

MARQUEURS DU STADE NEUROLOGIQUE DE LA TRYPANOSOMOSE HUMAINE AFRICAINE : ACTUALITÉS ET PERSPECTIVES

Courtioux B., Pervieux L., Bisser S., Bouteille B.

- Travail de l'UPRES EA 3174 Neuroparasitologie et neuroépidémiologie tropicale (C.B., Docteur de l'Université de Limoges ; P.L., Doctorante ; B.S., Docteur en médecine, Docteur de l'Université de Limoges, H.D.R. ; B.B., Maître de conférence des universités-Praticien hospitalier, Directeur), Faculté de médecine, Université de Limoges, France.
- Correspondance : B. COURTILOUX, UPRES EA 3174 Neuroparasitologie et neuroépidémiologie tropicale, IFR 145 GEIST (Génomique, Environnement, Immunité, Santé et Thérapeutiques), Faculté de Médecine, 2, rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, France • Fax : +33 5 55 43 58 21.
- Courriel : bertrand.courtioux@unilim.fr

Med Trop 2008 ; **68** : 17-23

RÉSUMÉ • La maladie du sommeil ou trypanosomose humaine africaine (T.H.A.) a pour origine une infection parasitaire due à un protozoaire flagellé sanguicole du genre *Trypanosoma brucei*. La maladie évolue classiquement en deux stades : le stade hémolympatique et le stade neurologique. Actuellement une des difficultés de cette pathologie est le diagnostic du stade neurologique dont dépend le traitement. Ce diagnostic, sur le terrain, repose uniquement sur la cytorachie et la recherche du parasite dans le liquide céphalo-rachidien des patients. Cette recherche reste très aléatoire et invasive. De nombreux travaux sont en cours pour adapter le diagnostic du stade aux conditions de terrain et développer des tests fiables, peu coûteux et non invasifs. Nous proposons ici une revue des mécanismes impliqués dans l'atteinte neurologique au cours de la THA, ainsi que les travaux en cours sur les différentes techniques qui à l'avenir pourraient simplifier et améliorer le diagnostic du stade.

MOTS-CLÉS • *Trypanosoma brucei* - Marqueurs et diagnostic de stade.

CRITERIA FOR DIAGNOSIS OF THE CNS STAGE OF HUMAN AFRICAN TRYPANOSOMIASIS. UPDATE AND PERSPECTIVES

ABSTRACT • Sleeping sickness or human African trypanosomiasis (HAT) is due to parasite infection by a sanguicolous flagellate protozoan of the *Trypanosoma brucei* genus. The disease is classically divided into two stages, i.e., the hemolympathic stage and the CNS stage. Disease staging is currently a major challenge for therapeutic decision-making. In the field, diagnosis is based solely on white blood cell (WBC) count and detection of the parasite in the patient's cerebrospinal fluid (CSF). This technique is unreliable and invasive. Numerous studies are now under way to adapt staging to field conditions and to develop a reliable, low-cost, non-invasive test. This article describes the mechanisms underlying CNS involvement during HAT and reviews the different techniques now being studied to simplify and improve diagnosis of the CNS stage.

KEY WORDS • Human African trypanosomiasis - *Trypanosoma brucei* - Diagnostic markers - Staging.

La maladie du sommeil ou trypanosomose humaine africaine (THA) est une maladie parasitaire qui sévit dans les pays du continent africain dans une zone géographiquement située entre 15° de latitude nord et 23° de latitude sud, correspondant à la zone de répartition des glosines (mouches tsé-tsé). Ces vecteurs transmettent à l'homme *Trypanosoma brucei* (*T. b.*) *gambiense* en Afrique de l'Ouest et Centrale, *T. b. rhodesiense* en Afrique de l'Est. En dehors de ces zones, les cas décrits sont importés ou le résultat d'accidents de laboratoire (1). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 60 millions de personnes sont exposées aux mouches tsé-tsé et que 500 000 personnes sont à risque de développer la maladie. En 2004, le nombre de cas notifiés à l'OMS pour l'ensemble des pays endémiques a été de

17 036 infections à *T. b. gambiense* et 580 à *T. b. rhodesiense* (2). Ces chiffres ne représentent que la partie émergée de l'iceberg car seules environ 10 % des personnes exposées bénéficient d'une surveillance active dans les foyers par manque de moyens des services sanitaires des pays concernés. La THA reste de nos jours une maladie négligée et ré-émergente qui touche les zones rurales reculées (3-5).

La THA pose de nombreux problèmes tant au niveau du diagnostic, du traitement que du suivi post-thérapeutique. Après un bref rappel des manifestations cliniques résultant de l'interaction du parasite avec son hôte, nous nous focaliserons sur les mécanismes de passage du trypanosome dans le système nerveux central (SNC) afin de faire d'une part le point sur les possibilités actuelles de diagnostic et de suivi sur

le terrain et d'autre part sur les perspectives de nouveaux marqueurs au stade de méningo-encéphalite.

Interactions hôte-parasite : les mécanismes du développement de la maladie

Après piqûre et inoculation des trypanosomes, la réaction de l'hôte est d'abord locale avec le développement d'un chancre. Ce dernier correspond à une infiltration cellulaire faite de polynucléaires neutrophiles puis de lymphocytes T et B avec une prédominance de lymphocytes T CD8+ (6). Le trypanosome sécrète un activateur des lymphocytes T CD8+, le Trypanosome Lymphocyte Triggering Factor (TLTF) ou trypanine (7). Les lymphocytes T CD8+

