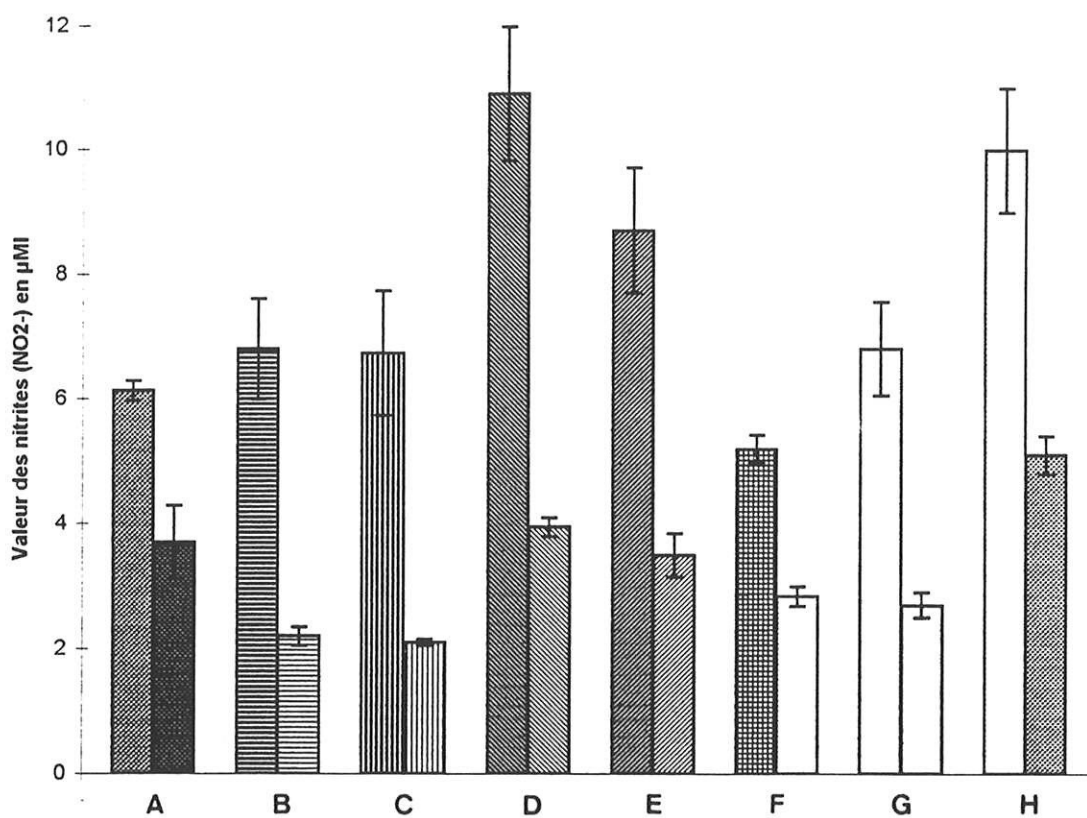
stimulation par le LPS ne modifie pas significativement les résultats (lignée seule = $6,72 \pm 0,66 \mu\text{M}$; lignée + trypanosomes = $6,69 \pm 0,59 \mu\text{M}$, $p = 0,88$; lignée + trypanosomes + LPS = $6,50 \pm 0,91 \mu\text{M}$, $p = 0,77$). L'IFN- γ en association avec les trypanosomes ou le LPS donne les taux les plus élevés de NO_2^- (lignée seule = $6,72 \pm 0,66 \mu\text{M}$; lignée + trypanosomes + IFN- γ = $10,91 \pm 1,65 \mu\text{M}$, $p < 0,05$). L'IFN- γ est nécessaire mais ne semble pas suffisant à l'activation des cellules. Le LPS et *T. b. brucei* paraissent jouer le même rôle coactivateur. *In vitro*, l'IFN- γ semble activer la voie du NO sur les cellules microgliales en présence des parasites (*T. b. brucei*) ou de LPS.

L'incubation des cellules avec l'inhibiteur spécifique des NOS entraîne une nette diminution de la quantité de NO_2^- dans toutes les conditions expérimentalement testées (figure 13 et annexe 5). La NMMA n'entraîne pas la disparition totale des nitrites, ce qui s'explique par la teneur en NO_2^- du milieu et peut-être par un effet plus ou moins sélectif des analogues de la L-arginine sur les NOS. Les valeurs obtenues après incubation avec l'inhibiteur sont inférieures aux valeurs obtenues pour les cellules seules mais supérieures aux valeurs obtenues pour le milieu seul.

1.2 Lignée astrocytaire de rat C6.

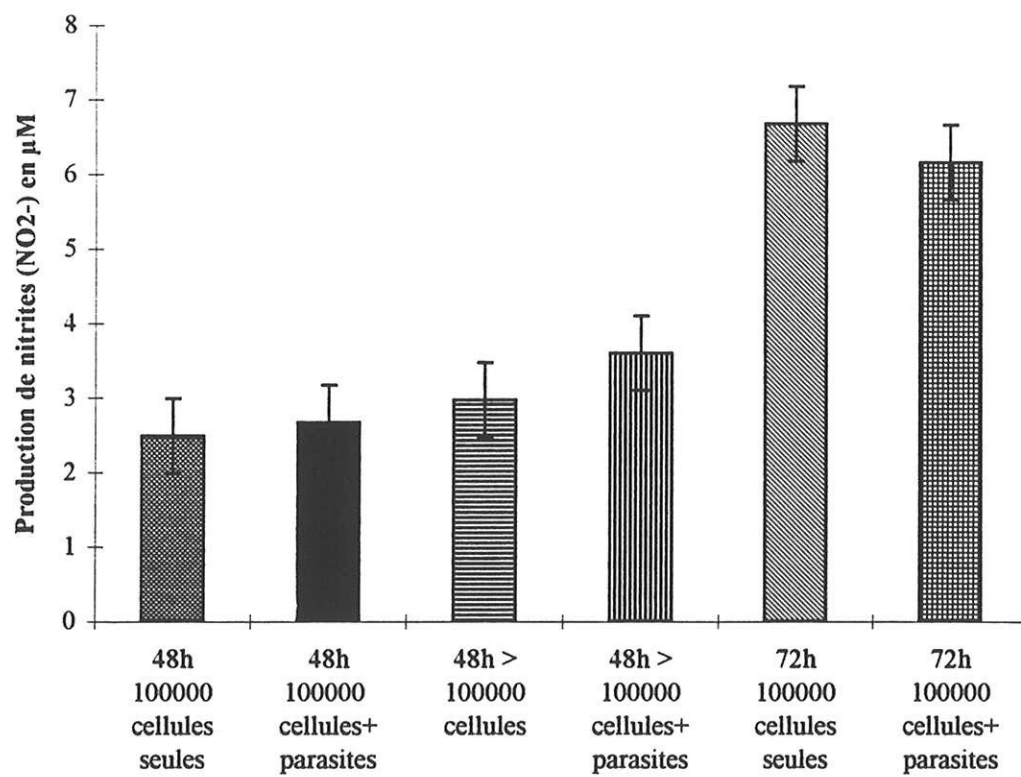
Comme pour la lignée humaine CMH5, les résultats obtenus sur 48 heures montrent une faible production de NO_2^- dans les surnageants de culture, que les cellules soient en présence ou non de *T. b. brucei* (lignée seule 48h = $2,49 \pm 0,37 \mu\text{M}$; lignée + trypanosomes = $2,67 \pm 0,50 \mu\text{M}$, $p = 0,24$) (figure 14 et annexe 3). L'augmentation du nombre de cellules

Figure 13 :
Production de nitrites par la lignée microgiale CMH5
sans et avec inhibiteur spécifique (NMMA) pendant 72 heures.
Valeur pour 100000 cellules et 100000 parasites, moyenne sur 2 expériences.



- A** ■ seules
■ seules+NMMA
- B** ■ cell.+parasites
■ cell.+parasites+NMMA
- C** ■ cell.+parasites+LPS
■ cell.+parasites+LPS+NMMA
- D** ■ cell.+parasites+IFN
■ cell.+parasites+IFN+NMMA
- E** ■ cell.+parasites+LPS+IFN
■ cell.+parasites+LPS+IFN+NMMA
- F** ■ cell.+LPS
□ cell.+LPS+NMMA
- G** □ cell.+IFN
□ cell.+IFN+NMMA
- H** □ cell.+LPS+IFN
■ cell.+LPS+IFN+NMMA

Figure 14 :
Production de nitrites par la lignée astrocytaire de rat C6.
Valeur pour 100000 parasites et moyenne sur 5 expériences.



ne permet pas une forte élévation de la quantité de NO_2^- (lignée seule 48h = $2,49 \pm 0,37 \mu\text{M}$ et lignée ($>10^5$ cellules) 48h = $2,97 \pm 0,55 \mu\text{M}$, $p = 0,21$).

L'allongement du temps d'incubation à 72 heures permet d'observer une augmentation nette du taux de NO_2^- pour les cellules seules et en présence de *T. b. brucei* par rapport aux résultats sur 48 heures (lignée seule 48h = $2,49 \pm 0,37 \mu\text{M}$ et lignée seule 72h = $6,68 \pm 0,54 \mu\text{M}$, $p < 0,05$; lignée + trypanosomes 48 h = $2,67 \pm 0,50 \mu\text{M}$ et lignée + trypanosomes 72h = $6,16 \pm 0,30 \mu\text{M}$, $p < 0,05$). La seule présence des trypanosomes ne modifie pas la quantité de nitrites par rapport aux cellules seules. La production de NO_2^- par la lignée C6 à 72 heures est supérieure à celle mesurée dans le milieu de culture seul incubé dans les mêmes conditions sur 72 heures (lignée C6 = $6,89 \pm 0,39 \mu\text{M}$; milieu seul = $1,62 \pm 0,51 \mu\text{M}$, $p < 0,05$).

