

Université de Limoges
École Doctorale Gay Lussac - Sciences pour l'Environnement (ED 523)
UMR INSERM 1094 Neuro-Epidémiologie Tropicale
Institut d'Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Discipline / Spécialité : Parasitologie

Présentée et soutenue par
Julien BONNET

Le 19 décembre 2017

**Exploitation d'une biobanque d'échantillons de patients atteints de
Trypanosomose Humaine Africaine à *Trypanosoma brucei*
gambiense : recherche et validation de biomarqueurs**

Thèse dirigée par le Dr Bertrand COURTIoux

JURY :

Pré-Rapporteurs

M. Frédéric BRINGAUD, Docteur (PhD, HDR), Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR-CNRS 5234, Bordeaux, France.

M. Jorge Beirão SEIXAS, Professeur (MD, PhD), Unidade de Clínica das Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA, Lisbonne, Portugal.

Examineurs

Mme. Sylvie BISSER, Docteur (MD, PhD, HDR), Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne, France.

M. Bertrand COURTIoux, Docteur (PhD, HDR), Institut d'Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale, UMR INSERM 1094, Limoges, France.

M. Dennis John GRAB, Professeur (PhD), Department of Pathology, Uniformed Services University of the Health Sciences, Washington, Etats Unis.

M. Philippe VIGNOLES, Docteur, (PhD, HDR) Institut d'Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale, UMR INSERM 1094, Limoges, France.



À tous ceux qui me sont chers



La proportion de 100% est exclue à tout jamais de la terminologie scientifique.

Amélie Nothomb



Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Bertrand COURTIOUX d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci de votre présence essentielle et d'avoir su m'accompagner avec justesse, patience (beaucoup...) et gentillesse, afin de me permettre de réaliser un travail dont, je l'espère, vous serez fier. Je vous remercie également pour ces trois années où j'ai beaucoup appris à vos côtés.

I would especially like to thank Professor Dennis GRAB, for having crossed the Atlantic to preside this thesis jury. It is an immense honor for me. I thank you for your interest in this work. Be assured of my gratitude and profound respect.

Je remercie également le Docteur Frédéric BRINGAUD et le Docteur Jorge SEIXAS qui ont accepté de juger ce travail et de siéger comme rapporteurs. Je vous suis reconnaissant de me faire l'honneur de juger mon travail.

Je tiens également à remercier le Docteur Sylvie BISSER et le Docteur Philippe VIGNOLES pour leur aide, leurs conseils, pour avoir toujours répondu présents lorsque j'en faisais la demande ainsi que pour le temps qu'ils m'ont accordé tout au long de ce travail.

Je témoigne également ma gratitude envers le Professeur Pierre-Marie PREUX, Directeur de l'UMR INSERM 1094 Neuroépidémiologie Tropicale à Limoges, pour m'avoir accueilli au sein de son unité et pour son soutien tout au long de ma thèse.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Professeur Jean Luc DUROUX pour m'avoir confié un poste d'ATER au sein de la Faculté de Pharmacie de Limoges.

Je remercie la Région Limousin devenue Nouvelle Aquitaine et l'INSERM pour son soutien financier nécessaire à l'aboutissement de ce travail. Je remercie également la Fondation FIND par l'intermédiaire de Monsieur le Professeur Joseph NDUNG'U et Monsieur Sylvain BIELER.

J'ai le plaisir aussi de remercier Messieurs Thibaut LEGER et Camille GARCIA, responsable technique et ingénieur d'étude au sein de la plateforme protéomique structurale et onctionnelle de l'Institut Jacques Monod, pour leur aide immense, leur gentillesse et pour les moments agréables que nous avons partagés.



Un grand merci à toutes les personnes de l'UMR INSERM 1094 NET pour leur aide, leur soutien et leur bonne humeur, notamment Elisabeth, Pascale, Laetitia, Emmanuelle, Marie-Laure, Aurélien, Daniel, Jean-Benjamin, Farid, François et Benoit. Enfin j'adresse également mes remerciements à l'initiateur de cette équipe et référence internationale en matière de THA en la personne de Monsieur le Professeur Michel DUMAS.

J'adresse également un clin d'œil amical à nos collègues et voisins de palier de l'UMR INSERM 1092.

Un très grand merci également à Sylvie ROGEZ, Jenny COOK-MOREAU et Sylvie DELEBASSE du service de microbiologie de la faculté de Pharmacie de Limoges. Un merci un peu spécial à Martine et Roselyne, mes deux mamans du labo, merci pour votre gentillesse, votre douceur, votre joie de vivre et votre aide toujours très précieuse. Ces trois années n'auraient pas été pareilles sans vous !

Un merci également à tous les doctorants que j'ai pu fréquenter au cours de ma thèse. Les anciens : Paola, Patcharee, Emilie toxo, Mandy, Karim, Brice et Bello ; et les actuels : Azra, Mayoura, Emilie des plantes, Pascale, Ines, Jeremy, Gilles, Goeffrey, Jaime et Lokman.

Et bien entendu Clotilde pour son aide, ses talents de relectrice, sa bonne humeur et tous les moments passés et à venir (avec Alex bien sûr) autour d'un bon repas, parce qu'il n'y a pas que les trypanosomes dans la vie, il y a la raclette aussi !

Je dois aussi remercier l'ensemble des personnes qui ont participé à ce travail à l'occasion de stage. Merci à Sabrina, à Manon, à Clotilde, à Clémentine, à Camille, à Valère et à Marie-Pauline pour leur travail et leur acidité qui ont permis de mener à bien cette thèse.

Un grand merci à tout mes ami(e)s de Coussac Bonneval et des alentours, inutile de tous vous citer, vous vous reconnaitrez facilement. Le cours de ma vie n'aurait pas été le même sans vous.

Un grand merci également à mes copains et collègues de Toulouse qui m'ont bien aidé pendant mes deux années passées là-bas. Parce que OUI ! entre deux apéros on a bossé !!!

Un merci tout particulier à mes parents, vous qui m'avez soutenu dans toutes mes actions, qui avez forgé mon éducation et inculqué mon envie de bien faire. Même si je ne suis pas toujours présent et que je ne l'exprime pas, vous avez toujours été d'une importance précieuse pour moi.



A mon frère, Maxime. Je suis persuadé que la rivalité fraternelle que nous entretenons est pour beaucoup dans mon parcours. Je suis fier et heureux d'avoir un petit frère comme toi, et j'espère que notre esprit de compétition nous poussera encore longtemps.

Je garde le meilleur pour la fin, un infini merci à « mon p'tit cœur » Nadège que j'aime plus que tout. Merci pour ton sourire, ton humour, ton soutien, pour ta patience pendant que je rédigeais la thèse et pour tes relectures aussi... Mais surtout merci pour tout le reste. Merci d'être juste toi.

Et enfin, un merci à tous ceux que j'ai pu croiser de près ou de loin, avec qui j'ai parlé, échangé, plaisanté ou seulement échangé un sourire ; si vous vous sentez concernés : MERCI.



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Abstract	17
Introduction.....	28
Généralités	30
1.1. Les maladies tropicales négligées	30
1.2. Epidémiologie de la THA	31
1.3. Le parasite	35
1.3.1. Classification	35
1.3.2. Morphologie	36
1.4. Le vecteur de la maladie.....	38
1.5. Le cycle parasitaire.....	40
1.6. Evolution de la maladie.....	42
1.6.1. Stade cutané	43
1.6.2. Stade hémolympatique ou stade 1.....	45
1.6.2.1 La clinique de la THA en stade 1.....	45
1.6.2.2 La physiopathologie de la THA en stade 1.....	46
1.6.2.3 La réponse immunitaire et l'adaptation du parasite.....	47
1.6.3. Stade nerveux ou stade 2	51
1.6.3.1 La clinique	52
1.6.3.2 La physiopathologie.....	53
1.6.3.2.1. Franchissement de la BHE	53
1.6.3.2.2. Réponse immunitaire de l'hôte	60
1.6.4. La théorie du stade intermédiaire.....	63
1.7. Le diagnostic.....	64
1.7.1. Outils de diagnostic de la maladie utilisés actuellement.....	64
1.7.1.1 Outils de diagnostic indirect (détection d'anticorps)	65
1.7.1.1.1. Le CATT (<i>Card Agglutination Test for Trypanosomiasis</i>)	65
1.7.1.1.2. Test d'immuno-trypanolyse.....	67
1.7.1.1.3. Test d'immunofluorescence indirect (IFI).....	68
1.7.1.1.4. Test immuno-enzymatique ou ELISA	68
1.7.1.2 Examen parasitologique (détection du parasite)	69
1.7.1.2.1. Observation directe du parasite par microscopie optique.....	69
1.7.1.2.2. La Centrifugation en Tube Capillaire (CTC).....	70
1.7.1.2.3. La mini-colonne échangeuse d'anions (mAECT).....	71
1.7.1.2.4. La Technique de la couche leuco-parasitaire (QBC).....	72
1.7.1.3 Détection moléculaire	72
1.7.1.3.1. Amplification d'ADN par PCR	73
1.7.1.3.2. Amplification d'ARN	74
1.7.2. Outils de diagnostic de la maladie en cours d'évaluation	75

1.7.2.1 Amplification isotherme à médiation par boucles	75
1.7.2.2 Test de Diagnostic Rapide (TDR) et nouveaux antigènes	76
1.7.3. Outils de diagnostic de stade de la maladie utilisés actuellement	77
1.7.3.1 Détection du parasite.....	79
1.7.3.2 Numération leucocytaire	79
1.7.3.3 Protéïnorachie	80
1.7.4. Outils de diagnostic de stade de la maladie en cours d'évaluation.....	81
1.7.4.1 Tests moléculaires.....	81
1.7.4.2 Biomarqueurs de stade	81
1.8. Les traitements de la maladie et le suivi des patients post-traitement	88
1.8.1. Les traitements actuels	88
1.8.2. Le suivi post-traitement	93
1.8.3. Les traitements d'avenir et la vaccination	94
1.8.3.1 Nouveaux traitements.....	94
1.8.3.2 Vaccination	96
Objectifs	110
Matériels et Méthodes	111
3.1. Cohorte FIND Angola	111
3.1.1. Présentation de l'Angola et du contexte de la création de la biobanque	111
3.1.2. Constitution de la cohorte, 1 ^{ère} étape : le dépistage.....	112
3.1.3. Le diagnostic de la maladie.....	113
3.1.4. Le diagnostic de stade de la maladie	113
3.1.5. Synthèses	114
3.1.6. Origine des individus contrôles	114
3.1.7. Le suivis des patients.....	115
3.1.8. Autres examens réalisés.....	116
3.1.9. Constitution de la biobanque.....	117
3.1.10. Informatisation des données	117
3.2. Sous Cohorte utilisée pour l'article : Neopterin and CXCL-13 in diagnosis and follow up of <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> sleeping sickness: lessons from the field in Angola.	118
3.2.1. Inclusion	118
3.2.2. Données biologiques, cliniques.....	119
3.3. Sous-cohortes utilisées pour les travaux de spectrométrie de masse.....	122
3.3.1. Cohorte de screening par protéomique.....	122
3.3.2. Cohorte de validation	123
3.4. Technique de spectrométrie de masse.....	124
3.4.1. Préparation des échantillons	125
3.4.1.1 Sérum et LCR.....	126
3.4.1.2 Urine	127
3.4.1.3 Salive	127
3.4.2. Chromatographie liquide (LC).....	127
3.4.3. Instrument de mesure en tandem (MS/MS).....	128



3.4.4. Logiciels de traitement des données.....	131
3.4.5. Critères de sélection des protéines les plus prometteuses.....	132
3.5. Technique ELISA.....	132
3.5.1. ELISA utilisées pour l'article : Neopterin and CXCL-13 in diagnosis and follow up of <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> sleeping sickness: lessons from the field in Angola.	133
3.5.2. ELISA complémentaires au travail de dépistage	133
3.6. Outils Statistiques	133
Résultats	135
4.1. Article 1: Neopterin and CXCL-13 in diagnosis and follow up of <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> sleeping sickness: lessons from the field in Angola.	135
4.2. Article 2: Proteome characterization in various biological fluids of <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> -infected subjects.	163
4.3. Comparaisons Néoptérine, CXCL-13 et Neuroserpine.....	211
4.3.1. A l'inclusion	213
4.3.1.1 Néoptérine versus CXCL-13.....	213
4.3.1.2 Néoptérine versus Neuroserpine	215
4.3.1.3 CXCL-13 versus Neuroserpine.....	217
4.3.2. Douze mois après traitement	219
4.3.2.1 Néoptérine versus CXCL-13.....	219
4.3.2.2 Néoptérine versus Neuroserpine	222
4.3.2.3 CXCL-13 versus Neuroserpine.....	225
Discussion	228
Conclusion et perspectives	240
Références bibliographiques	241
Annexes	278



Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ag	Antigène
ANOFEL	Association Française des enseignants de parasitologie et mycologie
ANOVA	<i>ANalysis Of VAriance</i> pour analyse de variance
APOL1	Apolipoprotéine L1
ArcSinh	Arc Sinus hyperbolique
Arn pour ANA	Abondance relative normalisée pour <i>Average Normalized Abundance</i>
ARN	Acide Ribonucléique
AUC	<i>Area Under the Curve</i> pour aire sous la courbe
B2MG	β -2-microglobuline
BF	<i>Bent Flatapôle</i>
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CAM	<i>Cell Adhesion Protein</i> pour protéine d'adhésion cellulaire
CATT	<i>Card Agglutination Test for Trypanosomiasis</i> pour Test d'Agglutination sur Carte <i>Trypanosomose</i>
CCL	<i>Chemokine ligand</i>
CMH-5	Cellule Microgiale Humaine 5
CNIL	Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés
courbe ROC	<i>Receive Operating Characteristic curve</i> pour courbe caractéristique de fonctionnement du récepteur
CTC	Centrifugation en Tube Capillaire
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
CXCR	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
DEAE cellulose	Diéthylaminoethyl cellulose
DFMO	Difluoromethylornithine
DMG	Dimyristoylglycerol
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
DO	Densité optique
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> pour dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i> pour ionisation par électronébuliseur
FAE	Facteur activateur de l'endothélium
FIND	<i>Foundation for Innovative and New Diagnostics</i>



GPI	glycosyl-phosphatidyl-inositol
H-FABP	<i>Heart-type Fatty Acid Binding Protein</i>
HAT-PCR-OC	<i>Human African Trypanosomiasis-Polymerase Chain Reaction-Oligo Chromatography</i>
HCD	<i>Higher-energy Collisional Dissociation</i>
Hpr	Haptoglobulin-related protein
IC	Intervalle de Confiance
IF	Injection Flatapôle
IFI	ImmunoFluorescence Indirect
Ig	Immunoglobuline
IL	InterLeukine
INF-γ	Interféron gamma
LAMP	<i>Loop-mediated Isothermal amplification</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i> pour Chromatographie en phase liquide
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LED	<i>Light-Emitting Diode</i> pour diode électroluminescente
LPS	Lipopolysaccharide
Lymphocyte NK	Lymphocyte <i>Natural Killer</i> pour cellules tueuses naturelles
Lys-C	Lysine C
mAECT	<i>mini Anion Exchange Centrifugation Technique</i>
MAJ	Molécule d'Adhésion et de Jonction
mHCT	<i>Micro Hématocrite-Centrifugation Tube</i> pour Tube de Centrifugation en micro-hématocrite
MMP	<i>Matrix Metallopeptidase</i> pour métalloprotéinase matricielle
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MTN	Maladies Tropicales Négligées pour <i>Neglected Tropical Disease</i>
NASBA	<i>Nucleic acid sequence based amplification</i>
NECT	Nifurtimox-Eflornithine Combination Therapy
NO	Oxyde Nitrique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé pour World Health Organization (WHO)
OPN	Ostéopontine
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> pour amplification en chaîne par polymérase
QBC	<i>Quantitative Buffy Coat</i>
RCA	République Centrafricaine



RDC	République Démocratique du Congo
S1	Stade hémo-lymphatique
S2	Stade neurologique
SLPI	<i>Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor</i>
SNC	Système Nerveux Central
SRA	Serum Resistance-Associated
STAG	<i>Strategic and Technical Advisory Group</i>
T. b.	<i>Trypanosoma brucei</i>
TAA	Trypanosomose Animale Africaine
TAF	<i>Trypanosome Apoptotic Factor</i>
TbHpHbR	<i>Trypanosoma brucei haptoglobin hemoglobin receptor</i>
TDR	Test de Diagnostique Rapide
TgsGP	<i>Trypanosoma gambiense-specific GlycoProtein</i> pour glycoprotéine spécifique de <i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
THA	Trypanosomose Humaine Africaine
TIC	Trouble Involontaire Convulsif
TLF	<i>TrypanoLytic Factor</i> pour Facteur Trypanolytique
TLR	Toll Like Receptor pour récepteur type Toll
TNF-α	<i>Tumor Nécrosis Factor α</i> pour Facteur de Nécrose Tumorale α
TSIF	<i>Trypanosome-Suppressive Immunomodulating Factor</i> pour facteur recombinant immunomodulateur suppressif de trypanosome
VAT	<i>Variable Antigene Type</i> pour Type Variant Antigénique
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VSG	<i>Variant Surface Glycoprotein</i> pour Glycoprotéine de Surface Variable



Table des illustrations

Figure 1 : Nombre de nouveaux cas de THA en 2015.	32
Figure 2 : Nombre de nouveaux cas de THA entre 1940 et 2013.	33
Figure 3 : Nombre de cas rapportés de THA à <i>T. b. gambiense</i> entre 2000 et 2015, et projection attendue en 2020.	34
Figure 4 : Classification des trypanosomes de mammifères.	35
Figure 5 : Frotti sanguin révélant des trypanosomes (<i>T. b. gambiense</i>) colorés au Giemsa (à droite, photo personnelle). Schéma de l'organisation cellulaire d'un trypanosome en forme trypanomastigote (à gauche) d'après Vickerman (1969, 1970).	38
Figure 6 : La mouche Tsé-Tsé ou <i>Glossine sp.</i>	40
Figure 7 : Cycle parasitaire de Trypanosomose Humaine Africaine.	40
Figure 8 : Observation d'un double trypanome ou "double chancre d'inoculation"	44
Figure 9 : Adénopathie palpable caractéristique de la THA.	46
Figure 10 : Modélisation 3D du manteau antigénique de <i>T. brucei</i>	50
Figure 11 : Représentation simplifiée de la réponse immunitaire au cours du stade 1 de la THA.	51
Figure 12 : Représentation simplifiée de la réponse immunitaire au cours du stade 2 de la THA.	62
Figure 13 : Test sérologique CATT (<i>Card Agglutination Test for Trypanosomiasis</i>).	66
Figure 14 : Mini Colonne échangeuse d'anions à gauche et le portoir pour l'observation au microscope de l'éluât.	71
Figure 15 : Méthode de visualisation de résultat de LAMP (LAMP-RIME) : A bandelettes réactives et B réaction colorée par SYBR® Green.	76
Figure 16 : Réalisation d'une ponction lombaire dans le cas d'un diagnostic de stade de la THA, aseptie réalisée par simple application d'alcool sur la peau (photo Dr Sylvie Bisser)..	78
Figure 17 : Test rapide de détection de la néoptérine utilisable sur plasma, sérum et LCR .	86
Figure 18 : Structure moléculaire de la pentamidine.	88
Figure 19 : Structure moléculaire de la suramine.	89
Figure 20 : Structure moléculaire du mélarsoprol.	90
Figure 21 : Structure moléculaire de l'éflornithine.	90
Figure 22 : Structure moléculaire du nifurtimox.	91
Figure 23 : Programme des essais cliniques pour le fexinidazole.	95
Figure 24 : Programme des essais cliniques pour le SCYX-7158.	96
Figure 25 : Zone d'échantillonnage de la cohorte FIND Angola.	111

Figure 26 : Diagramme représentant l'inclusion et le suivi des patients et des individus contrôles de la cohorte FIND Angola.	115
Figure 27 : Flowchart du suivi des patients avec (A) les caractéristiques de la sous-cohorte à l'inclusion et (B) les caractéristiques des 11 patients ayant rechutés.	120
Figure 28 : Schéma du spectromètre Q Exative plus.	125
Figure 29 : Schéma d'un analyseur quadripolaire.	129
Figure 30 : Schéma de l'Orbitrape utilisé par le spectromètre G Exative plus®.	130
Figure 31 : Seuils « anciens » de néoptérine et CXCL-13 et nouveaux seuils de néoptérine, de CXCL-13 et de neuroserpine discriminant les différents stades de la THA.	212
Figure 32 : Représentation du taux de néoptérine en fonction du taux de CXCL-13 pour chaque individu à l'inclusion.	214
Figure 33 : Représentation du taux de néoptérine en fonction du taux de neuroserpine pour chaque individu à l'inclusion.	216
Figure 34 : Représentation du taux de neuroserpine en fonction du taux de CXCL-13 pour chaque individu à l'inclusion.	218
Figure 35 : Représentation du taux de néoptérine en fonction du taux de CXCL-13 pour chaque patient à 12 mois post-traitement.	221
Figure 36 : Représentation du taux de néoptérine en fonction du taux de neuroserpine pour chaque à 12 mois post-traitement.	224
Figure 37 : Représentation du taux de neuroserpine en fonction du taux de CXCL-13 pour chaque patient à 12 mois post-traitement.	227



Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des 20 Maladies Tropicales Négligées.	31
Tableau 2 : Critères OMS pour le diagnostic de stade de la THA.	78
Tableau 3 : Liste des biomarqueurs proposés pour le diagnostic de stade (Stade 1 / Stade 2) de la THA à <i>T. b. gambiense</i>	87
Tableau 4 : Les traitements utilisés contre la THA.	92
Tableau 5 : Critères de suivi des patients atteint de THA à <i>T. b. gambiense</i> après traitement.	94
Tableau 6 : Composition et données épidémiologiques de la cohorte FIND Angola.	114
Tableau 7 : Caractéristiques des 11 patients issus de la sous-cohorte ayant rechutés.....	121
Tableau 8 : Caractéristiques des patients inclus dans la cohorte de screening par protéomique.	123
Tableau 9 : Caractéristiques des individus inclus dans la cohorte de validation.	124
Tableau 10 : Composition de la cohorte de validation en incluant le stade intermédiaire....	211



Abstract

Human African Trypanosomiasis (HAT) is a parasitic disease caused by a protozoan flagellate called *Trypanosoma brucei* (*T. b.*). In humans, the first stage is characterized by the presence of the parasite in the blood and lymphatic system. In the case of *T. b. gambiense*, the parasite crosses the blood-brain barrier (BBB) after a period of several weeks to several months and invades the central nervous system (CNS). Presently, HAT patients infected by *T. b. gambiense* are treated with Pentamidine for stage 1 and Eflornithin, in monotherapy or in combination with Nifurtimox (NECT) is required for Stage 2. Staging of the disease is based on cytorachia increase and parasite identification in the CSF, requiring a lumbar puncture. This medical act is invasive and difficult to perform in field conditions. Moreover, these stage criteria lack sensitivity (parasite identification in CSF) and specificity (cytorachia). Staging is an essential point for effective therapeutic management of the patient because treatments are stage dependent.

It is commonly accepted that HAT evolves into two distinct stages: the first stage or hemo-lyphatic stage defined by trypanosome presence in the blood and the second stage or nervous stage characterized by the presence of the parasite in the CNS and a cytorachia increase (> 5 cells/ μL of CSF). However, the existence of a group of patients with cytorachia between 6 and 20 cells without trypanosomes in the CSF complicates disease staging. This group of patients can be considered in an intermediate stage and studies have already shown that these patients can be cured with first stage treatments.

In addition, once the treatment is given, patients must be followed to identify relapses. There are also questions about the follow-up time and the tools used to identify relapse.

In this context, it is urgent to develop new tools for the diagnosis and staging of the disease as well as for patient monitoring after treatment. Due to the evolution of mass spectrometry techniques applied to proteomics, the analysis and comparison of the proteomes from uninfected individuals and HAT patients has identified numerous proteins which can be used as biomarkers for several pathologies. In this study, after discussing the current state of the intermediate stage, we analysed a series of biological samples from HAT patients using mass spectrometry to identify new biomarkers.

This work is based on the exploitation of biobank samples from patients infected with *T. b. gambiense*. This cohort was constituted during a prospective survey between 2008 and 2011 in 3 Angolan provinces by Dr. Sylvie Bisser. Two hundred and forty-seven people were included in this cohort: 19 uninfected controls, 67 stage 1 patients (patients with cytorachia < 5 cells/ μL without trypanosomes in CSF), 34 intermediate stage patients (patients with

cytorachia between 6 and 20 cells without trypanosomes in CSF or with trypanosomes in CSF with cytorachia < 5 cells) and 127 advanced stage 2 patients (all patients with cytorachia > 20 cells and patients with trypanosomes in CSF and a cytorachia > 5 cells). Medical examinations were performed at time of diagnosis and treatment and during 24 months follow-up at 0, 6, 12, 18 and 24 months. Biological samples (blood, serum, CSF, urine saliva, tears) were also collected at each stage of the follow-up.

The main objective of our thesis work was to exploit this biobank of samples to identify new biomarkers for HAT diagnosis and patient follow-up. For this, we looked for a new potential protein biomarker for the diagnosis of disease and stage in 4 biological fluids: serum, CSF, urine and saliva. We then studied intermediate stage patients by evaluating the potential of two proteins already used as biomarkers for characterization of this stage. Finally, we re-measured the most promising biomarkers at 12 months post-treatment to assess their ability to identify relapses.

Article 1: Neopterin and CXCL-13 in the diagnosis and follow up of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: lessons from the field in Angola.

A sub-cohort of 83 patients (30 stage 1 patients, 19 individuals in intermediate stage and 34 in advanced stage 2) was designed for this article. The objective was to determine the neopterin and CXCL-13 thresholds in the CSF to discriminate between different stages of the disease and to compare them to the classic stage criteria recommended by the WHO. Neopterin is a pteridin, pyrazino-pyrimidine compound, synthesized by monocytes and macrophages in response to the production of INF- γ by activated T-cells. This pteridin is a marker of early inflammation for many pathologies. CXCL-13, is a chemo-attractant for lymphocytes, which allows leukocyte extravasation. A modification in plasma CXCL-13 concentration is associated with activation of the host immune response and may also be used as an indicator for several pathologies. Both proteins are involved in the early immune response.

For this study:

- Patients without trypanosomes in the CSF and cytorachia less than or equal to 5 cells/ μ L were classified in stage 1.
- Patients with one or more trypanosomes in the CSF or with a cytorachia greater than 20 cells/ μ L were classified as advanced stage 2.
- Intermediate stage patients were defined by a cytorachia of between 6 and 20 cells/ μ L or trypanosomes in the CSF without a cytorachia increase (\leq 5 cells/ μ L).

We had, for patients selected for this study, data of neopterin and CXCL-13 CSF concentrations at each time of follow-up. Seventy-six (90%) patients were re-examined at 6-months(S6), 75 patients (89%) at 12-months(S12) and 75 patients (89%) at 18 months (S18). At the end of the follow-up, 64 patients were cured, and 11 patients relapsed.

Our work demonstrates that neopterin and CXCL-13 are two potential biomarkers for HAT staging and more particularly markers of early CNS invasion. These two cytokines play a role during the immune response against *T. b. gambiense* infection. By analyzing the neopterin and CXCL-13 levels in the CSF of 83 patients from the FIND Angola cohort, we were able to define, for each of these markers, a cut-off below which patients were considered in stage 1 of the disease and a cut-off above which patients were considered in advanced stage 2 (> 20 cells/ μ L). Patients with a concentration between the two thresholds (for each protein respectively) were considered in the intermediate stage. In addition, level evolutions of these two proteins in the patients CSF during the follow-up were analyzed. We also defined cut-offs for these two proteins that characterize the onset of sleep disorders, nervous disorders and the presence of the parasite in the CNS. The results of this work show that neopterin and CXCL-13 are possible disease stage biomarkers. We have also been able to provide evidence supporting the biological and clinical reality of the intermediate stage of HAT. This study has shown that relapse cases are not more frequent in intermediate stage patients compared to patients in stage 1 and advanced stage 2. In intermediate patients, 16 of them with trypanosomes in the CSF and no cytorachia increase or with a cytorachia between 5 and 20 cells/ μ L were treated with pentamidine. It was also shown that the onset of neurological signs and sleep disorders was not necessarily correlated with the presence of the parasite in the CSF.

Article 2: Proteome characterization in various biological fluids of *Trypanosoma brucei gambiense*-infected subjects.

A second sub-cohort was designed to identify new stage biomarkers by mass spectrometry. We chose to focus on effective biomarkers to diagnose HAT and differentiate disease stages in 4 biological fluids: blood (serum), CSF, saliva, and urine.

For this study:

- Patients without trypanosome in the CSF and cytorachia less than or equal to 5 cells/ μ L were classified in stage 1.
- Patients with one or more trypanosomes observed in the CSF and/or with cytorachia greater than 5 cells/ μ L were classified in stage 2.

This study was conducted in two stages. The first step consisted of identifying all proteins present in these biological fluids on a small cohort (n = 10) by liquid chromatography coupled to a tandem spectrometric measuring instrument (LC-MS/MS). Subsequently, the relative abundance of each identified protein was estimated by label-free quantification. Finally, data analysis selected the most promising proteins based on their statistical significances, the differences in standardized relative abundance observed between the groups, and the biological interest of these proteins defined by bibliographic analysis. The second step was to validate the discriminating potential of these proteins by ELISA quantification on a large cohort collected at inclusion (n = 80) and at 12 months follow up (n = 51).

Human proteins were identified by LC-MS/MS: 269 proteins in serum, 491 proteins in CSF, 664 proteins in urine and 954 proteins in saliva. Firstly, the semi-trypsin analysis of our samples revealed no alteration in the quality of the proteome due to freezing and storage of our samples. Then, the global analysis of these data showed a decrease in protein diversity expressed in the CSF according to the disease progression. An average of 219 and 289 different proteins were identified in the control and stage 1 patients' CSF respectively, compared to an average of 67 proteins identified in stage 2 patients' CSF.

Uniprot database for *T. b. gambiense* was also queried and 14 parasitic proteins in serum, 6 proteins in CSF, 9 proteins in urine and 24 proteins in saliva were identified.

Among those proteins, we selected 69 proteins (37 in CSF, 8 in saliva and 24 in urine) that could potentially diagnose HAT or stage of the disease. Finally, 5 proteins were measured by ELISA in 80 patients and uninfected controls: neuroserpin, neogenin and secretogranin II in CSF; moesin in urine and intelectin II in saliva.

In CSF, data analysis from neuroserpin ELISA assay indicated that it is a biomarker that discriminates stage 1 from stage 2 patients. ROC curves analysis showed that a decrease in neuroserpine concentration below the threshold of 4.99 ng/mL was characteristic of stage 2 patients (AUC = 0.72; sensitivity 0.58 and specificity 0.94).

In urine, moesin ELISA data showed that this protein was able to discriminate stage 2 patients. ROC curve analysis showed that a concentration of moesin in urine greater than 0.60 ng/mL (AUC = 0.72; sensitivity 0.63 and specificity 0.65) was indicative of second stage disease.

In saliva, analysis of the ELISA data from intelectin II showed no significant differences in expression of this protein between uninfected controls and stage 1 or stage 2 patients.

Neopterin, CXCL-13 and Neuroserpin comparisons

Here, we compared CSF biomarker cuts-off: neopterin and CXCL-13 to neuroserpine in patients and controls at inclusion and 12 months post-treatment. This comparison was done on a portion of the FIND cohort composed of 14 non-infected controls, 23 patients in stage 1,

20 patients in intermediate stage and 23 patients in stage 2 (ELISA quantification cohort used for proteomic study).

These two proteins also appear to be effective for relapse identification at 12 months post-treatment. On the other hand, neuroserpine appeared to be a good diagnostic tool to differentiate stage 1 and stage 2 patients. However, this protein did not permit significant identification of intermediate stage patients. In fact, 16 of the 20 patients tested had a CSF concentration of neuroserpine characteristic of stage 1 patients.

Discussion

As part of our thesis, we first looked at the theory of the intermediate stage of the disease. The intermediate stage could be defined as a transition between the hemo-lymphatic and the nervous stage. At this stage, parasite presence remains marginal in the CSF. Several studies highlight the intra- or transcellular BBB crossing by the parasite. Thus, cell biology studies showed the ability of *T. b. gambiense* to invade human brain endothelial cells. This study indicated that the intracellular form of the parasite is largely minor compared to the extracellular form. However, the physiological role of these intracellular forms of the parasite is not yet well established. The viability of the intracellular parasite and its ability to exit from the cell has not been confirmed. The presence of trypanosome (*T. b. brucei*) has also been described by Stoppini et al in 2000 in glial rat cells present in the nerve tissue. An additional study conducted during our thesis showed that *T. b. brucei* also appears to be able to invade human glial cells *in vitro* suggesting that this non-pathogenic strain for humans has the protein and enzymatic equipment adapted to this type of migration. It is possible that the trypanosome could penetrate the constitutive BBB cells and invade the CNS. This transcellular migration could explain some biological and clinical manifestations observed in the first stage of the disease (intrathecal IgM, IgG and trypanosome-specific antibodies, neuro-inflammation and alteration of the BBB). Clinically, neurological disorders are described in 20% of stage 1 patients; sleep disorders are also observed in stage 1 patients (somnolence in 18% of patients and insomnia in 73% of patients) and psychiatric disorders (less than 10%).