ainsi activés produisent de l'interféron- γ (IFN- γ) qui est un facteur de croissance pour le trypanosome. L'IFN- γ produit permet aussi l'activation des monocytes-macrophages qui à leur tour produisent du monoxyde d'azote (NO) et du Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) toxiques pour le trypanosome (8, 9). Le système macrophagique représente ainsi la première barrière de défense de l'organisme. Lorsqu'elle est dépassée, le trypanosome peut atteindre le système lymphaticosanguin (stade 1) où il tentera à nouveau de se développer à l'aide de mécanismes subversifs aux dépens de la réaction inflammatoire générale mise en œuvre par l'hôte. Il sera alors détectable dans le sang et/ou les ganglions et un état de paix armée pourra s'établir pendant quelques mois à plusieurs années entre les réactions de défense de l'hôte et les mécanismes d'échappement du parasite (10). Le sujet infecté devient ainsi sans le savoir un réservoir de parasites pérennisant la transmission (4). Le principal mécanisme mis en œuvre par le trypanosome est celui de la variation antigénique en changeant périodiquement ses antigènes de surface (V.S.G. pour « variant surface glycoprotein »), très immunogènes. Ce phénomène est sous contrôle génétique et son potentiel de variations immense (11). Ce mécanisme permet de comprendre les quatre signes cliniques principaux décrits au cours de la phase lymphaticosanguine : une fièvre anarchique et rebelle, qui oscille entre 38°-38°5 et est contemporaine des pics de parasitémie ; la présence d'adénopathies et d'une hépatosplénomégalie (signes des réactions inflammatoires produites par l'hôte) et des signes cutanés (trypanides, œdèmes et prurit) (12).

Après un temps mal défini, souvent long de quelques mois à quelques années pour l'infection à *T. b. gambiense*, les trypanosomes pénètrent la barrière hémencéphalique (BHE) et provoquent une infection du SNC réalisant une méningo-encéphalite mésoenchymateuse avec infiltration cellulaire péri-vasculaire (stade 2). Les mécanismes de ce passage sont imparfaitement élucidés. L'envahissement progressif depuis des zones où la BHE est plus « perméable » jusqu'aux différentes zones du parenchyme cérébral permet d'expliquer les manifestations neurologiques variées décrites dans la maladie du sommeil (12, 13). Alors que les signes du stade 1, exception faite de la fièvre, régressent, apparaissent des troubles de la sensibilité, des troubles psychiques, des troubles moteurs, des troubles neuroendocriniens, et des troubles du sommeil. Ces derniers sont les

signes les plus connus et potentiellement les plus précoces. Ils sont caractérisés par une succession d'épisodes de veille et de sommeil débutant de façon anormale par une phase de sommeil paradoxal (14-16). L'évolution en l'absence de traitement se fait vers un état d'hébétéude permanente et une cachexie dite sommeilleuse terminale avec encéphalite démyélinisante, auto entretenue, irréversible.

La THA à *T. b. rhodesiense* présente une évolution similaire mais beaucoup plus rapide avec des manifestations cliniques aiguës potentiellement létales dès la phase lymphaticosanguine sous la forme de myocardite (17). L'atteinte neurologique est plus rare ; elle serait un facteur de mauvais pronostic (18). Nous nous limiterons dans la suite de notre exposé à la THA à *T. b. gambiense* qui par sa forme chronique pose plus particulièrement le problème du diagnostic de la phase nerveuse.

Interactions hôte-parasite au niveau de la BHE : les mécanismes du passage du trypanosome dans le SNC

Ces mécanismes sont fondamentaux pour la compréhension de la neuropathogénie de la THA et à terme pour le diagnostic de la phase nerveuse. Le SNC est séparé du système sanguin par un mécanisme sophistiqué de barrières sélectives constituées par la BHE et la barrière hémoméningée (BHM). Brièvement, la BHE représente la barrière la plus étendue en superficie d'échanges. Elle se situe au niveau des capillaires cérébraux qui contiennent une couche interne de cellules endothéliales connectées par des jonctions serrées, imperméables. L'endothélium capillaire et sa membrane basale continue se prolongent par les pieds astrocytaires qui forment une plate-forme de jonction avec l'environnement extracellulaire du SNC. Il existe des zones cérébrales dépourvues de BHE ; ces régions permettent le passage de molécules de grande taille et un contact fonctionnel sans intermédiaire (19).

La BHM est localisée au sein des plexus choroïdes. Sa surface ne représente que 0,02% de la surface de la BHE mais elle joue un rôle important dans le transport de substances et la production du liquide céphalo-rachidien (LCR).

Le cerveau est protégé des mécanismes immunitaires se développant en périphérie par l'absence d'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (C.M.H.). Dans cer-

taines conditions, les cellules endothéliales, les astrocytes et la microglie peuvent prendre le rôle de cellules présentatrices d'antigènes et initier la réponse immunitaire (20). Il existe des connexions entre le SNC et le système lymphatique (21) via les ganglions cervicaux (22, 23). Les lymphocytes T peuvent pénétrer dans le SNC (24), réagir avec un antigène cérébral et initier une réaction inflammatoire (25, 26). Le SNC est donc sous surveillance immunitaire dépendante des lymphocytes T. Ces derniers favorisent les processus inflammatoires et sont les principaux médiateurs de processus immunopathologiques. En fait, tous les éléments constitutifs de la barrière sont impliqués dans la réponse inflammatoire en produisant des cytokines, des molécules d'adhésion, des métalloprotéases, des sérines protéases, des dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique (prostaglandines) et du NO (27). Le trypanosome mesure environ 2 μ m de diamètre et ne peut pas traverser d'emblée la BHE en raison de sa grande taille. Des modèles *in vitro* de BHE ont été développés récemment ; ils montrent que les trypanosomes pathogènes pour l'homme (*T. b. gambiense* souche IL1852) traversent la BHE plus rapidement que ceux pathogènes pour l'animal (*T. b. brucei* souche 427) (28). Il semblerait que le passage soit possible sans perte des jonctions serrées (29). Les trypanosomes traversent au niveau ou à proximité des jonctions intercellulaires. Au moment du passage de *T. b. gambiense*, il a été noté une diminution de la résistance électrique de la BHE. Des données histologiques montrent que les trypanosomes passent dans le SNC plus facilement au niveau de régions où la BHE est plus perméable (plexus choroïdes, racines des ganglions dorsaux et trigéminals, organes péri-ventriculaires incluant la glande pinéale, éminence médiane et area postrema) (30-32). Ces localisations expliquent les manifestations cliniques initiales dans la THA (troubles du sommeil, troubles endocriniens et troubles de la sensibilité profonde).