La stimulation de la lignée pendant 72 heures par de l'IFN- γ et/ou du LPS et/ou des trypanosomes est reportée sur la figure 15 et l'annexe 4. Comme sur la figure 14 précédente, on n'observe pas de différence significative entre les cellules seules et les cellules en présence de *T. b. brucei*. Le LPS seul et l'IFN- γ seul ne modifient pas sensiblement le taux de NO_2^- par rapport à celui des cellules seules (lignée C6 = $6,89 \pm 0,39 \mu\text{M}$ et lignée + IFN = $6,80 \pm 0,33 \mu\text{M}$, $p = 0,25$). L'incubation des cellules avec l'IFN- γ et des parasites, ou avec l'IFN- γ et du LPS permet d'obtenir une augmentation significative des NO_2^- de l'ordre de 50% (lignée + trypanosomes = $6,08 \pm 0,26 \mu\text{M}$ et lignée + trypanosomes + IFN- γ = $9,69 \pm 1,10 \mu\text{M}$, $p < 0,05$). Parallèlement, nous avons testé de l'IFN- γ de souris, ce qui nous a permis d'obtenir une augmentation de 100% du taux de

Figure 15 :
Production de nitrites par la lignée astrocytaire C6
après 72 heures d'incubation.
Valeur pour 100000 parasites et 100000 cellules et moyenne sur 4 expériences.

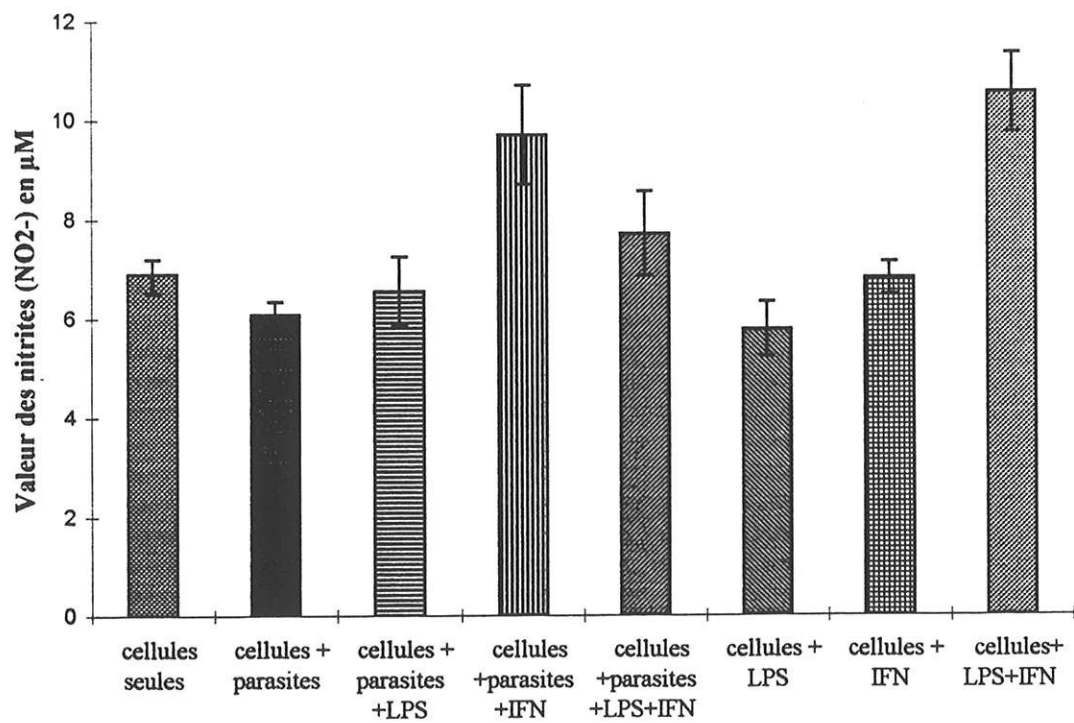
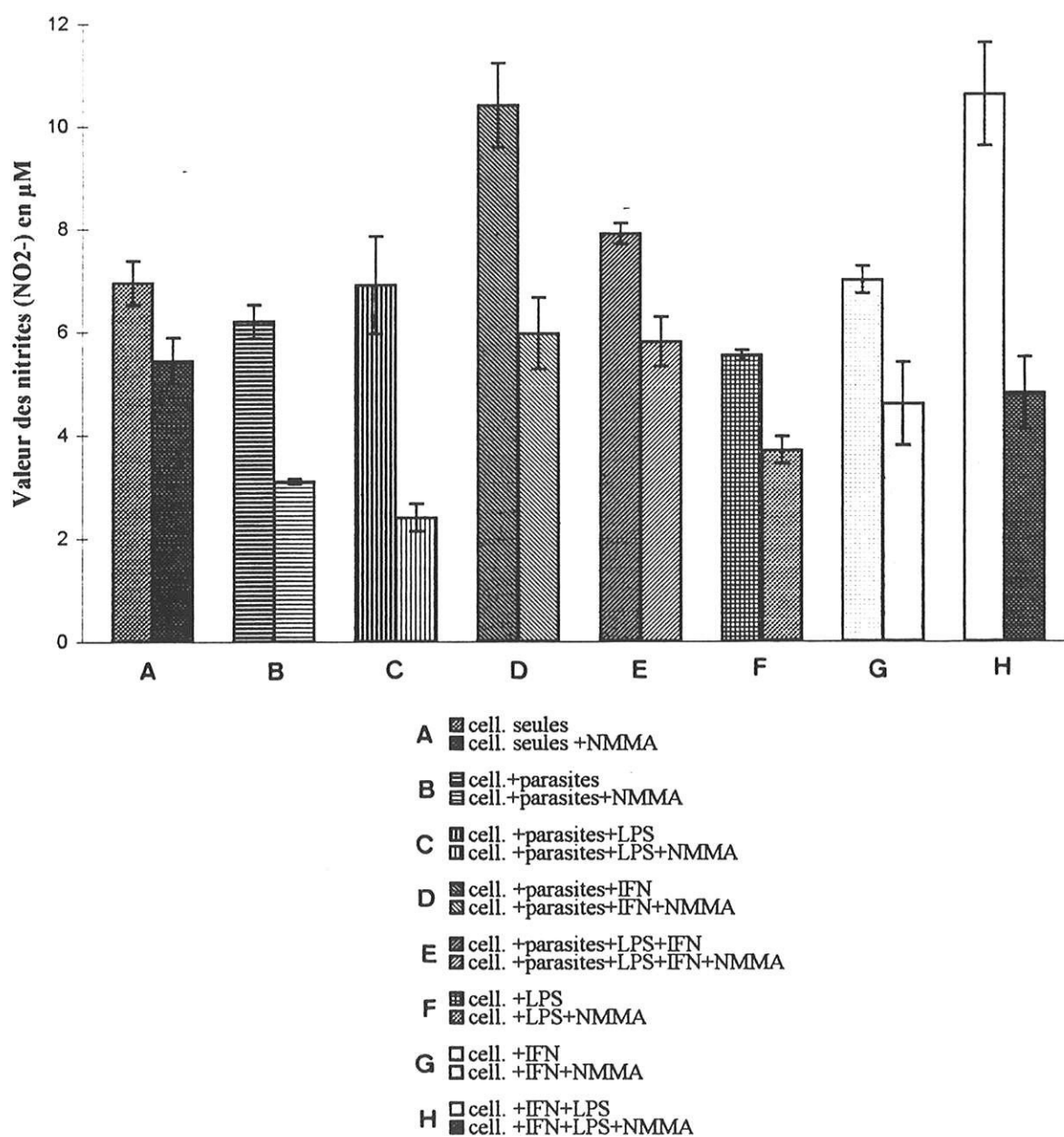


Figure 16 :
Production de nitrites par la lignée astrocytaire C6
sans et avec inhibiteur spécifique (NMMA) pendant 72 heures.
Valeur pour 100000 parasites et 100000 cellules, moyenne sur 2 expériences.



nitrites lors de l'incubation des cellules C6 avec cette cytokine et des trypanosomes par rapport aux cellules seules, impliquant une spécificité d'espèce de l'IFN- γ .

L'IFN- γ joue un rôle important dans la voie d'activation du monoxyde d'azote mais il n'est pas suffisant, un second signal semble nécessaire (représenté ici par les trypanosomes ou le LPS).

L'incubation des cellules avec de la NMMA pendant 72 heures entraîne une diminution des taux de NO_2^- dans toutes les conditions expérimentalement testées (figure 16 et annexe 6). Cependant, cette diminution semble moins importante que pour la lignée microgliale CMH5.