In Article 1, neopterin and CXCL-13 are quantified in CSF from patients who may be in the intermediate stage (cytorachia between 5 and 20 cells without trypanosomes in CSF). We were able to determine that neopterin levels between 15.6 nmol/L and 60.3 nmol/L and CXCL-13 levels between 91.2 pg/mL and 395.4 pg/mL are characteristic of intermediate stage. In the case of HAT, these biomarkers could be of great interest to characterize a physiological response to the presence of trypanosomes during CNS invasion. Alteration of neopterin and CXCL-13 levels in the CSF of intermediate stage patients therefore indicates the development of an early immune response at the cerebral level that would reflect the onset of neuro-

inflammation. These patients classified as intermediate stage are currently considered in stage 2 by the WHO, which is only based on cytorachia and are therefore treated with molecules for stage 2 patients. In our study, neurological disorders and sleep disturbances appear on the average only when the patient has a cytorachia greater than 16 cells and the parasite is found in CSF only when the cytorachia reaches an average of 50 cells. These thresholds are a function of the sample studied, but the tendency remains that the cytorachia classification defined by the WHO (5 cells) does not appear to be an appropriate stage diagnostic criteria. In addition, based on the classification of patients according to cytorachia and taking into account the follow-up of patients who relapsed from the whole FIND Angola cohort (11 relapsed/ 228 follow-ups), it can be seen that: 6% of stage 1 patients relapsed with pentamidine treatment, 2% of advanced stage 2 patients relapsed with DFMO treatment and 11% of intermediate stage patients relapsed. These rates seem to show that factors, other than cytorachia, have to be identified for therapeutic choice for intermediate stage patients. This discussion of intermediate stage definition and its treatment has been the subject of other studies. The treatment of the intermediate stage with pentamidine appears to be much more appropriate than the use of a stage 2 treatments such as NECT, eflornithin monotherapy (or melarsoprol) which are more restrictive or dangerous for the patient.

When measuring neopterin and CXCL-13 in these patient samples 12-month post-treatment, 5 of these patients had neopterin and/or CXCL-13 levels above the thresholds determined for advanced stage 2 at inclusion. Among these patients, 2 relapsed in the 12th month after-treatment, 1 in the 18th month after-treatment and 2 in the 24th month after treatment. For these patients, the two biomarkers could also allow early diagnosis of relapses, from 12 months post-treatment. Two other patients relapsed with neopterin and CXCL-13 concentrations within the standard levels. These were both stage 1 patients treated with pentamidine. The particularity of these two patients is that they both worked on the same farm and more precisely in the same geographical area. For them, reinfection in the workplace was strongly suspected, and it could explain their low levels of neopterin and CXCL-13 in their CSF. The results of the other 4 relapsed patients could not be exploited.

The results of our work on neopterin and CXCL-13 could provide new recommendations:

- 1) Treat patients in the intermediate stage (5-20 cells/L of CSF and without trypanosomes) with pentamidine.
- 2) Use neopterin and CXCL-13 assays at 12 months after treatment for all patients gives better control of relapse.

Although new safe and non-stage dependent therapies will be proposed in the coming years, the WHO emphasized the need to combine these treatments with a reliable and field-adapted

diagnostic tool to facilitate disease management. In the future, the development of a new rapid detection tool for the disease, which is sensitive, specific and as less invasive as possible, remains one of the keys to controlling this neglected disease. Research and use of biomarkers, which can be used as diagnostic tools in the field, will facilitate the control of many human pathologies.

Proteomics techniques based on mass spectrometry for the identification of new biomarkers clearly improve medical research. Study of biological fluid proteomes and the comparison between healthy individuals and proteomes of individuals affected by a pathology may reveal changes in protein concentrations indicative of the disease. We chose to focus on 4 biological fluids: blood (serum), CSF, saliva, and urine. The protein composition of human biological fluids is complex with variations from one fluid to another and can be defined by the dynamic range of protein concentrations, especially for serum, where the dynamic range can be up to 10 orders of magnitude. Studies show that mass spectrometry of a biological fluid can cover only 3 to 4 orders of magnitude of the dynamic range and defines the "dark corner" of proteomics, which includes all proteins with less than 500 copies per cell. Biomarker detection in serum is often complex since more than 95% of the total protein content comes from only 5 hyper-abundant proteins. And yet, the best biomarker candidates are in this 5%. In order to analyze the entire proteome, including this small fraction, we had to reduce sample complexity by depletion which reduced the abundance of these hyper-represented proteins, such as albumin.

For the spectrometry study of serum samples, it was not possible to identify biomarkers for HAT. The main reason seems to be the presence of large amounts of majority proteins despite depletion. This biological fluid is therefore of major interest for biomarker research. New depletion protocols should lead to the identification of proteins of interest in this fluid.

The interest of CSF in the case of HAT is no longer needs to be proven due to the proximity to the brain. Monitoring CSF protein modifications can be used as a sensitive indicator of CNS pathologies. Proteomic studies have identified potential biomarkers in many brain disorders. Under normal conditions, the protein concentration in CSF is 100 to 400 times lower than in serum making it easier to identify proteins specific for CSF alteration. Of the 491 proteins identified in CSF, 159 are differentially expressed between controls, stage 1 patients and stage 2 patients. Among these 159 proteins, 37 proteins present an interest for diagnosis because of their biological activities within the CNS and their links with infectious processes.

These proteins include:

- proteins involved in the growth and maintenance of neuron integrity such as neurofascin.
- proteins involved more specifically in axonal regeneration such as testican 1 and in the regulation of myelin production such as contactins. During HAT, demyelination is observed during the nervous stage of the disease and the presence of autoantibodies directed against myelin component like galactocerebrosides. A change in the concentration of these proteins according to the disease stage seems to be possible.
- proteins playing a role in synaptic plasticity and thus maintenance of cognitive functions. This is the case of cerebellin 4 and VGF, whose actions maintain the processes involved in memory.
- proteins related to the patient's neuro-psychological balance. This is the case of VGF, which also acts as an antidepressant. The MCH protein (Melanin Concentrating Hormone) regulates anxiety and food intake. It also plays a role in the regulation of the circadian cycle.

All these proteins could have a strong link to HAT pathophysiology.

We selected 3 of them to verify their potential interest as biomarkers on a larger number of individuals from the FIND Angola cohort. These three proteins were neuroserpin, neogenin and secretogranin 2:

- Neuroserpine is involved in axogenesis, synaptic plasticity and brain memory and development.
- Neogenin is a protein implicated in apoptosis and neuronal differentiation as well as in axon guidance during axogenesis.
- Secretogranin 2 is also present in neurite growth and has a chemo-attractant effect on monocytes, eosinophils and dendritic cells.

Our results from patients in the FIND cohort indicated that neuroserpine levels discriminate stage 1 and stage 2 patients. A neuroserpine decrease in CSF below the threshold of 4.99 ng/mL appears to be characteristic of stage 2 of the disease. However, sensitivity (58%) and specificity (94%) are not yet satisfactory from the perspective of a field tool. The specificity value was relatively low indicating that this biomarker has a 42% chance of revealing a false positive. Eighty patients in the intermediate stage had a neuroserpine level above 4.99 ng/mL while 21 patients in the advanced stage 2 out of 23 had a neuroserpine level below this threshold. This result is still very promising in terms of the early expression of this protein in a neuro-inflammation context. For neuroserpin utilization as a relapse indicator during patient follow-up, this protein did not appear to be a good indicator. Indeed, 38% of patients (17/44)

at 12 months post-treatment had a neuroserpine level below the cut-off characteristic of stage 2 patients. Of these patients, 23% (4/17) were patients who relapsed. The kinetics of this protein seems to indicate a rapid increase at the beginning of infection with a decrease following treatment, with or without relapse.

Our proteomic study of CSF also showed that the number of proteins in stage 2 patients is lower than in uninfected controls and stage 1 patients. One of the hypotheses that could explain this decrease in protein counts depending on the stage of infection could be the leakage or resorption of these proteins from the CSF into the blood due to BBB permeability. The identification of serum proteins such as apolipoproteins, albumin, transthyretin and complement proteins present in the stage 2 patients CSF may confirm a protein diffusion mechanism. This is probably due to transudation through the BBB. This early or transitory alteration of BBB may explain the remission of some intermediate stage patients in the cohort following stage 1 treatment.

We also looked-for biomarkers in saliva and urine because it was easier to collect these biological fluids. These body fluids have the advantage of being collected in a non-invasive, non-painful and stress-free manner for the patient and open the prospect of self-diagnosis. From a biological point of view, the low concentration of interfering proteins and the stable nature of these fluids are advantageous (their molecular activity does not change much after sampling).

For urine, we identified 8 proteins of interest among the 32 proteins whose abundance is different between controls, stage 1 and stage 2 patients. Among them, there are several proteins of the lysosomal system associated with many human pathologies. For ELISA quantification, we measured moesin because it is a protein involved in another trypanosomiasis: Chagas disease. This protein is part of a group called ERM proteins composed of Ezrin, Radixin and Moesin. These proteins are the link between the membrane and actin of the cell cytoskeleton allowing remodeling of cell membranes. These proteins promote angiogenesis and are involved in the processes of invasion of cells by *T. cruzi*. However, no biological link has been established to our knowledge between moesin and *T. brucei*. Results of the urinary proteomic analysis showed that the moesin level was lower in uninfected controls than in stage 1 and 2 HAT-patients. However, only the difference between controls and Stage 2 patients could be confirmed by ELISA. For example, urinary moesin concentrations could be used to diagnose disease stage by avoiding lumbar puncture. There are, however, some biases in our urine analysis, such as the timing of urine sample collection that is not specifically specified in the database. In addition, there is an inter-individual variability of about 10% in the urinary protein. This may explain the difference between the

significance of the results obtained by proteomic analysis and ELISA assays for discriminating between controls, stage 1 and 2 patients. This variability may also explain the low number of retained urinary proteins compared to the 664 proteins identified by proteomics. This variability, when few urine samples are used for proteomic analysis, can lead to an overestimation of the accuracy of identified biomarkers.

For saliva, our analysis revealed 24 potentially interesting proteins among 137 proteins with different abundance for uninfected controls, stage 1 and stage 2 patients. Many of the proteins identified as potential biomarkers are difficult to biologically and clinically link to *T. b. gambiense* infection. We decided to measure intelectin 2. This lectin is synthesized in the small intestine. Various studies on animal models have shown that intelectins are proteins linked to host-pathogen interactions. Intelectin II could also be involved in inflammation due to infection by intestinal parasites and allergies due to aerial allergens. The inflammatory nature of a pathology such as HAT could be linked to the presence of this protein in patient' biological fluids. However, ELISA assays of intelectin-2 did not show a difference in expression between controls and patients and between stage 1 and 2 patients.

During our analysis, proteins such as albumin may have been an interference with biomarker detection. In fact, albumin is a large protein known to bind to proteins, lipids and small molecules containing various peptide hormones. These elements are collectively called: albuminome. The depletion step of albumin therefore also affects all these elements. The albuminome eliminated at the same time as albumin may contain a large number of molecules of interest that reflect the physiopathology of a disease. It is possible that some of the proteins that compose the albuminome may be potential biomarkers.

Finally, with the introduction of independent treatment drugs, even if stage diagnosis is no longer obligatory, it is necessary to find biomarkers for the follow-up of patients, because this follow-up will remain an essential element. The efficacy of neuroserpin for patient follow-up seems limited, but our work has identified a number of biomarkers that can facilitate patient follow-up. The main reasons why health authorities limit follow-up are the need to use lumbar puncture to diagnose relapse and the cost of follow-up. These problems could be resolved with the discovery of a urinary or salivary relapse biomarker to limit invasive acts and to enable self-diagnosis.

In conclusion, the HAT diagnosis criteria, used for decades, may need to be reconsidered regarding the cytorachia cut-off. The management of intermediate stage patients is also a question with regards to the risk-benefit ratio of treatments currently used in the field. These management aspects could also be improved with better understanding of patient proteomes.

In this study, a global proteome analysis was available for 4 biological fluids. This work was completed by ELISA assays on a fraction of the proteins detected. Nevertheless, the path to potential biomarker verification of the other identified proteins is long. The results of this study will be available to the scientific community.

It contributes new perspectives for the development of tools that can be used for both diagnosis and patient follow-up. On the other hand, these results must be completed in order to understand the role and involvement of these proteins in the physiopathology of HAT. Of course, we can question the usefulness of such work for the HAT when current orientations are on therapeutic issues. However, it must be kept in mind that new stage-independent drugs will not solve all the problems of neglected tropical disease. These include the parasite reservoir and its management, as well as resistance to these new molecules? The eradication of HAT, in the short or medium term as announced, may seem utopian even if it is an important goal to achieve.

Introduction

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou plus communément appelée maladie du sommeil, est une parasitose vectorielle endémique et 36 pays d'Afrique subsaharienne sont exposés à cette maladie.

Cette infection est due à un protozoaire flagellé sanguicole du genre *Trypanosoma* et d'espèce *brucei*. Il existe deux sous-espèces de ce parasite pathogène pour l'Homme: *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) en Afrique occidentale et centrale et *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*) en Afrique orientale et australe. Le vecteur de ce parasite est la glossine ou mouche Tsé-Tsé. La transmission a lieu lors du repas sanguin de cette mouche. A la suite de la piqûre par la mouche infestée, les trypanosomes vont alors se développer au niveau du chancre d'inoculation, puis vont envahir le système sanguin et lymphatique de l'hôte. Ce stade constitue le stade 1 de la maladie, ou stade hémolympatique, marqué par des symptômes tels que des adénopathies et des fièvres anarchiques. Le parasite va ensuite franchir la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) pour envahir le Système Nerveux Central (SNC). Cette phase de polarisation nerveuse marque l'entrée en stade 2 de la maladie ou stade neurologique. Des nouveaux symptômes, d'ordres neurologiques et psychiatriques, apparaissent à ce stade ainsi qu'un dérèglement du cycle nyctéméral.

Actuellement, les traitements disponibles sont "stades et espèces dépendants". Le dépistage de cette maladie et le diagnostic de stade sont donc des étapes cruciales pour la bonne prise en charge des patients atteints de THA. Le diagnostic de référence repose sur la recherche et la mise en évidence du parasite. Des tests de dépistages sérologiques ont été développés comme le CATT (*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*) qui est basé sur une technique rapide d'agglutination avec recherche d'anticorps anti-trypanosomes présents dans le sang. Ce test d'agglutination sur carte, malgré une bonne sensibilité et spécificité, n'est pas fiable à 100% et d'autre part, présente des contraintes d'utilisation sur le terrain (source d'énergie et conservation des réactifs à basse température). Le CATT doit ensuite être confirmé par un examen parasitologique. Cet examen consiste en une recherche du parasite directement dans le suc ganglionnaire lorsque les ganglions sont présents et dans le sang. Le diagnostic de stade va, lui, nécessiter une ponction lombaire afin d'analyser le LCR dans le but de mettre en évidence les parasites ou une augmentation de la cytorachie. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la mise en évidence du trypanosome ou une cytorachie supérieure à 5 cellules par μL dans le Liquide Céphalo-Rachidien (LCR) sont des éléments caractéristiques du stade 2 de la maladie. Malheureusement, la nécessité d'une ponction lombaire, acte médical invasif, rend le diagnostic de stade complexe à réaliser dans les conditions de terrain,

loin de toutes structures sanitaires adaptées. De plus, les marqueurs de stade de la maladie tels que définis par l’OMS restent peu sensibles (pour la détection du parasite) et peu spécifiques (pour la cytorachie). Il est donc urgent de développer de nouveaux outils pour le diagnostic de la maladie et pour le diagnostic de stade ainsi que pour le suivi des patients après le traitement (Simarro et al., 2011; WHO, 2016, 2013).

Grâce à l’évolution des techniques de spectrométrie de masse appliquées à la protéomique, l’analyse et la comparaison du protéome d’individus sains et de patients ont permis d’identifier de nombreuses protéines utilisables comme biomarqueurs pour plusieurs pathologies. Nous avons, dans ce travail, analysé une série d’échantillons biologiques de patients atteints de THA par spectrométrie de masse pour rechercher de nouveaux biomarqueurs.

1.1. Les maladies tropicales négligées

Actuellement vingt « Maladies Tropicales Négligées » ou MTNs ont été listées par l'OMS. Cette liste regroupe des infections virales, bactériennes, fongiques et parasitaires dont la THA (Strategic and Technical Advisory Group on NTDs (STAG), 2017).

Les MTNs sont un groupe d'infections tropicales qui sont soit extrêmement rares, soit sévissant dans des zones de pauvreté extrême. Deux raisons pour lesquelles elles ne représentent qu'un faible intérêt stratégique pour les investissements pharmaceutiques ou diagnostiques. L'OMS estime qu'un milliard de personnes sont affectées par ces MTNs dans 149 pays du monde (Aubry and Gaüzère, 2015). Outre les pertes humaines, les MTNs sont à l'origine de handicaps (retard du développement physique et cognitif dans le cas de schistosomoses et de géohelminthoses), de cécités (onchocercose et trachome) et de déformations (lèpre, éléphantiasis). Ces pathologies peuvent également entraîner une stigmatisation des individus touchés.

Il existe deux grandes classes de MTNs : les maladies endémiques chroniques contre lesquelles il existe un traitement efficace et peu coûteux, et les maladies mortelles pour lesquelles la seule issue est un dépistage actif et un traitement à un stade précoce. La THA fait partie de cette deuxième catégorie au même titre que les leishmanioses viscérales et la maladie de Chagas (**Tableau 1**).

Il est à noter que des solutions efficaces et économiquement acceptables existent pour prévenir, combattre et parfois éliminer les MTNs. Toutefois, ces solutions restent complexes à mettre en place dans les régions, voir les pays, touchés par ces maladies. Grâce aux efforts menés par les pays endémiques, de bons résultats ont tout de même été obtenus pour certaines MTNs, comme la lèpre ou l'onchocercose. A l'inverse, les MTNs transmises par les insectes, comme la dengue par exemple, gagnent de nouvelles zones du fait d'une urbanisation croissante et des modifications climatiques et environnementales (Aubry and Gaüzère, 2015).

Tableau 1 : Liste des 20 Maladies Tropicales Négligées.

	Infections virales	Infections bactériennes	Infections parasitaires	Infection fongique	Autres
Maladie endémiques chroniques	Dengue et Chikungunya	Trachome Ulcère de Buruli Lèpre	Clonorchose Cysticercose Filarioses lymphatiques Onchocercose Géohelminthoses Dracunculose Echinococcose Bilharziose Trématodose	Mycétome	Gale et autres ectoparasites
Maladies mortelles	Rage		Maladie de Chagas Trypanosomose Humaine Africaine Leishmaniose		Morsure de serpent

Pour réduire l'impact des MTNs sur les populations, plusieurs recommandations sont mises en place par l'OMS comme la création de partenariats public-privé et de plans de financement dans le but de promouvoir la recherche, de développer des traitements et d'optimiser l'accès à ces traitements.

1.2. Epidémiologie de la THA

La THA est actuellement classée parmi les MTNs en raison de la diminution du nombre de nouveaux cas dépistés chaque année. Pourtant environ 55,1 millions de personnes vivent dans des zones où le trypanosome est présent et risquent ainsi de contracter la maladie (WHO, 2016). Ce sont les personnes vivant principalement dans des zones rurales et isolées d'Afrique subsaharienne. La majorité des cas de *T. b. gambiense* est retrouvée dans 24 pays d'Afrique de l'Ouest et Centrale et est à l'origine d'une forme chronique de la maladie. *Trypanosoma brucei rhodesiense* est lui présent dans 13 pays de l'Est et du Sud de l'Afrique et provoque une forme beaucoup plus aiguë de la maladie (**Figure 1**) (Simarro et al., 2011).

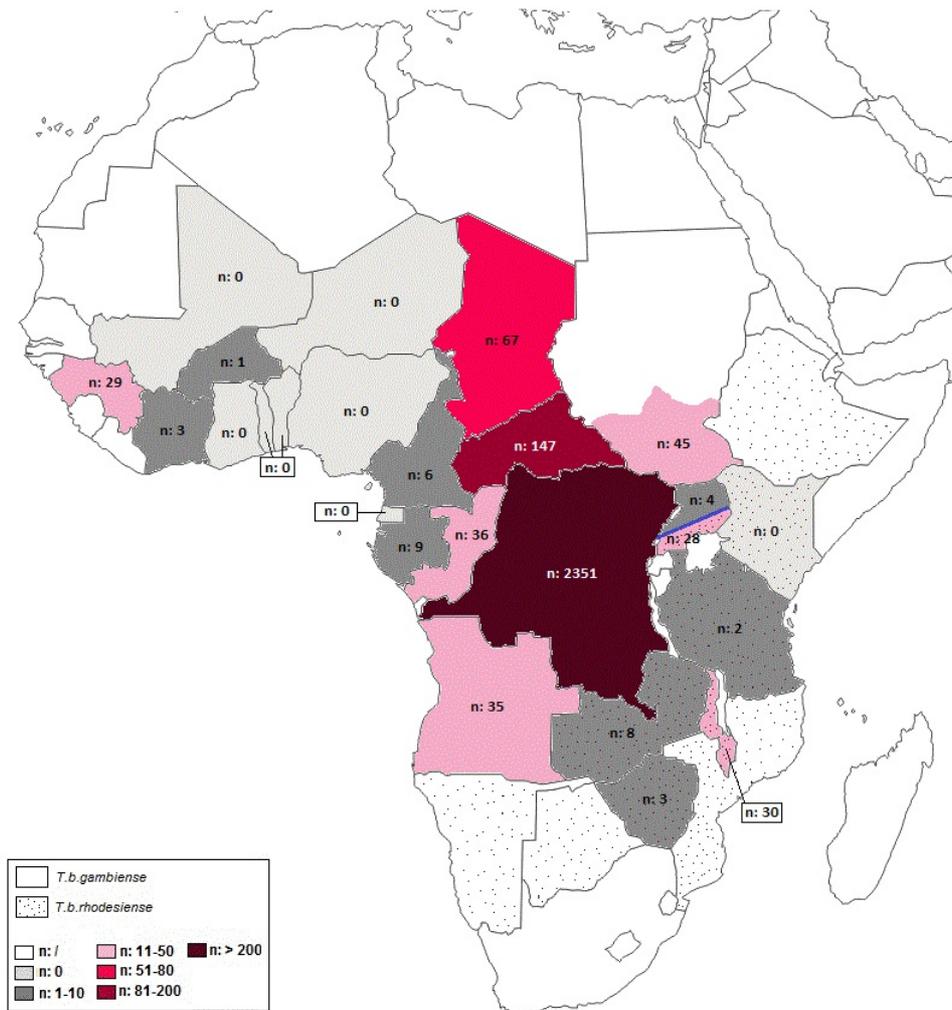


Figure 1 : Nombre de nouveaux cas de THA en 2015.
(d'après Bonnet et al., 2015)

Il est à noter que la forme aiguë de la maladie tend à s'étendre vers l'Ouest du continent et que dans certains pays les deux formes de la maladie sévissent comme en Ouganda (Simarro et al., 2011).

La prévalence de la THA a largement varié au cours des années à la faveur des programmes de contrôles et d'interventions mis en place. Au début du XX^{ème} siècle, les trypanosomoses représentaient un frein à l'exploitation des territoires africains, entraînant un grand nombre de pertes humaines et une pénurie alimentaire provoquée par la Trypanosomose Animale Africaine (TAA).

Le continent africain a connu trois épidémies majeures:

- La première a eu lieu pendant la colonisation européenne et la traite d'êtres humains à la fin du XIX^{ème} siècle.

- La seconde a eu lieu entre 1920 et 1950 suite aux guerres mondiales empêchant l'accès aux soins et la prise en charge des populations. Les puissances coloniales se sont alors investies fortement dans la prise en charge des populations et dans la lutte anti-vectorielle permettant une éradication quasi totale de la maladie dans les années 1960.
- A partir des années 1970, l'émergence de nombreux conflits dûs aux problèmes sociaux, économiques et politiques découlant de l'indépendance des pays africains couplée à un relâchement des efforts de lutte, ont provoqué la réapparition progressive de la maladie jusqu'à un pic important dans les années 1990 (Ekwanzala et al., 1996; Stanghellini and Josenando, 2001). Les pays les plus touchés par cette épidémie sont les pays présentant une instabilité socio-économique comme la République Démocratique du Congo (RDC), l'Angola, la République Centrafricaine (RCA), l'Ouganda et le Sud du Soudan (Smith et al., 1998) (**Figure 2**).

Depuis le début du XXI^{ème} siècle, le nombre de nouveaux cas de THA tend à décliner. Ceci en raison de la fin de certains conflits et à une meilleure prise en charge de la population ainsi qu'à l'engagement des gouvernements dans la lutte contre cette maladie en Afrique subsaharienne (Franco et al., 2014).

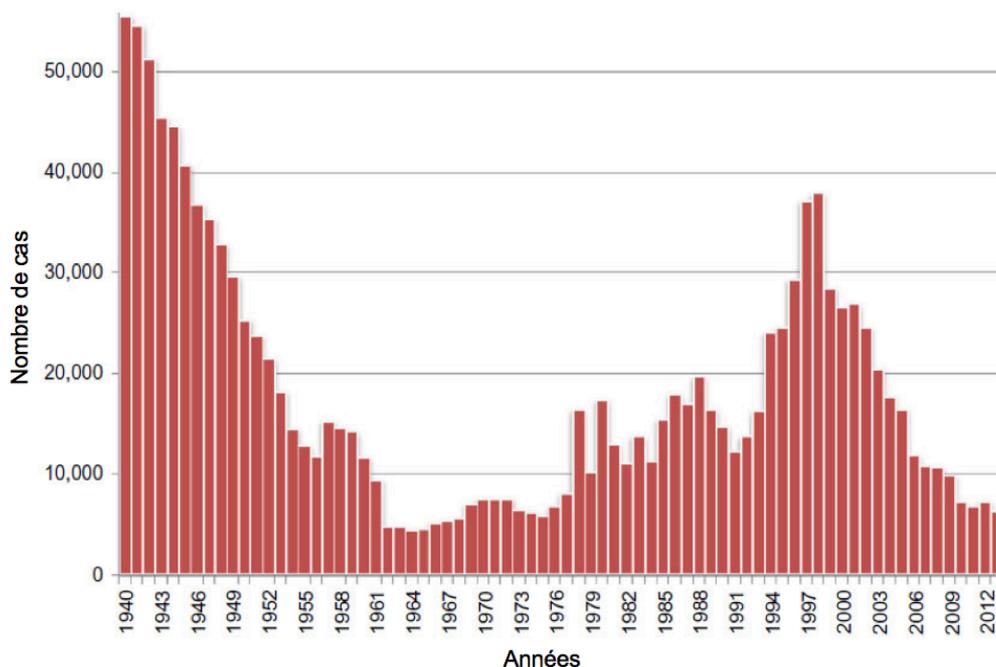


Figure 2 : Nombre de nouveaux cas de THA entre 1940 et 2013.
(Franco et al., 2014)

Les derniers rapports de l'OMS indiquent une diminution constante du nombre de cas annuels rapportés depuis 2001. Moins de 5 000 nouveaux cas par an ont été rapportés en 2014 et 2015 et l'OMS prévoit une élimination de la THA pour 2020 et une éradication du parasite pour 2030 (interruption du cycle de transmission de *T. b. gambiense*) (**Figure 3**). On note également une très forte diminution des zones à « fort » et « très fort » risque depuis 2000. Ces zones représentaient en cumulé environ 300 000 Km² en 2000 et ne représentent plus que 60 000 Km² en 2014. La population à risque a aussi largement diminuée entre ces deux périodes passant de 5,66 millions à 1,12 millions de personnes (WHO, 2016).

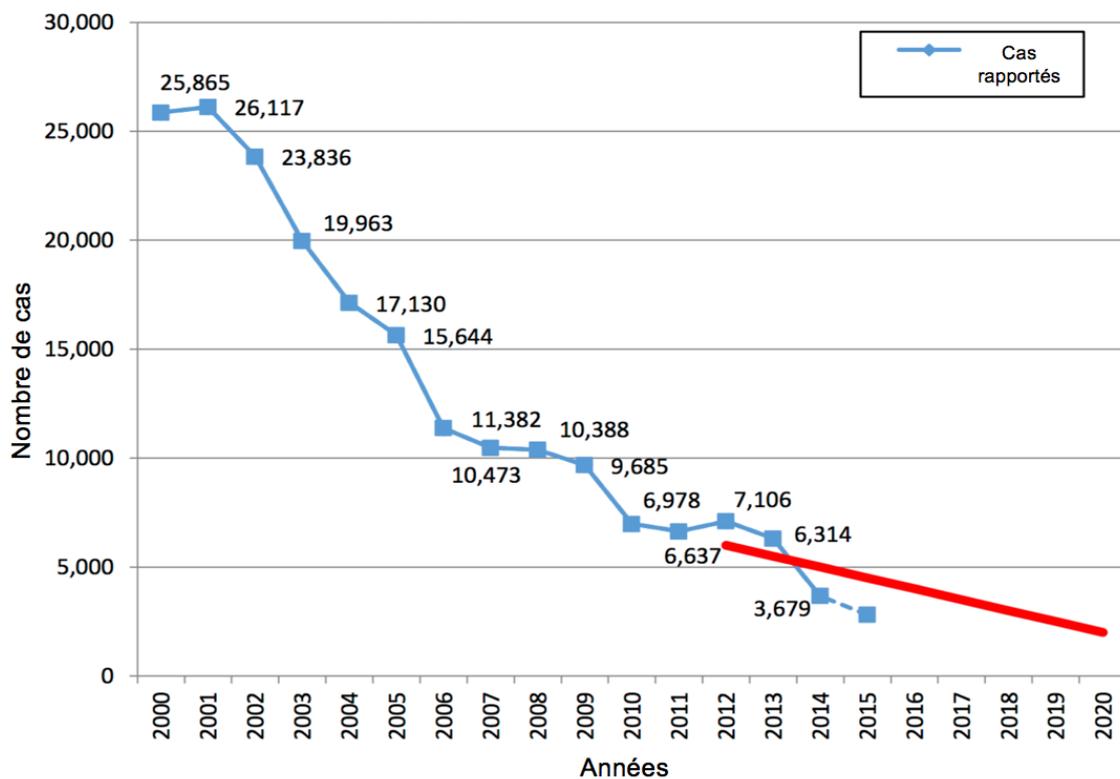


Figure 3 : Nombre de cas rapportés de THA à *T. b. gambiense* entre 2000 et 2015, et projection attendue en 2020. (WHO, 2016)

Toutefois, pour parvenir à l'éradication de la THA, les efforts mis en place en matière de surveillance et de lutte contre la THA devront rester optimum (Pandey and Galvani, 2017). De récents exemples ont montré que tout relâchement dans les plans de surveillance et de contrôle de la maladie pouvaient donner lieu à la résurgence de nouveaux cas. Ce fut le cas au Ghana où, en 2013, un cas de THA a été rapporté après plus de 10 ans sans aucune infection. On peut aussi citer l'exemple de la Guinée qui a connu en 2014 une très forte diminution du nombre de cas rapportés, cependant cette diminution semble plus imputable à

la diminution des efforts de dépistage en raison de l'explosion du virus Ebola dans cette région, qu'à une diminution réelle du nombre de cas de THA (WHO, 2016). La situation géopolitique dans certaines régions d'Afrique doit aussi être prise en compte pour atteindre l'objectif fixé par l'OMS. Par exemple, en Ouganda, les flux de populations engendrés par les conflits et la situation humanitaire au Sud Soudan créent un contexte excluant tout contrôle de la THA à l'heure actuelle (Picado and Ndung'u, 2017).

1.3. Le parasite

1.3.1. Classification

Le parasite à l'origine de la THA est un trypanosome de la famille des Trypanomatidae du genre *Trypanosoma*. C'est un protozoaire flagellé sanguicole, qui se multiplie par scissiparité. Il est capable de parasiter un grand nombre de vertébrés allant des mammifères aux poissons, en passant par les reptiles, les amphibiens et les oiseaux (Overath et al., 1998; Njagu et al., 1999; Sehgal et al., 2001).



Figure 4 : Classification des trypanosomes de mammifères.

(d'après Levine et al, 1980)

Document non libre de droits, non reproduit par respect du droit d'auteur

Il existe deux groupes:

-Les *Stercoraria*, qui sont transmis par les déjections de leur vecteur. On retrouve par exemple *T. cruzi*. Ce trypanosome américain transmet la maladie de Chagas dont le vecteur est le triatome (Stevens and Brisse, 2004).

-Les *Salivaria*, qui regroupent les parasites transmis via une piqûre soit par passage au niveau des glandes salivaires soit directement par les organes piqueurs du vecteur.

Trypanosoma brucei appartient à ce groupe et plus particulièrement au sous-genre *Trypanozoon* ; il se décline en plusieurs sous-espèces (Stevens and Brisse, 2004).

- *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense* sont les deux principales sous-espèces pathogènes pour l'Homme. La première est responsable d'une anthroponose présente en Afrique orientale et australe et est l'agent de la forme aiguë de la THA. La seconde est considérée comme anthroponotique. Elle est présente en Afrique occidentale et centrale et est responsable de la forme chronique de la THA.
- *T. b. brucei* qui est une sous-espèce non pathogène pour l'Homme mais responsable de pathologies chez l'animal telle que la Nagana. Cette F, capable de décimer entièrement un troupeau, participe à la fragilité économique et alimentaire des pays où elle est présente. Chez l'Homme *T. b. brucei* est lysé par un complexe trypanolytique présent dans le sérum et nommé TrypanoLytic Factor (TLF). Ce complexe est composé d'apolipoprotéine L-1 (APOL1) et d'haptoglobuline (Hpr pour Haptoglobulin-related protein) (Thomson et al., 2009) (**Figure 4**).