La connaissance de ces mécanismes laisse supposer que le passage de la BHE est un phénomène actif médié par un système multifactoriel dépendant de substances diffusibles issues du parasite (principalement VSG, hydrolases, protéases, acides gras saturés et dérivés des aminoacides aromatiques) et/ou de substances sécrétées par l'hôte (endotoxines, prostaglandines, NO, TNF- α , IFN- γ) qui favorisent le passage du parasite (33-37).

Les mécanismes inflammatoires initiés

dans le sang peuvent également influencer la perméabilité de la BHE par l'activation de récepteurs spécifiques. La BHE elle-même peut jouer un rôle actif dans la médiation d'une réponse neuro-immunologique par la production de médiateurs de l'inflammation ou par l'expression de molécules d'adhésion (29, 38). Une protéine dérivée du parasite (trypanosome apoptotic factor) a montré sa potentialité d'induire l'apoptose de cellules endothéliales humaines, qui pourrait être un mécanisme clé du passage du parasite dans le SNC (39, 40). Par ailleurs, comme pour les lymphocytes, la pénétration du parasite peut être induite par la production d'IFN- γ . Ainsi, la BHE serait perméable pour les parasites et les cellules T en présence de laminine- $\alpha 4$ et en synergie avec l'IFN- γ (41). La conjonction de ces phénomènes va permettre au parasite de se retrouver dans le LCR dont la composition ne semble pas favorable à son développement (42) mais pourrait être à l'origine de modifications de son métabolisme influençant la sensibilité aux traitements (43).

La présence du trypanosome dans le SNC va initier des réactions locales dont la première serait liée à une infiltration macrophagique. Mais les cellules résidentes, principalement les astrocytes et la microglie, vont rapidement produire elles-mêmes des cytokines et des chimiokines (44-46). Un réseau complexe d'interactions se forme et, à nouveau, le parasite va essayer de déjouer les défenses de l'hôte pour favoriser sa croissance.

Cependant, en luttant contre le parasite et en raison de l'existence d'un mimétisme moléculaire entre des composants parasitaires et ceux du SNC, l'hôte peut produire des anticorps, véritables auto-anticorps, dirigés contre la myéline (galactocébroside), le L-tryptophane (un précurseur de la sérotonine) et contre le neurofilament (47-49). Le mimétisme moléculaire a été démontré pour le neurofilament, les auto-anticorps anti-neurofilament reconnaissent un épitope commun présent sur les neurones et le flagelle du trypanosome (48).

Ces anticorps pourraient être aussi la résultante de dommages tissulaires cérébraux occasionnés par l'invasion du trypanosome comme le démontre la présence de neurofilaments dans le LCR de patients au stade 2 (50). Des auto-anticorps peuvent également être produits par une activation polyclonale B. La présence d'anticorps anti-endotoxine et d'endotoxines a également été démontrée et proposée comme marqueur (51).

Ces auto-anticorps peuvent induire des lésions cérébrales et augmentent les mécanismes inflammatoires entraînant la démyélinisation.

Le diagnostic de la phase nerveuse : enjeu et réalités

Le diagnostic de l'invasion du SNC, ou diagnostic de stade, est primordial car il conditionne l'attitude thérapeutique (52). Au stade 1 lymphaticosanguin, la pentamidine, qui diffuse peu dans le SNC, est efficace, peu toxique et peut être administrée au dispensaire. Le seul risque est le développement à bas bruit d'une phase nerveuse si le diagnostic de stade est incorrect (53). Au stade 2 nerveux, seuls le mélarsoprol et l'éflornithine sont efficaces. Ces médicaments doivent être administrés dans une structure hospitalière, ils sont difficiles d'utilisation, coûteux et toxiques (5-10% de mortalité avec le mélarsoprol). Les signes cliniques spécifiques de l'invasion du SNC n'existent pas et cette phase passe souvent inaperçue (12). Ainsi, pour le diagnostic de stade, nous restons tributaires des marqueurs biologiques signant l'invasion du SNC.

Selon les recommandations de l'OMS (54), le stade nerveux est défini par la présence d'au moins une des altérations biologiques du LCR ci-dessous avec ou sans présence de signes neurologiques: (i) un taux de cellules $> 5/\mu\text{L}$, (ii) la présence de trypanosomes, (iii) un taux de protéines $> 370 \text{ mg/L}$ (méthode colorimétrique). En pratique, ces critères font l'objet de nombreuses controverses de par leur manque de sensibilité (détection des trypanosomes) ou par leur manque de spécificité (cytorachie et protéinorachie). Sur le terrain, il est possible d'améliorer la détection parasitologique par un examen extemporané (dans les 10 minutes qui suivent le prélèvement) et par des techniques de concentration qui sont cependant longues et alourdissent les prospections (55, 56). La protéinorachie est rarement pratiquée par difficulté de standardisation, l'absence de contrôles internes pour leur réalisation et des résultats souvent difficiles à interpréter (57). En fait, les concentrations élevées d'immunoglobulines dans le sang des patients entraînent une diffusion passive de ces immunoglobulines dans le LCR sans signification pathologique. Le comptage des leucocytes reste encore actuellement l'élément clé pour la décision thérapeutique malgré son manque de spécificité et la difficulté de définir un seuil (57).

Cette classification en deux stades en fonction de la cytorachie est arbitraire. La limite de 5 cellules est proche de la limite de détection des chambres de comptage utilisées ce qui permet déjà de larges fluctuations des résultats lors de la répétition de cet examen sur un même échantillon. Le comptage peut cependant être facilité par l'utilisation de chambres de comptage unitaire type Kova (Hycor biomedical Inc., Gardengrove, C.A., U.S.A.). Il faut garder en mémoire que le seuil de normalité de la cytorachie varie en fonction de l'âge : il est normal jusqu'à 30 cellules/ μL pendant la première année de vie, normal jusqu'à 20 cellules/ μL entre 1 et 4 ans, normal jusqu'à 10 cellules/ μL de 5 ans à la puberté (58).