2. Immunohistochimie des NO synthases.

2.1 Lignée microgliale humaine CMH5.

La présence de l'enzyme NOS constitutive a été révélée dans le cytoplasme de cellules CMH5 non stimulées. Le marquage est faiblement positif et hétérogène. Sur un même puits de cellules, toutes n'apparaissent pas positives. Le fait de travailler sur une lignée peut expliquer ces différences, dans la mesure où les cellules ne sont pas forcément, à un instant donné, en phase pour leur cycle cellulaire. Sur le puits contrôle, où les cellules n'ont été incubées qu'avec l'anticorps secondaire, aucune cellule n'a été retrouvée positive.

L'enzyme NOS inductible n'a été retrouvée que dans le cytoplasme de cellules incubées pendant 24 heures avec de l'IFN- γ et des trypanosomes. Le marquage est faiblement positif sous forme de granulations cytoplasmiques. La NOS inductible n'a pas été retrouvée sur des cellules stimulées pendant 72h avec de l'IFN- γ et des trypanosomes ou du

LPS, suggérant que l'expression de la NOS inductible est transitoire dans notre lignée. La NOS inductible n'a pas été détectée dans le cytoplasme de cellules non stimulées.

2.2 Lignée astrocytaire de rat C6.

L'enzyme NOS constitutive a été révélée dans le cytoplasme de cellules non stimulées. Le marquage est très positif mais, comme pour la lignée microgliale, il est hétérogène. Les cellules des puits contrôles ne sont pas marquées.

Nous n'avons pas mis clairement en évidence la NOS inductible lors de nos immunomarquages sur la lignée C6, que ce soit sur des cellules non stimulées ou stimulées pendant 24h ou 72h par de l'IFN- γ murin et des trypanosomes. Cela n'exclut pas totalement la présence de cette enzyme d'autant plus que les cellules sont capables d'activer la voie du NO après stimulation et de permettre l'accumulation des nitrites dans nos cocultures comme le montrent les mesures de NO_2^- effectuées dans les surnageants de cultures.

Photo 1A : lignée microgiale CMH5, marquage de la NOS constitutive à 72 heures.

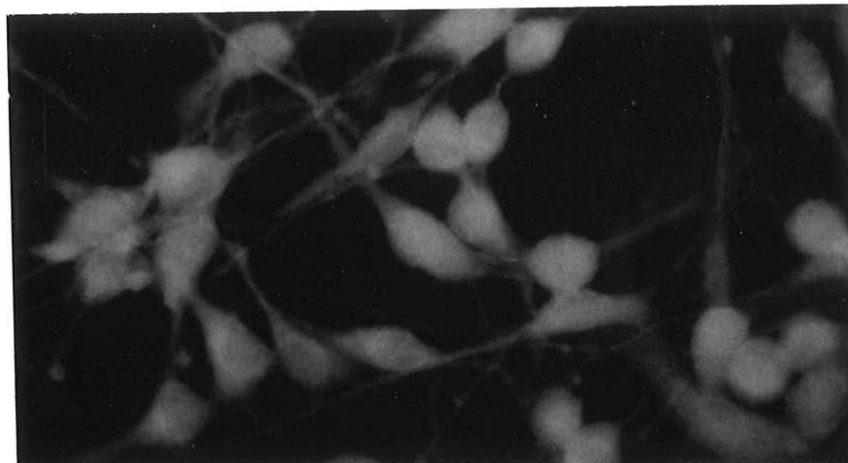


Photo 1B : lignée astrocytaire C6, marquage de la NOS constitutive à 72 heures.

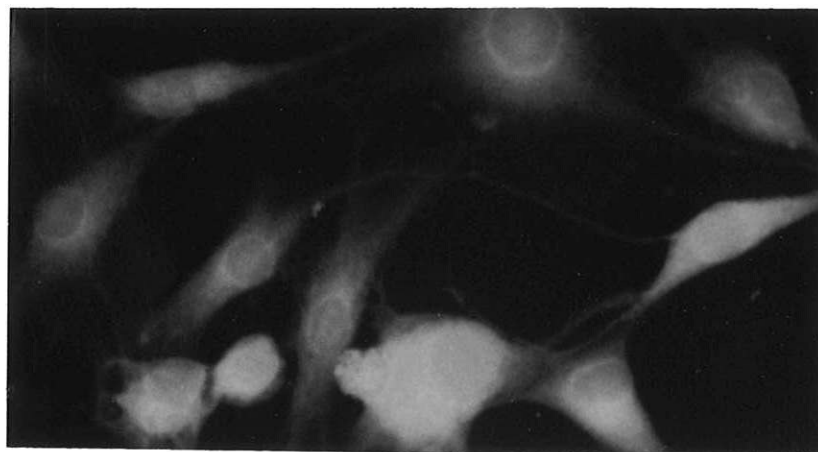


Photo 1C : témoin conjugué à 72 heures.



Photo 2A : lignée microgiale CMH5, marquage de la NOS inductible à 24 heures.

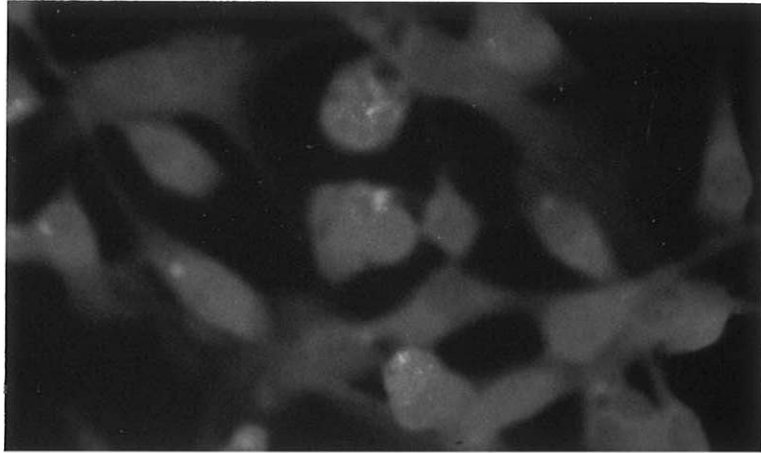


Photo 2B : lignée astrocytaire C6, marquage de la NOS inductible à 24 heures.



Photo 2C : témoin conjugué à 24 heures.





DISCUSSION

Le monoxyde d'azote NO est synthétisé par différents types cellulaires, en particulier macrophages, astrocytes et cellules endothéliales, par des NO synthases (NOS) cytosoliques constitutives ou inductibles. Des études menées sur les souris ont montré que ces différents types cellulaires possèdent les NOS constitutives et inductibles, sans que leur coexistence dans une même cellule soit déterminée avec précision (MURPHY et al., 1993). Dans le système nerveux central, on a pu montrer que les cellules microgliales activées, avec du LPS en association avec d'autres cytokines, étaient capables de produire de grandes quantités de nitrites par l'expression de la NOS inductible (BOJE et ARORA, 1992 ; OKUDA et al., 1995).

Chez l'homme, les études sont discordantes. Certaines n'ont pu mettre en évidence la présence de NOS inductible dans les cellules microgliales humaines (provenant d'embryons de 7 à 9 semaines) par la technique indirecte de dosage des nitrites (BROSNAN et al., 1994 ; DAUBENER et al., 1996) alors que d'autres trouvent une activité NOS inductible faible en testant des cellules d'âges différents (cellules provenant de fœtus de 18 à 22 semaines) (PETERSON et al., 1994). Quand une méthode plus sensible est utilisée comme la biologie moléculaire (PCR transcriptase reverse), on détecte transitoirement des ARN messagers de NOS inductibles, après stimulation par LPS et IFN- γ , dans les cellules humaines (SCHOEDON et al., 1995).

Notre étude a permis de mettre en évidence sur la lignée humaine CMH5 une réactivité immunohistochimique de la NOS inductible uniquement après stimulation pendant 24 heures par de l'IFN- γ et des trypanosomes. L'absence de réactivité avec des cellules non

stimulées concorde avec les études précédentes (PETERSON et al., 1994 ; SCHOEDON et al., 1995). Lors de notre étude sur les cellules CMH5, nous avons constaté qu'il existait une sécrétion basale de nitrites (amplifiée par la stimulation par l'IFN- γ et les trypanosomes ou le LPS) suggérant que la lignée est partiellement activée en culture et/ou qu'elle exprime une NOS constitutive. Le marquage immunocytochimique a révélé la présence de la NOS constitutive sur la lignée CMH5, impliquant la présence des deux isoformes de NOS dans les cellules microgliales humaines comme pour les cellules microgliales murines (MURPHY et al., 1993 ; DAWSON et SNYDER, 1994). Les faibles niveaux de nitrites détectés lors de nos cocultures de la lignée CMH5, par rapport aux études menées sur les cellules microgliales murines, peuvent s'expliquer de différentes façons. D'une part, nous avons utilisé une méthode colorimétrique spécifique mais de sensibilité moyenne. D'autre part, il est possible que des cytokines ou des facteurs autres que ceux utilisés ici puissent induire une activation plus importante de la voie du NO et que la régulation des NOS inductibles chez l'homme soit différente de celle des souris.

Nous avons mis en évidence, pour la lignée microgliale CMH5, une production de nitrites. Cette production est spécifique de la voie d'activation du NO car elle est diminuée lors de l'incubation en présence de l'inhibiteur spécifique, la NMMA. Parallèlement, nous avons montré d'une part que les trypanosomes en association avec l'IFN- γ activaient la NOS inductible entraînant une augmentation de production du NO, et d'autre part que les parasites ou l'IFN- γ seuls n'augmentaient pas la production du NO. Ceci suggère que les trypanosomes ou le LPS préparent les cellules à l'action de l'IFN- γ et que cette préactivation est nécessaire à l'activation de la voie du NO par le signal induit par l'IFN- γ . D'autres études ont montré la synergie d'action des trypanosomes et de l'IFN- γ dans la

stimulation des NOS inductibles macrophagiques chez les souris infestées et son rôle dans l'immunosuppression lymphocytaire (STERNBERG et MABBOTT, 1996).