Une particularité est à noter pour *T. b. gambiense*, il s'agit de l'existence de deux groupes distincts : le groupe 1 et le groupe 2. Les données moléculaires et isoenzymatiques montrent que ces deux parasites diffèrent, de manière faible, sur le plan génotypique et phénotypique. Il est toutefois admis que le groupe 2 est plus proche de *T. b. brucei* que le groupe 1. La principale différence entre ces deux groupes est le mécanisme de résistance au sérum humain qui est un caractère stable chez les *T. b. gambiense* du groupe 1 et plus variable chez les *T. b. gambiense* du groupe 2 (des similitudes existent avec *T. b. rhodesiense*) (Capewell et al., 2011).

1.3.2. Morphologie

Les trypanosomes d'espèce *brucei* apparaissent fusiformes et mobiles au stade sanguicole. Leur taille moyenne varie de 24 à 30 µm de long pour 4 à 5 µm d'épaisseur. Leur organisation cellulaire est relativement simple (**Figure 5**). Ils ont un corps constitué par un noyau contenant le matériel génétique en position centrale ou légèrement décalée vers la partie antérieure du parasite et une mitochondrie extrêmement grande et allongée. L'ensemble du génome mitochondrial est condensé dans le kinétoplaste dans la région postérieure à proximité de l'origine du flagelle (Baral, 2010). Il contient une série de molécules d'ADN circulaires intercaténées codant pour les protéines mitochondriales et des mini-molécules qui contiennent

des ARN guides (Stuart et al., 2008). Le corps cellulaire du parasite est délimité par une membrane nommée périplasme. Cette membrane est composée de trois couches, la plus externe est une couche dense de glycoprotéines de surface nommées VSG pour "Variant Surface Glycoprotein".

Les trypanosomes sont des protozoaires extrêmement mobiles. Leur mobilité est assurée par un flagelle dont une partie est reliée directement à la membrane formant un voile ondulant. Ce flagelle présent sur la forme sanguine grêle, dite forme trypomastigote, est nécessaire à la survie du parasite. Il prend son origine au niveau de la poche flagellaire en position postérieure. La poche flagellaire constitue une invagination de la membrane plasmique extrêmement spécialisée à l'intérieur de laquelle l'ensemble du trafic endocytose/exocytose a lieu. La poche flagellaire est une région très particulière du trypanosome car elle est le lieu d'expression de glycoprotéines invariantes et de nombreux récepteurs essentiels au métabolisme et à la survie du trypanosome (transferine et récepteur à lipoprotéine) (Field and Carrington, 2009).

Le flagelle s'articule autour d'une structure microtubulaire nommée axonème et reste accolé au corps cellulaire en formant une membrane ondulante jusqu'à ce que la partie libre émerge à l'extrémité antérieure du trypanosome. Le flagelle du trypanosome assure d'autres fonctions telles que l'adhésion du parasite aux surfaces tissulaires de l'hôte, la morphogénèse et la division cellulaire (Blisnick et al., 2014).

Le parasite possède différents organelles essentiels tels qu'un lysosome et un réticulum endoplasmique répartis à travers le cytoplasme. Il est aussi constitué d'une structure multivésiculaire empilée et reliée par des endosomes de triage et de recyclage : l'appareil de Golgi. On note également la présence d'un organelle extrêmement important à la survie du trypanosome : le glycosome, puisqu'il contient entre autre les enzymes (glycosyltransférase) nécessaires à la synthèse de ses glycoprotéines (Mariño et al., 2010; Bringaud et al., 2015). Enfin, on note la présence d'acidocalcisomes, qui jouent un rôle dans le maintien de l'équilibre des cations et du pH, paramètres importants pour la stabilité de nombreuses protéines intracellulaires (Docampo and Moreno, 2011).

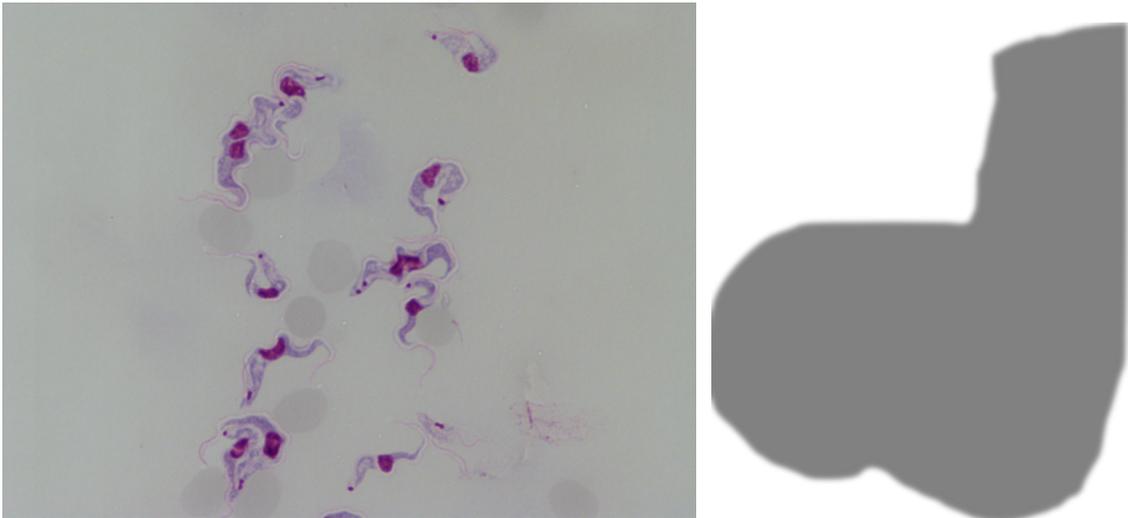


Figure 5 : Frotti sanguin révélant des trypanosomes (*T. b. gambiense*) colorés au Giemsa (à droite, photo personnelle). Schéma de l'organisation cellulaire d'un trypanosome en forme trypanomastigote (à gauche) d'après Vickerman (1969, 1970).

Document non libre de droits, non reproduit par respect du droit d'auteur

b : Corps basale, **g** : Appareil de Golgi, **er** : Réticulum endoplasmique, **ri** : Ribosome, **um** : Membrane ondulante, **fl** : Flagelle attaché, **ff** : Flagelle libre, **pm** : Microtubules sub-pelliculaires, **ch** : Noyau avec chromatine, **m** : Mitochondrie, **kn** : Kinétoplaste, **cg** : Granule cytoplasmique et **fp** : Poche flagellaire

1.4. Le vecteur de la maladie

Le vecteur du trypanosome est la glossine, plus communément nommée mouche Tsé-Tsé. Elle appartient à l'ordre des Diptères, à la super famille des Muscides et plus particulièrement à la famille des glossinidés (*Glossinidae*) qui est une famille créée exclusivement pour classer ces insectes car elle ne comprend qu'un seul genre: le genre *Glossina*. On dénombre trois sous-genres:

-Sous-genre *Glossina sensus stricto* (Zumpt, 1935), ou groupe : *morsitans*. Ce groupe rassemble les espèces occupant principalement les paysages de savane boisée. Les espèces de ce sous-genre sont de remarquables vecteurs de la TAA, leur distribution est liée en partie à la présence d'animaux sauvages et de bétails dans les zones de savanes. Certaines espèces telles que *G. pallipides* et *G. morsitans* sont connues pour intervenir plus particulièrement dans la transmission de *T. b. rhodesiense* (Gooding and Krafur, 2005).

-Sous-genre *Austenina* (Townsend, 1921), ou groupe : *fusca*. Ce sous-genre regroupe, à quelques exceptions près, les espèces inféodées aux zones forestières. A l'heure actuelle, les espèces de ce groupe ne sont pas considérées comme vecteur de la THA

mais le fractionnement de leur habitat par l'activité humaine en forêt africaine pourrait modifier le comportement de ces espèces de façon peu prévisible (Babin, 2004; De La Rocque et al., 2004).

-Sous-genre *Nemorhina* (Robineau-Desvoidy, 1830), ou groupe : *palpalis*. Il comprend les espèces vivant au niveau de la ripisylve, c'est-à-dire dans la végétation présente à proximité de points d'eau et de rivières. On retrouve les espèces de ce sous-genre en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale. Certaines espèces telles que *G. palpalis* et *G. fuscipes* étendent leur milieux jusqu'aux zones anthropisées telles que des plantations (caféiers, cacaoyers, manguiers...) et aux villes de taille moyenne à grande (Tshimungu et al., 2010). Ce sont les espèces de ce groupe qui sont les principaux vecteurs de la THA à *T. b. gambiense* (Wamwiri and Changasi, 2016).

Ces mouches, longues et robustes, de couleur gris-brun, mesurent 6 à 16 mm de long et possèdent une trompe et une paire d'ailes hyalines croisées sur l'abdomen (**Figure 6**). Pour ces mouches, le mâle et la femelle sont hématophages. Les pièces buccales, longues et acérées, sont protégées au repos par les palpes maxillaires et vont se déployer lors du repas sanguin. L'animal abaisse sa trompe et l'insère dans le tissu cutané ; les mouvements rapides des dents labellaires vont provoquer la formation de micro-hématomes dans lesquels la glossine va injecter sa salive. Les propriétés vasodilatatrices et anticoagulantes de la salive de la glossine vont lui permettre de fluidifier et d'aspirer le sang plus rapidement. Les repas sanguins durent environ 20 à 30 secondes et ont lieu préférentiellement tard le soir ou tôt le matin ; c'est un insecte principalement diurne (Rogers, 1985). C'est lors de ce repas sanguin que la mouche va se contaminer avec le trypanosome en piquant un individu lui-même trypanosomé.

Le mode de reproduction de cette mouche est particulier car elle ne pond pas d'oeuf mais produit une seule larve qui se développe dans l'utérus de la femelle en se nourrissant des glandes utérines ; c'est un mode de gestation nommé "viviparité adénotrophique". Une fois à maturité, la larve est déposée sur un sol humide et va s'enfouir pour atteindre le stade de puppe. L'individu adulte émerge 30 à 80 jours plus tard. Ce mode de reproduction exige des conditions climatiques particulières, une température allant de 16 à 36°C au sol et une humidité relative comprise entre 50 et 80% (Franco et al., 2014). La femelle ne produit pas plus de 10 larves au cours de sa vie (Gentilini and Dulfo, 1986).



Figure 6 : La mouche Tsé-Tsé ou *Glossine sp.*
(M. Dukhan, IRD)

Document non libre de droits, non reproduit par respect du droit d'auteur

1.5. Le cycle parasitaire

Le cycle parasitaire est complexe ; le trypanosome passe par différents stades biologiques chez le vecteur et chez l'hôte (**Figure 7**).

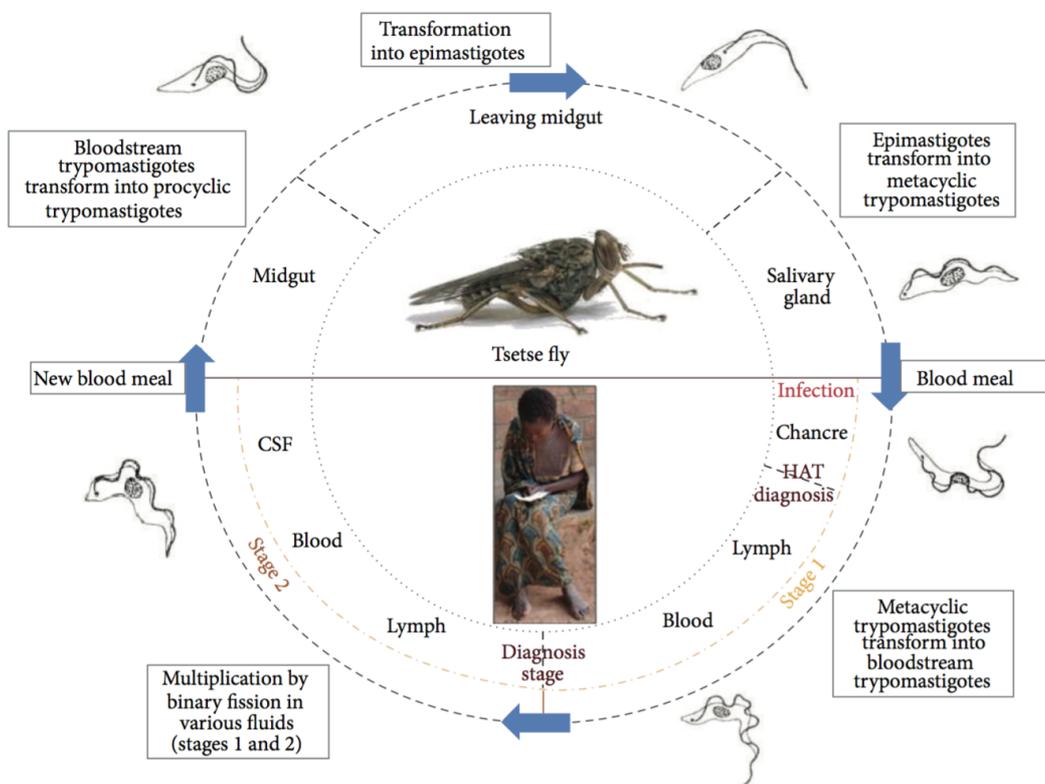


Figure 7 : Cycle parasitaire de Trypanosomose Humaine Africaine.

(WHO, 2013)

Le cycle de vie du trypanosome, dans le cas de la THA, se déroule en faisant intervenir deux hôtes distincts : la glossine et l'Homme. Au moment du repas sanguin, la mouche, qu'elle soit infectée par le trypanosome ou non, va injecter sa salive pour fluidifier et éviter la coagulation sanguine au niveau de la piqûre. Si la mouche est parasitée par des trypanosomes pathogènes pour l'Homme, sa salive va contenir des trypomastigotes métacycliques qui vont être injectés de façon hypodermique chez l'hôte au niveau du chancre d'inoculation. Les trypanosomes vont proliférer au niveau épidermique et se transformer en forme trypomastigote sanguicole "circulant". Sous cette forme, les trypanosomes vont se multiplier par fission binaire et envahir le système sanguin et le système lymphatique de l'hôte. A ce stade, on distingue deux formes de trypanosomes : une forme "*stumpy*" ou "*trapu*" (trypomastigotes métacycliques) où le flagelle gagne l'avant du corps, et une forme "*slender*" ou "*mince*" (trypomastigotes en division) où le flagelle se prolonge en position antérieure et devient libre.

L'Homme devient alors un réservoir du parasite. La prolifération et la dissémination du trypanosome dans le sang et la lymphe représente le premier stade de la maladie ou stade hémo-lymphatique ou encore stade 1 (noté S1). Les trypanosomes vont ensuite migrer vers le SNC en franchissant la BHE. C'est l'étape dite de polarisation nerveuse de la maladie. Cette étape intervient au bout de quelques semaines pour *T. b. rhodesiense* et après un à deux ans pour *T. b. gambiense* (Checchi et al., 2008). Le franchissement de la BHE marque l'entrée dans la deuxième phase de la maladie nommée stade neurologique, stade nerveux ou encore stade 2 de la maladie (noté S2) (WHO, 2013).

Si une nouvelle glossine, non infectée, vient à prendre un repas sanguin sur cet hôte infecté, elle peut ingérer des formes trypomastigotes circulantes. Les trypanosomes vont alors subir une maturation dans le système digestif de l'insecte vecteur. L'établissement du parasite chez l'insecte est possible grâce à des endosymbiontes, les *Rickettsia-Like Organisms*, retrouvés au niveau du mycétome (cellules géantes présentes dans la partie antérieure de l'intestin moyen). Elles vont produire une endochitinase qui va générer de la glucosamine inhibant les lectines de l'intestin moyen qui ont une activité trypanocide. La présence de ces endosymbiontes va donc permettre le développement du trypanosome chez l'insecte (Maudlin and Ellis, 1985; Welburn et al., 1993). Ce processus de développement débute au niveau de l'intestin où les trypanosomes vont se transformer en forme trypomastigotes procycliques et s'y multiplier (Robertson, 1913). A ce stade, les trypanosomes vont perdre leur manteau glycoprotéique sous l'action combinée de la GPI-PLC (glycosyl-phosphatidyl-inositol-specific phospholipase C) et du clivage protéolytique des glycoprotéines de surface variables (VSG)

grâce à la zinc métalloprotéase. Par ailleurs, cette transformation est aussi marquée par le changement de la voie d'apport énergétique, on passe d'un apport exclusivement basé sur la glycolyse chez la forme circulante à un apport énergétique mitochondriale assuré par la chaîne de respiration (Baral, 2010). Après leur prolifération dans l'intestin, les trypanosomes traversent la membrane péritrophique pour rejoindre l'espace ectopéritrophique, ils vont se multiplier et se différencier en forme mésocyclique avant de traverser à nouveau la membrane péritrophique. Les parasites vont alors migrer jusqu'au proventricule sous forme épimastigote longue puis sous forme trypomastigote à division asymétrique. Sous cette dernière forme, les trypanosomes vont se différencier en trypomastigotes longs ou courts. Les épimastigotes courts migrent ensuite vers les glandes salivaires de l'insecte (Van Den Abbeele et al., 1999; Roditi and Lehane, 2008; Walshe et al., 2009). Les parasites vont alors coloniser les glandes salivaires de la glossine, s'y diviser par méiose et vont subir une dernière transformation pour prendre leur forme trypomastigote métacyclique (Peacock et al., 2011). Cette forme est obtenue par l'activation des gènes codant pour les VSG. Ces gènes sont activés stochastiquement après la fin de la division du trypanosome et la libération dans la lumière des glandes salivaires (Tetley et al., 1987). A la fin de ce processus, les trypanosomes ont acquis leur manteau glycoprotéique ce qui constitue un mécanisme de résistance et leur confère leur potentiel infectieux (Turner et al., 1988; Dyer et al., 2013). La maturation au sein de la mouche dure entre 20 et 35 jours (Robertson, 1913). Après cette période, ils sont prêts à être libérés lors d'un prochain repas sanguin. La glossine reste ensuite infectante pour le reste de sa vie (Rotureau and Van Den Abbeele, 2013).

1.6. Evolution de la maladie

Les symptômes observés au cours de la maladie sont liés à l'activation et au développement de la réponse immunitaire de l'hôte en fonction de la progression de la maladie. Pour la THA à *T. b. rhodesiense*, l'évolution de la maladie est rapide alors que pour une infection à *T. b. gambiense*, l'évolution est progressive et chronique. Les symptômes sont en général similaires et évoluent en fonction du stade de la maladie.

Par la suite, nous allons décrire les différents processus immunitaires et infectieux impliqués dans la physiopathologie en fonction des différents stades de la THA. Toutefois, il convient d'être prudent quant à l'explication physiopathologique des symptômes apparaissant au cours de la THA. La plupart des informations sur le rôle des réponses immunitaires à médiation cellulaire sont principalement décrites dans les modèles animaux d'infections expérimentales. Il est probable que ces fonctions immunitaires diffèrent chez l'Homme par rapport aux modèles animaux ou *in vitro* (Ponte-Sucre, 2016).

1.6.1. Stade cutané

La THA débute avec la piqûre de la glossine infectée. La réponse locale de l'hôte se traduit par l'apparition d'un chancre d'inoculation. Ce chancre est aussi nommé trypanome et peut parfois passer inaperçu. Le chancre apparaît immédiatement après la piqûre par la glossine (Gentilini et al., 1993) ou dans les 7 à 15 jours qui suivent l'inoculation du parasite (Iborra et al., 1999). Cette lésion cutanée prend l'aspect d'un nodule rouge-violacé mesurant quelques centimètres de diamètre et accompagné d'adénopathies satellites (**Figure 8**). Le chancre d'inoculation est observable uniquement à la suite d'une piqûre par une glossine infectante (Darsaud, 2003). Des trypanosomes sont retrouvés au niveau de ce chancre (Dwinger et al., 1988). Le chancre constitue la voie d'entrée du trypanosome dans l'organisme de l'hôte avant d'être disséminé dans le système lymphatico-sanguin.

Malgré le fait que la détection du parasite dans la peau ne soit pas bien documentée, des études récentes font état d'une nouvelle étape du cycle de vie du trypanosome dans la matrice cutanée. Ces études décrivent la présence d'une sous-population de trypanosomes métacycliques très infectieux, conservée et qui prolifère activement dans le derme à proximité immédiate du site initial d'inoculation (Caljon et al., 2016; Capewell et al., 2016). Une étude menée sur des souris par Trindade et al (2016), a montré que les tissus adipeux extravasculaires, présents notamment dans la peau, constituent un nouvel organe de stockage au même titre que la rate, le foie et le cerveau. Cette population de trypanosomes intradermiques pourrait jouer un rôle précoce de réservoir de trypanosomes chez l'hôte mammifère et pourrait faciliter la capture par le vecteur et donc la dissémination du parasite (Caljon et al., 2016).



Figure 8: Observation d'un double trypanome ou "double chancre d'inoculation" (Hope-Rapp et al., 2009).

Document non libre de droits, non reproduit par respect du droit d'auteur

Le délai d'apparition du chancre d'inoculation pourrait être expliqué en partie via des propriétés particulières de la salive de la mouche. En effet, certains composés présents dans la salive de la mouche vont permettre d'une part d'interférer avec la réponse de l'hôte (suppression de la vasoconstriction, de l'agrégation plaquettaire et de la coagulation) ce qui va favoriser la prise de son repas sanguin (Mant and Parker, 1981; Caljon et al., 2010). D'autre part, la salive va permettre de moduler la réponse immunitaire de l'hôte au niveau du site d'inoculation. Notamment le peptide immunorégulateur Gloss2, retrouvé dans la salive de *G. morsitans morsitans*, qui inhibe la sécrétion de molécules trypanolytiques comme le Facteur de Nécrose Tumorale α (TNF- α pour Tumor Necrosis Factor α) et d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron- γ (INF- γ) et l'interleukine (IL) 6 (IL-6), ce qui permet au parasite d'éviter une élimination initiale et de se développer au niveau du site d'inoculation (Bai et al., 2015). Par la suite, la prolifération des trypanosomes induit une réaction cutanée locale qui constitue la première protection développée par l'hôte. Cette réaction cutanée ou chancre peut quelques fois évoluer vers un ulcère (Barry and Emery, 1984; Vincendeau and Bouteille, 2006). Une activation de la voie du complément est observable à ce stade. Toutefois, il a été décrit dans le cas d'infection à *T. b. gambiense* une sorte d'hypocomplémentémie, c'est-à-dire que l'activation de la voie du complément est initiée sans aller jusqu'au bout, en empêchant une lyse du trypanosome en raison d'un blocage au-delà de l'association de la C3 convertase sur

la surface du trypanosome (Devine et al., 1986). Cependant, l'activation de la voie du complément peut conduire à l'apparition de fragments solubles pouvant déclencher des réponses chimiotactiques pour les neutrophiles et les monocytes ainsi que la libération de neurotransmetteurs impliqués dans le déclenchement d'une augmentation de la perméabilité vasculaire favorisant la réponse inflammatoire initiale au chancre (Mwangi et al., 1990). Des travaux suggèrent que les neutrophiles et les lymphocytes T et B s'infiltrent de façon prédominante lors de la réaction cutanée locale. Les neutrophiles s'infiltrent en premier, alors que les lymphocytes T et B infiltrent le chancre à 5-7 jours après l'infection. Les lymphocytes T CD8+ sont prédominants (Mwangi et al., 1990; Vincendeau and Bouteille, 2006). Des trypanosomes ainsi qu'une grande quantité de lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont observés dans les vaisseaux lymphatiques drainant le chancre. Des lymphocytes NK (*Natural Killer*) pourraient également participer à l'initiation de la réponse inflammatoire par la synthèse d'IFN- γ et de TNF- α (Vincendeau and Bouteille, 2006; Ponte-Sucre, 2016). Malgré tous ces mécanismes de défenses, l'hôte ne parvient généralement pas à éliminer le parasite au niveau du chancre qui va donc se disséminer dans les voies lymphatico-sanguines de l'hôte ce qui marque l'entrée en stade 1 de la maladie (Barry and Emery, 1984).

1.6.2. Stade hémolympatique ou stade 1

Après une période d'invasion allant de deux à trois semaines, les signes cliniques du stade 1 apparaissent (Barry and Emery, 1984). Ceux-ci sont non spécifiques et variables en fonction des individus (Kennedy, 2004).

1.6.2.1 La clinique de la THA en stade 1

Le signe le plus caractéristique du stade 1 est la présence d'adénopathies palpables et mobiles, non douloureuses et non suppuratives (signe de Winterbottom). Le plus souvent ce sont les ganglions cervicaux et sus-claviculaires qui réagissent et qui servent au diagnostic par palpation (**Figure 9**). Les autres symptômes que l'on retrouve classiquement sont une fièvre irrégulière, une perte de poids, des céphalées, des arthro-myalgies, des éruptions cutanées non prurigineuses, des œdèmes périphériques (souvent localisés au niveau de la face), une anémie, une hépatosplénomégalie, un prurit, etc. (Brun et al., 2010). Des troubles cardiaques ont aussi été décrits tels que des palpitations, des douleurs thoraciques, une dyspnée ainsi qu'une hypotension artérielle (Blum et al., 2008).

L'ensemble de ces symptômes ne sont pas systématiques et restent difficiles à identifier, et ils ne sont pas spécifiques de la THA.



Figure 9 : Adénopathie palpable caractéristique de la TBA.
(Photo ANOFEL)

Document non libre de droits, non reproduit par respect du droit d'auteur

1.6.2.2 La physiopathologie de la TBA en stade 1

La fièvre intermittente, prolongée, sur une période allant de plusieurs jours à plusieurs mois, est synchrone avec des pics parasitémiques (Blum et al., 2006). Cette fièvre est due à l'activation des cellules macrophagiques de type 1 et la libération en masse d'INF- γ , de TNF- α et de radicaux libres tels que l'Oxyde Nitrique (NO) qui correspondent à une réaction inflammatoire de Type 1. Cette réaction inflammatoire de Type 1 peut se révéler néfaste pour les tissus de l'hôte lorsqu'elle est exagérée. Pour contrer cela, une réponse immunitaire de Type 2 se met en place. Cette réaction immunitaire de Type 2 va faire intervenir des cellules macrophagiques qui vont favoriser la libération des chimiokines et cytokines aux propriétés anti-inflammatoires, immunodépresseuses et inhibitrices de la synthèse de NO telle que les interleukines 10, 4 et 1 β (Bisser et al., 2006).

La réponse immunitaire de Type 1 et la libération de cytokines peuvent aussi être associées à une anémie. En effet, une étude de Stijlemans et al. (2008) a montré que cette anémie est liée principalement à une érythrophagocytose initiée au niveau du foie et contrôlée par les cytokines produites par les cellules macrophagiques. Dans le cas de TBA, les cellules

macrophagiques sont hyperactivées ce qui induit une hyper érythrophagocytose qui ne peut pas être compensée par une réponse érythropoïétique.

Il a été décrit que le foie, la rate et les ganglions lymphatiques (Kennedy, 2004) et plus récemment la matrice cutanée (Capewell et al., 2016) sont des organes « réservoirs » pour les trypanosomes. On note une augmentation de la taille de certains de ces organes notamment du foie et de la rate (hépatosplénomégalie).

Dans le cas des troubles cardiaques, la présence interstitielle du parasite a été démontrée au niveau du myocarde ainsi qu'une infiltration lympho-histiocytaire diffuse. Des œdèmes peuvent se former au niveau du péricarde, du myocarde et de l'endocarde, le plus souvent sans nécrose des fibres musculaires. Une inflammation (vascularite) et des infiltrations périvasculaires d'histiocytes ont également été relevées au niveau des vaisseaux sanguins cardiaques (Bertrand et al., 1974; Blum et al., 2008).

1.6.2.3 La réponse immunitaire et l'adaptation du parasite

Une fois dans le sang de son hôte, le trypanosome va devoir faire face à la première barrière de défense du système immunitaire : la réponse immunitaire innée. L'Homme et certains grands primates sont résistants à la plupart des trypanosomes en raison d'un complexe trypanolytique (TLF) présent dans leurs sérums (Laveran and Mesnil, 1902). Ce complexe est composé principalement par l'APOL1 et l'Hpr (Vanhamme and Pays, 2004). Pour que le TLF soit actif, il doit être internalisé par endocytose grâce aux récepteurs TbHpHbR (pour *haptoglobin hemoglobin receptor*) présents dans la poche flagellaire du parasite. Son internalisation va entraîner la formation de pores au niveau du lysosome et la lyse du parasite (Hager and Hajduk, 1997; Drain et al., 2001; Molina-Portela et al., 2005; Harrington et al., 2009). Le composant actif du TLF reste incertain mais de nombreuses études convergent vers l'APOL1 comme étant l'élément conférant au sérum humain son effet trypanolytique (Vanhamme et al., 2003; Vanhamme and Pays, 2004).

Le TLF constitue donc la première ligne de défense contre le parasite. Cependant, au cours de l'évolution, *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* ont acquis une résistance au complexe trypanolytique présent dans le sérum humain (Vanhamme and Pays, 2004). Dans le cas de *T. b. rhodesiense*, cette résistance est liée à une stratégie de neutralisation du TLF via l'expression d'un gène nommé SRA (*Serum Resistance-Associated*). Ce gène, silencieux lorsque le parasite n'est pas en présence du TLF, code pour la protéine SRA. Cette protéine présente une hélice α dans son domaine N-terminal qui est responsable de l'inhibition du TLF par contact hélice/hélice avec le domaine C-terminal de l'APOL1, empêchant la formation de

pores au niveau du lysosome (Vanhamme and Pays, 2004). Dans le cas de *T. b. gambiense* (groupe 1), incapable de produire la protéine SRA, c'est une stratégie d'évitement qui est mis en place afin de réduire l'action du TLF. La faible absorption de TLF peut être expliquée chez *T. b. gambiense* par l'expression réduite de récepteurs TbHpHbR (Vanhollebeke et al., 2008; Kieft et al., 2010). Toutefois, la réduction du nombre de récepteurs du TLF n'offre pas une protection complète et n'explique pas à elle seule le potentiel infectieux de *T. b. gambiense* vis à vis de l'Homme. Il est donc admis que *T. b. gambiense* évite le TLF via la réduction de récepteurs TbHpHbR, mais il semble qu'il ait également développé un inhibiteur non-SRA qui n'a pas encore été identifié (Stephens et al., 2012).

Les trypanosomes qui ne sont pas détruits par le TLF (*T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*) font alors face à la réponse immunitaire innée. Lors de cette phase de la réponse immunitaire, des cellules de l'immunité vont être activées, majoritairement par la libération d'ADN trypanosomal et par la libération d'«endotoxines» apparentées au manteau lipopolysaccharidique et à l'ancrage GPI (élément constituant des VSG) lors de la lyse du parasite (Rhind and Shek, 1999). Ces éléments sont repérés par les récepteurs type Toll (TLR) qui reconnaissent des motifs moléculaires particuliers (*Pathogen Associated Molecular Pattern* ou PAMP). Ces récepteurs sont exprimés par les cellules circulantes ou tissulaires de l'immunité (macrophages, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes B et T et cellules dendritiques) mais aussi par des cellules non immunes telles que les fibroblastes et les cellules épithéliales présentes aux interfaces avec le milieu extérieur. Dans le cas de la THA, l'ADN trypanosomal semble être l'élément principal impliqué dans les voies de signalisation des TLR (Drennan et al., 2005; Baral, 2010; Kuriakose et al., 2016). La reconnaissance de ces éléments parasitaires dans le milieu sanguin va provoquer une libération d'INF- γ par les cellules de l'immunité ce qui va déclencher une activation des macrophages et la libération de molécules pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12 et le NO. Cette phase de la réponse immunitaire correspond à une réaction inflammatoire de Type 1. Toutefois l'inflammation, si elle n'est pas contrôlée, peut causer des dommages et menacer l'intégrité de l'hôte. Il est donc essentiel pour l'hôte de réguler l'inflammation produite par la libération de cytokines pro-inflammatoires via les macrophages activés. De nouvelles cytokines, de Type 2, vont être produites (IL-4, IL-10 et IL-13) et vont permettre de moduler l'inflammation. C'est la réponse inflammatoire de Type 2. La réponse inflammatoire de Type 1 intervient donc au début de l'infection par le trypanosome et la réponse inflammatoire de Type 2 intervient ensuite lors de la phase tardive et chronique de l'infection (Bisser et al., 2006; Kuriakose et al., 2016).

L'une des adaptations du trypanosome acquis au contact de son hôte au cours de l'évolution est la capacité à détourner les éléments du système immunitaire à son profit (Bisser et al.,

2006). L'INF- γ a été décrit comme un facteur de développement pour le parasite. Il est intéressant de constater que le trypanosome va entretenir et amplifier, par l'intermédiaire de la trypanine, la libération d'INF- γ par les lymphocytes T (Bakhiet et al., 1993; Hill et al., 2000). De plus, la production de molécules trypanotoxiques telles que le TNF- α et le NO, même si elle va permettre de contrôler les premiers pics de la parasitémie, va être détournée. Il semble que le parasite soit capable d'échapper à l'effet trypanocide du NO. Il a même été observé que, dans les macrophages sanguins de l'hôte, le métabolisme de la L-arginine conduisant à la formation du NO (voie des enzymes NO synthétases) est détourné pour produire des facteurs de croissance du parasite : l'ornithine et ses dérivés (voie de l'Arginase dans le cycle de l'Urée) (Gobert et al., 2000; Vincendeau et al., 2003). Il est également à noter qu'une déplétion de la L-arginine médiée par l'arginase induit une suppression de la réponse immunitaire des lymphocytes T. De plus, l'ornithine va permettre la synthèse de polyamines via l'ornithine décarboxylase. Ces polyamines sont essentielles à la synthèse de l'ADN parasite et du trypanothion, un élément spécifique des kinétoplastides, analogue du glutathion chez l'Homme, qui permet au parasite de lutter contre le stress oxydatif. Ces deux éléments sont indispensables à la prolifération et à la réponse au stress oxydatif du trypanosome (Fairlamb and Cerami, 1992; Gobert et al., 2000). En résumé, l'augmentation de l'arginase et donc l'augmentation d'ornithine favorise la survie du parasite et diminue l'efficacité des défenses immunitaires chez l'hôte infecté.