De plus, la signification pathologique de la présence de trypanosomes dans un LCR, normal par ailleurs, n'est pas prouvée. Il en est de même avec les techniques récentes de biologie moléculaires : des patients au stade 1 dont la PCR est positive dans le LCR sont guéris après traitement spécifique du stade 1 (59, 60). Ainsi, il est opportun de décrire un stade « intermédiaire » qui correspondrait à la phase de passage du stade 1 au stade 2 (46, 61, 62). L'étude spécifique de ce stade intermédiaire pourrait apporter la clé pour la compréhension des mécanismes de l'atteinte nerveuse et ainsi la définition d'un marqueur spécifique.

Les marqueurs en développement

Ils prennent en compte les avancées technologiques dans le domaine de la détection des agents infectieux, dans celui de la compréhension des mécanismes immunitaires d'invasion du SNC et dans celui de l'électrophysiologie. Il est possible de diviser ces marqueurs en quatre catégories : (i) amélioration de la détection du parasite (technique PCR et détection antigénique), (ii) amélioration de la spécificité de la détection des protéines (profil protéique), (iii) amélioration de la spécificité de la détection de la réaction cellulaire (marqueurs issus des réactions immunitaires cellulaires et humorales) et (iv) amélioration et miniaturisation de l'appareillage permettant la réalisation de tracés de sommeil sur le terrain.

Marqueurs améliorant la détection du parasite

Plusieurs auteurs ont démontré la présence soit d'ADN de trypanosomes dans le LCR (59, 60, 63, 64), soit d'antigènes

parasitaires (65). A l'heure actuelle, il semblerait que la présence d'ADN ne soit pas synonyme de maladie (60) mais ceci reste à vérifier en conditions de terrain. C'est ainsi que des tests de biologie moléculaire de terrain sont en cours d'évaluation sous la forme : (i) de bandelettes de nitrocellulose (66). La HAT-PCR-OC (human African trypanosomiasis-PCR-oligochromatography) permet de détecter l'ADN du parasite après amplification. L'ADN du parasite est mis en évidence par son hybridation avec une bille d'or lors d'une migration sur buvard au cours d'une oligochromatographie. La limite de détection de cette technique est de 5 fg d'ADN de parasite soit l'équivalent de 1/40 de son ADN total. A l'heure actuelle sur un petit échantillon de contrôles et de patients infectés par *T. b. gambiense*, la sensibilité et la spécificité de ce test ont été évaluées à 100 % (ii) ou d'une alternative à la PCR conventionnelle en utilisant une réaction en boucle « loop-mediated isothermal amplification » (67). Cette technique permet d'amplifier rapidement de l'ADN avec une plus grande spécificité et efficacité. Elle fonctionne sous des conditions ambiantes de température et ne nécessite que de simples incubateurs. La méthode LAMP permet de synthétiser plus de 10 µg d'ADN en 30 à 60 minutes. La grande quantité de magnésium pyrophosphate produite forme un précipité blanc permettant une lecture facile et rapide de la présence ou non de l'ADN cible. Cette technique a déjà permis de détecter des parasites du groupe brucei (incluant *T. b. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* et *T. evansi*).

Par ailleurs, un test d'agglutination LATEX/*T. b. gambiense* détectant la présence du parasite a été mis au point mais son usage à grande échelle sur le terrain reste à définir (68, 69).

Marqueurs améliorant la spécificité de la détection protéique

Le LCR des patients au stade neurologique contient de fortes concentrations d'immunoglobulines, principalement de la classe des IgM. Une concentration élevée d'IgM dans le LCR est donc considérée depuis longtemps comme un marqueur de stade intéressant (70-74). Grâce à des études néphélométriques, la composition précise du LCR des patients est connue depuis peu (61, 75). Au stade de méningo-encéphalite, la réponse est caractérisée par une augmentation des IgG et des IgM avec

une prépondérance de synthèse intrathécale d'IgM en fréquence et en durée. En revanche, la recherche d'IgG ou d'IgM oligoclonales peut rester négative (75, 76).

Une application pratique de ces résultats a vu le jour. Il s'agit d'un test d'agglutination utilisant des particules de latex sensibilisées avec des IgM non spécifiques (LATEX/IgM). A un titre supérieur à 8, le LATEX/IgM détecte une synthèse intrathécale d'IgM avec une sensibilité de 89 % et une spécificité de 93 % (77). Plus récemment, la détection des IgM par le test au latex chez des patients au stade 1 a confirmé le potentiel de ce test à révéler précocement les patients à risque de rechute ; le risque de rechute était plus élevé pour les patients avec un titre supérieur à 2 (53).

Marqueurs améliorant la spécificité de la détection immunologique humorale et cellulaire

La détection de la phase nerveuse par la recherche d'anticorps spécifiques des trypanosomes a été décrite depuis longtemps dans le LCR par immunofluorescence ou technique immunoenzymatique (70, 72, 74, 78). Les anticorps détectés appartiennent principalement à la classe des IgM et à celle des IgG (sous types 1 et 3) avec des affinités différentes (79). Les anticorps spécifiques de la classe des IgG ont été décrits chez 52 % des patients au stade neurologique.

Le LCR des patients contient également des anticorps dirigés contre des composants du SNC : anti-galactocérobrosides, anti-neurofilaments et anti-tryptophane (49, 80-82). Une application pratique de ces marqueurs a été réalisée pour la détection des anticorps anti-galactocérobrosides et anti-neurofilament. Un test de terrain sous la forme d'un dot blot (bandelette de nitrocellulose pré sensibilisée avec du neurofilament et du galactocérobroside d'origine animale) permet d'évaluer directement les LCR. Ce test a une sensibilité de 83,2 % et une spécificité de 100 % chez les patients au stade neurologique (83).