L'étude de la lignée astrocytaire C6 nous a permis de mettre en évidence la présence d'une NOS constitutive. Ceci correspond à des études préalables qui avaient trouvé la NOS constitutive sur des primocultures d'astrocytes de rats et de souris et sur la lignée C6 (SIMMONS et MURPHY, 1992 ; BRISMAR, 1995). Dans nos cultures, le marquage est hétérogène. La question de savoir si l'expression de la NOS constitutive est liée à l'âge de la cellule, ou si la NOS constitutive n'est exprimée que par une sous-population astrocytaire ou si cette hétérogénéité n'existe qu'*in vitro* ne semble pas avoir de réponse à l'heure actuelle (MURPHY et al., 1993).

Sur le plan immunologique nous n'avons pas clairement mis en évidence la présence d'une NOS inductible dans la lignée C6. Cependant, l'utilisation de la biologie moléculaire permet de mettre en évidence des ARN messagers de NOS inductibles dans les cultures astrocytaires traitées par LPS et IFN- γ (MURPHY et al., 1993). Sur notre lignée C6, le dosage des nitrites après 72 heures d'incubation nous a permis de constater qu'il existait une sécrétion basale de nitrites, corrélée à la présence de la NOS constitutive, et que, sous certaines conditions, les cellules pouvaient augmenter leur production de NO certainement par activation de la NOS inductible. Le LPS, l'IFN- γ , ou les trypanosomes seuls ne modifient pas la production de NO. Seules les associations LPS / IFN- γ et trypanosomes / IFN- γ sont capables d'activer la voie du NO dans nos modèles *in vitro*.

L'utilisation de la NMMA, inhibiteur spécifique des NOS, nous a permis de confirmer que l'accumulation des nitrites dans le surnageant des cultures était due à l'activation de la voie du NO. Parallèlement, on peut constater que l'inhibition des NOS est

dans notre étude plus forte sur la lignée microgiale que sur la lignée astrocytaire. Il apparaît dans d'autres études que la NMMA serait plus active sur la NOS inductible que sur la NOS constitutive, ce qui pourrait expliquer la différence observée sur nos cultures (FUKUTO, 1995).

Sur les modèles utilisés, nous avons mis en évidence que des cellules astrocytaires et microgiales étaient capables de produire du NO et que les trypanosomes, en synergie avec l'IFN- γ , pouvaient activer la voie du monoxyde d'azote. Malgré les faibles taux de nitrites retrouvés *in vitro*, la quantité de NO sécrété par les cellules astrocytaires peut cependant jouer un rôle important dans le SNC dans la mesure où ces cellules sont très nombreuses et qu'elles jouent un rôle physiologique majeur dans la neurotransmission, le support trophique des autres cellules cérébrales et le contrôle de la barrière hémocéphalique (FATTORI et al., 1995).

Le NO est impliqué dans la physiopathologie de la trypanosomose expérimentale du rat où il a été trouvé augmenté dans le cortex cérébral (BUGUET et al., 1996). L'augmentation du NO cérébral peut entraîner une altération de la barrière hémocéphalique, permettre l'entrée de cellules immunocompétentes, activer les cellules astrocytaires et microgiales entraînant l'entretien de la réaction inflammatoire et la pérennisation des dysfonctionnements intervenant dans la symptomatologie clinique de la maladie. Le NO semble impliqué au niveau périphérique chez l'homme, où une étude récente a retrouvé une augmentation du NO sanguin chez des sujets infestés par *T. gambiense* (STERNBERG, 1996). Ces résultats sont discordants de ceux retrouvés chez le rat, où le NO est abaissé dans le sang périphérique (BUGUET et al., 1996). Cependant, les méthodes utilisées sont différentes (méthode de Griess pour l'homme et voltamétrie pour le rat), il est possible que les mécanismes de régulation du NO et que l'implication du NO dans

la physiopathologie de la trypanosomose soient différents chez les deux espèces au niveau périphérique.

Il est difficile de transposer *in vivo* des études réalisées *in vitro*, mais cela peut permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la trypanosomose, et l'efficacité de certaines molécules thérapeutiques (BOUTEILLE et al., 1988, 1995), et de maintenir nos efforts sur cette maladie mortelle en l'absence de traitement et malheureusement toujours d'actualité.



ANNEXES

ANNEXE 1

Concentrations de NO₂⁻ exprimées en µM
dans le surnageant des cultures des cellules microgliales CMH5.

	Mesure 1	Mesure 2	Mesure 3	Mesure 4	Mesure 5	Moyenne	Ecart type
Incubation 48 h							
10 ⁵ cell. seules	2,47	2,32	2,39	2,41	2,04	2,33	0,15
10 ⁵ cell.+T.b.b.	2,65	2,99	3,97	2,99	3,49	3,22	0,46*
>10 ⁵ cell.	3,60	2,56	3,45	2,54	2,41	2,91	0,50*
>10 ⁵ cell.+T.b.b.	3,58	3,47	3,88	2,47	3,94	3,47	0,52
Incubation 72 h							
10 ⁵ cell. seules	7,60	6,90	7,70	5,97	6,29	6,89	0,68*
10 ⁵ cell.+T.b.b.	5,97	6,44	6,75	7,60	5,97	6,55	0,60**

cell. : cellules

T.b.b : *Trypanosoma brucei brucei*

*p < 0,05 test U de Mann-Whitney, comparé aux 10⁵ cell. incubées durant 48 heures

**p < 0,05, comparé aux 10⁵ cell. + *T.b.b.* incubées pendant 48 heures

ANNEXE 2

Concentrations de NO_2^- exprimées en μM dans le surnageant des cultures des
cellules microgliales CMH5 après 72 heures d'incubation.

	Mesure 1	Mesure 2	Mesure 3	Mesure 4	Moyenne	Ecart type
cell. seules	6,90	7,70	5,97	6,29	6,72	0,66
cell.+ <i>T.b.b.</i>	6,44	6,75	7,60	5,97	6,69	0,59
cell.+ <i>T.b.b.</i> +LPS	6,92	5,64	7,81	5,64	6,50	0,91
cell.+ <i>T.b.b.</i> +IFN- γ	13,02	8,90	11,94	9,77	10,91	1,65 *
cell.+ <i>T.b.b.</i> +LPS+IFN- γ	8,33	7,20	9,76	7,60	8,22	0,97
cell.+LPS	6,64	6,44	5,43	4,99	5,88	0,68
cell.+IFN- γ	7,38	5,64	6,08	7,59	6,67	0,83
cell.+LPS+IFN- γ	10,85	9,76	8,68	11,28	10,14	1,00*

cell. : cellules

T.b.b. : *Trypanosoma brucei brucei*

* $p < 0,05$ test U de Mann-Whitney, comparé aux cell. seules incubées pendant 72 h.

ANNEXE 3

**Concentrations de NO₂⁻ exprimées en µM dans le surnageant de culture des
cellules astrocytaires C6.**

	Mesure 1	Mesure 2	Mesure 3	Mesure 4	Mesure 5	Moyenne	Ecart type
Incubation 48 h							
10 ⁵ cell. seules	2,76	2,37	2,82	2,71	1,80	2,49	0,37
10 ⁵ cell.+ <i>T.b.b.</i>	2,80	2,52	2,15	3,68	2,18	2,67	0,50
>10 ⁵ cell.	3,91	2,82	3,26	2,40	2,45	2,97	0,55
>10 ⁵ cell.+ <i>T.b.b.</i>	3,69	3,08	3,67	3,78	3,78	3,60	0,26**
Incubation 72 h							
10 ⁵ cell. seules	6,50	5,86	7,16	7,38	6,50	6,68	0,54*
10 ⁵ cell.+ <i>T.b.b.</i>	6,48	5,86	6,09	5,86	6,50	6,16	0,30**

cell. : cellules

T.b.b. : *Trypanosoma brucei brucei*

*p<0,05 test U de Mann-Whitney, comparé aux cell. seules durant 48 heures

**p<0,05 test U de Mann-Whitney, comparé aux 10⁵ cell. + *T.b.b.* incubées 48 heures

ANNEXE 4

Concentrations de NO₂⁻ exprimées en µM dans le surnageant des cultures des cellules astrocytaires C6 après 72 heures d'incubation.

	Mesure 1	Mesure 2	Mesure 3	Mesure 4	Moyenne	Ecart type
cell. seules	6,50	7,16	7,38	6,51	6,89	0,39
cell.+ <i>T.b.b.</i>	5,86	6,09	5,86	6,50	6,08	0,26
cell.+ <i>T.b.b.</i> +LPS	6,34	6,10	5,90	7,80	6,54	0,75
cell.+ <i>T.b.b.</i> +IFN-γ	9,92	8,09	11,20	9,55	9,69	1,10*
cell.+ <i>T.b.b.</i> +LPS+IFN-γ	6,34	8,64	8,10	7,70	7,70	0,85
cell.+LPS	5,30	6,70	5,64	5,43	5,77	0,55
cell.+IFN-γ	6,84	6,36	7,27	6,73	6,80	0,33**
cell.+LPS+IFN-γ	11,02	9,87	11,70	9,53	10,53	0,87*

*p< 0,05 test U de Mann-Whitney, comparé aux cellules seules

**p< 0,05 test U de Mann-Whitney, comparé aux cell.+*T.b.b.*+IFN-γ

ANNEXE 5

Concentrations de NO₂⁻ exprimées en μM dans le surnageant de cultures des lignées microgliales CMH5 sans et avec incubation avec la NMMA pendant 72 heures.