Le trypanosome a également développé un manteau glycoprotéique qui lui permet de déjouer les mécanismes de défense de l'hôte. En effet, le parasite est recouvert d'une couche dense composée de 10^7 VSG. Ces VSG forment un manteau dense d'environ 13 nm d'épaisseur recouvrant 95% de la surface du trypanosome (Vickerman, 1969). Ce sont des protéines antigéniques distinctes formant une barrière qui empêche la liaison de celles-ci à des composants du complément de l'hôte ou d'autres composants lytiques contenus dans le sérum de l'hôte. La caractéristique principale de ces glycoprotéines est la présence, au niveau du domaine N-terminal, de deux hélices alpha longues et perpendiculaires à la membrane plasmique (Baral, 2010). Du fait de leur longueur et de leur densité, seul un faible nombre d'acides aminés sont accessibles aux défenses immunitaires. Le domaine C-terminal est lui relié à la membrane plasmique via un ancrage Glycosyl-phosphatidylinositol nommé ancre-GPI (**Figure 10**). L'assemblage de l'ancrage GPI et de la VSG a lieu au niveau du réticulum endoplasmique pendant le transport de la protéine jusqu'à la surface du parasite (Manna et al., 2014; McDowell et al., 1998). Il existe chez le trypanosome plus de 2000 gènes codants pour des VSG individuelles. De plus, le parasite a la capacité de créer de nouvelles variantes à partir de gènes chimères grâce à une réorganisation de courtes régions de chaque gène

(Barry, 1997). Ce revêtement se renouvelle et se modifie très rapidement de sorte que les anticorps qui ont pour cibles ces antigènes à la surface du parasite ne puissent repérer efficacement le pathogène. Ce mécanisme d'échappement au système immunitaire permet au trypanosome de leurrer les défenses immunitaires quasi indéfiniment (Barry, 1997; Manna et al., 2013).



Figure 10 : Modélisation 3D du manteau antigénique de *T. brucei*.
(Image de Jacob Glanville).

Document non libre de droits, non reproduit par respect du droit d'auteur

En effet, pendant la phase ascendante de la parasitémie, la majorité des trypanosomes expriment les mêmes VSG donc le même type antigénique ou homotype. Le système immunitaire de l'hôte va reconnaître cet homotype et développer des anticorps dirigés contre lui et détruire ces trypanosomes. Cela va avoir pour effet de diminuer la parasitémie. Toutefois, au même moment, une minorité de parasites va exprimer un nouveau type antigénique ou hétérotype, qui ne sera pas reconnu. Ils vont passer en quelque sorte sous le radar du système immunitaire de l'hôte et vont pouvoir se multiplier jusqu'à devenir le nouvel homotype et engendrer une nouvelle vague de parasitémie (Gjini et al., 2010; McCulloch et al., 2015).

Le flagelle joue aussi un rôle dans le mécanisme de défense, permettant un balayage hydrodynamique de la surface du trypanosome. Le flux induit par le flagelle va favoriser l'endocytose des anticorps ayant réussi à se fixer et va permettre au système phagolysosomal de les détruire (Engstler et al., 2007). De plus, la grande majorité des récepteurs invariants, pouvant servir de cible pour les défenses immunitaires, sont concentrés au niveau de la poche flagellaire, les rendant inaccessibles (Field and Carrington, 2009).

1.6.3.1 La clinique

La présence du trypanosome au niveau du SNC va entraîner une méningo-encéphalite et induire de nouveaux symptômes principalement représentés par des troubles neuropsychiatriques. Des céphalées ainsi que des troubles de l'humeur ou du comportement sont généralement observés et ceci parfois dès la fin du premier stade ; leur intensité et leur persistance augmentant au fur et à mesure que la maladie évolue. Les troubles de l'humeur se manifestent régulièrement par une alternance d'épisodes dépressifs, délirants et euphoriques ainsi que l'apparition d'hallucinations. Les patients atteints présentent aussi un comportement agressif ou antisocial qui peut être couplé à de l'irritabilité ou à de l'indifférence (Blum et al., 2006).

Les troubles du sommeil caractéristiques, et donnant son nom à cette maladie, apparaissent en stade 2. On note chez le patient en stade neurologique un dérèglement du cycle nyctéméral avec un fractionnement de la période de sommeil sur l'ensemble de la journée (Buguet et al., 1993, 2005). Toutefois, la durée totale de sommeil est la même que chez un sujet sain (WHO, 2013). Une fois que le parasite a envahi le SNC, la localisation des lésions cérébrales occasionnées explique en partie la manifestation des signes cliniques. Les troubles du sommeil résultent d'une dérégulation du profil hormonal journalier du patient directement en lien avec le cycle veille-sommeil (Brandenberger et al., 1996).

Les troubles moteurs sont importants au cours de la phase nerveuse puisque tous les types de mouvements anormaux peuvent être observés : tremblement des extrémités, chorée, athétose ou simple trouble de la marche. Un syndrome de type parkinsonien peut être observé avec hypertonie et hypokinésie. Ces troubles sont généralement liés à une atteinte du striatum (Antoine, 1977; Blum et al., 2006b). Plus rarement, des syndromes paresthésiques ou une hémiplégie peuvent apparaître chez des patients en stade 2 tardif (Blum et al., 2006; Kennedy, 2006).

Les troubles endocriniens, thyroïdiens et adrénocorticaux, font aussi partie du tableau clinique. Ces troubles se traduisent par une diminution de la libido voire une impuissance sexuelle chez l'homme et une aménorrhée chez la femme (Noireau et al., 1988).

Au stade terminal de la maladie, le patient souffre généralement d'incontinence, de malnutrition et d'escarres dûs à son alitement. La faiblesse généralisée ou cachexie du patient ouvre la voie à de nombreuses surinfections. De graves perturbations apparaissent telles que des crises de démences et d'épilepsies ainsi qu'une altération de la conscience. En l'absence de traitement, le patient sombre dans un coma conduisant à la mort (Dumas and Bisser, 1999).

1.6.3.2 La physiopathologie

1.6.3.2.1. Franchissement de la BHE

Le franchissement de la BHE par le parasite est l'étape qui marque l'entrée en stade 2 de la maladie. La BHE est une barrière physiologique étanche existante entre la circulation sanguine et le SNC. C'est une barrière unique et très sélective qui est formée par les cellules endothéliales qui constituent les capillaires sanguins cérébraux ainsi que par des éléments périvasculaires tels que les pieds astrocytaires, les neurones périvasculaires et péricystes. Ces cellules forment une unité neurovasculaire (Cecchelli et al., 2007). Les cellules endothéliales cérébrales sont particulières, en plus des jonctions cellulaires adhésives présentes au niveau des autres vaisseaux sanguins, des jonctions complexes et étroites créées par l'interaction de plusieurs protéines transmembranaires scellent efficacement la voie paracellulaire. Les principales protéines transmembranaires mises en cause sont l'occludine, les claudines et les molécules d'adhésion de jonction (MAJ) (Ballabh et al., 2004). Ces jonctions que l'on nomme « jonctions serrées » rendent le cerveau pratiquement inaccessible aux pathogènes, toxines, hormones et molécules polaires présentes dans le sang (Dunn, 1980). Seuls les éléments essentiels au fonctionnement du cerveau (nutriments, minéraux...) sont sélectionnés et transférés à travers la BHE (Huber et al., 2001).

Les mécanismes par lesquels le parasite franchit cette barrière restent encore à ce jour mal connus. Il a été décrit que plusieurs protéines exprimées à la surface de *Trypanosoma brucei* spp. favorisent leur passage à travers les cellules endothéliales (Nikolskaia et al., 2006a; Grandgenett et al., 2007; Abdulla et al., 2008; Grab et al., 2009; de Sousa et al., 2010). Notamment le TAF (pour Trypanosome Apoptotic Factor) qui est un dérivé d'une protéine parasitaire capable d'induire l'apoptose des cellules endothéliales cérébrales afin de permettre l'entrée du trypanosome dans le cerveau (Girard et al., 2003). La migration des trypanosomes à travers la BHE peut aussi être liée à des dérivés de protéases sécrétées par le parasite, en particulier la brucipaine (Grab et al., 2004; Nikolskaia et al., 2006a) ou une métalloprotéase de surface (MSP) (Grandgenett et al., 2007; Masocha and Kristensson, 2012).

L'altération et le franchissement de la BHE par le trypanosome va induire une augmentation de la perméabilité de cette barrière. Cette porosité de la BHE va alors permettre l'extravasation leucocytaire du compartiment sanguin vers le SNC, guidée par un gradient de protéines chimioattractantes (chimiokines et cytokines) (Rollins, 1997; Courtioux et al., 2006; Kennedy, 2009). Ce passage des leucocytes à travers la BHE est possible grâce à l'action de métalloprotéinases matricielles (MMP pour *Matrix Metalloproteinase*) qui augmentent la perméabilisation de la BHE (Rosenberg, 2009) et de molécules d'adhésion cellulaire (CAM pour Cell Adhesion Molecule) qui permettent la liaison entre les leucocytes et les cellules

endothéliales puis la transmigration des leucocytes dans le SNC (Hainard et al., 2011; Ransohoff et al., 2003). Il a été également montré que *T. b. gambiense* est capable de sécréter un facteur activateur de l'endothélium (FAE) ce qui pourrait intensifier l'expression des CAM par les cellules endothéliales.

Il a également été montré chez la souris que *T. b. brucei* traverse la BHE au même endroit que les lymphocytes et que l'IFN- γ libéré par les lymphocytes facilite la traversée du parasite. Par ailleurs, un traitement avec de la minocycline, un inhibiteur empêchant l'extravasation leucocytaire, réduit considérablement le franchissement de la BHE par le trypanosome (Masocha et al., 2006; Amin et al., 2008; Grab and Kennedy, 2008). Ceci suggère que *T. b. brucei* pourrait suivre les lymphocytes lorsqu'ils traversent la BHE ou qu'il pourrait employer des mécanismes similaires à ceux utilisés par les lymphocytes pour traverser la BHE (Masocha et al., 2004; Mogk et al., 2016).

Toutefois, l'itinéraire pris par le parasite pour traverser les modèles de BHE *in vitro* n'est pas clair. En effet, plusieurs études sur modèle *in vitro* ou sur modèle murin ont montré que le trypanosome africain est capable de traverser la BHE par une voie paracellulaire en dégradant les jonctions serrées via des protéines dérivées sécrétées par le parasite ou en suivant la voie empruntée par les lymphocytes (Masocha et al., 2006; Grandgenett et al., 2007; Grab et al., 2009). D'un autre côté, certaines études suggèrent également un passage transcellulaire du parasite en formant des invaginations et en envahissant les cellules endothéliales y compris en utilisant des cellules humaines (Nikolskaia et al., 2006b; Namayanja et al., 2017).

Partant de cette dernière hypothèse, dans le cadre de stages réalisés par des étudiants dans le laboratoire, nous avons observé la capacité de *T. b. brucei* à envahir les cellules du SNC humain. En effet, même si *T. b. brucei* est dans le cas de l'Homme détruit au niveau sérique par le TLF, des études ont montré que *T. b. brucei* est capable de franchir la BHE humaine en condition expérimentale (Mulenga et al., 2001; Grab et al., 2004, 2009). L'objectif ici était de démontrer que *T. b. brucei* AnTat 1.9, qui n'est pas pathogène pour l'Homme, a la capacité d'envahir des cellules microgliales humaines (CMH) *in vitro*. Les CMH sont les cellules immunitaires résidentes du SNC qui répondent aux dommages neuronaux et éliminent les cellules endommagées par phagocytose. Sachant qu'au cours de la THA, la neuro-inflammation médiée par les cellules microgliales activées joue un rôle important dans la perméabilisation de la BHE et la physiopathologie de la maladie, la mise en évidence d'un envahissement de ces cellules par le parasite pourrait ouvrir de nouvelles pistes de réflexion.

Does *Trypanosoma brucei brucei* have the Ability to Invade Human Microglial cells?

Julien BONNET¹, Clotilde BOUDOT¹, Bertrand COURTILOUX¹

Soumis le 2 mai 2017, accepté le 8 juin 2017.

Résumé :

Les trypanosomes africains sont des parasites extracellulaires flagellés, agents causaux de la Trypanosomose Africaine. *Trypanosoma brucei* est la sous-espèce responsable de la majorité des cas de Trypanosomose Africaine. Deux espèces sont pathogènes pour l'Homme : *Trypanosoma brucei gambiense* et *Trypanosoma brucei rhodesiense* alors que *Trypanosoma brucei brucei* n'est pathogène que chez l'animal.

Le but de ce travail était d'étudier le pouvoir infectant de *Trypanosoma brucei brucei*, sur les cellules microgliales humaines (CMH-5). Les trypanosomes (*Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.9) marqués avec un colorant fluorescent ont été co-cultivés avec des cellules CMH-5 pendant 3 heures. Le noyau et les microtubules du cytosquelette des cellules ont ensuite été marqués avec deux colorants fluorescents avant d'être examinés par microscopie confocale. Ces examens ont permis de mettre en évidence la présence de trypanosomes à l'intérieur des CMH-5.

En conclusion, *Trypanosoma brucei brucei*, un parasite non-humain et décrit comme extracellulaire, semble avoir la capacité d'entrer dans des cellules microgliales humaines *in vitro*. Cela soulève un certain nombre de questions concernant le comportement de ce parasite dans le SNC humain et la réponse immunitaire initiée par les cellules microgliales qui correspond aux défenses endogènes du cerveau humain.



Does *Trypanosoma brucei brucei* have the Ability to Invade Human Microglial Cells?

Julien Bonnet, Clotilde Boudot and Bertrand Courtioux*

Tropical Neuroepidemiology, Institute of Neuroepidemiology and Tropical Neurology, School of Medicine, CNRS FR 3503 GEIST, University of Limoges, INSERM UMR1094, Limoges, France

*Corresponding author: Bertrand Courtioux, Tropical Neuroepidemiology, Institute of Neuroepidemiology and Tropical Neurology, University of Limoges, Limoges, France, Tel: 0555435829; E-mail: bertrand.courtioux@unilim.fr

Received date: May 02, 2017; Accepted date: June 08, 2017; Published date: June 15, 2017

Copyright: © 2017 Bonnet J, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

African trypanosomes are flagellated extracellular parasites, causal agents of African trypanosomiasis. *Trypanosoma brucei* is the most frequent species for the majority of African trypanosomiasis. Two sub-species are pathogenic for humans: *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* while *Trypanosoma brucei brucei* is not.

Objective: The aim of this work was to study the infectivity of *Trypanosoma brucei brucei*, on human microglial cells (CMH-5).

Methods: Trypanosomes (*Trypanosoma brucei brucei* Antat 1.9) labeled with a fluorescent dye were co-cultured with CMH-5 cells for 3 h. The nucleus and cytoskeletal microtubules of the cells were then labeled with two fluorescent dyes and the stained cell layer was examined by confocal microscopy.

Results: Trypanosomes were observed within CMH-5 cells.

Conclusion: *Trypanosoma brucei brucei*, a non-human parasite and described as an extracellular parasite, appears to have the ability to enter in human microglial cells *in vitro*. This raises a number of issues concerning the behaviour of this parasite in the human CNS and the immune response initiated by microglial cells which corresponds to endogenous defenses of the human brain.

Keywords: African trypanosomiasis; *Trypanosoma brucei brucei*; Human microglial cell; Intra-cellular parasite; Confocal microscopy

Rapid Communication

African trypanosomiasis is an endemic disease localized in Sub-Saharan Africa. It is caused by different subspecies of an extracellular protozoan called *Trypanosoma*. One of these subspecies, *Trypanosoma brucei*, and more specifically *Trypanosoma brucei* (T.b.) *gambiense* and *T.b. rhodesiense*, is able to infect humans causing Human African Trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness, or *T.b. brucei* can also cause Animal African Trypanosomiasis (AAT) in wild or farm animals. *T.b. brucei* is not pathogenic for humans because it exists as a trypaenolytic complex, in human serum, with a haptoglobulin and an apolipoprotein which lyse the parasites [1]. For this reason, *T.b. brucei* is the most commonly used trypanosome in research laboratories. These parasites are transmitted by an infected tsetse fly which bites the host during its blood meal. Trypanosomes are present in blood and lymph. This is the early stage. Later, the parasites are able to cross the blood brain barrier (BBB) to invade the Central Nervous System (CNS), and are involved in the development of neurological disorders. This is the meningoencephalitic stage and left untreated, African Trypanosomiasis is fatal [2]. Furthermore, therapy is stage-dependent, which limits treatment for patients when they are in stage 2. It is necessary to develop new therapies by studying the ability of trypanosomes to cross the BBB. At present, several publications report

a correlation between the understanding of the crossing of the BBB by the trypanosome and the improvement of the stage 2 treatment [3]. Indeed, studies of the invasive pathways of the CNS by the trypanosome and its behavior during this phase could help to understand certain cases of relapses [4,5].

One question concerns how the trypanosome is able to cross the BBB which is a barrier that separates the blood circulation from the cerebral extracellular fluid in the central nervous system. It is composed of endothelial cells, tight junctions, pericytes around the capillaries and astrocyte endfeet [6]. The BBB protects the brain from pathogens and toxins, maintains cerebral homeostasis by the exchange control between blood and brain [4]. But, the BBB is not present in all brain regions such as ventricles and circumventricular organs (CVOs), and perhaps it is at those areas where trypanosomes cross into the brain. Trypanosomes can express enzymes including metalloproteases and cysteine protease, that facilitate tissue invasion [7,8]. Furthermore, the host's immune system plays a key role in lymphocyte invasion and the action of IFN- γ which determines which sites penetration of *T.b. brucei* was observed in the brain [9].

Our objective was to demonstrate the ability of *T.b. brucei* Antat 1.9, which is not pathogenic for humans, to invade human microglial cells *in vitro*. Microglial cells are the resident immune cells of the CNS which normally respond to neuronal damage and remove damaged cells by phagocytosis. During HAT, an inflammatory process in the central nervous system is believed to play an important role in the

pathway leading to neuronal cell death. The inflammatory response is mediated by the activated microglia, which could be implicated in the migration of protozoa.

To answer this question, we co-cultured *T. b. brucei* Antat 1.9 on Human Microglial Cell 5 (CMH-5).

Parasite Culture

Trypanosomes were cultured in Baltz Medium [10]: MEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Gibco[®]) supplemented with 20% heat-inactivated horse serum (Gibco[®]), L-glutamine (2 mM, Gibco[®]), HEPES (25 mM, Gibco[®]), glucose (0.2%, Sigma-Aldrich[®]), sodium pyruvate (2 mM, Gibco[®]), penicillin (150 IU/L, Gibco[®]), thymidine (0.1 mM, Sigma-Aldrich[®]), β -mercaptoethanol (0.5 mM, Sigma-Aldrich[®]), L-cysteine (15 mM, Sigma-Aldrich[®]), and bathocuproine sulfate (0.0001%, Sigma[®]). Parasites were cultured at 37°C in humidified air containing 5% CO₂.

Cell culture

CMH-5 (kindly provided by Pr P. Vincendeau, Bordeaux, France) were grown in flasks in a Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium (DMEM, Gibco[®]), containing L-cysteine (0.2 mM, Sigma-Aldrich[®]), L-glutamine (2 mM, Gibco[®]), sodium pyruvate (2 mM, Gibco[®]), streptomycin-penicillin (100 IU/L, Gibco[®]), HEPES (25 mM, Gibco[®]) and β -Mercaptoethanol (0.1 mM, Sigma-Aldrich[®]). This medium was supplemented with decomplexed 10% fetal calf serum (Gibco[®]). Flasks were incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells were seeded in 25 cm² culture flasks at a density of 5 × 10⁶ cells/mL and confluent cells were trypsinized in DMEM.

Co-culture and fluorescent immunostaining

Trypanosomes were stained with PKH26 Red (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for general cell membrane labeling, Sigma-Aldrich[®]) and co-cultured (10⁵/mL) on a CMH-5 layer in well culture chambers (Lab-tek, Sarstedt[®]) for 3 h at 37°C in a humidified atmosphere at 5% CO₂. For each culture chamber, a well was seeded with cells only and served as the control for our analysis. The cell layer was washed twice with PBS (phosphate buffered saline) and fixed with 4% formaldehyde for 15 min. Following two washes with PBS, wells were saturated with PBS, 2% BSA (Bovine Serum Albumin, Gibco[®]) for 5 min. Cells were permeabilized with PBS, 0.1% triton X-100 (Gibco[®]) for 5 min. The CMH-5s were then stained simultaneously with Alexa Fluor phalloidin (Alexa Fluor 488 phalloidin, Molecular Probes[®]) and Hoechst according to manufacturer's instructions (Hoechst fluorescent, Molecular Probes[®]). Excess stain was eliminated by two washes with PBS and one with sterile water.

Confocal microscopy

Fluorescent Z stack was acquired with a Zeiss LSM 510 META confocal microscope using a Plan-Apochromat 100x/1.4 lens over a range of 7.65 μ m and with a z step of 0.450 μ m. Orthogonal projection on the X and Y axes, using the LSM 5 Image Browser and ZEN2 software, was used to localize the trypanosome in the cell (Figure 1).

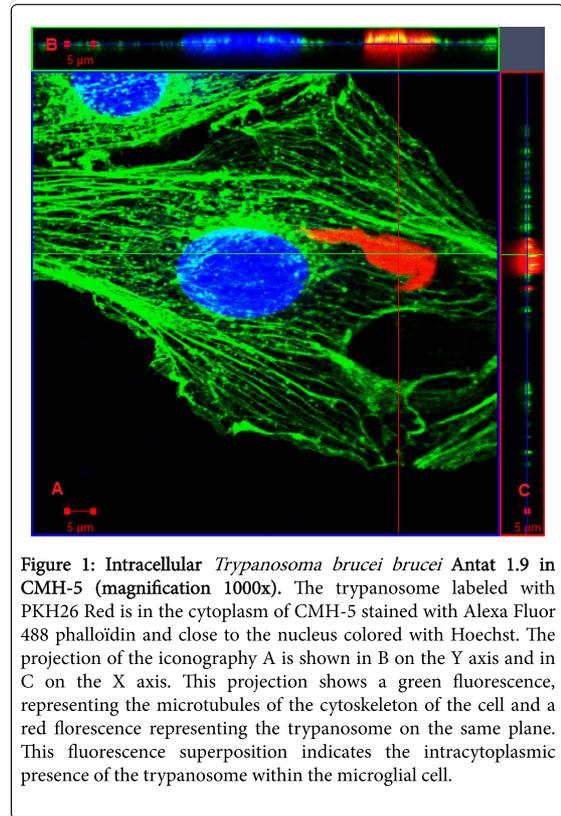


Figure 1: Intracellular *Trypanosoma brucei brucei* Antat 1.9 in CMH-5 (magnification 1000x).

The trypanosome labeled with PKH26 Red is in the cytoplasm of CMH-5 stained with Alexa Fluor 488 phalloidin and close to the nucleus colored with Hoechst. The projection of the iconography A is shown in B on the Y axis and in C on the X axis. This projection shows a green fluorescence, representing the microtubules of the cytoskeleton of the cell and a red fluorescence representing the trypanosome on the same plane. This fluorescence superposition indicates the intracytoplasmic presence of the trypanosome within the microglial cell.

Controls were used to verify that cells were viable, that they grew well and that the stain did not modify their morphology (Figure 2A). *Trypanosoma brucei brucei* Antat 1.9 was specifically observed with a Zeiss LSM880 confocal microscope with the airyscan module to enhance the resolution (Figure 2B).

Results and Discussion

After co-incubation with labeled (red) *T. b. brucei* Antat 1.9 and CMH-5 during 3 h, CMH-5 actin cytoskeleton and nuclei were stained and a random screening of slides by confocal microscopy made it clear that some *T. b. brucei* were found present in CMH-5 even after several extensive washes. The present study demonstrated that *T. brucei* can infect microglial cells in the human CNS. The presence of trypanosomes inside cells, in an intra-cytoplasmic position, was confirmed by an overlay of trypanosome-labeled fluorescence and CMH-5 cytoskeletal microtubule labeled fluorescence (Figure 1). The optical series (Figure 3) also showed the presence of trypanosomes at each step and throughout the entire cell thickness. This image sheet confirms the intracellular presence of the trypanosome.

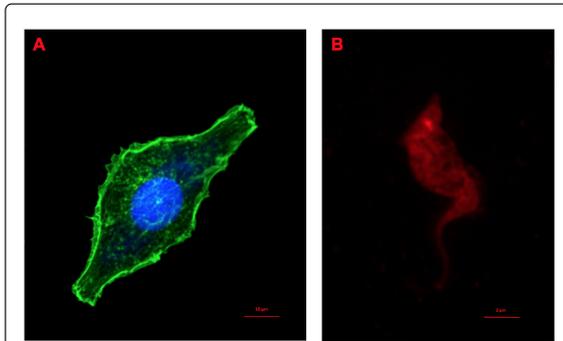


Figure 2: CMH-5 observed by confocal microscopy (magnification 1000x) without co-infection with *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.9. **A)** Human Microglial Cell (CMH-5) from a control well. The nucleus is colored in blue with the Hoechst and the actin filaments of the cytoskeleton are colored green with Alexa Fluor 488 phalloidin. **B)** *Trypanosoma brucei brucei* observed in Airyscan by confocal microscopy, prior to co-culture with the cells. The lipid region of the protozoa membrane is stained a yellow- orange fluorescent dye with long aliphatic tails (PKH26).

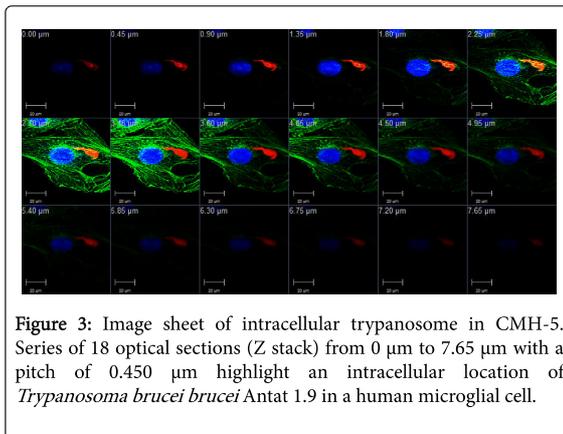


Figure 3: Image sheet of intracellular trypanosome in CMH-5. Series of 18 optical sections (Z stack) from 0 µm to 7.65 µm with a pitch of 0.450 µm highlight an intracellular location of *Trypanosoma brucei brucei* Antat 1.9 in a human microglial cell.

The preliminary results presented in this short communication did not allow us to define a frequency of cellular invasion by the parasite. However, the presence of the trypanosome in the intracellular position could be observed only a small number of times, so it appears that the entry of the trypanosome into the cell is a rare event.

Microglia represents the endogenous brain defense and immune system, which is responsible for CNS protection against various types of pathogenic factors such as parasites [11]. Activation of microglia is a hallmark of brain pathology but it can be used by infectious agents as transporters [12,13]. Our study demonstrates that a strain of *Trypanosoma* can infect brain macrophages, which naturally play an essential role in the propagation of neuro-inflammation but also has migratory properties.

In a previous report, Grab et al. already demonstrated paracellular traversal of African trypanosomes (*T.b. gambiense* and *brucei*) across

the human BBB. The cell models used to identify this migration were human brain microvascular endothelial cells. This intracellular form has long been challenged in HAT research, although it is unclear at this time how important this intracellular form is in human CNS. Intracellular detection of trypanosomes (Figure 1) highlights the ability of this non-human parasite to cross over the human cell membrane. Our study should be completed to show that *T.b. gambiense* and *rhodesiense* have the same abilities as *T.b. brucei* to cross the BBB and to elucidate mechanisms used by trypanosomes to invade cells.

In 2006, Nikolskaia et al. showed that *T.b. gambiense* could cross the BBB [14] and, once in human BMEC, they are protected from drugs and host immune responses. Furthermore, *T.b. gambiense* is able to use paracellular and transcellular routes to cross the barrier during an *in vitro* study [3]. Before that, others studies have shown the presence of *T.b. rhodesiense* in the cells of choroid plexus epithelium [15]. This crossing might be possible because of the presence of an enzyme, serine oligopeptidase [16], which is similar to an enzyme in *T. cruzi* implicated in the calcium mediated intracellular penetration of host cells [17]. Another enzyme found in *Leishmania* called *Leishmanial* GP63 could be implicated also in this internalization phenomenon [18]. To understand the mechanisms used by this parasite to invade the CNS, in 2017, Namayanja et al. studied *T.b. brucei* with two different types of canine and human dermal cells (MDCK II and HDMEC) mimicking biological barriers. They found that *T.b. brucei* could use two mechanisms: paracellular and transcellular migration across biological host barriers [5]. Similarly, they showed the formation of structures called “possible cuplike structures” when the parasites are going through HDMEC. These structures play a key role in the transcellular route of migration. Moreover, the trypanosomes are able to modify their morphology and their flagella to pass across membrane barriers [5].

Other aspects of this study need to be addressed. One of them is the viability of trypanosomes when they are intracellular. We do not have information concerning their viability and their capacity to multiply if they leave the intracellular compartment. It is tempting to speculate that trypanosomes that have adapted to life in the bloodstream of mammals can adapt to a different environment such as the cell compartment. The intracellular trypanosome life inside human CNS cells could be a new mechanism to escape the immunological host response. The intracellular medium could represent a refuge for trypanosomes to escape from CSF lymphocytes and cytokines due to the immune response as well as the therapeutic trypanocidal molecules present in the CSF following stage 2 treatment. It would now be interesting to determine whether or not *T.b. brucei* is able to exit the cell. This may explain how, following appropriate neurological therapy, the parasite could re-infect different biological fluids and explain some relapse cases.

However, caution must be taken when extrapolating these results to *in vivo* situations during human disease which is certainly more complex. But we can now affirm that *T.b. brucei* Antat 1.9 can enter CMH-5. It is conceivable that trypanosomes can cross the human BBB *via* different cells types and not only *via* disruption of the endothelial tight junctions or anatomical weaknesses. Otherwise, these results need to be confirmed and extended, in particular by real-time observation of living cells and trypanosomes during co-culture. It will also be interesting to see the behaviour of trypanosomes in contact with a larger panel of human cells and for different duration of co-incubation.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin. The authors express thanks to Claire Carrion (BISCEM core facility, GEIST, Limoges, France) for her technical help in confocal microscopy imaging. The authors would like to thank J. Cook-Moreau for is technical and scientific assistance.

References

1. Baral TN (2010) Immunobiology of African trypanosomes: need of alternative interventions. J Biomed Biotechnol 2010: 389153.
2. Bacchi CJ (2009) Chemotherapy of human african trypanosomiasis. Interdiscip Perspect Infect Dis 2009: 195040.
3. Grab DJ, Nikolskaia O, Kim YV, Lonsdale-Eccles JD, Ito S, et al. (2004) African trypanosome interactions with an in vitro model of the human blood-brain barrier. J Parasitol 90: 970-979.
4. Mogk S, Boßelmann CM, Mudogo CN, Stein J, Wolburg H, et al. (2016) African trypanosomes and brain infection – the unsolved question. Biol Rev Camb Philos Soc 1.
5. Namayanja M, Dai Y, Nerima B, Matovu E, Lun ZR, et al. (2017) *Trypanosoma brucei brucei* traverses different biological barriers differently and may modify the host plasma membrane in the process. Exp Parasitol 174: 31-41.
6. Pham YT, Gimenez F (2001) Capture, efflux et modulation du transport des médicaments au niveau cérébral. J Pharm Clin 20: 52-63.
7. Lonsdale-Eccles JD, Grab DJ (2002) Trypanosome hydrolases and the blood-brain barrier. Trends Parasitol 18: 17-19.
8. Grandgenett PM, Otsu K, Wilson HR, Wilson ME, Donelson JE (2007) A function for a specific zinc metalloprotease of African trypanosomes. PLoS Pathog 3: 1432-1445.
9. Masocha W, Robertson B, Rottenberg ME, Mhlanga J, Sorokin L, et al. (2004) Cerebral vessel laminins and IFN-gamma define *Trypanosoma brucei brucei* penetration of the blood-brain barrier. J Clin Invest 114: 689-694.
10. Baltz T, Baltz D, Giroud C, Crockett J (1985) Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. EMBO J 4: 1273-1277.
11. Rustenhoven J, Park TIH, Schweder P, Scotter J, Correia J, et al. (2016) Isolation of highly enriched primary human microglia for functional studies. Sci Rep 6: 19371.
12. Mammari N, Vignoles P, Halabi MA, Darde ML, Courtioux B (2014) In Vitro Infection of Human Nervous Cells by Two Strains of *Toxoplasma gondii*: A Kinetic Analysis of Immune Mediators and Parasite Multiplication. PLoS One. 9: e98491.
13. Capuccini B, Lin J, Talavera-López C, Khan SM, Sodenkamp J, et al. (2016) Transcriptomic profiling of microglia reveals signatures of cell activation and immune response, during experimental cerebral malaria. Sci Rep 6: 39258.
14. Nikolskaia OV, Kim YV, Kovbasnjuk O, Kim KJ, Grab DJ (2006) Entry of *Trypanosoma brucei gambiense* into microvascular endothelial cells of the human blood-brain barrier. Int J Parasitol 36: 513-519.
15. Abolarin MO, Evans DA, Tovey DG, Ormerod WE. (1982) Cryptic stage of sleeping-sickness trypanosome developing in choroid plexus epithelial cells. Br Med J (Clin Res Ed) 285: 1380-1382.
16. Morty RE, Lonsdale-Eccles JD, Mentele R, Auerswald EA, Coetzer TH (2001) Trypanosome-derived oligopeptidase B is released into the plasma of infected rodents, where it persists and retains full catalytic activity. Infect Immun 69: 2757-2761.
17. Caler EV, Vaena de Avalos S, Haynes PA, Andrews NW, Burleigh BA (1998) Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. EMBO J 17: 4975-4986.
18. LaCount DJ, Gruszynski AE, Grandgenett PM, Bangs JD, Donelson JE (2003) Expression and function of the *Trypanosoma brucei* major surface protease (GP63) genes. J Biol Chem 278: 24658-24664.