La détection de l'atteinte nerveuse par la recherche des modifications cytologiques du LCR a été récemment entreprise par notre équipe et a montré l'importance des lymphocytes B reconnus par leur récepteur de surface, le CD19, dans la sévérité de la maladie (résultats non publiés). Par ailleurs, la concentration des cytokines/chimiokines a été étudiée chez des patients atteints de THA. Les prostaglan-

dines D2, l'interleukine-6 (IL-6), l'IL-8/CXCL-8, l'IL-10, le MCP-1/CCL-2, le MIP-1α/CCL-3 sont augmentés au stade nerveux (45, 46, 84). Pour les infections à *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*, la concentration d'IL-10 est élevée chez les patients au stade nerveux et revient à des valeurs normales après traitement (45, 85). Plus récemment, le potentiel diagnostique de CXCL-13, une chimiokine qui attire les lymphocytes B, a été souligné dans la neuroborréliose (86). Nous avons constaté la production de CXCL13 par les cellules microgliales en culture en présence de trypanosomes (résultats non publiés). Nous avons également dosé CXCL13 dans le LCR de patients en stade 2 ; les premiers résultats semblent encourageants (résultats non publiés).

Marqueurs permettant d'éviter la réalisation d'une ponction lombaire

L'analyse du cycle veille-sommeil par polysomnographie a été récemment proposée comme outil potentiel de diagnostic de stade de la THA. C'est une méthode électrophysiologique non invasive qui pourrait permettre d'éviter la ponction lombaire souvent mal perçue par les populations. Elle suit en cela les recommandations récentes de l'OMS/TDR. Des enregistrements polysomnographiques de 24 heures ont été réalisés chez des patients en stade 1 et chez des patients en stade 2. Chez ces derniers, les auteurs ont décrit un syndrome polysomnographique, constitué de deux symptômes majeurs : (i) altération de l'alternance nyctémérale (24 heures) de la veille et du sommeil, proportionnelle à la gravité de la maladie, le sommeil et l'éveil survenant sur un mode polyphasique par épisodes courts, tant le jour que la nuit ; (ii) altération de la structure du sommeil, avec la survenue de fréquents épisodes de sommeil débutant par du sommeil paradoxal (Sleep Onset Rapid Eye Movements sleep periods ou SOREM) (16). Les SOREM diminuent ou disparaissent après traitement au mélarisoprol (15). La survenue de SOREM a aussi été observée chez le rat entre 12 et 14 jours d'évolution après infection par *T. b. brucei* ; elle semble déterminante pour le diagnostic électrophysiologique du passage du stade 1 au stade 2 de la maladie (87). La polysomnographie est actuellement en cours d'évaluation sur le terrain (A. Buguet, communication personnelle).

Conclusion et perspectives

Les nouveaux marqueurs que nous venons de décrire doivent maintenant être validés à grande échelle sur le terrain. Cette validation est d'autant plus difficile qu'il n'existe pas de réel « gold standard » permettant de classer les patients en fonction du stade. Le diagnostic du stade de la THA devrait pouvoir être établi en

combinant plusieurs tests diagnostiques et en ne pratiquant plus la ponction lombaire. Cet objectif peut être atteint grâce à des centres référents basés en Afrique dans les zones d'endémie. Ces centres pourraient également réaliser un suivi post-thérapeutique des patients à long terme. La « Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND) » a été créée lors de l'Assemblée mondiale de la Santé, le 22 mai 2003 à Genève, pour soutenir et pro-

mouvoir la santé des populations dans les pays en développement en partenariat avec l'OMS, le TDR, les organisations non gouvernementales et l'industrie avec le soutien de la Fondation BILL & MELINDA GATES. Un des axes de promotion de FIND est la mise au point et l'introduction de nouveaux diagnostics pour les maladies infectieuses dont la THA, relançant ainsi la recherche dans ce domaine ■