	Mesure 1	Mesure 2
cell. seules	5,97	6,29
cell. +NMMA	4,34	3,15
cell. + <i>T.b.b.</i>	7,60	5,97
cell.+ <i>T.b.b.</i> +NMMA	2,30	2,0
cell. + <i>T.b.b.</i> +LPS	7,81	5,64
cell. + <i>T.b.b.</i> +LPS+NMMA	2,01	2,10
cell. + <i>T.b.b.</i> +IFN	11,94	9,77
cell. + <i>T.b.b.</i> +IFN+NMMA	3,79	4,09
cell. + <i>T.b.b.</i> +LPS+IFN	9,76	7,60
cell. + <i>T.b.b.</i> +LPS+IFN+NMMA	3,79	3,09
cell. +LPS	5,43	4,99
cell. +LPS+NMMA	2,70	2,99
cell. +IFN	6,08	7,59
cell. +IFN+NMMA	2,50	2,89
cell. +IFN+LPS	8,68	11,28
cell. +IFN+LPS+NMMA	4,79	5,40

ANNEXE 6

Concentrations de NO_2^- exprimées en μM dans le surnageant de cultures des lignées astrocytaires C6 sans et avec incubation avec la NMMA pendant 72 heures.

	Mesure 1	Mesure 2
cell. seules	7,38	6,51
cell. +NMMA	4,99	5,89
cell. + <i>T.b.b.</i>	5,86	6,50
cell.+ <i>T.b.b.</i> +NMMA	3,15	3,05
cell. + <i>T.b.b.</i> +LPS	5,90	7,80
cell. + <i>T.b.b.</i> +LPS+NMMA	2,05	2,60
cell. + <i>T.b.b.</i> +IFN- γ	11,20	9,55
cell. + <i>T.b.b.</i> +IFN- γ +NMMA	6,68	5,25
cell. + <i>T.b.b.</i> +LPS+IFN- γ	8,10	7,70
cell. + <i>T.b.b.</i> +LPS+IFN- γ +NMMA	5,28	6,25
cell. +LPS	5,64	5,43
cell. +LPS+NMMA	3,99	3,60
cell. +IFN- γ	7,27	6,73
cell. +IFN- γ +NMMA	5,20	3,40
cell. +IFN- γ +LPS	11,70	9,53
cell. +IFN- γ +LPS+NMMA	5,51	4,04

BIBLIOGRAPHIE

- ABOLARIN M.O., EVANS D.A., TOVEY D.G., ORMEROD W.E. - **Cryptic stage of sleeping sickness trypanosome developing in choroid plexus epithelial cells.** British Medical Journal, 1982, 285, 1380-1382.
- ABOLARIN M.O., STAMFORD S.A., ORMEROD W.E. - **Interaction between *Trypanosoma brucei* and the ependymal cell of the choroid plexus.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1986, 80, 618-625.
- ALAFIATAYO R.A., CRAWLEY B., OPPENHEIM B.A., PENTREATH V.W. - **Endotoxins and the pathogenesis of *Trypanosoma brucei brucei* infection in mice.** Parasitology, 1993, 107, 49-53.
- ALAFIATAYO R.A., COOKSON M.R., PENTREATH V.W. - **Production of prostaglandins D2 and E2 by mouse fibroblasts and astrocytes in culture caused by *Trypanosoma brucei brucei* products and endotoxin.** Parasitology Research, 1994, 80, 223-229.
- AMEVIGBE M.D.D., JAUBERTEAU-MARCHAN M.O., BOUTEILLE B., DOUA F., BRETON J.C., NICOLAS J.A., DUMAS M. - **Human African trypanosomiasis : presence of antibodies to galactocerebrosides.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1992, 47, 652-662.
- AMOLE B., SHARPLESS N., WITTNER M., TANOWITZ H.B. - **Neurochemical measurements in the brain of mice infected with *Trypanosoma brucei brucei* (TREU 667).** Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 1989, 83, 225-232.
- ARROZ J.O.L. - **Melarsoprol and reactive encephalopathy in *Trypanosoma brucei rhodesiense*.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1987, 81, 192.
- ASH C. - **Macrophages at the centre of infection.** Parasitology Today, 1991, 7, 2-3.

- ASONGANYI T., LANDO G., NGU J.L. - **Serum antibodies against human brain myelin proteins in gambian trypanosomiasis.** *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*, 1989, 69, 213-221.
- AYED Z., BRINDEL I., BOUTEILLE B., VAN MEIRVENNE N., DOUA F., HOUINATO D., DUMAS M., JAUBERTEAU M.O. - **Detection and characterisation of antibodies directed against neurofilament proteins in human African trypanosomiasis.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, soumis à publication.
- BADO J.P. - **De l'observation du sommeil à la découverte du trypanosome et de la glossine.** *Médecine Tropicale*, 1993, 53, 149-157.
- BAKER J.R. - **The subspecific taxonomy of *Trypanosoma brucei*.** *Parasite*, 1995, 2, 3-12.
- BAKHJET M., OLSSON T., MHLANGA J., BUSCHER P., LYCKE N., VANDERMEIDE PH., KRISTENSSON K. - **Human and rodent interferon-gamma as a growth factor for *Trypanosoma brucei*.** *European Journal of Immunology*, 1996, 26, 1359-1364.
- 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 Journal*, 1985, 4, 1273-1277.
- BANATI R.B., GEHRMANN J., SCHUBERT P., KREUTZBERG G.W. - **Cytotoxicity of microglia.** *Glia*, 1993, 7, 111-118.
- BENTIVOGLIO M., GRASSI-ZUCCONI G., KRISTENSSON K. - **From trypanosomes to the nervous system, from molecules to behavior : a survey, on the occasion of the 90th anniversary of Castellani's discovery of the parasites in sleeping sickness.** *Italian Journal of Neurosciences*, 1994a, 15, 77-89.

- BENTIVOGLIO M., GRASSI-ZUCCONI G., OLSSON T., KRISTENSON K.
Trypanosoma brucei and the nervous system. Trends in Neuroscience, 1994b, 17, 325-329.
- BLACKWELL J. M., ALEXANDER J. - **The macrophage and parasitic protozoa.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1983, 77, 636-645.
- BOJE K.M., ARORA P.K. - **Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death.** Brain Research, 1992, 587, 250-256.
- BOUTEILLE B., DARDE M.L., PESTRE-ALEXANDRE M. - **Action des médicaments testés en milieu acellulaire et chez la souris infestée par *Trypanosoma brucei brucei*.** Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1988, 81, 533-542.
- BOUTEILLE B., MARIE-DARAGON A., CHAUVIERE G., DE ALBUQUERQUE C., ENANGA B., DARDE M.L., VALLAT J.M., PERIE J., DUMAS M. - **Effect of megazol on *Trypanosoma brucei brucei* acute and subacute infections in mice.** Acta Tropica, 1995, 60, 73-80.
- BOUTEILLE B., DUMAS M. - **Human African trypanosomiasis.** In «Tropical Neurology», CHOPRA ed., 1996 (à paraître).
- BRISMAR T. - **Physiology of transformed glial cells.** Glia, 1995, 15, 231-245.
- BROSNAN C.F., BATTISTINI L., RAINE C.S., DICKSON D.W., CASADEWALL A., LEE S.C. - **Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology : an overview.** Developmental Neuroscience, 1994, 16, 152-161.
- BRUN R., JENNI L.- **Cultivation of African and South American trypanosomes of medical or veterinary importance.** British Medical Bulletin, 1985, 41, 122-129.

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 L., DUMAS M. - **Distribution du sommeil et de la veille dans la trypanosomose humaine africaine.** Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1994, 87, 362-367.

BUGUET A., MONTMAYEUR A., BOURDON L., AUZELLE F., TAPIE P., BERT J., TABARAUD F., DUMAS M., BOGUI P., DOUA F., STANGHELLINI A., SARDA J., MUANGA G., CHAUFFARD F., LONSDORFER J., BRANDENBERGER G., RADOMSKI M.W., CLAUSTRAT B., CESPUGLIO R. - **La maladie du sommeil : trouble majeur des rythmes circadiens.** Revue Scientifique et Technique de la Défense, 1995, 3, 107-117.

BUGUET A., BURLET S., AUZELLE F., MONTMAYEUR A., JOUVET M., CESPUGLIO R. - **Dualité d'action du monoxyde d'azote (NO) dans la trypanosomose africaine expérimentale.** Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris (Sciences de la Vie, Neurosciences), 1996, 319, 201-207.

CATTAND P. - **Trypanosomiase humaine africaine : situation épidémiologique actuelle, une recrudescence alarmante de la maladie.** Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1994, 87, 307-310.

CESPUGLIO R., BURLET S., MARINESCO S., ROBERT F., JOUVET M. - **Détection voltamétrique du NO cérébral chez le rat. Variations du signal à travers le cycle veille-sommeil.** Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris (Sciences de la Vie, Neurosciences), 1996, 319, 191-200.