1.6.3.2.2. Réponse immunitaire de l'hôte

Certaines manifestations neurologiques spécifiques peuvent être expliquées par l'infiltration diffuse, périvasculaire et non spécifique de lymphocytes, de cellules plasmiques et de macrophages dans le système nerveux. Des infiltrations de cellules de Mott avec des vacuoles remplies d'IgM sont aussi observées (Greenwood et al., 1976; Greenwood and Whittle, 1980). Cette infiltration cellulaire est plus marquée dans la substance blanche, la moelle épinière et le système nerveux périphérique (Dumas and Bisser, 1999).

Selon Owens et al. (2005) les cellules de l'immunité (lymphocyte T naïf et mémoire) présentes au niveau du SNC, même si elles sont peu nombreuses chez un individu sain (le cerveau étant un site de privilège immun), peuvent être activées et sont capables de développer une réponse immunitaire. Le SNC a également la capacité de développer des réponses immunitaires innées par l'intermédiaire de cellules gliales activées par la signalisation des TLR. Cette réponse gliale innée est requise pour une protection immédiate et inflammatoire ainsi que dans les processus de réparation et de régénération du SNC. De plus, lors d'une infection, il y a des échanges de stimuli entre le sang et le cerveau (parenchyme cérébrale et hypothalamus). Ces échanges permettent de maintenir l'homéostasie lors de réactions immunitaires systémiques (Rivest et al., 2000). Ces signaux passent par la BHE. En considérant l'altération de cette barrière induite par le trypanosome, il est probable que cet échange de stimuli soit altéré (Bisser et al., 2006). Une protéine soluble dérivée du parasite est impliquée dans l'apoptose des cellules endothéliales (TAF pour *Trypanosome Apoptotic Factor*), ce qui favorise la fragilisation de la BHE. Ce phénomène d'apoptose va induire l'expression de molécules d'adhésions cellulaires (ICAM-1 et VCAM-1) par les cellules endothéliales ce qui amplifie le processus pathologique (Girard et al., 2005).

Les trypanosomes vont préférentiellement franchir la BHE aux endroits où elle est la plus perméable, ce qui inclut les organes circumventriculaires car ils possèdent des capillaires fenestrés. Les parasites vont ensuite se disséminer dans les tissus proches et l'atteinte de ces tissus correspond aux symptômes observés. L'altération des réflexes émétiques et la survenue de nausées peuvent être provoquées par une atteinte de l'*area postrema* (Mogk et al., 2016). Par ailleurs, une atteinte au niveau de la glande pinéale peut induire une sécrétion dérégulée de la mélatonine entraînant une somnolence progressive et la fragmentation du sommeil. Les trypanosomes sont également capables de produire et de sécréter de la prostaglandine D2 (Figarella et al., 2005), qui peut être partiellement responsable des niveaux élevés de prostaglandine D2 enregistrés chez des patients atteints de THA au stade 2 (Pentreath et al., 1990). La prostaglandine D2 induit le sommeil et peut également être impliquée dans la dérégulation du cycles nyctémérale (Urade and Hayaishi, 2011).

Comme dans le sang, les lymphocytes T (résidents du SNC et infiltrés à partir du sang) vont produire de l'INF- γ . Cette cytokine va dans les premiers temps de l'infection du SNC contrôler la parasitémie mais va aussi être impliquée dans la pathogénèse de la douleur (Kristensson et al., 2002). Le TNF- α joue également un rôle physiopathologique important. Il contribue à l'altération de la BHE et à l'infiltration de cellules immunitaires dans le SNC. Pour limiter la surproduction de TNF- α au niveau du cerveau, une cytokine proinflammatoire est produite en grande quantité : l'IL-10 (MacLean et al., 2001; Bisser et al., 2006). Toutefois, il a été montré que la présence et la surproduction de protéines inflammatoires (TNF- α et INF γ) ainsi que de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 sont à l'origine de manifestations cliniques de la THA (Rhind and Shek, 1999). Il a aussi été décrit que la production en continue de NO (via les NO synthétases) induit un effet toxique au niveau du SNC et entraîne des altérations de la signalisation neuronale au niveau synaptique conduisant à des troubles neurologiques (Keita et al., 2000). Le NO (et des éléments associés tels que la peroxinitrite) pourrait aussi être impliqué dans l'apoptose des cellules inflammatoires du cerveau, ce qui d'un coté permet de réguler la réponse immunitaire mais d'un autre coté a un effet protecteur sur le parasite (Reist et al., 1998).

Il existe également des réactions croisées, dûes à l'existence de molécules parasitaires présentant un mimétisme avec des molécules du SNC. En luttant contre le parasite, le système immunitaire de l'hôte va produire des anticorps qui vont se révéler être des auto-anticorps. Ces auto-anticorps sont dirigés contre le L-tryptophane qui est un précurseur de la sérotonine (Okomo-Assoumou et al., 1995). La sérotonine est une mono-amine impliquée dans la régulation du cycle circadien, du stress et de l'anxiété. D'autres cibles de ces auto-anticorps sont les galactocérébrosides, qui sont les lipides constituant de la gaine de myéline (Amevigbe et al., 1992). Ceci peut expliquer la démyélinisation observée au stade 2 de la maladie ainsi que des symptômes tels que les troubles moteurs, les tremblements et des syndromes parkinsoniens (Enanga et al., 2002). On note également la production d'auto-anticorps dûs à une réaction croisée entre le neurofilament humain et un épitope présent au niveau du flagelle du trypanosome (Ayed et al., 1997). Le neurofilament est un élément structurel qui détermine la taille et la forme des neurones ainsi que le calibre des axones (Letourneau, 1989). La présence d'anticorps anti-neurofilament pourrait intervenir dans la physiopathologie de la THA en causant des dommages au niveau des neurites (Lejon et al., 1999).

Il subsiste encore des interrogations sur l'explication biologique de certains symptômes de la THA comme les troubles de la marche et les paralysies des nerfs de la face (Bruzzzone et al., 2009). Il est probable que l'ensemble des troubles neurologiques soit imputables à des substances sécrétées par le parasite, par le système immunitaire de l'hôte ou par un effet



concomitant de ces deux facteurs (Kristensson et al., 2010; Mogk et al., 2016). Les différents mécanismes immunitaires intervenant au cours du stade neurologique de la THA sont résumés sur la figure suivante (Figure 12).

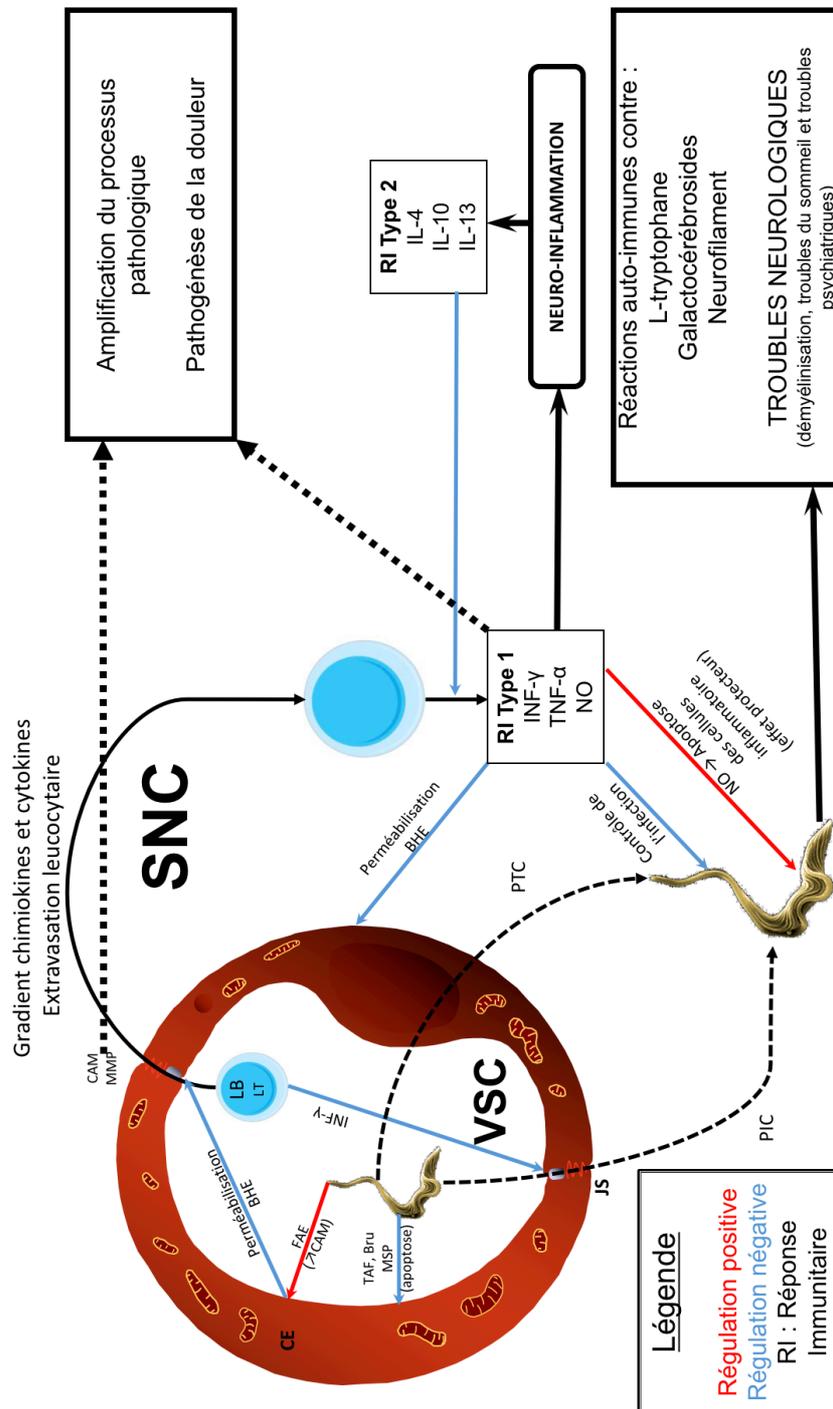


Figure 12 : Représentation simplifiée de la réponse immunitaire au cours du stade 2 de la THA.

VSC : Vaisseau sanguin cérébral, **SNC** : Système nerveux central, **CE** : Cellule endothéliale, **JS** : Jonction serrée, **PIC** : Passage intracellulaire, **PTC** : Passage transcellulaire, **Le** : leucocyte, **TAF** : Trypanosome Apoptotic Factor, **Bru** : Brucipaine, **MSP** : Métalloprotéase de surface parasitaire, **FAE** : Facteur d'activation de l'endothélium

1.6.4. La théorie du stade intermédiaire

La THA à *T. b. gambiense*, est classiquement décrite avec une évolution en deux stades : le stade hémolympatique et le stade nerveux. Toutefois, ces 2 stades ne reflètent pas toujours la réalité clinique et physiopathologique des patients. Par exemple, on a pu observer la survenue de troubles du sommeil et de troubles neurologiques chez des patients en stade 1 (Bertrand et al., 1974; Boa et al., 1988; MacLean et al., 2012). Des analyses ont également montré une neuroinflammation, une dysfonction de la BHE ainsi que la synthèse d'IgM, IgG et d'anticorps spécifiques du trypanosome au niveau intrathécale chez certains patients en stade 1 (Bisser et al., 2002; Lejon et al., 2003; Lejon and Büscher, 2005). Par ailleurs, chez certains patients, où le trypanosome a été retrouvé dans le LCR, la cytorachie n'est pas augmentée (< 5 cellules/ μ L) (Lejon et al., 2003). Enfin, certaines études font également état de patients présentant des trypanosomes dans leur LCR (sans augmentation de la cytorachie) traités avec succès grâce à des molécules actives uniquement sur les premiers stades de la maladie (Doua et al., 1996; Pépin and Milord, 1994; Ruiz et al., 2002).

Tous ces éléments conduisent à s'interroger sur l'existence d'un stade intermédiaire (Pépin and Milord, 1994; Doua et al., 1996; Lejon et al., 2003). Ce stade qui serait marqué par l'identification de parasites dans le LCR sans augmentation de la cytorachie (< 5 cellules/ μ L) ou bien par une cytorachie comprise entre 5 et 20 cellules/ μ L de LCR sans parasite (Lejon et al., 2003). Ce stade de la maladie n'est actuellement pas reconnu par l'OMS et les patients présentant ces caractéristiques sont considérés en stade 2 de la maladie. Ce stade est également décrit dans la littérature sous le nom de « stade 2 précoce » ou stade « nerveux précoce » (Doua et al., 1996; Lejon et al., 2003; Kennedy, 2008; MacLean et al., 2012).

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer les caractéristiques cliniques et physiopathologiques du stade intermédiaire :

Ce stade représenterait l'étape où les parasites viennent de traverser la BHE, avec un possible passage intracellulaire du parasite (Nikolskaia et al., 2006b; Bonnet et al., 2017a; Namayanja et al., 2017). La présence du parasite à l'intérieur des cellules endothéliales constitutives de la BHE et la réponse immunitaire que cela entraîne pourrait expliquer la neuro-inflammation précoce.

Il a été montré que les trypanosomes franchissent la BHE préférentiellement là où elle est la plus perméable, y compris au niveau des organes circumventriculaires. Toutefois, les parasites qui franchissent les vaisseaux sanguins à ce niveau sont confinés dans les organes circumventriculaires car ils sont bloqués par les tanocytes qui forment une barrière physique

(Mogk et al., 2014, 2016). Là encore, la présence de parasites à l'interface du parenchyme cérébral et de la circulation sanguine pourrait expliquer la neuro-inflammation précoce.

Enfin, la perméabilisation de la BHE induite par le trypanosome pourrait permettre le passage de molécules efficaces sur le stade 1. Ceci pourrait expliquer, lorsque la parasitémie est faible au début de l'invasion du SNC, la guérison des patients présentant des trypanosomes dans le LCR ou une cytorachie augmentée avec des traitements de stade 1.

1.7. Le diagnostic

Le diagnostic de la THA et ensuite le diagnostic de stade de la maladie sont des étapes clés dans l'orientation du choix thérapeutique car le traitement est à la fois espèce et stade dépendants. De plus, ce diagnostic doit être réalisé le plus tôt possible, dans l'idéal avant le passage du trypanosome dans le SNC. Il est aussi indispensable que les outils permettant le diagnostic de la THA et le diagnostic de stade soient utilisables sur le terrain pour les populations touchées. Ces outils doivent donc être capables de s'affranchir du matériel présent dans les infrastructures de soins urbains (électricité, zone stérile ...), doivent être utilisables par du personnel qui n'est pas forcément qualifié et surtout être acceptables économiquement pour les populations à risque. Sur le terrain, le diagnostic actif actuel de la THA repose sur un dépistage de toute la population présente dans la zone d'endémie. Concrètement, ce sont des équipes mobiles qui se déplacent au niveau des foyers et effectuent un dépistage de masse de la population. Cette méthode de dépistage sur le terrain nécessite des outils diagnostics sensibles, faciles à utiliser, rapides et peu coûteux. Les patients vont alors suivre une série d'exams suivant un arbre décisionnel permettant d'établir le diagnostic de la maladie puis le diagnostic de stade conduisant au choix thérapeutique.

1.7.1. Outils de diagnostic de la maladie utilisés actuellement

Actuellement, le diagnostic de la maladie repose essentiellement sur un dépistage actif de la population à l'aide d'outils de diagnostic indirect. Les cas suspects devront dans un second temps être confirmés par un diagnostic direct ou quand cela est possible par des outils de détection moléculaire. Les symptômes cliniques ne permettent pas à eux seuls de poser un diagnostic car ils sont aspécifiques de la THA. De plus, dans plusieurs zones d'endémie, la THA se superpose à d'autres parasitoses ou pathologies ayant des symptômes similaires ce qui complique là encore le diagnostic.

1.7.1.1 Outils de diagnostic indirect (détection d'anticorps)

1.7.1.1.1. Le CATT (*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*)

Le diagnostic de la maladie sur le terrain s'appuie dans un premier temps sur la recherche d'anticorps dirigés contre le trypanosome grâce à un test d'agglutination nommé CATT pour *Card agglutination test for trypanosomiasis* puis sur l'observation directe du parasite. Le CATT est un test à la fois sensible, simple, rapide et peu coûteux permettant la détection des anticorps (Ac) présents chez un individu et dirigés contre *T. b. gambiense* (Zillmann and Albiez, 1986). Les Ac développés par l'hôte en réaction à la présence du trypanosome sont principalement dirigés contre les VSGs. Certaines parties de ces VSGs, extrêmement antigéniques, vont être différentes à chaque vague de parasitémie et permettent de différencier le type de variant antigénique (VAT). Dans le cas de *T. b. gambiense*, 3 VAT ont été mis en évidence : LiTat 1.3, LiTat 1.5 et LiTat 1.6. Pour le CATT, les antigènes (Ag) utilisés pour la détection des Ac sont des Ag LiTat 1.3 isolés à partir de rats infectés puis colorés et lyophilisés (Magnus et al., 1978). Ce test est réalisé sur le terrain directement sur du sang total prélevé grâce à une piqûre au bout du doigt du patient. Le sang est mélangé à un réactif contenant l'Ag (lyophilisat d'Ag LiTat 1.3 reconstitué au moment du test) et mis sous agitation cinq minutes à 60 rpm. Un résultat positif se traduit par une agglutination visible à l'œil nu (**Figure 13**). Le CATT est l'outil de prédilection de tous les programmes de dépistage en raison de sa facilité d'utilisation mais aussi de sa fiabilité. La sensibilité de ce test est de 91% (IC = 78%-99,8%) et la spécificité est de 97%. Toutefois cette spécificité est à nuancer car la valeur prédictive positive diminue très largement dans des zones où la prévalence globale de la THA à *T. b. gambiense* est faible du fait de faux positifs obtenus avec des patients pouvant être atteints d'autres parasitoses (paludisme et filariose) (WHO, 2013). Le CATT est donc un outil diagnostique hautement sensible mais avec une spécificité insuffisante en zone de faible prévalence (Checchi et al., 2011).



Figure 13 : Test sérologique CATT (*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*).

Ce test d'agglutination peut cependant être mis en défaut dans certains cas de figure, notamment dans le cas où le dépistage du patient a lieu pendant « la fenêtre sérologique d'apparition des Ac » (délai de formation des Ac), soit dans les quatre premières semaines de l'infection où les Ac ne sont pas encore détectables (Lestrade-Carluer de Kyvon, 2015). Par ailleurs, comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe précédent, des réactions croisées sont possibles avec des Ac dirigés contre d'autres pathologies parasitaires entraînant des faux positifs (WHO, 2013). Nous avons vu précédemment que les Ag utilisés lors du CATT pour la détection des Ac sont des Ag LiTat 1.3. Le CATT est donc beaucoup moins sensible dans les zones où les parasites n'expriment pas cet épitope particulier. C'est le cas dans des foyers présents au Cameroun (Dukes et al., 1992) et en Ouganda (Enyaru et al., 1998). Ajouté à cela, la conception même du CATT peut être source d'erreurs. En effet, les VATs LiTat 1.3 et LiTat 1.5 sont obtenus à partir de trypanosomes et peuvent présenter, même après purification, des épitopes non spécifiques responsables de réactions croisées. Ce sont des éléments non exposés lorsque le parasite est vivant pouvant augmenter le nombre de faux positifs et donc diminuer la sensibilité du CATT (Lestrade-Carluer de Kyvon, 2015). Enfin, d'autres contraintes logistiques et pratiques entrent en ligne de compte. Les flacons de réactifs doivent être conservés à 4°C. Une fois reconstitué, le réactif permet d'effectuer 50 tests et peut être conservé au maximum une semaine entre 2 et 8°C. Il est donc obligatoire de disposer d'un système réfrigérant car à des températures élevées (37°C), le réactif ne peut être conservé que 8 heures. En dernier lieu, pour assurer l'étape de rotation à 60 rpm pendant 5 min, une alimentation électrique est nécessaire. Il faut donc prévoir une source d'électricité nomade dans le cas de zone dépourvue de réseau électrique, comme par exemple la batterie d'une voiture.

Il existe plusieurs variantes au CATT qui ont été adaptées du test original. Le CATT-P réalisé sur du plasma dilué de manière séquentielle de deux en deux ce qui permet une titration du CATT et ainsi l'augmentation de la spécificité de ce test tout en maintenant une sensibilité acceptable (Checchi et al., 2011). Le CATT-FP pour CATT *filter paper*, est un test sérologique réalisé sur un prélèvement de sang préalablement séché sur un papier filtre et réhydraté au moment du test à l'aide d'un tampon. Cette variante du CATT permet de réaliser un dépistage y compris dans les zones totalement impossibles d'accès ou dans les zones extrêmement reculées où les moyens logistiques (absence d'électricité) ne permettent pas de réaliser le CATT. Les papiers filtres (avec du sang coagulé) peuvent être récoltés sur le terrain puis conservés et acheminés vers un laboratoire pour être testés. Toutefois cette méthode présente des limites, par exemple les échantillons sur papiers filtres doivent être conservés à 4°C pour que le test conserve une bonne sensibilité, il faut donc utiliser du matériel approprié à la réfrigération ce qui est parfois impossible sur le terrain (Truc et al., 2002). Enfin, le Test latex/*T. b. gambiense* est un test d'agglutination où, cette fois-ci, les Ag sont fixés à la surface de billes de latex (Büscher et al., 1991). Pour ce test, les trois Ag sont présents à la surface des billes (LiTat 1.3, LiTat 1.5 et LiTat 1.6) ce qui rend cet outil diagnostic plus spécifique (de 96 à 99%) mais moins sensible (de 71 à 100%) que le CATT (Büscher et al., 1999). Cette sensibilité plus ou moins aléatoire explique le fait que le test Latex ne soit pas utilisé en première intention sur le terrain (Chappuis et al., 2005).

Récemment, un nouveau format de CATT a été développé : le CATT-D10 (Hasker et al., 2010). Il est constitué avec les mêmes Ag que le CATT classique mais utilise un milieu de lyophilisation différent. Il reste stable s'il est conservé à température ambiante et dans un endroit sec. Cette version thermostable du test est actuellement considérée comme le meilleur outil de screening sur le terrain (Mitashi et al., 2012).

1.7.1.1.2. Test d'immuno-trypanolyse

Le test d'immuno-trypanolyse (Liu et al., 1989) est un test basé sur la lyse du parasite médié par le complément. Il repose sur la reconnaissance des épitopes des VSG (VATs) à la surface des parasites par des Ac spécifiques contenus dans le sérum ou le plasma du patient. La très grande spécificité de ce test en fait un test de référence (gold-standard) (Jamonneau et al., 2010). Il permet, dans les zones dotées de cet outil, de confirmer la présence du parasite chez le patient à la suite d'un CATT non confirmé par l'examen parasitologique. Il est aussi utilisé pour le contrôle qualité des tests sérologiques de terrain.

Toutefois ce test est réservé aux laboratoires de référence car il oblige la mise en place et l'utilisation de clones de trypanosomes vivants qui peuvent être entretenus uniquement dans une animalerie (Camara et al., 2014). De plus, pour que ce test soit valide, les échantillons de sérums des patients doivent être congelés avant d'être acheminés au laboratoire de référence. Des études menées en 2014 par Camara et al., ont montré que l'utilisation de papier filtre pour le recueil du sang de patients était une bonne alternative.

1.7.1.1.3. Test d'immunofluorescence indirect (IFI)

Ce test consiste à faire réagir les Ac présents chez le patient avec des trypanosomes préalablement fixés sur une lame. Par la suite, après plusieurs lavages, une IgG anti-humaine couplée à un substrat est utilisée pour révéler la présence de complexes Ag (Trypanosomes)/Ac de l'hôte. Les lames sont ensuite fixées au glycérol et la fluorescence est observée à l'aide d'un microscope à fluorescence (Sadun et al., 1963). Par la suite, l'utilisation d'Ag stables et standards (LiTat 1.3 et 1.5) a permis d'améliorer la spécificité de ce test (91%) mais la sensibilité fluctue entre 76 et 95% (Mitashi et al., 2012). Le réel apport de ce test, par rapport au test précédent, est qu'il est utilisable sur le LCR en plus du sérum, du plasma et du sang récupérés sur papier filtre (Wery et al., 1970).

Ici encore, ce test ne fait pas parti de la panoplie utilisable sur le terrain en raison des contraintes pratiques et logistiques que nécessite sa mise en œuvre. En effet, pour cette technique il faut utiliser un microscope à fluorescence qui est un matériel onéreux ainsi qu'une grande quantité d'eau pure pour effectuer les différents lavages. Les réactifs sont eux aussi coûteux et doivent être conservés à 4°C avant utilisation. Toutes ces contraintes font de l'IFI un outil destiné uniquement à la surveillance et à la recherche en laboratoire. Toutefois, il est possible que l'évolution technologique permette un jour l'utilisation de cette technique sur le terrain avec le développement de microscopes portables munis de diodes photoémettrices (Biéler et al., 2012) ou encore de systèmes s'adaptant à des smartphones permettant la lecture de lames rapidement et simplement par fluorescence dans la lignée du CellScope Loa® (D'Ambrosio et al., 2015).

1.7.1.1.4. Test immuno-enzymatique ou ELISA

Ce test repose lui aussi sur la reconnaissance d'Ag parasites, déposés et fixés au fond des puits d'une microplaque à l'aide d'une solution protéique, par les Ac contenus dans le sérum, le plasma, ou le LCR de l'hôte. Une fois le complexe immun formé, la plaque est lavée et le conjugué IgG anti-humaine-enzyme est ajouté. Après un nouveau lavage, le substrat

chromogène de l'enzyme est ajouté. La présence d'Ac spécifiques dirigés contre le trypanosome est révélée par une réaction colorée quantifiable par mesure de la Densité Optique (DO). Comme pour les techniques de diagnostic sérologique indirect présentées précédemment, la sensibilité de ce test dépend des Ag trypanosomiens utilisés. Cette sensibilité oscille entre 95% et 100% pour une spécificité entre 97% et 100% (WHO, 2013).

Une fois de plus, cet outil n'est pas adaptable aux conditions de terrain car il requière l'utilisation d'un spectrophotomètre et d'eau pure en grande quantité pour les nombreux lavages. Il est à noter que des ELISA (direct et indirect) utilisables sur la salive de patients ont été testées et ont montré des résultats très encourageant (Lejon et al., 2006). En effet, l'ELISA indirect (Ac secondaire dirigé contre les IgG humain) sur de la salive de patients diluée au 20^{ème} présente une sensibilité de 96% et une spécificité de 95%. De plus, lorsque cette ELISA indirect est comparé au CATT utilisé sur le terrain on n'observe aucune différence de sensibilité mais la spécificité de l'ELISA est supérieure au CATT. L'utilisation de fluides biologiques tels que la salive pourrait simplifier grandement le recueil des échantillons lors des campagnes de dépistage.

1.7.1.2 Examen parasitologique (détection du parasite)

En cas de suspicions de THA à *T. b. gambiense* révélée par une détection sérologique, le diagnostic doit obligatoirement être confirmé par un examen parasitologique direct pour confirmer la présence du trypanosome dans l'organisme du patient. De plus, seul l'observation du trypanosome dans le LCR permet de faire la distinction entre un patient en stade 1 et un patient en stade 2. La détection du parasite est donc, à l'heure actuelle, une étape obligatoire du diagnostic de la THA. L'observation de trypanosomes est complexe sur le terrain car il faut que le prélèvement soit examiné dans un délai très court n'excédant pas une heure pour éviter la stabilisation et la lyse du parasite. Il faut donc prévoir la logistique pour installer un microscope dans le village prospecté. A ceci s'ajoute la difficulté de détection du parasite due à la faible charge parasitaire dans le cas d'infection à *T. b. gambiense*. Différentes techniques ont été développées pour tenter d'augmenter cette limite de détection.

1.7.1.2.1. Observation directe du parasite par microscopie optique

La mise en évidence du parasite dans le cadre du diagnostic de la maladie peut être effectuée par microscopie optique dans le cas d'une observation d'une goutte épaisse ou de suc ganglionnaire. L'examen de base est la technique de la goutte épaisse suivi d'une coloration au Giemsa. A la suite de cette coloration, le corps cellulaire du trypanosome apparaît en bleu

et le noyau et le kinétoplaste sont colorés en rouge. Pour qu'un test en goutte épaisse soit considéré comme positif il faut que l'observateur soit capable d'identifier un parasite dont le noyau, le kinétoplaste et le flagelle sont colorés et ayant une morphométrie semblable à celle du trypanosome (Laveissière and Penchenier, 2000). La sensibilité de ce test est faible ; sur le terrain la limite de détection de ce test est estimée entre 5 000 et 10 000 parasites par mL de sang (WHO, 2013). Pour mieux distinguer le parasite, et donc augmenter la sensibilité de ce test, il est possible de réaliser une lyse des hématies avant la coloration à l'aide d'un tampon lytique (Biéler et al., 2012).

En présence d'adénopathies cervicales palpables, un symptôme évocateur de la THA en zone d'endémie, il est possible de ponctionner le ganglion et d'observer le suc ganglionnaire entre lame et lamelle directement à l'état frais. La sensibilité est d'environ 60% (IC = 43-77%) car comme nous l'avons évoqué précédemment, la charge parasitaire d'un patient peut être très faible, le nombre de faux négatifs est donc élevé (WHO, 2013). De plus, la présence des ganglions cervicaux hypertrophiés n'est pas systématique, ce test ne peut donc pas être pratiqué. Il est aussi possible d'observer l'exsudat du chancre d'inoculation lorsque celui-ci est visible. Dans le cas de la THA à *T. b. gambiense* où la parasitémie peut être très faible, l'ensemble de ces tests basé sur l'observation directe du trypanosome dans différents fluides biologiques souffrent d'une faible sensibilité. L'une des solutions pour augmenter cette sensibilité est de passer par une étape de concentration du parasite.

1.7.1.2.2. La Centrifugation en Tube Capillaire (CTC)

La CTC est aussi connue sous le nom de technique de centrifugation en tube à micro-hématocrite (mHCT) ou technique de Woo (Woo, 1969). Cette technique est réalisée en centrifugeant 50 µL de sang mélangé à un anticoagulant dans un tube capillaire. Les trypanosomes ayant une densité similaire à celle des leucocytes, seront localisés après centrifugation au niveau de la phase leucocytaire. Ce test présente une sensibilité de 56% (IC = 48,3-64,5%) et permet d'abaisser le seuil de détection à 500 trypanosomes par mL de sang (Lutumba et al., 2006). Cette technique, bien que simple et rapide à réaliser, présente quelques limites. Tout d'abord, une centrifugeuse à micro-hématocrite est nécessaire et l'interprétation de ce test nécessite un personnel qualifié et expérimenté. Par ailleurs, les zones où sévit la THA sont souvent soumises à de nombreuses autres infections parasitaires, ce qui peut rendre l'interprétation du test difficile si des microfilaries mobiles sont présentes dans le sang (WHO, 2013).

1.7.1.2.3. La mini-colonne échangeuse d'anions (mAECT)

Ce test est basé sur la différence de potentiel de charge existante entre les trypanosomes et les autres cellules sanguines. Les cellules sanguines sont chargées négativement à pH physiologique (pH 8) alors que les parasites sont neutres de toute charge. La technique de la mini-colonne échangeuse d'anions ou mAECT (Lanham and Godfrey, 1970), pour *mini Anion Exchange Centrifugation Technique*, consiste à séparer ces deux éléments par chromatographie d'échange d'anions. Pour cette technique, un volume de sang compris entre 350 et 500 μL est filtré sur une colonne remplie de diéthylaminoéthylcellulose (DEAE cellulose). Après filtration, les cellules sanguines sont retenues par la DEAE cellulose en raison de leurs charges électriques alors que les parasites la traversent et sont récupérés dans l'éluât. L'éluât est récupéré dans un tube et centrifugé à faible vitesse. Les tubes d'éluât sont effilés à leurs extrémités pour pouvoir être placés sur un portoir spécial et examinés au microscope (Figure 14).



Figure 14 : Mini Colonne échangeuse d'anions à gauche et le portoir pour l'observation au microscope de l'éluât.