REFERENCES

- 1 - LEJON V, BOELAERT M, JANNIN J *et al.* - The challenge of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness diagnosis outside Africa. *Lancet Infect Dis* 2003 ; **3** : 804-8.
- 2 - ANONYMOUS - Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): Epidemiological update. *Weekly Epidemiol Rec* 2006 ; **81** : 71-80.
- 3 - BARRETT MP - The rise and fall of sleeping sickness. *Lancet* 2006 ; **367** : 1377-8.
- 4 - KOFFI M, SOLANO P, DENIZOT M *et al.* - Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: a potential human reservoir of parasites? *Acta Trop* 2006 ; **98** : 183-8.
- 5 - PEPIN J - Combination therapy for sleeping sickness: A wake-up call. *J Infect Dis* 2007 ; **195** : 311-3.
- 6 - MWANGI DM, HOPKINS J, LUCKINS AG - *Trypanosoma congolense* infection in sheep: Cellular phenotypes in lymph and lymph nodes associated with skin reactions. *J Comp Pathol* 1996 ; **114** : 51-61.
- 7 - OLSSON T, BAKHIET M, EDLUND C *et al.* - Bidirectional activating signals between *Trypanosoma brucei* and CD8+ T cells: A trypanosome-released factor triggers interferon-gamma production that stimulates parasite growth. *Eur J Immunol* 1991 ; **21** : 2447-54.
- 8 - OKOMO-ASSOUMOU MC, DAULOUEDE S, LEMESRE JL *et al.* - Correlation of high serum levels of tumor necrosis factor-alpha with disease severity in human African trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1995 ; **53** : 539-43.
- 9 - BUGUET A, BANZET S, BOUTEILLE B *et al.* - NO a cornerstone in sleeping sickness: Voltammetric assessment in animal and man. In « MORA-VEC J, TAKEDA N, SINGAL PK - Adaptation Biology and Medicine, vol 3, chapter 23 ». Narosha Publishing House ed, New Dehli, India, 2002, pp 221-9.
- 10 - VINCENTEAU P, BOUTEILLE B - Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *An Acad Bras Cienc* 2006 ; **78** : 645-65.
- 11 - DUBOIS ME, DEMICK KP, MANSFIELD JM - Trypanosomes expressing a mosaic variant surface glycoprotein coat escape early detection by the immune system. *Infect Immun* 2005 ; **73** : 2690-7.
- 12 - DUMAS M, BISSER S - Clinical aspects of human African trypanosomiasis. In « DUMAS M, BOUTEILLE B, BUGUET A - Progress in human African Trypanosomiasis, sleeping sickness ». Springer-Verlag, Paris (France), 1999, pp. 215-23.
- 13 - KENNEDY PG - Human African trypanosomiasis of the CNS: Current issues and challenges. *J Clin Invest* 2004 ; **113** : 496-504.
- 14 - BUGUET A, BERT J, TAPIE P *et al.* - Sleep-wake cycle in human African trypanosomiasis. *J Clin Neurophysiol* 1993 ; **10** : 190-6.
- 15 - BUGUET A, TAPIE P, BERT J - Reversal of the sleep/wake cycle disorder of sleeping sickness after trypanosomicide treatment. *J Sleep Res* 1999 ; **8** : 225-35.
- 16 - BUGUET A, BISSER S, JOSENANDO T *et al.* - Sleep structure: A new diagnostic tool for stage determination in sleeping sickness. *Acta Trop* 2005 ; **93** : 107-17.
- 17 - KOTEN JW, DE RAADT P - Myocarditis in *Trypanosoma rhodesiense* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1969 ; **63** : 485-9.
- 18 - BRAAKMAN HM, VAN DE MOLENGRAFT FJ, HUBERT WW, BOERMAN DH - Lethal African trypanosomiasis in a traveller : MRI and neuropathology. *Neurology* 2006 ; **66** : 1094-6.
- 19 - CARPENTER MB, SUTIN J - Human neuroanatomy. Eight edition. Williams and Wilkins ed, 1983, 872 p.
- 20 - DHIB-JALBUT S, MCFARLIN DE, MCFARLAND HF - Measles virus-polypeptide specificity of the cytotoxic T-lymphocyte response in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1989 ; **21** : 205-212.
- 21 - PRINEAS JW - Multiple sclerosis: Presence of lymphatic capillaries and lymphoid tissue in the brain and spinal cord. *Science* 1979 ; **203** : 1123-5.
- 22 - WIDNER H, MOLLER G, JOHANSSON BB - Immune response in deep cervical lymph nodes and spleen in the mouse after antigen deposition in different intracerebral sites. *Scand J Immunol* 1988 ; **28** : 563-71.
- 23 - KIVISAKK P, MAHAD DJ, CALLAHAN MK *et al.* - Expression of CCR7 in multiple sclerosis: Implications for CNS immunity. *Ann Neurol* 2004 ; **55** : 627-8.
- 24 - HICKEY WF, KIMURA H - Graft-vs.-host disease elicits expression of class I and class II histocompatibility antigens and the presence of scattered T lymphocytes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; **84** : 2082-6.
- 25 - BAILEY SL, CARPENTIER PA, MCMAHON EJ *et al.* - Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit Rev Immunol* 2006 ; **26** : 149-88.
- 26 - MCMAHON EJ, BAILEY SL, MILLER SD - CNS dendritic cells: Critical participants in CNS inflammation? *Neurochem Int* 2006 ; **49** : 195-203.
- 27 - WEBB AA, MUIR GD - The blood-brain barrier and its role in inflammation. *J Vet Intern Med* 2000 ; **14** : 399-411.
- 28 - GRAB DJ, NIKOLSKAIA O, KIMYV *et al.* - African trypanosome interactions with an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Parasitol* 2004 ; **90** : 970-9.
- 29 - MULENGA C, MHLANGA JD, KRISTENSSON K, ROBERTSON B - *Trypanosoma brucei brucei* crosses the blood-brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat chronic disease model. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001 ; **27** : 77-85.