CHAO C.C., HU S., EHRLICH L., PETERSON P.K. - **Interleukin 1 and Tumor necrosis factor synergistically mediate neurotoxicity : involvement of nitric oxide and of N-Methyl-D-Aspartate receptors.** Brain, Behavior and Immunity, 1995a, 9, 355-365.

- CHAO C.C., HU S., MOLITOR T.W., SHASKAN E.G., PETERSON P.K. - **Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism.** Journal of Immunology, 1992, 149, 2736-2741.
- CHAO C.C., HU S., SHENG W.S., TSANG M., PETERSON P.K. - **Tumor necrosis factor a mediates the release of bioactive Transforming growth factor b in murine microglial cell cultures.** Clinical Immunology and Immunopathology, 1995b, 77, 358-365.
- COLLOMB H. - **Encéphalite de la trypanosomiase humaine africaine.** Gazette Médicale de France, 1957, 64, 1069-1079.
- COT S., RINGWALD P., MULDER B., MIALHES P., YAP-YAP J., NUSSLER A.K., ELING W.M.C. - **Nitric oxide in cerebral malaria.** Journal of Infectious Diseases, 1994, 169, 1417-1418.
- CREPEL F., LEMAIRE G. - **Le monoxyde d'azote.** Médecine/Sciences, 1995, 11, 1639-1642.
- DARJI A., BESCHIN A., SILEGHEM M., HEREMANS H., BRYLS L., DE BAETSELIER P. - **In vitro simulation of immunosuppression caused by *Trypanosoma brucei* : active involvement of gamma interferon and tumor necrosis factor in the pathway of suppression.** Infection and Immunity, 1996, 64, 1937-1943.
- DAUBENER W., REMSCHEID C., NOCKEMANN S., PILZ K., SEGHRUCHNI S., MAC KENZIE C., HADDING U. - **Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells : role of Interferon g and Tumor necrosis factor a.** European Journal of Immunology, 1996, 26, 487-492.
- DAULOUEDE S., OKOMO-ASSOUMOU M.C., LABASSA M., FOUQUET C., VINCENDEAU P. - **Mécanismes de défense au cours des trypanosomoses.** Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1994, 87, 330-332.

- DAWSON T.M., SNYDER S.H. - **Gases as biological messengers : nitric oxide and carbon monoxide in the brain.** *Journal of Neuroscience*, 1994, 14, 5147-5159.
- DE GROOF D., BRUNEEL H., MUSUMARI T.S., RUPPOL J.F. - **Traitement de la maladie du sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense* avec le DI- α -difluorométhylornithine (DFMO) dans un hôpital rural au Zaïre.** *Médecine Tropicale*, 1992, 52, 369-375.
- DING A.H., NATHAN C.F., STUEHR D.J. - **Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages.** *Journal of Immunology*, 1988, 141, 2407-2412.
- DOUA F., YAPO F.B. - **Actualités thérapeutiques de la trypanosomiase.** *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1994, 87, 337-340.
- DUMAS M. - **African trypanosomiasis.** *In* «Tropical Neurology», SHAKIR R.A., NEWMAN P.K., POSER C.M. ed., WB Saunders Company Ltd, Philadelphia, USA, 1995, 275-286.
- DUMAS M., BOA F.Y. - **Human African trypanosomiasis.** *In* «Handbook of Clinical Neurology», HARRIS A.A. ed., Elsevier Science Publishing Compagny, Amsterdam, The Netherlands, 1988, vol 8, 339-344.
- DUMAS M., BOUTEILLE B. - **Trypanosomose humaine africaine.** *Comptes Rendus de la Société de Biologie*, 1996, 190, (sous presse).
- DUMAS M., GIRARD P.L. - **Human African trypanosomiasis (sleeping sickness).** *In* «Handbook of Clinical Neurology», VINKEN P.J., BRUYN G.W. ed., North Holland Publishing Company, Amsterdam (Pays Bas), 1978, vol 35, 67-83.
- EDDELSTON M., MUCKE L. - **Molecular profile of reactive astrocytes. Implications for their role in neurologic disease.** *Neuroscience*, 1993, 54, 15-36.

FAIRLAMB A.H. - Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis.

1. Novel approaches to the chemotherapy of trypanosomiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1990, 84, 613-617.

FATTORI E., LAZZARO D., MUSIANI P., MODESTI A., ALONZI T., CILIBERTO G.

- IL-6 expression in neurons of transgenic mice causes reactive astrocytosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage. European Journal of Neuroscience, 1995, 7, 2441-2449.

FONTT E.O., VRAY B. - Relationship between granulocyte macrophage colony

stimulating factor, Tumor necrosis factor α and *Trypanosoma cruzi* infection of murine macrophages. Parasite Immunology, 1995, 17, 135-141.

FUKUTO J.M., CHAUDHURI G. - Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide

synthase : potential selective inhibition. Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology, 1995, 35, 165-194.

GIULIAN D., CORPUZ M. - Microglial secretion products and their impact on the

nervous system. Advances in Neurology, 1993, 59, 315-320.

GREENWOOD B.M., WHITTLE H.C. - The pathogenesis of sleeping sickness.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1980, 74, 716-725.

GREENWOOD B.M., WHITTLE H.C., ODULOJU K.O., DOURMASHKIN R.R. -

Lymphocyte infiltration of the brain in sleeping sickness. British Medical Journal, 1976, 2, 1291-1292.

GUILLEMIN G., BOUSSIN F.D., LE GRAND R., CROITORU J., COFFIGNY H.,

DORMONT D. - Granulocyte macrophage colony stimulating factor stimulates *in vitro* proliferation of astrocytes derived from simian mature brains. Glia, 1996, 16, 71-80.

- HERTZ L., MAC FERLIN D.E., WAKSMAN B.H. - **Astrocytes : auxiliary cells for immune responses in the central nervous system?** Immunology Today, 1990, 11, 265-268.
- HESSE F., SELZER P.M., MUHLSTADT K., DUSZENKO M; - **A novel cultivation technique for long term maintenance of bloodstream form trypanosomes *in vitro*.** Molecular and Biochemical Parasitology, 1995, 70, 157-166.
- HIRUMI H., HIRUMI K. - **Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers.** Journal of Parasitology, 1989, 75, 985-989.
- HIRUMI H., HIRUMI K. - **Axenic culture of African trypanosome bloodstream forms.** Parasitology Today, 1994, 10, 80-84.
- HOARE C.A. - **The trypanosomes of mammals.** Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1972.
- HUNTER C.A., JENNINGS F.W., KENNEDY P.G.E., MURRAY M. - **Astrocyte activation correlates with cytokine production in central nervous system of *Trypanosoma brucei brucei* infected mice.** Laboratory Investigation, 1992, 67, 635-642.
- JACOBS P., RADZIOCH D., STEVENSON M.M. - **Nitric oxide expression in the spleen, but not in the liver, correlates with resistance to blood stage malaria in mice.** Journal of Immunology, 1995, 155, 5306-5313.
- JACOBS P., RADZIOCH D., STEVENSON M.M. - ***In vivo* regulation of nitric oxide production by Tumor necrosis factor α and γ Interferon, but not by Interleukin-4, during blood stage malaria in mice.** Infection and Immunity, 1996, 64, 44-49.

- JAMES S.L., HIBBS J.B. - **The role of nitrogen oxides as effector molecules of parasite killing.** *Parasitology Today*, 1990, 6, 303-305. —
- JENNINGS F.W., MAC NEIL P.E., NDUNG'U J.M., MURRAY M. - **Trypanosomiasis and encephalitis : possible aetiology and treatment.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1989, 83, 518-519.
- JENNINGS F.W., WHITELAW D.D., HOLMES P.H., CHIZYUKA H.G.B., URQUHART G.M. - **The brain as a source of relapsing *Trypanosoma brucei* infection in mice after chemotherapy.** *International Journal for Parasitology*, 1979, 9, 381-384.
- KAZYUMBA G.L., RUPPOL J.F., TSHEFU A.K., NKANGA N. - **Arsénorésistance et difluorométhylornithine dans le traitement de la trypanosomiase humaine africaine.** *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1988, 81, 591-594.
- KREMSNER P.G., WINKLER S., WILDLING E., PRADA J., BIENZLE U., GRANINGER W., NUSSLER A.K. - **High plasma levels of nitrogen oxides are associated with severe disease and correlate with rapid parasitological and clinical cure in *Plasmodium falciparum* malaria.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1996, 90, 44-47.
- KRISTENSSON K., ENEROTH A., OLSSON T., WIESENFELD-HALLIN Z. - **A new approach for the pathogenesis of human African trypanosomiasis.** *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1994, 87, 319-322.
- KUZOE F.A.S. - **Current situation of African trypanosomiasis.** *Acta Tropica*, 1993, 54, 153-162.
- LASKIN D.L., PENDINO K.J. - **Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury.** *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, 1995, 35, 655-677.