Document non libre de droits, non reproduit par respect du droit d'auteur

Cette technique de séparation permet de détecter des parasites lorsque la parasitémie est très faible (environ 30 trypanosomes par mL de sang) avec une sensibilité diagnostique atteignant les 75% (IC = 67,7-81,9%). La technique comporte quelques points négatifs qui la rendent difficile à utiliser sur le terrain : elle est longue (environ 30 minutes), coûteuse et nécessite des moyens logistiques (centrifugeuse, microscope) (Lutumba et al., 2006). De plus, elle est

actuellement uniquement destinée au diagnostic de la THA, ce qui, sur un plan purement commercial, ne justifie pas totalement le maintien de sa production (WHO, 2013).

1.7.1.2.4. La Technique de la couche leuco-parasitaire (QBC)

La QBC (pour *Quantitative Buffy Coat*) a initialement été développée pour le diagnostic des hémoparasites, et adaptée ensuite principalement à la détection de *Plasmodium* et de *Trypanosoma* (Levine et al., 1989). Dans les zones où les deux pathologies co-existent, ce test permet un diagnostic concomitant de ces deux parasitoses (WHO, 2013). Cette technique associe une concentration des trypanosomes sanguins à une coloration fluorescente du parasite. C'est l'acridine orange qui est principalement utilisée pour colorer l'ADN du parasite (noyau et kinétoplaste) (Bailey and Smith, 1992). Pour cette technique, un volume d'environ 70 μ L de sang est centrifugé dans un tube capillaire contenant un cylindre flotteur recouvert d'EDTA et d'acridine orange. Après centrifugation, les trypanosomes sont concentrés au niveau de la couche leuco-plaquettaire (entre les hématies et le plasma) et sont révélés en vert à la lumière ultra-violette produit par un module LED (Kuhn et al., 2010) ou par une source de lumière froide passant à travers un filtre (Bailey and Smith, 1994). Cette méthode de détection est utilisable sur le terrain mais présente plusieurs désavantages à commencer par son prix car il faut être équipé d'une centrifugeuse, d'un microscope ayant la source lumineuse appropriée ainsi que de tubes capillaires spécifiques qui sont relativement chers. A ceci s'ajoute les difficultés logistiques à prévoir en raison de la fragilité de ces équipements lors du transport et la mise en place d'une pièce noire pour la lecture des résultats (WHO, 2013).

La QBC présente un seuil de détection compris entre 15 et 500 trypanosomes par mL de sang, pour une sensibilité proche de la mAECT comprise entre 69 et 92% (Truc et al., 1998). Il est possible de coupler les deux techniques en centrifugeant 5 mL de sang par QBC avant de filtrer 500 μ L de la couche leuco-plaquettaire par mAECT. Cette méthode se nomme mAECT-BC et permet d'abaisser le seuil de détection à 10 trypanosomes par mL de sang pour une sensibilité améliorée jusqu'à 96,5% (Camara et al., 2010).

1.7.1.3 Détection moléculaire

L'ensemble des techniques utilisées vont avoir pour but de mettre en évidence la présence du matériel génétique (ADN ou ARN) du parasite. La mise en évidence de ce matériel génétique passe par la reconnaissance d'une séquence cible et donc le choix de l'amorce appropriée ainsi que l'amplification de l'ADN ou de l'ARN du trypanosome. La sensibilité et la spécificité de ces tests sont donc intimement liées au choix de la séquence d'amorce. Cette amorce doit donc cibler une séquence :

- Unique, afin de ne détecter que l'élément recherché qui dans notre cas est le trypanosome.
- Suffisamment répétée pour que les séquences obtenues par amplification soient en quantité détectable.
- Suffisamment conservée dans le génome du parasite au cours de son évolution dans le but d'éviter les faux négatifs.

En fonction du choix de l'amorce il sera possible de détecter un parasite du groupe *Trypanozoon* ou plus spécifiquement une sous-espèce pathogène pour l'Homme. Dans notre cas, nous détaillerons uniquement les techniques capables de détecter *T. b. gambiense*.

Les outils de détection moléculaire représentent des tests très sensibles ayant l'avantage de pouvoir être pratiqués sur des échantillons (sang et LCR) mis en réserve (sang conservé sur papier buvard ou congelé). Toutefois, la plupart de ces tests ne sont pas adaptables au terrain en raison de leur complexité et sont réservés aux laboratoires de référence. L'amplification doit être précédée d'une étape de purification dans un endroit distinct (afin d'éviter les contaminations) du matériel génétique et nécessite un appareil capable de maintenir des cycles de chaleur. Ce sont des éléments difficiles à mettre en place sur le terrain (WHO, 2013). De plus, les acides nucléiques peuvent être des éléments très stables dans le temps et leur détection ne garantit pas la présence du parasite vivant au moment de l'examen. L'OMS recommande de ne pas prendre de décision thérapeutique uniquement en fonction des résultats de tests moléculaires, ces tests ne doivent être utilisés que pour identifier des cas suspects (WHO, 2013).

La séquence cible de choix pour la caractérisation de *T. b. gambiense* est le gène TgsGP pour *Trypanosoma gambiense-specific GlycoProtein* (Radwanska et al., 2002). Ce gène de 47 kDa code pour une glycoprotéine de surface exprimée au niveau de la poche flagellaire de *T. b. gambiense* Groupe 1 (Gibson et al., 2010). Ce gène est possiblement impliqué dans la résistance du parasite au sérum humain (Berberof et al., 2001; Capewell et al., 2013).

1.7.1.3.1. Amplification d'ADN par PCR

La réaction de PCR, pour *Polymerase Chain Reaction* ou Réaction de Polymérisation en Chaîne, permet d'amplifier des séquences cibles d'ADN pour qu'elles puissent être identifiées. Dans le cas de *T. b. gambiense*, il s'agit du gène TgsGP présent en faible nombre de copies, qui est amplifié. Lorsqu'un faible nombre d'ADN est disponible, il est possible d'augmenter la quantité d'ADN en amplifiant tout le génome grâce à une amplification par déplacements

multiples (Deborggraeve and Büscher, 2010). Un nombre important de copies de la séquence cible est ensuite produit par une réaction enzymatique contrôlée par des cycles de chaleur (environ 2 heures). L'amplicon est ensuite visualisé par migration sur gel d'agarose couplé à une coloration à l'aide d'un intercalant de l'ADN (bromure d'éthidium ou Midori Green).

La PCR sur sang est un outil très performant pour le diagnostic présentant une excellente sensibilité (99%) et spécificité (97,7%) mais est difficile à mettre en place sur le terrain en raison de sa complexité, de son coût et de la logistique nécessaire. Cette technique est donc réservée aux laboratoires de référence et de recherche. La PCR sur LCR est possible pour la détermination de stade mais présente une sensibilité et une spécificité plus faible (Mugasa et al., 2012).

Une PCR en temps réel a été développée par Becker et al en 2004 et permet d'abaisser le seuil de détection à 100 trypanosomes par mL de sang et peut être utilisée sur du sang conservé sur papier buvard. Ceci permet de collecter de façon simple les échantillons sur le terrain et de réaliser un diagnostic sensible et rapide ensuite en laboratoire. Un autre dérivé de la PCR a été développé par Deborggraeve et al en 2006, la HAT-PCR-OC pour *Human African Trypanosomiasis-PCR-OligoChromatography*. C'est un test simplifié utilisant une jauge à flux latéral pour la visualisation du produit de PCR à l'aide d'une hybridation avec une sonde marquée à l'or. Ce test permet de visualiser un résultat de PCR en 5 minutes et présente un seuil de détection équivalent à 1 trypanosome pour 180 µL de sang (5 fg d'ADN de *T. brucei*).

Toutefois, ces deux techniques PCR utilisent une séquence cible issue de *T. brucei* et donc ne permettent pas de diagnostiquer spécifiquement *T. b. gambiense* (Becker et al., 2004). Elles peuvent être aussi mises en défaut (faux positifs) en cas d'infection passagère par des trypanosomes non pathogènes.

1.7.1.3.2. Amplification d'ARN

Ce test, nommé NASBA, basé sur la détection de l'ARN ribosomique 16S commun au groupe *Trypanozoon* a été le précurseur du LAMP (Notomi et al., 2000). Cette technique introduite par Compton en 1991 permet l'amplification d'une séquence cible avec une température stable faible (40°C), elle a été adaptée ensuite à la détection du trypanosome en 2007.

La principale faiblesse de cette technique est la faible température d'hybridation qui augmente la probabilité d'hybridations non spécifiques et fait ainsi chuter la spécificité. Des méthodes de NASBA en temps réel (Mugasa et al., 2008) combinées à une oligochromatographie (Mugasa et al., 2009; Matovu et al., 2010) ont été développées. Ce test présente donc un seuil de

détection à 10 trypanosomes par mL de sang, une bonne sensibilité (entre 91% et 97%) mais une spécificité moyenne (entre 60% et 90%) (Mugasa et al., 2012). De plus, l'utilisation sur le terrain est compliquée en raison de l'instabilité de l'ARN utilisé pour la technique. Il est donc nécessaire de disposer d'un système réfrigérant permettant de contrôler la température. De surcroît, l'ARN utilisé pour cette technique ne permet pas de différencier les différentes sous espèces de trypanosomes. Des essais sur le terrain ont été menés en Ouganda et en RDC (Matovu et al., 2010) mais il n'existe aucun kit commercialisé (WHO, 2013).

1.7.2. Outils de diagnostic de la maladie en cours d'évaluation

1.7.2.1 Amplification isotherme à médiation par boucles

La technique du LAMP pour Loop-mediated isothermal amplification est une technique qui permet d'amplifier une séquence cible en s'affranchissant des cycles de chaleur. Une chaleur stable de 62 °C pendant 1 h est nécessaire. Le test du LAMP a été développé pour la détection des parasites du groupe *Trypanozoon* (Kuboki et al., 2003) mais aussi plus spécifiquement pour la détection de *T. b. gambiense* (Njiru et al., 2011). La détection de *T. b. gambiense* est réalisée principalement en ciblant le gène TgsGP mais des tests ont été développés pour cibler le gène 5.8S ribosomal RNA internal transcribed 2 (Nikolskaia et al., 2017). Le LAMP et la PCR en temps réel montrent des résultats homogènes (100%), ce qui en fait un outil de diagnostic puissant beaucoup mieux adapté au terrain puisqu'il n'y a plus besoin d'avoir à disposition un thermocycleur (Njiru et al., 2011). Toujours dans un souci d'adaptation de cette technique aux contraintes de terrain, plusieurs systèmes ont été élaborés pour s'affranchir de la lecture par électrophorèse (**Figure 15**).

La méthode de visualisation la plus couramment utilisée est le suivi par réaction colorée grâce à différents agents colorants ou fluorescents tels que le bleu d'hydroxynaphtol (Goto et al., 2009), la calcéine (Tomita et al., 2008) ou le SYBR® Green dye. Il est aussi possible de suivre la turbidité induite par la formation d'amplicons mais cette méthode de lecture abaisse fortement la sensibilité (Njiru et al., 2008; Wastling et al., 2010). Des études ont aussi été menées pour la mise au point d'un système avec flux latéral et bandelettes réactives : le LAMP-LFD (Njiru, 2011). Le LAMP, développé initialement en 2000 pour le diagnostic de la tuberculose (Notomi et al., 2000), est toujours en cours d'évaluation sur le terrain pour le diagnostic de la THA à *T. b. gambiense*.



Figure 15 : Méthode de visualisation de résultat de LAMP (LAMP-RIME) : **A** bandelettes réactives et **B** réaction colorée par SYBR® Green.
(Njiru, 2011)

Document non libre de droits, non reproduit par respect du droit d'auteur

1.7.2.2 Test de Diagnostic Rapide (TDR) et nouveaux antigènes

Les TDR ou Test de Diagnostic Rapide développés actuellement dans le cadre de la THA sont des tests basés sur la détection des Ac chez les patients par immunochromatographie après migration de l'échantillon le long d'une bandelette de nitrocellulose. Ces tests sont adaptés à plusieurs fluides biologiques tels que le sang, le sérum et le plasma et utilisent des VAT comme Ag. Là encore, la sensibilité est directement impactée par le choix de l'Ag. Actuellement les tests en cours de développement utilisent des Ag LiTat 1.3 et 1.5, soit séparément soit en les combinant. Le principe général du test est simple, une goutte de l'échantillon est déposée sur la bandelette (il peut être dilué avec un tampon) et va migrer le long de cette bandelette. Si l'élément à détecter est présent (Ag du parasite ou Ac dirigé contre ce parasite), il va se fixer sur l'Ac ou l'Ag correspondant faisant apparaître une bande colorée. Une seconde réaction doit aussi avoir lieu au niveau d'une bande contrôle pour garantir le bon déroulement de la procédure. Ce TDR est actuellement développé sous le nom de SD BIOLINE HAT® par FIND™ et Standard Diagnostic™. Il présente une sensibilité de 89,26% (IC = 83,27-93,94%) et une spécificité de 94,58% (IC = 95,20-94,94%) (Bisser et al., 2016).

Deux nouveaux prototypes sont étudiés en parallèle pour ce TDR :

- Le premier utilise des Ag LiTat 1.3 et 1.5 recombinants ce qui a pour but de simplifier la production du kit et donc de diminuer son prix (Sternberg et al., 2014). L'utilisation de protéines recombinantes permet aussi de limiter les réactions croisées avec des VSGs obtenues à partir de trypanosomes car elles ne miment que les épitopes spécifiques (elles sont aussi appelées mimitopes) (Van Nieuwenhove et al., 2012).
- Le deuxième met en jeu deux nouveaux Ag : ISG65 qui est une glycoprotéine de surface invariable détectée par spectrométrie de masse sur *T. b. gambiense* et *rhodesiense* (Ziegelbauer et al., 1992; Sullivan et al., 2013) et MITat 1.4 aussi appelé VSG117 (Sullivan et al., 2014). Un autre test, élaboré par Coris bioconcept™, labélisé HAT Sero-K-seT® est lui aussi en cours de validation sur le terrain en RDC (Büscher et al., 2014) et utilise les mêmes Ag que le SD BIOLINE HAT® (Büscher et al., 2013).

Les études menées sur les tests rapides de sérodiagnostic dans le cadre de la THA représentent un nouvel espoir car ils pourraient constituer un élément clé de la surveillance et du diagnostic passif de cette pathologie (Jamonneau et al., 2015).

1.7.3. Outils de diagnostic de stade de la maladie utilisés actuellement

La THA évolue classiquement en 2 stades. Le premier stade correspond à la prolifération et la dissémination du parasite dans le sang et la lymphe et le second stade correspond à l'envahissement du SNC par le parasite. Le diagnostic de stade est une étape extrêmement importante car elle conditionne la réussite thérapeutique, le traitement étant stade dépendant. Actuellement, le diagnostic de stade ne peut être posé qu'à la suite d'une ponction lombaire et l'examen du LCR. La ponction lombaire est un acte délicat, invasif et douloureux qui est réalisé, sur le terrain, dans des conditions d'asepsie bien loin des standards des pays du Nord (**Figure 16**). La procédure consiste à prélever à l'aide d'une aiguille du LCR au niveau des espaces intervertébraux entre la 3^e et la 4^e ou entre la 4^e et la 5^e vertèbre lombaire. Dans le cas d'une ponction lombaire de routine chez l'adulte, on prélève entre 8 et 15 mL de LCR (Johnson and Sexton, 2017).



Figure 16 : Réalisation d'une ponction lombaire dans le cas d'un diagnostic de stade de la THA, aseptie réalisée par simple application d'alcool sur la peau (photo Dr Sylvie Bisser).

Document non libre de droits, non reproduit par respect du droit d'auteur

Le véritable test diagnostique spécifique du stade 2 de la maladie est la confirmation de l'invasion neurologique par le parasite qui se traduit par la découverte de trypanosomes dans le LCR du patient, c'est le gold standard (Meirvenne, 1999). Toutefois la parasitémie dans le LCR peut être très faible et donc la détection du parasite manque de sensibilité. L'OMS a mis en place d'autres critères pour le diagnostic de stade de la maladie, basé sur la numération de leucocytes infiltrés dans le LCR (cytorachie) en réponse à une invasion de SNC par le parasite. Une cytorachie supérieure à 5 cellules/ μ L de LCR, sans confirmation de la présence du trypanosome dans le LCR, est révélatrice du stade 2 de la maladie (**Tableau 2**). L'augmentation de la cytorachie comme critère de stade 2 et la valeur exacte de la cytorachie sont sujets à controverse et ont donné lieu à des adaptations différentes selon les pays (Lejon et al., 2003, 2005; Kennedy, 2008, 2010).

Tableau 2 : Critères OMS pour le diagnostic de stade de la THA.
(WHO, 2013)

	Numération leucocytaire ou cytorachie	
	0-5 cellules/ μ L de LCR	≥ 6 cellules/ μ L de LCR
Absence de trypanosome	Stade hémolympatique	Stade nerveux
Présence de trypanosomes	Stade nerveux	Stade nerveux

1.7.3.1 Détection du parasite

La mise en évidence du parasite dans le LCR est le seul élément qui permet de classer un patient atteint de THA en stade 2, c'est le « gold standard » (Meirvenne, 1999). En pratique, la recherche de trypanosomes se fait sur chambre de comptage (sur lame de type Malassez, Fush-Rosenthal ou Neubauer) pendant la numération leucocytaire. C'est une technique qui est rapide et peu coûteuse mais qui présente une sensibilité faible. La faible sensibilité de ce critère, due à la faible parasitémie surtout dans le cas d'un stade nerveux précoce, peut être augmentée par centrifugation du LCR (Mumba Ngoyi et al., 2013). Le LCR doit être centrifugé immédiatement après la ponction afin que le parasite soit encore vivant et mobile ce qui facilite sa mise en évidence. La centrifugation ne doit pas excéder les 10 minutes et 3000 rpm (environ 1000 g) et peut être réalisée en tube à hématocrite, dans un tube collecteur de mAECT ou simplement dans une pipette pasteur dont l'extrémité est obturée à la flamme (Miézan et al., 2000).

1.7.3.2 Numération leucocytaire

La numération leucocytaire ou cytorachie lorsqu'elle est augmentée est le signe d'une inflammation du système nerveux central. Dans le cas du stade 2 de la THA, cette cytorachie se compose essentiellement de lymphocytes B (Greenwood et al., 1976). On peut aussi retrouver dans le LCR de grands plasmocytes remplis de vacuoles contenant des IgM nommées cellules de Mott, révélatrices du stade 2 de la THA (Greenwood and Whittle, 1980).

A l'état normal, le LCR ne contient que très peu de leucocytes ($< 3/\text{mm}^3$ de LCR). Il ne doit donc pas être dilué pour le comptage. La réalisation de la ponction lombaire peut entraîner des lésions au niveau des vaisseaux sanguins à l'endroit de la piqûre entraînant un LCR hémorragique pouvant gêner le comptage. La numération est réalisée sur chambre de comptage de type Fush-Rosenthal ou Neubauer le plus couramment (WHO, 2013). Une attention particulière doit être prise quant au volume de LCR utilisé ; toute erreur pouvant entraîner un mauvais diagnostic de stade. Des chambres de comptage jetables ont été développées pour retenir un volume de LCR déterminé et donc limiter ce type d'erreur (Mumba Ngoyi et al., 2013). Enfin, le seuil de normalité de la cytorachie est variable en fonction de l'âge : une cytorachie allant jusqu'à 20 cellules/ μL est considérée comme normale chez l'enfant de 1 à 4 ans ; une cytorachie allant jusqu'à 10 cellules/ μL est normale jusqu'à la puberté (Kjeldsberg and Knight, 1993).

Il est actuellement considéré par l'OMS, qu'un patient présentant une cytorachie supérieure ou égale à 6 éléments par μL de LCR, se trouve en stade 2 de la maladie, que la présence du

trypanosome soit confirmée ou non. A l'inverse, les patients présentant une numération leucocytaire comprise entre 0 et 5 éléments et en l'absence de trypanosome sont considérés en stade 1 de la maladie (**Tableau 2**). Dans le cas de la THA à *T. b. gambiense*, de nombreuses études remettent en cause ce seuil de 5 cellules/ μ L de LCR et revendiquent l'existence d'un troisième stade entre le stade 1 et le stade 2 (Lejon et al., 2003; Kennedy, 2008; Njamnshi et al., 2017). Ce stade intermédiaire serait défini par une cytorachie comprise entre 6 et 20 éléments/ μ L de LCR sans présence de trypanosome, ou bien par la présence de trypanosomes dans le LCR sans augmentation de la cytorachie (≤ 6 élément par μ L de LCR) (Lejon et al., 2003). Plusieurs publications font état de patients en stade intermédiaire traités avec succès à la pentamidine (Pépin and Milord, 1994; Doua et al., 1996). L'existence de ce stade intermédiaire n'est actuellement pas prise en compte par l'OMS et par les autorités de santé des pays touchés par la THA.

1.7.3.3 Protéïnorachie

Il y a quelques années, l'OMS recommandait le dosage de protéines totales dans le LCR pour permettre de discriminer le stade 2 de la maladie. Une augmentation de la protéïnorachie est révélatrice d'un dysfonctionnement de la BHE. Dans son rapport de 1983, l'OMS définit un seuil de protéïnorachie à 370 mg/L (par méthode colorimétrique) permettant de discriminer le stade 2 de la THA (Lejon and Büscher, 2005). Toutefois, une étude de Bisser et al (2002) a montré que la quantité de protéines dans le LCR de patient atteint de THA pouvait être extrêmement variable. Lejon et al ont montré en 2003 qu'une concentration supérieure ou égale à 750 mg/L était révélatrice d'un dysfonctionnement de la BHE marquant l'entrée en stade 2 de la THA. La concentration totale en protéines a donc été proposée comme outil de diagnostic de stade et présente une sensibilité de 85,7% et une spécificité de 82,4%.

Cette méthode de diagnostic n'est plus utilisée actuellement en raison de la complexité du dosage, la rendant inutilisable sur le terrain. Par ailleurs, la présence de protéines en grande quantité est révélatrice d'un dysfonctionnement de la BHE et pas spécifiquement de la THA. Le dysfonctionnement de la BHE peut avoir de multiples causes comme par exemple une hémorragie cérébrale, une malformation caverneuse cérébrale, une microcéphalie, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Nasu-Hakola, la maladie d'Alexander (Zhao et al., 2015; Schoknecht and Shalev, 2012). De plus, dans le cas de la THA, l'augmentation du taux d'immunoglobulines dans le sang, dès le stade 1 de la maladie, va déjà induire une augmentation de la protéïnorachie.

L'utilisation du dosage des IgM dans le LCR fait partie des marqueurs de stade proposés pour la THA. L'augmentation du taux d'IgM intrathécal au cours de l'inflammation est corrélée à la présence du parasite et à un dysfonctionnement de la BHE (Bisser et al., 2002; Lejon et al., 2003). Un test d'agglutination a été conceptualisé en 2002 et fait l'objet d'évaluations plus poussées (Lejon et al., 2002).

1.7.4. Outils de diagnostic de stade de la maladie en cours d'évaluation

Devant la faible sensibilité de la recherche du parasite dans le LCR et la faible spécificité de la cytorachie, les critères de l'OMS sont de plus en plus remis en cause dans différentes études (Doua et al., 1996; Lejon et al., 2003; Kennedy, 2008, 2010). Pour améliorer ce diagnostic de stade, de nouveaux procédés ont été élaborés tels que la protéinorachie, la détection moléculaire et la recherche de nouveaux biomarqueurs.

1.7.4.1 Tests moléculaires

Des tests moléculaires réalisés sur le LCR, comme la PCR ou le NASBA vu précédemment, peuvent être utilisés pour le diagnostic de stade. Dans le cas de la NASBA sur LCR, il a été observé une sensibilité de 88,4% et 82,9% pour le diagnostic de stade (Deborggraeve et al., 2011a). Dans le cas de la PCR sur LCR, la sensibilité varie selon les études entre 96% (Jamonneau et al., 2003) et 100% (Truc et al., 1999) mais la spécificité est faible (WHO, 2013). L'utilisation d'outils moléculaires n'est pas recommandée par l'OMS pour le diagnostic de stade en raison de cette faible spécificité. Ils ne garantissent pas un meilleur diagnostic (WHO, 2013).

1.7.4.2 Biomarqueurs de stade

Face à la faible sensibilité et spécificité des critères de stade classiques (la cytorachie et la caractérisation du trypanosome dans le LCR), de nouvelles pistes sont recherchées pour la détermination de stade. Actuellement, de nombreuses études se concentrent sur la recherche de biomarqueurs de stade. Un biomarqueur est une caractéristique biologique quantifiable révélatrice d'un processus biologique.

La recherche de lymphocytes B présentant des marqueurs CD19 a aussi été étudiée. Il a été montré que l'augmentation du nombre de lymphocytes B CD19 dans le LCR est directement associé au stade 2 de la THA à *T. b. gambiense* (Boda et al., 2009; Bouteille et al., 2010). Cette spéciation des lymphocytes B est trop complexe à réaliser sur le terrain.

Actuellement, la recherche se concentre sur la recherche de biomarqueurs induits par la réponse inflammatoire de l'hôte telle que les cytokines et chimiokines pro et anti inflammatoires. Ce sont ces molécules qui sont responsables des manifestations cliniques de la maladie (Kennedy, 2004, 2009). Les chimiokines (de la famille α , β , CC et CXC) vont induire le recrutement des cellules de l'immunité vers le parenchyme cérébral en réponse à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'INF- γ ou l'IL-1 β . Ce sont donc des molécules qui sont en lien direct avec l'inflammation occasionnée par le parasite (Rollins, 1997; Brenier-Pinchart et al., 2001). Depuis quelques années, de nombreux médiateurs immunitaires (cytokines et chimiokines), sur-exprimés dans le LCR au cours du stade nerveux de la maladie, ont été proposés comme biomarqueurs potentiels (**Tableau 3**).

L'ensemble des biomarqueurs étudiés dans le cas de la THA sont des protéines intervenant dans la mise en place et la signalisation de la réponse immunitaire.

- L'association entre les taux de chimiokines et de cytokines retrouvées dans le LCR et le stade 2 de la THA a été clairement démontrée (Lejon et al., 2002; Courtioux et al., 2006; Amin et al., 2009; Courtioux et al., 2009; Hainard et al., 2009).

- La chimiokine CXC ligand 13 (CXCL-13), aussi connue sous le nom de *B-Cell-attracting chemokine 1* (BCA-1), est exprimée par les lymphocytes B et les cellules dendritiques. Elle joue le rôle de chimio-attractant pour les lymphocytes B et va permettre leur migration, notamment à travers la BHE au cours de la THA. Une perturbation de la concentration en CXCL-13 est liée à une activation de la réponse immunitaire (Gunn et al., 1998; Rainey-Barger et al., 2011). Des associations ont déjà été établies entre la variation du taux de CXCL-13 dans le LCR et la neuro-borreliose (Hytönen et al., 2014) ainsi que la neuro-syphilis concomitante au VIH (Marra et al., 2010).

- La chimiokine CXC ligand 10 (CXCL-10), aussi connue sous le nom de IP-10 (*Inductible Protein-10*), est une chimiokine pro-inflammatoire jouant un rôle central dans les réponses inflammatoires. L'effet principal de cette chimiokine est d'exercer un chimiotactisme et d'induire l'activation de la migration des lymphocytes T vers le site de l'inflammation, après liaison à son récepteur CXCR-3 (CXC receptor 3) (Weng et al., 1998; Huang et al., 2000). L'augmentation du taux de CXCL-10 dans le LCR est donc clairement liée à l'infiltration tissulaire des lymphocytes T (Dufour et al., 2002), et cette augmentation a déjà été associée à d'autres troubles du SNC comme la sclérose en plaque (Sørensen et al., 1999) et la méningite virale (Lahrtz et al., 1997).

- La chimiokine CXC ligand 8 (CXCL-8), aussi nommée interleukine 8 (IL-8), est une protéine inflammatoire qui régule l'expression des molécules d'adhésion dans les neutrophiles et induit la migration directionnelle des neutrophiles du courant sanguin vers le site de l'inflammation (Baggiolini et al., 1994; Courtioux et al., 2006). La CXCL-13 régule également l'activité fonctionnelle des neutrophiles incluant la libération d'autres cytokines (Martinez et al., 2004). Cette protéine est retrouvée en quantité élevée chez les patients sommeilleux en stade 2 présentant une cytorachie relativement faible (< 20 cellules/ μ L) ce qui semble indiquer une action précoce. Il est également possible qu'elle soit impliquée dans l'altération de la BHE (Lejon et al., 2002). Une étude expérimentale menée par Russo et al (2014), suggère que la CXCL-8 intervient dans le processus de fibrose et d'angiogenèse. Elle n'a cependant pas d'effet sur les neutrophiles et les éosinophiles.

- La chimiokine CC ligand 2 (CCL-2) est une protéine inflammatoire exprimée par les cellules endothéliales, les macrophages ainsi que les fibroblastes à la suite de lésions. C'est un attractant puissant pour les lymphocytes T CD4 et CD8 activés (Rollins, 1997). Dans le cas de la THA, elle est donc suspectée d'être en partie responsable de l'extravasation leucocytaire des voies sanguines vers le SNC (Courtioux et al., 2006).

- La chimiokine CC ligand 3 (CCL-3) est, comme la CCL-2, impliquée dans la migration des cellules de l'immunité et principalement les lymphocytes (Weber, 2003; Rot and von Andrian, 2004). Il semble qu'elle soit aussi impliquée dans la migration des éosinophiles, des basophiles, et en particulier des neutrophiles (Reichel et al., 2012). La CCL-3 est donc suspectée de jouer un rôle complémentaire avec la CCL-2 dans l'infiltration des leucocytes dans le SNC au stade 2 de la THA (Courtioux et al., 2006).

- L'interleukine 1 β (IL-1 β) est une cytokine qui s'exprime précocement lors d'atteintes cérébrales et qui provoque une infiltration de leucocytes dans le SNC (Allan and Rothwell, 2001; Ching et al., 2005). L'IL-1 β est donc logiquement retrouvée en grande quantité dans le LCR de patient en stade 2 de la THA en réponse à l'inflammation. De plus, un niveau élevé de cette cytokine a clairement été corrélé avec les troubles neurologiques dus à la neuro-dégénérescence chez les patients en stade 2 (Hainard et al., 2009).

- L'interleukine 10 (IL-10) est une cytokine anti-inflammatoire, qui régule certaines cellules intervenant dans la réponse immunitaire telles que les lymphocytes

(B et T), les mastocytes, les granulocytes ainsi que les cellules dendritiques et endothéliales. L'IL-10 influe sur l'inflammation en inhibant la production d'autres cytokines comme l'INF- γ , le TNF- α ainsi que l'IL-2 (Moore et al., 2001). Cette inhibition a pu être observée dans le cas de la THA à *T. b. rhodesiense* sur un modèle animal (Vervet). Dans cette étude, on montre une régulation négative de l'INF- γ et du TNF- α par l'IL-10 au stade 2 de la maladie (Ngotho et al., 2006). Il a été démontré dans le cas de la THA qu'une augmentation de la concentration de l'IL-10 et d'IL-6 était directement associée au second stade la maladie avec une cytorachie élevée (>20 cellules/ μ L), ce qui semble indiquer une expression de ces deux protéines après le processus d'inflammation (Hainard et al., 2009).

- L'interleukine 6 (IL-6) est une cytokine qui va induire la différenciation de certains types cellulaires et notamment des lymphocytes B. Elle joue également un rôle dans la synthèse des hépatocytes au cours de la phase aiguë de l'inflammation en réduisant la production de fibronectine, d'albumine et de transferrine (Hirano et al., 1990). L'IL-6 est également impliquée dans la régulation des niveaux de fer sérique. L'IL-6 induit la production d'hépcidine, ce qui bloque l'action du transporteur de fer (ferroportine 1) présent au niveau de l'intestin et réduit ainsi les taux de fer dans le sérum (Nemeth et al., 2004). Cela signifie que l'IL-6 pourrait être à l'origine de l'hyposidémie et de l'anémie associées à une inflammation chronique (Tanaka et al., 2014).

- La néoptérine est un composé pyrazino-pyrimidine qui est synthétisé par des monocytes et des macrophages en réponse à la production d'INF- γ par des lymphocytes T activés. L'augmentation du niveau d'expression de la néoptérine suit donc l'augmentation de l'activation des macrophages et des lymphocytes T (Brown et al., 1989). La néoptérine est connue comme un marqueur d'inflammation virale et a la particularité de ne pas être surexprimée dans le cas d'une infection bactérienne (Chan et al., 2006; Renneberg et al., 2013). Une augmentation des taux de néoptérine a également été observée dans le cas de tumeurs malignes telles que les lymphomes du SNC (Viaccoz et al., 2015) et les infections virales (Berdowska and Zwirski-Korczała, 2001; Murr et al., 2002), incluant le VIH (Wirleitner et al., 2005).

- Les métalloprotéinases matricielles (MMP pour *Matrix Metalloproteinase*) sont des protéines impliquées dans la modification de la matrice extracellulaire. Ces protéines jouent un rôle important dans la perméabilisation de la BHE (Rosenberg, 2009). Au cours de la THA,

MMP-2 et MMP-9 sont impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte en permettant l'infiltration des leucocytes dans le SNC (parenchyme cérébrale et LCR) (Agrawal et al., 2006). L'action de ces protéines sur la BHE a été identifiée dans d'autres pathologies impliquant une neuro-inflammation telles que le neuro-paludisme (Van den Steen et al., 2006) et la méningite (Tsai et al., 2008).

- Les molécules d'adhésions cellulaires (CAM pour *Cell Adhesion Molecule*) jouent également un rôle lors de la perméabilisation de la BHE et l'extravasation leucocytaire. L'ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) et VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion molecule 1*) sont des protéines exprimées en grande quantité à la suite d'une stimulation via des cytokines. Elles permettent la liaison entre les leucocytes et les cellules endothéliales puis la transmigration des leucocytes dans les tissus. (Ransohoff et al., 2003; Rosenberg, 2009).