- 30 - SCHULTZBERG M, AMBATSIS M, SAMUELSSON EB *et al.* - Spread of *Trypanosoma brucei* to the nervous system: Early attack on circumventricular organs and sensory ganglia. *J Neurosci Res* 1988 ; **21** : 56-61.
- 31 - PHILIP KA, DASCOMBE MJ, FRASER PA, PENTREATH VW - Blood-brain barrier damage in experimental African trypanosomiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1994 ; **88** : 607-16.
- 32 - KEITA M, BOUTEILLE B, ENANGA B *et al.* - *Trypanosoma brucei brucei*: A long-term model of human African trypanosomiasis in mice, meningoencephalitis, astrocytosis, and neurological disorders. *Exp Parasitol* 1997 ; **85** : 183-92.
- 33 - TIZARD I, NIELSEN KH, SEED JR, HALL JE - Biologically active products from African Trypanosomes. *Microbiol Rev* 1978 ; **42** : 664-81.
- 34 - PENTREATH VW, ALAFIATAYO RA, BARCLAY GR *et al.* - Endotoxin antibodies in African sleeping sickness. *Parasitology* 1997 ; **114** : 361-65.
- 35 - KEITA M, VINCEDEAU P, BUGUET A *et al.* - Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in the central nervous system of mice chronically infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp Parasitol* 2000 ; **95** : 19-27.
- 36 - LONSDALE-ECCLES JD, GRAB DJ - Trypanosome hydrolases and the blood-brain barrier. *Trends Parasitol* 2002 ; **18** : 17-9.
- 37 - NIKOLSKAIA OV, DE A LIMA AP, KIM YV *et al.* - Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signalling induced by parasite cysteine protease. *J Clin Invest* 2006 ; **116** : 2739-47.
- 38 - VISWAMBHARAN H, SEEBECK T, YANG Z - Enhanced endothelial nitric oxide-synthase activity in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol* 2003 ; **33** : 1099-104.
- 39 - GIRARD M, BISSER S, COURTILOUX B *et al.* - *In vitro* induction of microglial and endothelial cell apoptosis by cerebrospinal fluids from patients with human African trypanosomiasis. *Int J Parasitol* 2003 ; **33** : 713-20.
- 40 - STILES JK, WHITTAKER J, SARFO BY *et al.* - Trypanosome apoptotic factor mediates apoptosis in human brain vascular endothelial cells. *Mol Biochem Parasitol* 2004 ; **133** : 229-40.
- 41 - MASOCHA W, ROBERTSON B, ROTTENBERG ME *et al.* - Cerebral vessel laminins and IFN-gamma define *Trypanosoma brucei brucei* penetration of the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 2004 ; **114** : 689-94.
- 42 - PENTREATH VW, OWOLABI AO, DOUA F - Survival of *Trypanosoma brucei brucei* in cerebrospinal fluid. *Ann Trop Med Parasitol* 1992 ; **86** : 29-34.
- 43 - ENANGA B, BURCHMORE RJ, STEWART ML, BARRETT MP - Sleeping sickness and the brain. *Cell Mol Life Sci* 2002 ; **59** : 845-58.
- 44 - BRENIER-PINCHART MP, PELLOUX H, DEROUICH-GUERGOUR D, AMBROISE-THOMAS P - Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends Parasitol* 2001 ; **17** : 292-6.
- 45 - LEJON V, LARDON J, KENIS G *et al.* - Interleukin (IL)-6, IL-8 and IL-10 in serum and CSF of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness patients before and after treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002 ; **96** : 329-33.
- 46 - COURTILOUX B, BODA C, VATUNGA G *et al.* - A link between chemokine levels and disease severity in human African trypanosomiasis. *Int. J. Parasitol.* 2006 ; **36** : 1057-65.
- 47 - AMEVIGBE MD, JAUBERTEAU-MARCHAN MO, BOUTEILLE B *et al.* - Human African trypanosomiasis: Presence of antibodies to galactocerebrosides. *Am J Trop Med Hyg* 1992 ; **47** : 652-62.
- 48 - AYED Z, BRINDEL I, BOUTEILLE B *et al.* - Detection and characterization of autoantibodies directed against neurofilament proteins in human African trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1997 ; **57** : 1-6.
- 49 - OKOMO-ASSOUMOU MC, GEFFARD M, DAULOUEDE S *et al.* - Circulating antibodies directed against tryptophan-like epitopes in sera of patients with human African trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1995 ; **52** : 461-7.
- 50 - LEJON V, ROSENGREN LE, BUSCHER P *et al.* - Detection of light subunit neurofilament and glial fibrillary acidic protein in cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense*-infected patients. *Am J Trop Med Hyg* 1999 ; **60** : 94-8.
- 51 - PENTREATH VW - Trypanosomiasis and the nervous system. Pathology and immunology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995 ; **89** : 9-15.
- 52 - BOUTEILLE B, OUKEM O, BISSER S, DUMAS M - Treatment perspectives for human African trypanosomiasis. *Fundam Clin Pharmacol* 2003 ; **17** : 171-81.
- 53 - LEJON V, ROBAYS J, N'SIESI FX *et al.* - Treatment Failure Related to intrathecal immunoglobulin M (IgM) synthesis, cerebrospinal fluid IgM, and interleukin-10 in patients with hemolympathic-stage sleeping sickness. *Clin Vaccine Immunol* 2007 ; **14** : 732-7.
- 54 - WORLD HEALTH ORGAN TECH REP SER - Control and surveillance of African trypanosomiasis. *World Report of a WHO expert committee* 1998 ; **881** : 1-113.
- 55 - CATTAND P, MIEZAN BT, DE RAADT P - Human African trypanosomiasis: Use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *Bull World Health Organ* 1988 ; **66** : 83-86.
- 56 - MIEZAN TW, MEDA HA, DOUA F *et al.* - Single centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000 ; **94** : 293.
- 57 - MIEZAN TW, MEDA HA, DOUA F *et al.* - Assessment of central nervous system involvement in gambiense trypanosomiasis: Value of the cerebrospinal white cell count. *Trop Med Int Health* 1998 ; **3** : 571-5.
- 58 - KJELDSBERG CR, KNIGHT JA - Cerebrospinal fluid. In «JOHNSON KD - Body fluids» American Society of Clinical Pathologists ed, 1993, pp 65-157.
- 59 - KYAMBADDE JW, ENYARU JC, MATOVU E *et al.* - Detection of trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using the polymerase chain reaction. *Bull World Health Organ* 2000 ; **78** : 119-24.
- 60 - JAMONNEAU V, SOLANO P, GARCIA A *et al.* - Stage determination and therapeutic decision in human African trypanosomiasis: Value of polymerase chain reaction and immunoglobulin M quantification on the cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients in Cote d'Ivoire. *Trop Med Int Health* 2003 ; **8** : 589-94.
- 61 - BISSER S, LEJON V, PREUX PM *et al.* - Blood-cerebrospinal fluid barrier and intrathecal immunoglobulins compared to field diagnosis of central nervous system involvement in sleeping sickness. *J Neurol Sci* 2002 ; **193** : 127-35.
- 62 - BISSER S, OUWE-MISSI-OUKEM-BOYER ON, TOURE FS *et al.* - Harboring in the brain: A focus on immune evasion mechanisms and their deleterious effects in malaria and human African trypanosomiasis. *Int J Parasitol* 2006 ; **36** : 529-40.
- 63 - KIRCHHOFF LV - Use of a PCR assay for diagnosing African trypanosomiasis of the CNS: A case report. *Cent Afr J Med* 1998 ; **44** : 134-6 (Retraction in *Cent Afr J Med* 2005 ; **51** : 21).