- LEE S.C., DICKSON D.W., BROSNAN C.F. - **Interleukin-1, nitric oxide and reactive asrocytes.** Brain, Behavior and Immunity, 1995, 9, 345-354.
- 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.** Research in Immunology, 1993, 144, 303-392.
- MATTERN P. - **Etat actuel et résultats des techniques immunologiques utilisées à l'Institut Pasteur de Dakar pour le diagnostic et l'étude de la trypanosomose humaine.** Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé, 1968, 38, 1-15.
- MOLYNEUX D.H., PENTREATH V.W., DOUA F. - **African trypanosomiasis in man.** In «Manson's Tropical Diseases», COOK G.C., W.B. Saunders Company LTD, 1996, 1171-1196.
- MONCADA S., PALMER R. M. J., HIGGS E. A. - **Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology.** Pharmacological Reviews, 1991, 43, 109-142.
- MOSSALAYI M.D. - **Mise en évidence du rôle du monoxyde d'azote (NO) dans l'activité leishmanicide des macrophages humains : implication des IgE et du Fce RII/CD23.** Eurobiologiste, 1995, 215, 13-21.
- MURPHY S., SIMMONS M.L., AGULLO L., GARCIA A., FEINSTEIN D.L., GALEA E., REIS D.J., MINC-COLOMB D., SCHWARTZ J.P. - **Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells.** Trends in Neuroscience, 1993, 16, 323-328.
- NICOLAS J.A., BOSGIRAUD C., LABROUSSE F., BOUTEILLE B., DUBOST G. - **Culture de *Trypanosoma brucei brucei* sur plexus choroïdes de mouton.** 19ème réunion du Conseil International de Recherche sur les Trypanosomiasés et leur contrôle, Lomé, TOGO, 30 mars - 3 avril 1987, communication orale.

NORTON W.T., AQUINO D.A., HORUMI I., CHIU F.C., BROSNAN C.F. - **Quantitative aspects of reactive gliosis : a review.** *Neurochemical Research*, 1992, 17, 877-885.

OKOMO-ASSOUMOU M.C., DAULOUEDE S., LEMESRE J.L., N'ZILA-MOUANDA A., VINCENDEAU P. - **Correlation of high serum levels of TNF- α with disease severity in human African trypanosomiasis.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1995a, 53, 539-543

OKOMO-ASSOUMOU M.C., GEFFARD M., DAULOUEDE S., CHAUGIER C., LEMESRE J.L., VINCENDEAU P. - **Circulating antibodies directed against tryptophane like epitopes in sera of patients with human African trypanosomiasis.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1995b, 52, 461-467.

OKUDA Y., NAKATSUJI Y., FUJIMURA H., ESUMI H., OGURA T., YANAGIHARA T., SAKODA S. - **Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the central nervous system of mice correlate with the severity of actively induced experimental allergic encephalomyelitis.** *Journal of Neuroimmunology*, 1995, 62, 103-112.

OLSSON T., BAKHIET M., M., KRISTENSSON K. - **Interactions between *Trypanosoma brucei* and CD8+ T Cells.** *Parasitology Today*, 1992, 8, 237-239.

ORMEROD W.E., HUSSEIN M.S.A. - **The ventricular ependyma of mice infected with *Trypanosoma brucei*.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1986, 80, 626-633.

PENTREATH V.W. - **Neurobiology of sleeping sickness.** *Parasitology Today*, 1989, 5, 215-218.

PENTREATH V.W. - **The search for primary events causing the pathology in African sleeping sickness.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1991, 85, 145-147.

PENTREATH V.W. - **Endotoxins and their significance for murine trypanosomiasis.** Parasitology Today, 1994a, 10, 226-228.

PENTREATH V.W. - **Trypanosomiasis and the nervous system. Pathology and immunology.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1995, 89, 9-15.

PENTREATH V.W., ALAFIATAYO R.A., CRAWLEY B., DOUA F., OPPENHEIM B.A. - **Endotoxins in the blood and cerebrospinal fluid of patients with African sleeping sickness.** Parasitology, 1996, 112, 67-73.

PENTREATH V.W., COOKSON M.R., INGRAM G.A., MEAD C., ALAFIATAYO R.A. - ***Trypanosoma brucei* products activate components of the reactive response in astrocytes *in vitro*.** Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1994b, 87, 323-329.

PENTREATH V.W., REES K., OWOLABI O.A., PHILIP K.A., DOUA F. - **The somnogenic T lymphocyte suppressor prostaglandin D2 is selectively elevated in cerebrospinal fluid of advanced sleeping sickness patients.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1990, 84, 795-799.

PEPIN J., KHONDE N. - **Relapses following treatment of early stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness with a combination of pentamidine and suramin.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1996, 90, 183-86.

- PEPIN J., MILORD F., KHONDE A., NIYONSENGA T., LOKO L., MPIA B. - **Gambiense trypanosomiasis : frequency of, and risk factors for, failure of melarsoprol therapy.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1994, 88, 447-452.
- PETERSON P.K., HU S., ANDERSON W.R., CHAO C.C. - **Nitric oxide production and neurotoxicity mediated by activated microglia from human versus mouse brain.** Journal of Infectious Diseases, 1994, 170, 457-460.
- PHILIP K.A., DASCOMBE M.J., FRASER P.A., PENTREATH V.W. - **Blood brain barrier damage in experimental African trypanosomiasis.** Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 1994, 88, 607-616.
- POLTERA A.A. - **Immunopathological and chemotherapeutic studies in experimental trypanosomiasis with special reference to the heart and brain.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1980, 74, 706-715.
- POLTERA A.A. - **Pathology of human African trypanosomiasis with reference to experimental African trypanosomiasis and infections of the central nervous system.** British Medical Bulletin, 1985, 41, 169-174.
- PULLIAM L., MOORE D., WEST D.C. - **Human cytomegalovirus induces IL-6 and TNF- α from macrophages and microglial cells : possible role in neurotoxicity.** Journal of Neurovirology, 1995, 1, 219-227.
- RADOMSKI M.W., BUGUET A., BOGUI P., DOUA F., LONSDORFER A., TAPIE P., DUMAS M. - **Disruptions in the secretion of cortisol, prolactin, and certain cytokines in human African trypanosomiasis patients.** Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1994, 87, 376-379.

- RADOMSKI M.W., BUGUET A., MONTMAYEUR A., BOGUI P., BOURDON L., DOUA F., LONSDORFER A., TAPIE P., DUMAS M. - **Twenty four hour plasma cortisol and prolactin in human trypanosomiasis patients and healthy African controls.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1995, 52, 281-286.
- SCHMIDT H. - **The pathogenesis of trypanosomiasis of the CNS. Studies on parasitological and neurohistological findings in *Trypanosoma rhodesiense* infected vervet monkeys.** Virchows Archives (Pathol Anat), 1983, 399, 333-343.
- SCHMIDT H., BAFORT J.M. - **African trypanosomiasis : treatment induced invasion of brain and encephalitis.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1985, 34, 64-68.
- SCHOEDON G., SCHNEEMANN M., WALTER R., BLAU N., HOFER S., SCHAFFNER A. - **Nitric oxide and infection : another view.** Clinical Infectious Diseases, 1995, 21, S152-S157.
- SCHULTZBERG M., AMBATSIS M., SAMUELSSON E.B., KRISTENSSON K., VAN MEIRVENNE N. - **Spread of *Trypanosoma brucei* to the nervous system : early attack on circumventricular organs and sensory ganglia.** Journal of Neuroscience Research, 1988, 21, 56-61.
- SELMAJ K. - **Pathophysiology of the blood-brain barrier.** Springer Seminars in Immunopathology, 1996, 18, 57-73.
- SHELLITO J.E., KOLLS J.K., OLARIU R., BECK J.M. - **Nitric oxide and host defense against *Pneumocystis carinii* infection in a mouse model.** Journal of Infectious Diseases, 1996, 173, 432-439.

- SILEGHEM M., DARJI A., DE BAETSELIER P. - ***In vitro* simulation of immunosuppression caused by *Trypanosoma brucei***. Immunology, 1991, 68, 137-139.
- SILEGHEM M., FLYNN J.N., DARJI A., DE BAETSELIER P., NAESSENS J. - **African trypanosomiasis**. In «Parasitic infections and the immune system», KIERSZENBAUM F. ed., Academic press, San Diego, USA, 1994, 1, 1-51.
- SILVA J.S., VESPA G.N.R., CARDOSO M.A.G., ALIBERTI J.C.S., CUNHA F.Q. - **Tumor necrosis factor α mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected γ interferon activated macrophages**. Infection and Immunity, 1995, 63, 4862-4867.
- SIMMONS M.L., MURPHY S. - **Induction of nitric oxide synthase in glial cells**. Journal of Neurochemistry, 1992, 59, 897-905.
- STERNBERG J.M., MABBOTT N.A. - **Nitric oxide-mediated suppression of T cell responses during *Trypanosoma brucei* infection : soluble trypanosome products and Interferon γ are synergistic inducers of nitric oxide synthase**. European Journal of Immunology, 1996, 26, 539-543.
- STEVENS D.R., MOULTON J.E. - **Experimental meningoencephalitis in *Trypanosoma brucei* infection of deer mice (*Peromyscus maniculatus*)**. A light, immunofluorescent, and electron microscopic study. Acta Neuropathologica, 1977, 38, 173-180.
- TRUYENS C., TORRICO F., ANGELO-BARRIOS A., LUCAS R., HEREMANS H., DE BAETSELIER P., CARLIER Y. - **The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti TNF- α , but not by anti IL-6 or anti IFN- γ antibodies**. Parasite Immunology, 1995, 17, 561-568.
- VAN MEIRVENNE N., LE RAY D. - **Diagnosis of African and American trypanosomiasis**. British Medical Bulletin, 1985, 41, 156-161.