- La β 2-microglobuline (B2MG) est une protéine associée au complexe majeur d'histocompatibilité. La B2MG est donc impliquée dans la réponse immunitaire cellulaire lymphocyte T cytotoxique CD8+ (Cresswell et al., 1999; Tiberti et al., 2010). Cette protéine a également été proposée comme indicateur de l'infection par le cytomégalovirus (Alarcon et al., 2006) et est associée aux troubles nerveux retrouvés dans la maladie d'Alzheimer (Zhang et al., 2008) et certains cancers (Shi et al., 2009).

- L'ostéopontine (OPN) est une protéine qui est exprimée par plusieurs cellules, immunitaires ou non, y compris par des cellules du SNC (Sodek et al., 2000). Elle agit comme une cytokine pro-inflammatoire et se lie aux lymphocytes T cytotoxiques et aux lymphocytes T mémoire (Cantor and Shinohara, 2009). L'OPN induit également la production d'IL-12 et d'INF- γ et inhibe la production d'IL-10 (Chabas et al., 2001). Une augmentation de l'expression de cette protéine a également été observée dans le cas d'autres maladies impliquant une inflammation chronique ainsi que lors de lésions tissulaires (Denhardt et al., 2001; Tiberti et al., 2010).

-La H-FABP (pour *Heart-Fatty Acid-Binding Protein*) est une protéine de petite taille exprimée dans le cerveau et fait partie des protéines de liaison aux acides gras. Il a été démontré que cette protéine est rapidement libérée après une lésion tissulaire et notamment lors d'un infarctus du myocarde (Glatz et al., 1988; Lescuyer et al., 2005; Hainard et al., 2009). La H-FABP est en cours de validation comme un marqueur précoce d'accident vasculaire cérébral (Zimmermann-Ivol et al., 2004), et comme marqueur diagnostique pour la maladie de Creutzfeld-Jacob (Guillaume et al., 2003).

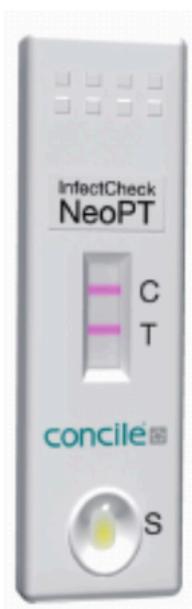
- La lipocaline-2 est une protéine qui induit un processus de mort cellulaire chez les bactéries et les eucaryotes. Son mode d'action repose sur la séquestration du fer (Flo et al.,

2004). Il a été démontré qu'elle est produite par les cellules épithéliales au niveau des plexus choroïdes et par les cellules endothéliales cérébrales en réponse à une inflammation (Marques et al., 2008). Une étude sur modèle *in vitro* a également montré l'expression de lipocaline-2 par les astrocytes et les cellules microgliales (Lee et al., 2007; S. Lee et al., 2009).

- La SLPI (pour *Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor*) est un inhibiteur de protéases anti-inflammatoire exprimé par les astrocytes et les neurones (Zhang et al., 1997). Une étude menée sur le rat laisse penser que la SLPI permet de supprimer la réponse inflammatoire lors d'une ischémie cérébrale (Wang et al., 2003).

- L'INF- γ est aussi un marqueur proposé en raison de son implication dans la neurophysiopathologie de la THA. En effet, comme expliqué précédemment, l'IFN- γ va permettre de contrôler la parasitémie dans les premiers temps de l'infection mais va aussi faciliter la pénétration des cellules T à travers la BHE dans le cerveau (Masocha et al., 2004).

Actuellement, le seul biomarqueur adapté sous forme de test rapide « strip » (bandelette) et évalué sur le terrain est la néoptérine (**Figure 17**). Une étude menée sur la faisabilité d'une utilisation du kit InfectCheck® NeoPT pour le diagnostic de la THA à *T. b. gambiense* est en cours mais n'a pas encore abouti. L'une des raisons étant la difficulté actuelle à trouver des patients pour tester cet outil.



InfectCheck® NeoPT

POC test for Neopterin

- Plasma, serum or cerebrospinal fluid
- 100 μ L of sample (NO EDTA)
- Results in 20 minutes
- Measurement range 2.5 - 100 nmol/L

Figure 17 : Test rapide de détection de la néoptérine utilisable sur plasma, sérum et LCR (Infectcheck NeoPT Flyer, Concile®).

Tableau 3 : Liste des biomarqueurs proposés pour le diagnostic de stade (Stade 1 / Stade 2) de la THA à *T. b. gambiense*.

Biomarqueurs	Cut-off (LCR)	Sen	Spé	Références	Nb Patients
CXCL-13 (pg/mL)	8,2	0%	100%	Tiberti et al (2012)	N = 100
	125,5	92%	85%	Tiberti et al (2013)	N = 97
CXCL-10 (pg/mL)**	2080	84%	100%*	Hainard et al (2009)	N = 100
	757,3	43%	100%*	Tiberti et al (2012)	N = 100
	NA	NA	NA	Amin et al (2009)	N = 60
CXCL-8 (pg/mL)**	97,1	82%	100%*	Hainard et al (2009)	N = 100
	NA	NA	NA	Courtioux et al (2006)	N = 61
CCL-2	NA	NA	NA	Courtioux et al (2006)	N = 61
CCL-3	NA	NA	NA	Courtioux et al (2006)	N = 61
IL-1 β (pg/mL)	0,7	48%	100%*	Hainard et al (2009)	N = 100
	NA	NA	NA	Courtioux et al (2006)	N = 61
IL-10 (pg/mL)	NA	NA	NA	Lejon et al (2002)	N = 46
	20,0	80%	100%*	Hainard et al (2009)	N = 100
IL-6 (pg/mL)	58.0	52%	100%*	Hainard et al (2009)	N = 100
Néoptérine (nmol/L)	14,3	84%	100%*	Tiberti et al (2012)	N = 412
	64.4	92%	100%	Tiberti et al (2013)	N = 97
MMP-2 (pg/mL)	39 220,2	52%	100%*	Hainard et al (2011)	N = 63
MMP-9 (pg/mL)	141,2	73%	100%*	Tiberti et al (2012)	N = 100
	424,7	90%	100%*	Hainard et al (2011)	N = 63
ICAM-1 (ng/mL)	1,3	61%	100%*	Tiberti et al (2012)	N = 100
	1,4	90%	100%*	Hainard et al (2011)	N = 63
VCAM-1 (ng/mL)	15,2	68%	100%*	Tiberti et al (2012)	N = 100
	25,7	85%	100%*	Hainard et al (2011)	N = 63
B2MG (ng/mL) ***	1802,5	78%	100%*	Tiberti et al (2010)	N = 58
OPN (ng/mL)***	408,8	68%	100%*	Tiberti et al (2010)	N = 58
	865,0	64%	100%*	Tiberti et al (2010)	N = 97
	2486,5	77%	94%	Tiberti et al (2013)	N = 97
H-FABP (pg/mL)**	571,8	62%	100%*	Hainard et al (2009)	N = 100
Lipocaline 2	NA	NA	NA	Amin et al (2010)	N = 180
SLPI	NA	NA	NA	Amin et al (2010)	N = 180
INF- γ	NA	NA	NA	Amin et al (2009)	N = 60

* La sensibilité est calculée pour 100% de spécificité (Hainard et al., 2009) (Tiberti et al., 2010). ** 97% de sensibilité lorsqu'ils sont associés (Hainard et al., 2009). *** 91% de sensibilité lorsqu'ils sont associés.

1.8. Les traitements de la maladie et le suivi des patients post-traitement

1.8.1. Les traitements actuels

Les molécules disponibles actuellement pour traiter la THA sont "stades et espèces dépendants". Ces traitements disponibles pour les plus anciens depuis les années 1920, se divisent en deux groupes en fonction de leur capacité ou non à franchir la BHE et donc du stade sur lequel ils sont actifs. L'ensemble de ces médicaments sont actuellement fournis par l'OMS via la mise en place d'un partenariat public-privé permettant une mise à disposition à moindre coût (WHO, 2013).

Dans le cas d'une THA, 2 traitements sont disponibles pour le stade 1 de la maladie en fonction de la souche du trypanosome :

- La pentamidine (**Figure 18**) qui est une diamidine aromatique utilisée comme agent antiprotozoaire depuis 1935. Cette molécule est utilisée en première intention pour le traitement de la THA à *T. b. gambiense* au stade 1 de la maladie et peut être utilisée en seconde intention dans le traitement de la pneumocystose à *Pneumocystis carinii* et de la leishmaniose à *Leishmania donovani* (Damper and Patton, 1976).

Le mode d'action trypanocide de cette molécule reste obscure. L'efficacité de celle-ci résiderait dans l'affinité forte qu'elle a avec de nombreux composants cellulaires dont l'ADN et l'ARNt limitant respectivement la transcription et la traduction. La pentamidine est aussi capable d'induire un clivage de l'ADN du kinéplaste, une inhibition de la Ca^{2+} -ATPase ainsi qu'une diminution du potentiel de la membrane mitochondriale du trypanosome (Sekhar et al., 2014).

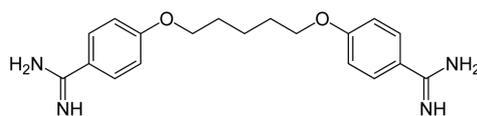


Figure 18 : Structure moléculaire de la pentamidine.

- La suramine (**Figure 19**), appartenant à la famille des naphtylamine sulfonées polyanioniques, possède une activité anti-trypanosome au stade 1 de la THA à *T. b. rhodesiense* (Morgan et al., 2011). Elle est aussi efficace dans le cas d'une THA à *T. b. gambiense* mais elle n'est pas utilisée en raison de son effet sur *Onchocerca volvulus*, présent aussi dans les régions endémiques de *T. b. gambiense*. L'action de

la suramine va détruire l'onchocercue provoquant une réaction allergique du type anaphylactique (Brun et al., 2010).

La suramine est un inhibiteur des enzymes de la glycolyse et notamment de la pyruvate kinase.

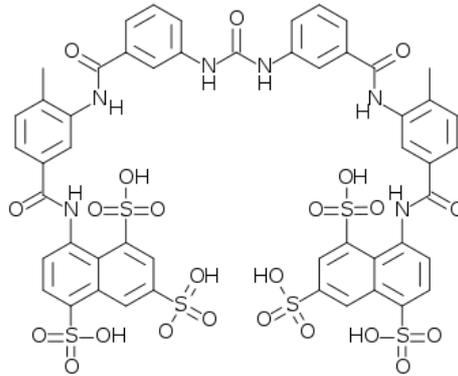


Figure 19 : Structure moléculaire de la suramine.

Ces deux traitements nécessitent une hospitalisation d'une semaine. Ces molécules ont aussi en commun leur incapacité à franchir la BHE à pH physiologique. Elles sont donc inefficaces sur le stade 2 de la maladie.

Pour le deuxième stade de la THA, d'autres molécules sont disponibles :

- Le mélarsoprol (**Figure 20**), qui est un dérivé de l'arsenic (oxyde de Melarsen), associé à un chélateur de métaux lourds (2,3 dimercaptopropanol). Sa découverte remonte à 1949. Il a depuis été employé sur le terrain pour traiter le stade 2 de la maladie sans distinction entre *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* (Sekhar et al., 2014). Le gros inconvénient de ce traitement est la présence d'effets indésirables et notamment, lorsqu'il n'est pas exactement dosé, la survenue d'encéphalopathies arsenicales. On estime que ces encéphalopathies surviennent chez 5 à 10% des patients traités au mélarsoprol et sont fatales dans un cas sur 2 (Kennedy, 2004; Sekhar et al., 2014). Actuellement, le mélarsoprol n'est plus utilisé pour traiter le stade 2 de la THA à *T. b. gambiense* mais reste la seule molécule active sur le stade 2 de la THA à *T. b. rhodesiense*.

L'action trypanocide de cette molécule réside dans sa capacité à inhiber la glycolyse en bloquant plusieurs étapes de cette voie de synthèse (notamment le pyruvate kinase). Le mélarsoprol va aussi inhiber la trypanothione réductase, qui permet le

maintien de l'homéostasie redox du trypanosome, en formant un complexe stable avec la trypanothione.

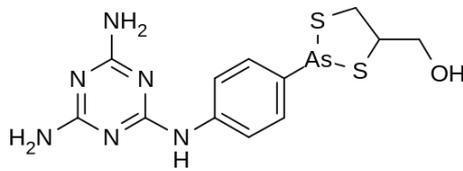


Figure 20 : Structure moléculaire du mélasoprol.

- L'éflornithine ou DFMO (pour α -difluoromethylornithine) (**Figure 21**) est une molécule relativement récente apparue en 1981. Elle offre une alternative au mélasoprol car elle est active sur le stade 2 de la THA à *T. b. gambiense*. Cependant, son action contre *T. b. rhodesiense* n'est pas optimale (Sekhar et al., 2014).

Cette molécule est un inhibiteur de l'ornithine décarboxylase qui intervient dans la voie de synthèse des polyamines. La croissance du parasite est alors bloquée (rôle cytostatique). De plus, la diminution de la synthèse de polyamine entraîne une diminution de la synthèse de macromolécules et notamment des glycoprotéines de surface (VSG). Le manteau protéique des trypanosomes ne se renouvelle plus, le parasite peut être ciblé et détruit efficacement par les cellules de l'immunité (Laveissière et al., 2005).

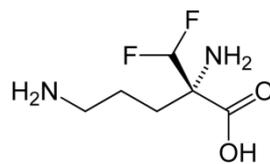


Figure 21 : Structure moléculaire de l'éflornithine.

- Le NECT (*Nifurtimox-Eflornithine Combinaison Therapy*) est une bithérapie composée par l'association de l'éflornithine et du nifurtimox (**Figure 22**). Le nifurtimox ou 5-nitrofurane est une molécule développée initialement pour traiter la maladie de Chagas.

Le mode d'action de cette molécule repose sur la reconnaissance du groupement nitré du nifurtimox par une nitroréductase de type 1 présente chez le parasite, induisant une catalyse du groupement nitro. Cette nitroréductase va alors entraîner la libération de

radicaux oxygénés. Ce processus va provoquer des cassures de l'ADN, une diminution de la synthèse protéique et d'acide nucléique, ainsi qu'une inhibition de la croissance parasitaire.

L'association de l'éflornithine et du nifurtimox comporte plusieurs avantages tels qu'une meilleure efficacité et une diminution du temps de traitement par rapport à la monothérapie. De plus, ce traitement est une alternative à la monothérapie dans le cas de résistance à l'éflornithine. Actuellement, le NECT est utilisé en première intention, le DFMO est utilisé uniquement dans le cas de contre-indications à l'utilisation de Nifurtimox (patients épileptiques ou psychotiques) (WHO, 2013).

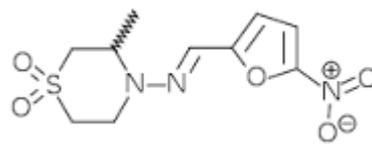


Figure 22 : Structure moléculaire du nifurtimox.

L'ensemble des mécanismes induisant le rôle trypanocide de ces molécules présentent encore certaines zones d'ombre. De plus, l'utilisation de ces traitements est limitée par plusieurs paramètres et notamment par la sélectivité de stade et d'espèce conditionnée par le diagnostic. Une autre limite à prendre en compte avec ces molécules est l'apparition de résistances inhérentes à tout traitement qui a parfois pu être favorisée par une utilisation déraisonnée de ces dernières. Par exemple la Lomidine® (pentamidine) a été utilisée pendant plusieurs années (à partir de 1946 en RCA) en chimioprophylaxie. En effet à l'époque, toutes les personnes vivantes dans le périmètre d'un foyer de THA recevaient une injection de Lomidine®, qu'elle soit malade ou non. Cette pratique nommée « lomidinisation » devait permettre de protéger massivement les populations exposées et a été considérée à tort comme une vaccination (Laveissière et al., 2005). Cette pratique n'a plus lieu actuellement et la Lomidine® n'est plus commercialisée.

Tableau 4 : Les traitements utilisés contre la THA.

	Stade 1			Stade 2	
Produit	Pentamidine	Suramine	Mélarsoprol	Eflornithine	Eflornithine / Nifurtimox
Dénomination commerciale	Pentacarinat®, Lomidine®*, Pentam®, Nepubent®	Germanin®, 205 Bayer®, Fourneau 309®, Moranyl®	Mel B®, Arsorbal®	Ornidyl®	NECT
Souche	<i>T. b. gambiense</i>	<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>T. b. gambiense</i> / <i>T. b. rhodesiense</i>	<i>T. b. gambiense</i>	<i>T. b. gambiense</i>
Posologie	4mg/kg/jour pendant 7 jours IM	100-200mg 1er jour, puis 1g max par jour pendant 7 jours IV	2.2mg/kg/jour pendant 10 jours IV	100mg/kg/6heures pendant 14 jours IV	200mg/kg/12heures pendant 7 jours (éflornithine) IV +5mg/kg/3xjour pendant 10 jours (nifurtimox) PO
Mécanismes d'action	Inhibition de la S-adénosylmethionine décarboxylase	Inhibition des enzymes de la glycolyse	Inhibition trypanothione reductase et pyruvate kinase	Inhibition de l'ornithine décarboxylase	Libération de radicaux oxygénés et inhibition de la croissance parasitaire par stress oxydatif
Effets indésirables	Hypotension, diarrhées, nausées, vomissements, douleurs au site d'injection	Eruption cutanées, prurit, vomissements, hématurie, neuropathie périphérique	Encéphalopathie arsenicale, neuropathie, paresthésie, réactions cutanées	Diarrhées, nausées, vomissements, leucopénie, anémie	Idem éflornithine + anorexie, douleurs abdominales, hépatite

*Plus commercialisé ; IM : Intra-musculaire ; IV : Intra-veineuse ; PO : Prise orale



1.8.2. Le suivi post-traitement

Le suivi post-thérapeutique des patients atteints de THA à *T. b. gambiense* est essentiel pour confirmer l'efficacité du traitement mis en place. De plus, ce suivi doit être régulier et comprendre plusieurs visites afin de diagnostiquer très vite les échecs thérapeutiques entraînant la rechute du patient (Priotto et al., 2012). Ces suivis comprennent un examen clinique, un examen du sang et du LCR pour la recherche du parasite et la cytorachie du LCR. Ces examens nécessitent donc une ponction lombaire à chaque suivi.

En 1998, l'OMS préconise des examens de suivi (incluant une ponction lombaire) tous les 6 mois jusqu'au 24^{ème} mois post-traitement. Ce système de suivi permet à l'époque de révéler de nombreux cas d'échecs thérapeutiques. Par exemple, une étude menée en 2010 par Ngoyi et al, montre que sur 360 patients ivoiriens atteints de THA à *T. b. gambiense*, le taux global de guérison est de 48,6% seulement. Parmi les 360 patients, il y a 41 patients en stade 1 dont 4 patients ayant rechuté (traité avec de la pentamidine). Sur les 272 patients en stade 2 le traitement a été inefficace pour uniquement 37% de ces patients (parmi eux 59% ont été traités avec du mélarsoprol pendant 10 jours). Quarante sept patients ont été retirés de l'étude en raison d'un manque de données.

Actuellement, l'OMS tend à restreindre la durée du suivi et le nombre de visites post-traitement pour limiter le nombre de ponctions lombaires et permettre une réduction des coûts. Ce choix est motivé par l'efficacité des traitements utilisés contre la THA à *T. b. gambiense*. En effet, le taux de rechutes post-traitement avec la pentamidine pour des patients en stade 1 est de 5% et le taux de rechutes post-traitement par le NECT pour des patients en stade 2 est inférieur à 2%. L'OMS indique par ailleurs que, le suivi est rarement effectué en raison du manque d'adhésion des patients aux visites de suivis (WHO, 2013).

A l'heure actuelle, l'OMS préconise donc seulement 3 suivis. Le premier suivi a lieu 3 mois après le traitement. A l'occasion de ce premier suivi, la cytorachie n'est pas effectuée car elle est ininterprétable. Le diagnostic de rechute ne peut alors se baser que sur la détection du parasite, dans le sang ou le LCR suivant le stade du patient avant traitement. Le second suivi a lieu 6 mois après le traitement et le troisième suivi 12 mois après le traitement. Pour ces deux derniers suivis, la cytorachie est effectuée et des critères ont été définis pour orienter la démarche thérapeutique à suivre par le clinicien (**Tableau 5**).



Tableau 5 : Critères de suivi des patients atteints de THA à *T. b. gambiense* après traitement.

Échéances des visites de suivis	Stade initial du patient (avant le traitement)	
	Stade 1	Stade 2
3 mois	T+ = rechute et traitement	T+ = rechute et traitement
6 mois	Cy 0-5/μL, T- = guérison Cy 6-19/μL, T- = évolution incertaine* Cy > 20/μL, T- = rechute et traitement T+ = rechute et traitement	Cy 0-5/μL, T- = guérison Cy 6-49/μL, T- = évolution incertaine* Cy > 50/μL, T- = rechute et traitement T+ = rechute et traitement
12 mois	Cy 0-5/μL, T- = guérison Cy 6-19/μL, T- = évolution incertaine* Cy > 20/μL, T- = rechute et traitement T+ = rechute et traitement	Cy 0-20/μL, T- = guérison Cy > 20/μL, T- = rechute et traitement T+ = rechute et traitement

T+ : présence de trypanosomes, T- : absence de trypanosome Cy : cytorachie
*Traitement ou attente du suivi à 12 mois à la discrétion du clinicien en fonction du tableau clinique

Des critères de substitution ont été proposés afin de remplacer la cytorachie (qui manque de spécificité et qui est peu reproductible) et la recherche du parasite (qui est peu sensible) lors du suivi (Lejon and Büscher, 2005; Tiberti et al., 2013). L'efficacité de la PCR ciblant l'ARN 18S ribosomal de *T. b. gambiense* a été testée mais les résultats ont montré que ce marqueur ne peut pas être utilisé pour le suivi des patients en raison de la persistance de la positivité de la PCR chez certains patients guéris (Deborggraeve et al., 2011).

Malgré tout, il est encore important de rechercher de nouveaux biomarqueurs plus spécifiques et permettant de faciliter le suivi des patients. L'idéal serait de mettre en évidence un biomarqueur à la fois de stade et de suivi des patients, présent dans un autre fluide biologique que le LCR, permettant de s'affranchir de la ponction lombaire.

1.8.3. Les traitements d'avenir et la vaccination

1.8.3.1 Nouveaux traitements

L'une des molécules la plus prometteuse actuellement est le fexinidazole (5-nitro-imidazole). Cette molécule découverte en 1980 doit son développement à une collaboration entre DNDi et Sanofi-Aventis®. Elle est à ce jour en phase 3 des essais cliniques. Cette molécule est prometteuse car elle est active sur les deux stades de la maladie et présente aussi une sécurité d'emploi car elle peut être administrée par voie orale sur un temps court (Tarral et al., 2014). Trois études, testant l'utilisation du fexinidazole sur la THA à *T. b. gambiense*, sont en cours simultanément : FEX 004, FEX 005 et FEX 006. Ces études testent l'efficacité du traitement

(1 prise par jour au moment des repas pendant 10 jours) sur les patients en stade 2 (FEX 004), sur des patients en stade 1 et stade intermédiaire (cytorachie comprise entre 6 et 20 cellules) (FEX 005) et chez l'enfant de plus de 6 ans et de plus de 20Kg (FEX 006). Une nouvelle étude multicentrique nommée FEX 009 (étude de phase 3), permettra de valider l'efficacité et la sécurité du traitement chez les adultes et chez l'enfant. L'étude FEX 007 porte sur l'utilisation de ce traitement dans le cas de THA à *T. b. rhodesiense* (dndi.org, 2017; WHO, 2016) (**Figure 23**).

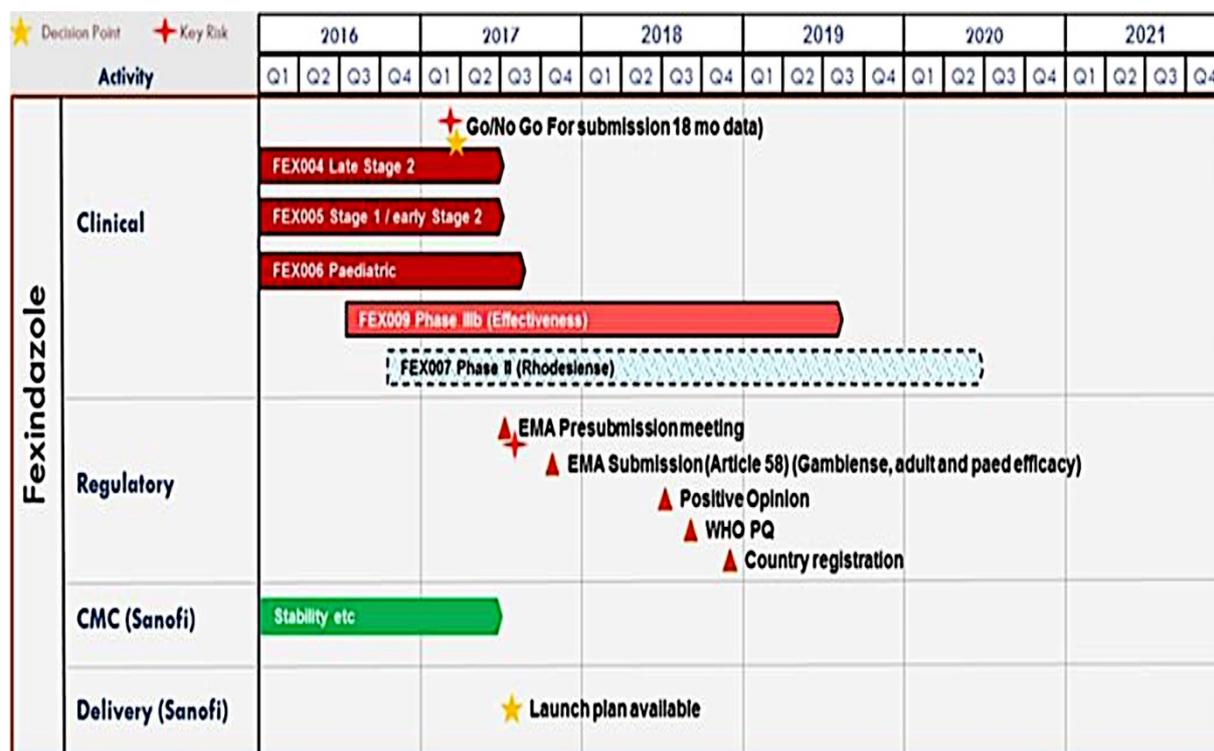


Figure 23 : Programme des essais cliniques pour le fexinidazole.
(WHO, 2016)

De même, le benzoxaborole est une molécule, de la famille des oxaboroles, découverte en 2009 par la société Anacor Pharmaceuticals®. Elle présente les mêmes avantages que le fexinidazole (Jacobs et al., 2011a). Cette molécule (SCYX-7158) est actuellement passée en phase 1 des essais cliniques. Le seul événement indésirable observé est l'augmentation des marqueurs de la fonction thyroïdienne (3 mois après l'administration). Cette augmentation est transitoire et de faible intensité. Une étude en phase 2 et 3, nommée OXA 002, mesurera l'efficacité du traitement sur des patients atteints de THA à *T. b. gambiense* en stade 1 et en stade 2. Le panel de patients est en cours de recrutement pour cette étude (dndi.org, 2017; WHO, 2016) (**Figure 24**).

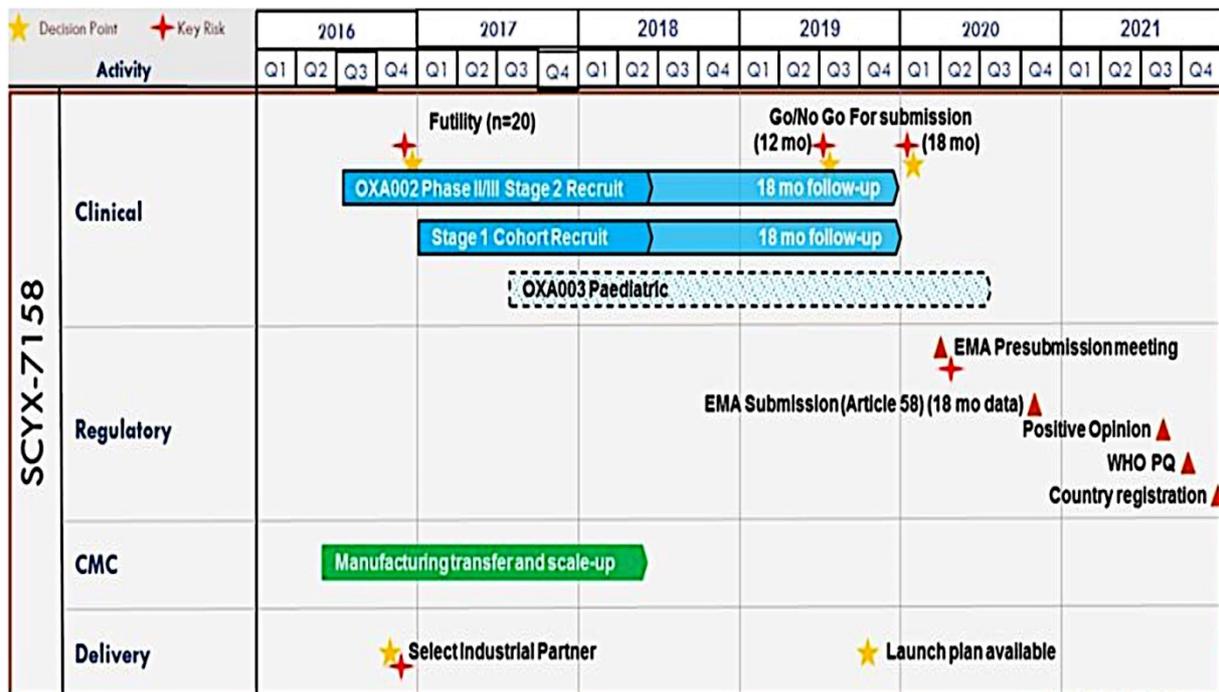


Figure 24 : Programme des essais cliniques pour le SCYX-7158.
(WHO, 2016)

En 2011, un dérivé de la pentamidine, la pafuramidine maleate était à l'étude pour ses effets trypanolytiques. Cette molécule est arrivée jusqu'en phase 3 des essais cliniques avant de s'arrêter brutalement à la suite d'apparitions d'effets indésirables hépatiques et rénaux (Jacobs et al., 2011a).

1.8.3.2 Vaccination

Le manteau antigénique variable du parasite lui permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Les réarrangements du manteau antigénique du trypanosome lui permettent de faire "peau neuve" quasi indéfiniment. Toutefois, certaines protéines et notamment des récepteurs présents au niveau de la poche flagellaire sont invariants. Cela permet d'envisager une thérapie vaccinale (La Greca and Magez, 2011). Les vaccins ont pour objectif l'induction d'une immunité secondaire protectrice vis-à-vis d'un agent infectieux. L'immunité conférée est plus ou moins durable et protectrice. Déjà en 1995, des études menées sur des élevages ont montré qu'en inoculant des dérivés d'antigènes issus de la poche flagellaire de *T. b. rhodesiense*, on offrait une meilleure protection aux troupeaux vis à vis des TAA. Ces résultats sont meilleurs que ceux obtenus avec le Samorin® (isométymidium chloride) utilisé encore à ce jour en prophylaxie sur les animaux d'élevage (Mkunza et al., 1995). Cette « vaccination »

permettrait donc aux troupeaux de développer une protection ou du moins une trypanotolérance partielle. Des études complémentaires ont ensuite montré que cette protection induite était temporaire et efficace seulement dans le cas d'infection à faible dose (charge parasitaire faible) (La Greca and Magez, 2011). De nouvelles études plus récentes se sont focalisées sur différents constituants de la poche flagellaire, comme la transferrine, ainsi que les protéines du cytosquelette telles que les tubulines et l'actine. Les essais menés sur des souris immunisées à partir de recombinant d'actine trypanosomale et de β -tubuline de *T. evansi* sont encourageants et démontrent une bonne protection contre les trypanosomoses à *T. evansi*, *T. equiperdum* et *T. b. brucei* (Li et al., 2009). Toutefois, là encore, le succès de la vaccination est largement tributaire de la charge parasitaire subie par l'hôte qui doit rester faible. De plus, l'infection des souris post-vaccination n'a eu lieu que 6 jours après la dernière vaccination, l'efficacité de ce vaccin dans le temps n'a donc pu être confirmée (Baral, 2010). Une étude précédente menée en ciblant les tubulines de *T. brucei* avait déjà permis de mettre en évidence une protection des souris, à hauteur de 70% contre les trypanosomoses à *T. brucei*, *T. congolense* et *T. b. rhodesiense* (Lubega et al., 2002). Là encore, comme pour l'étude menée par Li et al (2009), l'action prolongée de ce vaccin n'a pu être vérifiée et son efficacité protectrice est aussi conditionnée par la faiblesse de la charge parasitaire reçue par l'hôte lors de son infection par le trypanosome (inférieur à 1 000 parasites).