- 64 - TRUC P, JAMONNEAU V, CUNY G, FREZIL J L - Use of polymerase chain reaction in human African trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bull World Health Organ* 1999 ; **77** : 745-8.
- 65 - NANTULYA VM - Immunodiagnosis of rhodesiense sleeping sickness: Detection of circulating trypanosomal antigens in sera and cerebrospinal fluid by enzyme immunoassay using a monoclonal antibody. *Bull Soc Pathol Exot* 1988 ; **81** : 511-2.
- 66 - DEBORGGRAEVE S, CLAES F, LAURENT T *et al.* - Molecular dipstick test for diagnosis of sleeping sickness. *J Clin Microbiol* 2006 ; **44** : 2884-9.
- 67 - KUBOKI N, INOUE N, SAKURAI T *et al.* - Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J Clin Microbiol* 2003 ; **41** : 5517-24.
- 68 - JAMONNEAU V, TRUC P, GARCIA A *et al.* - Preliminary evaluation of LATEX/T. *b. gambiense* and alternative versions of CATT/T. *b. gambiense* for the serodiagnosis of human African trypanosomiasis of a population at risk in Cote d'Ivoire: Considerations for mass-screening. *Acta Trop* 2000 ; **76** : 175-83.
- 69 - PENCHENIER L, GREBAUT P, NJOKOU F *et al.* - Evaluation of LATEX/T. *b. gambiense* for mass screening of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Central Africa. *Acta Trop* 2003 ; **85** : 31-7.
- 70 - MATTERN P, PILLOT J, BONNARDOT R - Contribution à l'étude des immuno-globulines du liquide céphalo-rachidien responsables du phénomène d'immuno-fluorescence dans la neuro-syphilis et dans la trypanosomiase nerveuse. *Med Afr Noire* 1965 ; **6** : 219-21.
- 71 - GREENWOOD BM, WHITTLE HC - Cerebrospinal-fluid IgM in patients with sleeping-sickness. *Lancet* 1973 ; **2** : 525-7.
- 72 - WHITTLE HC, GREENWOOD BM, BIDWELL DE *et al.* - IgM and antibody measurement in the diagnosis and management of Gambian trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1977 ; **26** : 1129-34.
- 73 - LAMBERT PH, BERNEY M, KAZYUMBA G - Immune complexes in serum and in cerebrospinal fluid in African trypanosomiasis. Correlation with polyclonal B cell activation and with intracerebral immunoglobulin synthesis. *J Clin Invest* 1981 ; **67** : 77-85.
- 74 - KNOBLOCH J, TISCHENDORF F, KONIG J, MEHLITZ D - Evaluation of immunoassays for diagnosis and management of sleeping sickness in Liberia. *Tropenmed Parasitol* 1984 ; **35** : 137-40.
- 75 - LEJON V, REIBER H, LEGROS D *et al.* - Intrathecal immune response pattern for improved diagnosis of central nervous system involvement in trypanosomiasis. *J Infect Dis* 2003 ; **187** : 1475-83.
- 76 - LEJON V, SINDIC CJ, VAN ANTWERPEN MP *et al.* - Human African trypanosomiasis: Quantitative and qualitative assessment of intrathecal immune response. *Eur J Neurol* 2003 ; **10** : 711-9.
- 77 - LEJON V, LEGROS D, RICHER M *et al.* - IgM quantification in the cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients by a latex card agglutination test. *Trop Med Int Health* 2002 ; **7** : 685-92.
- 78 - ROFFI J, CARRIE J, GARRE MT, DEDET JP - Dépistage immunoenzymatique de la trypanosomiase humaine africaine utilisant des échantillons de sang séché. *Bull Soc Pathol Exot* 1980 ; **73** : 67-74.
- 79 - LEJON V, BUSCHER P, MAGNUS E *et al.* - A semi-quantitative ELISA for detection of *Trypanosoma brucei gambiense* specific antibodies in serum and cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients. *Acta Trop* 1998 ; **69** : 151-64.
- 80 - JAUBERTEAU MO, BISSER S, AYED Z *et al.* - Détection d'autoanticorps anti-galactocébrésides au cours de la trypanosomose humaine africaine. *Bull Soc Pathol Exot* 1994 ; **87** : 333-6.
- 81 - BISSER S, AYED Z, BOUTEILLE B *et al.* - Central nervous system involvement in African trypanosomiasis: Presence of anti-galactocébrésides antibodies in patients' cerebrospinal fluid. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000 ; **94** : 225-6.
- 82 - SEMBALLA S, OKOMO-ASSOUMOU MC, HOLZMULLER P *et al.* - Identification of a tryptophan-like epitope borne by the variable surface glycoprotein (VSG) of African trypanosomes. *Exp Parasitol* 2007 ; **115** : 173-80.
- 83 - COURTILOUX B, BISSER S, M'BELESSO P *et al.* - Dot enzyme-linked immunosorbent assay for more reliable staging of patients with Human African trypanosomiasis. *J Clin Microbiol* 2005 ; **43** : 4789-95.
- 84 - PENTREATH VW, REES K, OWOLABI OA *et al.* - The somnogenic T lymphocyte suppressor prostaglandin D2 is selectively elevated in cerebrospinal fluid of advanced sleeping sickness patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990 ; **84** : 795-9.
- 85 - MACLEAN L, ODIIT M, STERNBERG JM - Nitric oxide and cytokine synthesis in human African trypanosomiasis. *J Infect Dis* 2001 ; **184** : 1086-90.
- 86 - RUPPRECHT TA, PFISTER HW, ANGELE B *et al.* - The chemokine CXCL13 (BLC): A putative diagnostic marker for neuroborreliosis. *Neurology* 2005 ; **65** : 448-50.
- 87 - DARSAUD A, BOURDON L, CHEVRIER C *et al.* - Clinical follow-up in the rat experimental model of African trypanosomiasis. *Exp Biol Med* (Maywood) 2003 ; **228** : 1355-62.