VICKERMAN K. - **Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes.**

British Medical Bulletin, 1985, 41, 105-114.

VILLANUEVA M.S. - **Trypanosomiasis of the central nervous system.** Seminars in

Neurology, 1993, 13, 209-218.

VINCENDEAU P., DAULOUEDE S., VEYRET B., DARDE M.L., BOUTEILLE B.,

LEMESRE J.L. - **Nitric oxide mediated cytostatic activity on *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*.** Experimental Parasitology, 1992, 75, 353-360.

VINCENDEAU P., OKOMO-ASSOUMOU M.C., SEMBALLA S., FOUQUET C.,

DAULOUEDE S. - **Immunologie et immunopathologie de la trypanosomose africaine.** Médecine Tropicale, 1996a, 56, 73-78.

VINCENDEAU P., PAJOT F.X., RIPERT C. - **Trypanosomoses humaines africaines.** In

«Epidémiologie des maladies parasitaires. 1. Protozooses», RIPERT C. ed., Editions Médicales Internationales, 1996b, 181-252.

WIESENFELD-HALLIN Z., KRISTENSSON K., SAMUELSSON E.B.,

SCHULTZBERG M. - **Studies of hyperalgesia induced by *Trypanosoma brucei brucei* infection in rats.** Acta Tropica, 1991, 48, 215-222.

ZHANG J., SNYDER S.H. - **Nitric oxide in the nervous system.** Annual Reviews of

Pharmacology and Toxicology, 1995, 35, 213-233.

ZIELASEK J., TAUSCH M., TOYKA K.V., HARTUNG H.P. - **Production of nitrite by**

neonatal rat microglial cells / brain macrophages. Cellular Immunology, 1992, 141, 111-120.



TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition géographique de la maladie du sommeil à <i>T. gambiense</i> et <i>T. rhodesiense</i>	5
Figure 2 : Famille des Trypanosomatidae et genre <i>Trypanosoma</i>	11
Figure 3 : Structure des plexus choroïdiens	12
Figure 4 : Localisation des organes périventriculaires et voies empruntées par les trypanosomes	14
Figure 5 : Rôle du TLTF dans l'immunopathologie de la trypanosomose	20
Figure 6 : Implication des astrocytes dans la réponse inflammatoire	30
Figure 7 : Implication du monoxyde d'azote dans la trypanosomose	33
Figure 8 : Immunopathologie dans la trypanosomose africaine	35
Figure 9 : Dosage des nitrites : réaction colorimétrique de Griess	49
Figure 10 : Courbe d'étalonnage réalisée pour chaque dosage de nitrites	50
Figure 11 : Production de nitrites par la lignée microgliale humaine CMH5	52
Figure 12 : Production de nitrites par la lignée microgliale humaine CMH5 après 72 heures d'incubation	53
Figure 13 : Production de nitrites par la lignée microgliale humaine CMH5 sans et avec inhibiteur spécifique pendant 72 heures	55
Figure 14 : Production de nitrites par la lignée astrocytaire de rat C6	56
Figure 15 : Production de nitrites par la lignée astrocytaire de rat C6 après 72 heures d'incubation	58
Figure 16 : Production de nitrites par la lignée astrocytaire de rat C6 sans et avec inhibiteur spécifique pendant 72 heures	59
Photo 1A : Lignée microgliale CMH5, marquage de la NOS constitutive à 72 heures	62
Photo 1B : Lignée astrocytaire C6, marquage de la NOS constitutive à 72 heures	62
Photo 1C : Témoin conjugué à 72 heures	62
Photo 2A : Lignée microgliale CMH5, marquage de la NOS inducible à 24 heures	63
Photo 2B : Lignée astrocytaire C6, marquage de la NOS inducible à 24 heures	63
Photo 2C : Témoin conjugué à 24 heures	63



TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS UTILISEES.	1
PLAN.	2
INTRODUCTION.	3
CHAPITRE I : PHYSIOPATHOLOGIE DE LA THA.	8
SOMMAIRE.	9
A . ASPECTS ANATOMOCLINIQUES.	10
B . TROUBLES DES RYTHMES CIRCADIENS.	16
1. Trouble du sommeil.	16
2. Troubles hormonaux.	17
C . IMMUNOLOGIE ET IMMUNOPATHOLOGIE.	18
1. Rôle du trypanosome.	18
1.1 Les glycoprotéines variables de surface.	18
1.2 Facteurs libérés par le trypanosome.	19
2. Dysrégulation du système immunitaire.	21
2.1 Implication des lymphocytes B.	21
2.2 Implication des lymphocytes T.	23
2.3 Rôle des macrophages.	25
3. Atteinte immunopathologique du système nerveux.	27
3.1 Modifications du liquide céphalo-rachidien.	27
3.2 Rôle des astrocytes et de la microglie.	29
3.3 Encéphalopathie réactionnelle.	34
CHAPITRE II : ETUDE DE LA PRODUCTION DE MONOXYDE D'AZOTE PAR LES LIGNEES ASTROCYTAIRES ET MICROGLIALES.	36
SOMMAIRE.	37
A. CONDITIONS EXPERIMENTALES DE CULTURE.	38
1. Culture des trypanosomes.	38
1.1 Composition du milieu.	38
1.2 Adaptation en culture des trypanosomes.	39
2. Culture des lignées astrocytaire de rat C6 et microgliale humaine CMH5.	41
2.1 Composition du milieu.	41
2.2 Entretien des lignées.	42
3. Cocultures des lignées et des trypanosomes.	42
3.1 Adaptation des trypanosomes dans le milieu des lignées.	42
3.2 Mise en place des cocultures directes des lignées et des trypanosomes.	43
B. ETUDE DE LA PRODUCTION DE MONOXYDE D'AZOTE.	45
1. Dosage des nitrites : réaction colorimétrique de Griess.	45
2. Immunohistochimie.	46
C. RESULTATS.	51
1. Production de nitrites par les lignées.	51
1.1 Lignée microgliale humaine CMH5.	51
1.2 Lignée astrocytaire de rat C6.	54

2. Immunohistochimie des NO synthases.	60
1.1 Lignée microgliale humaine CMH5.	60
1.2 Lignée astrocytaire de rat C6.	61
DISCUSSION	64
ANNEXES.	70
Annexe 1 : Concentrations de NO_2^- exprimées en μM dans le surnageant des cultures des cellules microgliales CMH5.	71
Annexe 2 : Concentrations de NO_2^- exprimées en μM dans le surnageant des cultures des cellules microgliales CMH5 après 72 heures d'incubation.	72
Annexe 3 : Concentrations de NO_2^- exprimées en μM dans le surnageant de culture des cellules astrocytaires C6.	73
Annexe 4 : Concentrations de NO_2^- exprimées en μM dans le surnageant des cultures des cellules astrocytaires C6 après 72 heures d'incubation	74
Annexe 5 : Concentrations de NO_2^- exprimées en μM dans le surnageant de cultures des lignées microgliales CMH5 sans et avec incubation avec la NMMA pendant 72 heures.	75
Annexe 6 : Concentrations de NO_2^- exprimées en μM dans le surnageant de cultures des lignées astrocytaires C6 sans et avec incubation avec la NMMA pendant 72 heures.	76
BIBLIOGRAPHIE.	77
TABLE DES FIGURES.	94
TABLE DES MATIERES.	96

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 63

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME.

Le monoxyde d'azote (NO) intervient dans les mécanismes de défense immunitaire notamment antiparasitaire et dans les processus physiologiques de neurotransmission. Il peut représenter un médiateur commun à l'interaction entre le trypanosome, le système immunitaire et le système nerveux. Nous avons étudié *in vitro* la production de NO par la lignée microgliale humaine CMH5 et la lignée astrocytaire de rat C6 en présence de *Trypanosoma brucei brucei*.

Nous avons mis en évidence la présence des enzymes NO synthases (NOS) par immunocytochimie. Une NOS constitutive a été révélée dans les deux lignées étudiées. L'isoforme inducible n'a été retrouvée que dans le cytoplasme de cellules stimulées pendant 24 heures avec des trypanosomes et de l'IFN- γ . Cette isoforme est clairement mise en évidence dans la lignée microgliale CMH5 et plus faiblement dans la lignée astrocytaire C6. La production de NO a été mesurée de façon indirecte dans le surnageant des cultures, dans différentes conditions expérimentales, par le dosage des nitrites selon la méthode de Griess. Les deux lignées étudiées ont montré une production de nitrites spécifique de la voie d'activation du NO. Cette production est augmentée lors de la mise en présence des cellules avec des trypanosomes et de l'IFN- γ ; elle est spécifiquement inhibée par l'addition de N^G Méthyl Arginine.

Nous avons montré que les lignées CMH5 et C6 produisent *in vitro* du NO, et que les trypanosomes agissent en présence d'IFN- γ pour activer la voie du NO.

Dans le système nerveux central, l'augmentation du NO pourrait entraîner la perméabilisation de la barrière hémocéphalique, permettre l'entrée de cellules immunocompétentes, activer les cellules astrocytaires et microgliales, et ainsi entretenir la réaction inflammatoire et les dysfonctionnements intervenant dans la symptomatologie clinique de la maladie.

MOTS-CLES.

Trypanosomose humaine africaine

Trypanosoma brucei brucei

Monoxyde d'azote

Lignée astrocytaire C6

Lignée microgliale CMH5