D'autres protéines parasitaires ont été étudiées comme cible de potentiels vaccins. C'est le cas des sialidases, de la congopaine ainsi que de l'ancre GPI composant les VSG. Les sialidases sont des enzymes membranaires présentes à la surface du parasite, qui vont permettre l'assimilation de l'acide sialique, dérivé des glycoconjugués sialiques, issus de la surface cellulaire de l'hôte. L'utilisation de cette enzyme, étudiée principalement chez *T. cruzi* comme cible de vaccination, a montré qu'elle pourrait conférer une relative protection (chez 60% des animaux immunisés) vis-à-vis de *T. b. brucei* lorsque la charge parasitaire, lors de l'infection, n'excède pas 500 parasites. Là encore une protection durable et à long terme n'a pu être prouvée (Baral, 2010).

La congopaine est une cystéine protéase dont le rôle dans la pathogénicité de la trypanosomose a été suggérée en 1993 (Authié et al., 1993). Cette enzyme est impliquée dans la réponse à IgG des hôtes trypanotolérants mais pas chez les hôtes sensibles aux trypanosomoses. Une étude menée en 2001 sur des bovins immunisés avec deux recombinants de cette cystéine protéase a permis de démontrer que cette enzyme ne joue aucun rôle lors de la première phase de la maladie car aucune différence n'a été notée entre les bovins immunisés et les bovins contrôles. Cependant, au stade avancé de la maladie, les bovins immunisés présentaient une anémie moins sévère ainsi qu'une reprise de poids, ce qui



n'est pas le cas dans le développement normal d'une TAA (Authié et al., 2001). Malheureusement, malgré ces résultats, les recherches sur cette protéine se sont arrêtées.

Enfin, l'ancre GPI des VSG est depuis longtemps connue comme un inducteur de la réponse immunitaire. Soumis au stress environnemental, ce composant des glycoprotéines de surface va pouvoir être clivé (via une phospholipase hydrolytique) en Dimyristoylglycerol (DMG), qui va rester attaché à la membrane du parasite, et en glycosyl-inositol-phosphate (GPI) libéré dans le milieu extracellulaire (Fox et al., 1986; Rolin et al., 1996; La Greca and Magez, 2011). Ces composants de l'ancre GPI sont tous les deux susceptibles d'initier une différenciation et une activation des macrophages, notamment GIP qui va induire la production de TNF- α (Magez et al., 1998). La sensibilisation des macrophages à DMG dans un premier temps va ensuite rendre ces macrophages sensibles à de nouveaux agents inflammatoires tels que les lipopolysaccharides (LPS). Les LPS vont alors induire la sécrétion d'IL-1 α , une cytokine elle-même impliquée dans la production de TNF- α . Parallèlement, il a été démontré sur modèle murin que les niveaux de LPS sériques sont augmentés pendant l'infection due à un trypanosome (Pentreath, 1994). Des essais utilisant des molécules synthétiques de GPI pour immuniser des souris ont été effectués. A la suite de la vaccination, des Ac (IgG majoritairement) ont pu être retrouvés dans l'organisme des souris. Cependant, ces anticorps se sont révélés efficaces sur une courte durée. La vaccination via les ancres GPI, même si elle a eu pour effet de limiter les symptômes inflammatoires, n'a pas permis la survie de l'hôte infecté (La Greca and Magez, 2011).

La vaccination reste l'un des objectifs ultime de la lutte contre les trypanosomoses, aussi bien chez l'animal que chez l'Homme. Il est connu que certains mammifères endémiques de régions sujettes aux trypanosomoses présentent une trypanotolérance. Il est également rapporté que des cas humains de trypanosomoses ont pu être contrôlés par les défenses immunitaires de l'hôte (Garcia et al., 2000; Jamonneau et al., 2012). Ces faits montrent que la vaccination est un objectif qui reste réalisable et qui semble, face aux difficultés rencontrées à ce jour dans l'assainissement des réservoirs du parasite, être une option durable pour éviter les pertes humaines et pertes économiques dues aux infections du bétail. Toutefois, seuls des essais sur modèles murins et bovins ont été réalisés en laboratoire et aucun de ces essais ne permet de faire le lien avec la réponse immunitaire engendrée chez un hôte naturel du trypanosome. Jusqu'à présent, aucun protocole expérimental de vaccination anti-trypanosome n'a abouti et aucun vaccin humain n'est à l'étude (La Greca and Magez, 2011).



Overview of the diagnostic methods used in the field for human African trypanosomiasis: What could change in the next years.

Julien BONNET¹, Clotilde BOUDOT¹, Bertrand COURTILOUX¹

Soumis le 12 mars 2015, accepté le 2 juillet 2015.

Résumé :

La maladie du sommeil est une infection parasitaire causée par deux espèces de trypanosomes (*Trypanosoma brucei gambiense* et *rhodesiense*), transmis par la mouche tsé-tsé. La maladie, à un stade avancé affecte le système nerveux central, entraînant des symptômes neurologiques graves. Sans traitement, la mort est inévitable.

Un bon diagnostic va donc conditionner les traitements à mettre en place pour les patients en stade 1 ou en stade 2. Le travail de diagnostic est rendu complexe par les conditions de terrain : structures sanitaires insuffisantes ou absentes. Il est donc crucial de rechercher de nouveaux outils de diagnostic adaptés aux conditions de terrain.

Cette revue résume les procédés de diagnostic actuels et présente les progrès en cours dans le domaine.

Review Article

Overview of the Diagnostic Methods Used in the Field for Human African Trypanosomiasis: What Could Change in the Next Years?

Julien Bonnet,^{1,2} Clotilde Boudot,^{1,2} and Bertrand Courtioux^{1,2}

¹INSERM, U1094, Tropical Neuroepidemiology, Limoges, France

²UMR.S 1094, Tropical Neuroepidemiology, Institute of Neuroepidemiology and Tropical Neurology, Université de Limoges, CNRS FR 3503 GEIST, 87000 Limoges, France

Correspondence should be addressed to Bertrand Courtioux; bertrand.courtioux@unilim.fr

Received 12 March 2015; Revised 19 June 2015; Accepted 2 July 2015

Academic Editor: Stephan Karl

Copyright © 2015 Julien Bonnet et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Sleeping sickness is a parasitic infection caused by two species of trypanosomes (*Trypanosoma brucei gambiense* and *rhodesiense*), transmitted by the tsetse fly. The disease eventually affects the central nervous system, resulting in severe neurological symptoms. Without treatment, death is inevitable. During the first stage of the disease, infected patients are mildly symptomatic and early detection of infection allows safer treatment (administered on an outpatient basis) which can avoid death; routine screening of the exposed population is necessary, especially in areas of high endemicity. The current therapeutic treatment of this disease, especially in stage 2, can cause complications and requires a clinical surveillance for several days. A good stage diagnosis of the disease is the cornerstone for delivering the adequate treatment. The task faced by the medical personnel is further complicated by the lack of support from local health infrastructure, which is at best weak, but often nonexistent. Therefore it is crucial to look for new more efficient technics for the diagnosis of stage which are also best suited to use in the field, in areas not possessing high-level health facilities. This review, after an overview of the disease, summarizes the current diagnosis procedures and presents the advances in the field.

1. General Presentation of the Disease

Human African Trypanosomiasis (HAT), or sleeping sickness, is a vector-borne parasitic disease endemic in sub-Saharan Africa. This disease is caused by an extracellular parasite called *Trypanosoma* (genus) *brucei* (species). Three subspecies exist, which possess identical morphological characteristics (presence of a flagellum, a kinetoplast, and a nucleus) but differ in their ability to infect various hosts. *Trypanosoma brucei brucei* (*T.b.b.*) is a domestic animal parasite, which transmits Nagana disease, which is not pathogenic to humans [1]. The destruction of *T. b. brucei* is caused by two trypanolytic factors (TLF) complex content in human serum. Both TLF complexes include apolipoprotein L-1 (APOLI) and haptoglobin-related protein (Hpr). Hpr has been thought for a long time to be the active trypanolytic component of TLF. But now there are more and more confirmative evidences showing that APOLI is the trypanolytic

factor of normal human serum [2]. This parasite has proven particularly useful for research purposes. Regarding the 2 human pathogens [3], *T. b. gambiense* is an anthroponotic parasite found in 24 countries of central and western Africa and causes a chronic syndrome. *T. b. rhodesiense* is zoonotic and is endemic in 13 countries of eastern and southern Africa and causes an acute syndrome [4]. However, increasingly, the spread of *T. b. rhodesiense* has been found, especially in Uganda, where the 2 diseases forms overlap. *T. b. gambiense* is present in the north while *T. b. rhodesiense* is present in the south, but this distribution remains artificial due to population migrations and climatic changes [5].

Recently, its prevalence has dropped, largely because of the implementation of controls and intervention programs. It belongs to the group of Neglected Tropical Diseases. Neglected Tropical Diseases are diseases that develop mainly among the poorest populations. Currently HAT is one of 17 priority Neglected Tropical Diseases recognized by WHO

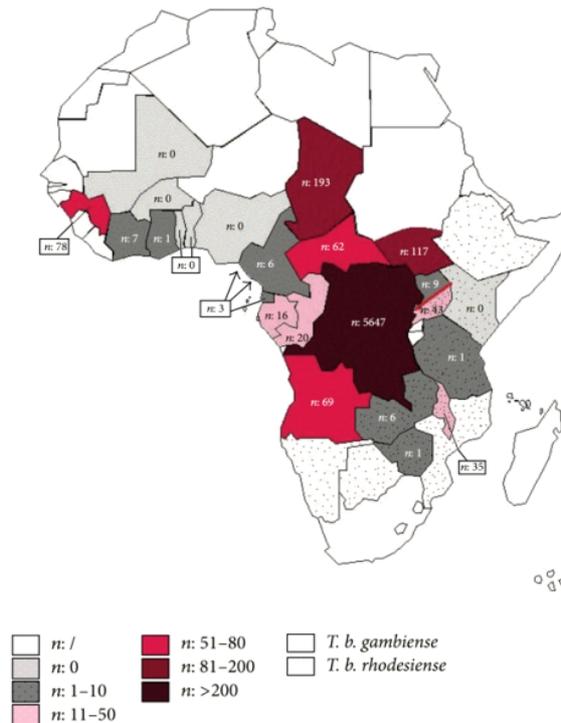


FIGURE 1: Number of new cases of HAT reported in 2013 to the WHO [1].

(World Health Organization) as Malaria, HIV, and others [6]. HAT is considered to be a huge threat to public health. Three severe epidemics have ravaged African populations. The first occurred at the end of the 19th century, the second during the 1920s, and the most recent began at the end of the 1970s and tends to be controlled today [1]. This disease outbreak is essentially linked to diverse social, economic, and political issues. Indeed, 36 sub-Saharan African countries are affected [4, 7], especially poor and remote rural regions (Figure 1). Furthermore, current estimations show that 70 million people live at risk of contracting HAT infection. Among these, 57 million people are at risk of developing *gambiense* HAT and 12.3 million people are at risk of contracting *rhodesiense* HAT [4]. This disease is considered by WHO to be one of the Neglected Tropical Diseases, for which it is necessary to establish population screening and disease control measures [4, 6].

This disease is transmitted by the bite of the tsetse fly during its blood meal. The *Glossina* vector belongs to the Diptera order. *Glossina* is viviparous and both the male and female are capable of spreading disease [1]. Many subgenus flies are involved in the transmission of parasites: *G. palpalis palpalis* and *G. p. gambiensis* transmit *T. b. gambiense* and *G. morsitans* transmits *T. b. rhodesiense* [8]. These flies need particular conditions to survive (temperature 16°C–38°C, 50%–80% relative humidity) [6]. However, the *Glossina* is classed as a “bad vector,” because it loses parasites at every

blood meal, and because the female produces only 10 larvae during its lifetime [9].

During the blood meal, the infected tsetse fly injects its saliva to prevent the coagulation of the host blood, and the metacyclic trypomastigote trypanosomes are injected subdermally into the host [4]. The trypanosomes proliferate at the site of inoculation and then transform into bloodstream trypomastigotes form during the first disease stage. That form can then multiply by binary fission, in different body fluids (blood, lymph), and can move to the cerebrospinal fluid (CSF), signaling the beginning of the second disease stage. If a new, noninfected tsetse fly bites the infected host, it can ingest parasites, in their bloodstream trypomastigote form, which can move to the fly midgut, where some will differentiate into procyclic trypomastigotes. Afterwards, the parasites migrate from the midgut to the salivary gland and transform into epimastigotes. In the salivary gland, the epimastigotes further transform into metacyclic trypomastigotes and await a new fly blood meal (Figure 2).

HAT clinically evolves in two stages and the symptoms for the *T. b. gambiense* and *T. b. rhodesiense* forms are often the same, but their frequency, severity, and kinetic appearance differ. Indeed, *T. b. rhodesiense* can cause patient death within 6 months, whereas *T. b. gambiense* patients can survive for more than 10 years [10, 11].

The first stage is called the hemolymphatic or bloodstream stage and is characterized by an intermittent fever,

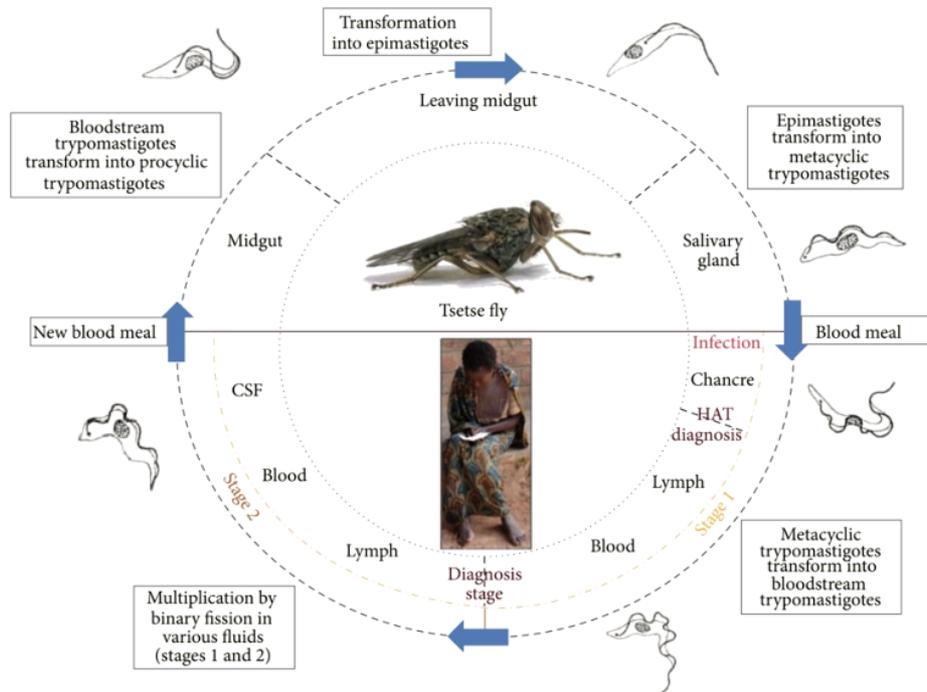


FIGURE 2: Life cycle of HAT.

headaches, pruritus, lymphadenopathy, asthenia, anemia, and hepatosplenomegaly [1, 4]. Once the parasites cross the blood-brain barrier (BBB), the meningoencephalic stage begins and the major symptoms are neuropsychiatric and include sleep disturbances, abnormal movement, limb paralysis, hemiparesis, irritability, aggressive behavior, and psychotic reactions [1, 4, 10]. This second stage is fatal if untreated.

Moreover, the impact on quality of life is potentially devastating, as affected subjects are unable to work for several years, which engenders poverty and social exclusion. Treatment development and therapeutic management are therefore very important. Treatments are separated into two groups.

The first group of treatments is composed of Pentamidine (Pentacarinat) and Suramin (Moranyl), and these treatments are mainly used during early disease stages. Pentamidine is the drug of choice for treatment of the *T. b. gambiense* form, while Suramin is used for *T. b. rhodesiense* treatment. However, Suramin cannot be used against *T. b. gambiense* in Western and Central Africa, because there is a risk of adverse reaction if combined with the medication used to treat *Onchocerca spp.* [1]. Pentamidine is administered intramuscularly and Suramin through intravenous injection. Pentamidine is generally well tolerated, despite side effects including hypoglycemia, nausea and vomiting, and injection site pain. Suramin can cause severe reactions, such as allergic reaction, hypersensitivity, nephrotoxicity, hematuria, or peripheral neuropathy [12].

Second stage treatments include Melarsoprol (Arsobal), Eflornithine (DFMO or α -Difluoromethylornithine), and the more recently developed Eflornithine/Nifurtimox combination therapy (NECT) [13]. Melarsoprol and Eflornithine are administered by intravenous injection; Nifurtimox is given orally. Melarsoprol is the only medication which can be used to treat both HAT forms [1, 12], although one of the known side effects is an increased risk of a potentially fatal encephalopathic syndrome. NECT has now become the standard first-line treatment for CNS stage *T. b. gambiense* HAT. Concerning CNS stage *T. b. rhodesiense* HAT it is intravenous Melarsoprol which is the first-line treatment [14]. However, Eflornithine causes similar adverse drug reactions as antineoplastic agents [15]. Nifurtimox can only be used in association with Eflornithine, against *T. b. gambiense*, and increases the efficacy of Eflornithine. All of these treatments require clinical surveillance during the therapeutic care. This is a major drawback for people with no access to health structures. In Table 1 are grouped the different dosages of the drugs currently used to fight against HAT.

Aside from the not insignificant adverse effects of these medications, a degree of drug resistance has evolved in the 15 to 50 years that these treatments have been employed, including Pentamidine, Melarsoprol, and Eflornithine [13, 16]. Therefore, the development of new, effective, and safe therapies is essential to advance the fight against HAT.

Recently, two new candidate drugs have been proposed. Fexinidazole, the 2-substituted 5-nitroimidazole, belongs to

TABLE 1: Drugs dosage used against THA.

	Pentamidine	Suramin	Melarsoprol	Eflornithine	Eflornithine/Nifurtimox
Dosage	4 mg/kg/day during 7 days	100–200 mg the first day and maximum 1 g/injection for 7 days	2.2 mg/kg/day for 10 days (for <i>T.b.g</i>) 3 × 3.6 mg/kg/day for 7 days (for <i>T.b.r</i>)	100 mg/kg/6 h during 14 days	200 mg/kg/12 h for 7 days (Eflornithine) + 5 mg/kg/3x day for 10 days (Nifurtimox)

the nitroimidazole class of drugs [17, 18]. This pharmacological class includes many active compounds, several of which target trypanosomes. Fexinidazole was discovered in the 1980s by the Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) and was developed jointly with Sanofi. In studies, Fexinidazole exhibited trypanocidal properties and demonstrated the potential to become a safe, short-course oral treatment for both HAT stages. Furthermore, this therapy, currently undergoing phase 2/3 clinical trials in treatment centers in the Democratic Republic of Congo (DRC) and Central African Republic (CAR), may avoid the necessity of disease stage screening and treatments requiring several days of hospitalization [17, 19].

The other potential treatment candidate, Benzoxaborole or SCYX-7158, is a by-product of the family of oxaboroles, developed by Anacor Pharmaceuticals. This drug proved to be highly effective in preclinical studies and is in phase 1 clinical trials today, as a single dose oral treatment for both HAT stages [18, 20]. This drug would be the ideal candidate to use for disease elimination, if current trials prove successful.

To date, these ideal treatment options are not available in the field and treatment remains “stage dependent” with serious side effects and potential complications during the second stage of the disease. Improvement in staging diagnosis and early screening methods are current challenges which would avoid delayed patient treatment.

2. Management of the Disease in the Field: Diagnosis

Diagnosis should be made as early as possible, in order to avoid disease progression to the neurological stage, which may necessitate complex and potentially unsafe treatments. Exhaustive screenings require major investment in personnel and material resources. In Africa such resources are often limited, especially in remote areas where the disease is most common. As a result, many infected people may die before diagnosis or treatment.

2.1. The Diagnosis of HAT Is Based on Active Screening (Figure 3). Antibody and parasite detection are needed for adequate patient examination and successful diagnosis in the field [1]. In this review, we only present the most currently used techniques in the field and propose how to put them into practice for field diagnosis of HAT in the context of a prospective campaign with a proposition of possible decision tree (Figure 3).

2.1.1. Antibody Detection

CATT (Card-Agglutination Trypanosomiasis Test). CATT is a serological test, useful for initial population screening to identify suspected cases. The test was developed in the late 1970s. It can be carried out on blood, capillary blood obtained from a finger prick, or blood from impregnated filter papers [21]. Antigen used for the test CATT is complete bloodstream forms of *T. b. gambiense* variable antigen type LiTat 1.3. This test can be performed on plasma or serum dilutions for which it is more specific than the CATT on blood and is therefore used to reduce the number of false-positive reactions, often before parasitological examinations. The sensitivity of CATT on blood is about 91%, with a range of 78–99.8%, and negative predictive values as high as 99–100% have been reported in mass population screening [22, 23]. False-negative CATT results may be obtained for patients infected with strains of trypanosomes that do not express the LiTat 1.3 gene, resulting in lower sensitivity of CATT in some endemic areas [24, 25]. Despite a specificity of about 97%, the positive predictive value of the CATT remains limited when the test is used for mass screening in populations in which the overall prevalence of *gambiense* HAT is low [23, 26–28]. False-positive results are found for patients with other parasitic diseases, such as malaria and filariasis, or a transient infection with *T. b. brucei*. Parasite CATT titration is done by some control programs after all parasitological examinations. This titer also depends on the country [6]. Because of its simplicity, reliability, and low cost, it is used in all control programs for serological screening of populations at risk for *T. b. gambiense* infection.

2.1.2. Parasite Detection

(i) *Lymph Node Examination.* The lymph node palpation is realized only for patient with a positive CATT. The fluid is examined rapidly after puncture. The sensitivity of lymph node palpation and aspiration varies from about 40% to 80% depending on parasite strain, stage of disease, and the prevalence of other diseases which may cause lymphadenopathy [6].

(ii) *mAECT (Mini Anion Exchange Centrifugation Technique or mAECT).* Parasitological investigation with microcolumns by anion exchange can be carried out on venous blood. Patient blood cells are negatively charged, while trypanosomes remain neutral, so that they can be separated by anion-exchange chromatography at pH 8 [29, 30]. For mAECT, 400 μ L of blood is applied onto a column containing

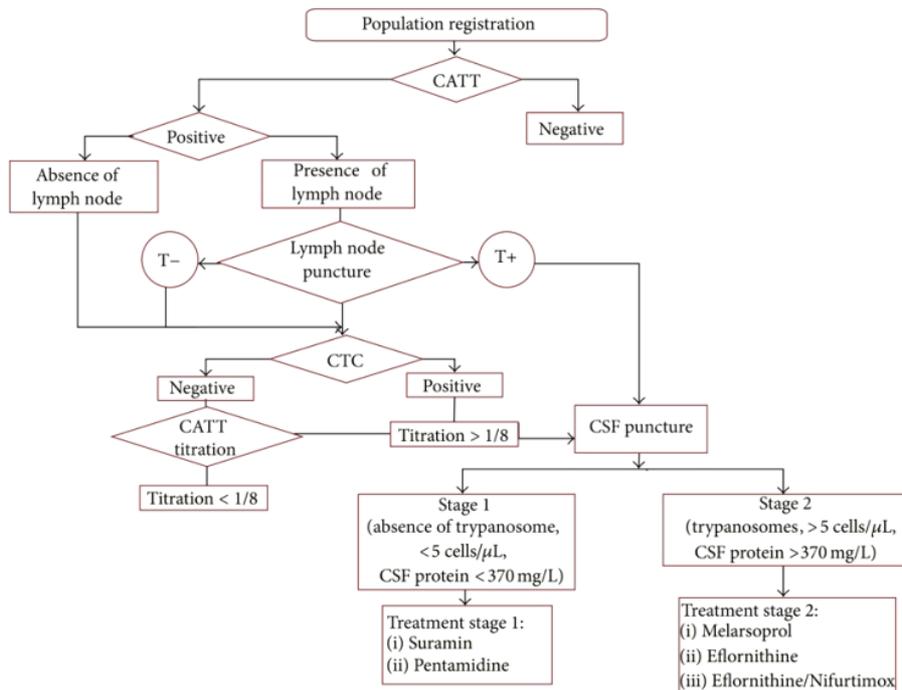


FIGURE 3: Decision tree of HAT stage diagnosis.

diethylaminoethyl cellulose. The blood cells stay on the gel, and the eluant containing the trypanosomes is collected in a tube. Trypanosomes are concentrated at the bottom of the tube by low-speed centrifugation (1000 g for 15 min), and the tip of the tube is examined in a special holder under a microscope (10 × 10 or ideally 10 × 16 magnification) for the presence of trypanosomes. The large blood volume used in the mAECT allows detection of fewer than 30 trypanosomes/mL, resulting in a high diagnostic sensitivity of 77% (68.8–92.1%) for mAECT [6]. This technic is time consuming and needs materials (buffer, column, etc.) and good technicians. Its use in the field is discussed by some authors and programs.

(iii) *CTC (Capillary Tube Centrifugation)*. The CTC technic is done on capillary tubes containing anticoagulant which are filled to three quarters (about 50 μL) with finger-prick blood. The dry end is sealed with plasticine or by flame, avoiding heating of the blood and killing the trypanosomes. Trypanosomes are concentrated in the same layer as the white blood cells (WBCs), between the plasma and the erythrocytes, by high-speed centrifugation (12 000 g for 5 min) in a hematocrit centrifuge. The capillary tubes are mounted in a special holder or between a microscope slide and a coverslip, and the empty space between the glass surfaces is filled with water to reduce diffraction. The capillary tubes are examined at low magnification (10 × 10) for mobile parasites at the junction of the WBC layer and the plasma layer. If available, use of 16x ocular lenses facilitates recognition of

trypanosomes. The detection limit of the CTC is estimated to be about 500 trypanosomes/mL. To increase its sensitivity, examination of at least four capillary tubes per person is recommended. The sensitivity is about 56% (39–80%) [6].

Disease stage identification, by examination of the cerebrospinal fluid (CSF), obtained by lumbar puncture, helps to establish the degree of progression of the disease and subsequently to determine the most appropriate treatment in each case (Figure 3).

2.2. Stage Diagnosis. Differentiation between the two stages can only be done by examination of the CSF after lumbar puncture. The detection of trypanosomes in CSF by microscopy alone has limited sensitivity and has a poor reproducibility rate. The number of parasites circulating in CSF can be very low, generating false negative results. An increased white blood cell (WBC) count in CSF is an indicator of meningitis and can help to increase the sensitivity of parasite detection. The WHO diagnostic criteria, which require the presence of trypanosomes in the CSF or a WBC count of more than 5 cells per μL, or both [1], are the most widely used guidelines for diagnosing late stages of the disease. Some clinicians use a higher white blood cell count cutoff point such as 20 cells per μL, especially for diagnosing CNS *T. b. gambiense* HAT. A consensus about the optimum WBC count of 10 cells per μL has been suggested for staging HAT [13].

There are reports of some patients with CSF white blood cell count of 20 cells per μL or less being treated successfully

with an early-stage drug like pentamidine, which highlights the possibility of an intermediate stage of infection [31–33]. This intermediate stage is characterized by parasites which have crossed the BBB but have not yet spread to the brain parenchyma.

Another potential parameter which may assist with late-stage diagnosis is the measurement of CSF IgM concentrations, which, due to synthesis within the spinal cord, are increased early in disease development in cases where there is CNS involvement. However all of these approaches have an intrinsic drawback; there is no gold standard of CNS HAT diagnosis with which to compare any new methods [14]. Furthermore, WBC counting is not specific to sleeping sickness, and alternative diagnoses or coexisting diseases, such as malaria, syphilis, HIV infection, tuberculosis, and toxoplasmosis, need to be investigated and excluded [34–38]. Most of the articles which report on the staging of sleeping sickness disease agree that WBC counting must be supported and confirmed by newer, more advanced diagnostic procedures.

3. New Research Pathways to Improve the Diagnosis of HAT

3.1. Screening of the Population. Existing diagnostic procedures are complex and cumbersome to implement because they require specialized mobile teams, trained to carry out rapid testing using invasive protocols. Research on this disease seeks to develop simplified tests which enable the integration of activities related to HAT diagnosis within the public health infrastructure. Thus, the target of HAT phase-out by 2020, as stipulated in the WHO roadmap and the London Declaration on Neglected Tropical Diseases, will have to be achieved through the development of rapid tests which are easy to produce on a large scale [6]. Several promising tests are under development.

Lateral flow immunochromatographic devices can detect low concentrations of antibodies targeting antigens in biological fluids [39, 40]. This technology can be used to develop rapid diagnostic tests (RDTs) that detect anti-trypanosome antibodies in human finger-prick blood samples. These RDT-based lateral flow devices are simple to use and easy to read and have stability characteristics that allow wide distribution and availability in remote endemic areas. The first RDTs for HAT diagnosis are currently being tested in the field. The tests were developed by Standard Diagnostics (SD BIOLINE HAT) and Coris Bioconcept (Sero-K-SeT) [41, 42]. They are based on a device using native surface glycoproteins (VSG) LiTat 1.3 and LiTat 1.5 to test for anti-trypanosome antibodies [41, 42]. Both tests show good ranges of sensitivity and specificity when compared to CATT [42]; however, improvements are still needed especially to facilitate test production and cost. Thus, recombinant antigens are currently being produced in line with these objectives.

The second prototype device, which uses the potential ISG65 diagnosis [43], is based on a combination of recombinant and native ISG65 VSG MiTat 1.4 [44]. ISG 65 is one of two well-characterized type 1 invariant surface glycoproteins,

which have moderately abundant transmembrane domains, expressed in *T. brucei* [45].

3.2. Advances in CSF Stage Diagnosis. The diagnosis of stage HAT is a key component in the therapeutic care of patients due to the high toxicity of some drugs including Melarsoprol that lead to arsenical encephalopathy in 5% of cases. So there is an urgent need to develop a quick, reliable, easy to perform, and cheap diagnostic test that can be used for HAT staging. The research and development of methods for disease staging have been revitalized, especially through an initiative launched by FIND and WHO in the 2000s and several alternative staging biomarkers and tools are under investigation.

3.2.1. Antibodies. Many published studies have investigated disease stage diagnosis, at the molecular level. In blood, and particularly plasma samples, some studies have observed decreased levels of cytokines such as IFN- γ or IL-10 and NO after treatment. These markers may be compared to control subject plasma [46]. Staging studies have primarily focused on CSF as the ideal body fluid for examination, due to its proximity to the CNS. Some research has focused on CSF antibodies. An alteration in the protein concentration of CSF, such as an increase in albumin or immunoglobulin, could indicate a BBB dysfunction or increased intrathecal synthesis of proteins [47]. We have known since the 1980s that the increased concentration of immunoglobulin in the CSF and the absence of a switch between IgM and IgG are characteristic of the immune response in the brain. More recently, some publications have demonstrated that the increased intrathecal IgM fraction is a sign of the presence of a brain inflammatory process, not necessarily connected to damage of the BBB in Stage 2 HAT patients [48]. Intrathecal IgM levels are considered by many to be superior to WBC counting as a parameter for HAT staging, especially for *T. b. gambiense* cases.

3.2.2. Cytokines and Chemokines. Another field of research being explored for the development of new diagnostic procedures for HAT staging is the modulation of immune-effectors such as cytokines and chemokines. The neuroinflammation seen in late stage HAT presents some characteristics such as the early activation of macrophages and astrocytes, the upregulation of inflammatory cytokines, and the presence of Mott cells (plasma cells containing IgM). Activated astrocytes and macrophages are two important sources of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the brain. The level of these cytokines and chemokines has been measured for the investigation of their diagnostic potential both in *T. b. gambiense* and *T. b. rhodesiense*. Cytokines and chemokines are also associated with the recruitment of leukocytes to the site of inflammation and their passage through the BBB, but also with the increase of WBC observed in CSF during the second stage of HAT. The most interesting cytokines and chemokines used for staging sleeping sickness are IL-10, IL-6, IL-1 β , CCL-3, CXCL-8, SLPI, Lipocalin 2,

ICAM-1, VCAM, MMP-9, MMP-2, CXCL-10, and CXCL-13 [48, 49], which permit the activation and amplification of the immune response and allow leukocytes which are sequestered in the perivascular space to transmigrate across the basement membrane and the glial limitans to reach the brain parenchyma [50]. A recent study initially evaluated the most promising molecules such as CXCL-10, CXCL-13, ICAM-1, VCAM-1, IgM, MMP-9, and B2MG and confirmed their capacity to act as accurate staging markers [50]. Furthermore, Neopterin as a new marker for staging of HAT was introduced and validated [51, 52]. Neopterin is an indicator of activation of the cellular immune response and has good potential not only as a staging marker but also for treatment outcome. The possibility of establishing a quick blood test for additional lateral disease testing, which is appropriate for field application, is advancing and is currently the primary focus of research and development [53]. This study was conducted only on *T. b. gambiense* patients. Some studies describe different outcomes for *T. b. rhodesiense* patients, largely due to the different neuropathogenesis of the two diseases [54]. In addition to being good staging markers, the level of these molecules seems to correlate with the severity of the neurological symptoms and therefore may assist with screening for the advanced second HAT stage [14]. The downside of these markers is the lack of specificity. Indeed, 80% of the CSF proteome is composed of blood derived proteins [55], and only the remaining 20% are produced in the brain, and so they are rarely considered to be specific to the neuroimmune response [47]. Moreover, these molecules are not specific markers of sleeping sickness, and other diseases such as malaria, which is also largely present in the countries affected by HAT, may also be responsible for the increased levels of these cytokines and chemokines. The vast majority of studies regarding this topic advocate the combination of multiple markers to increase staging accuracy [56, 57].

3.2.3. Proteomics. Another approach currently under investigation is the evaluation of the changes in protein expression between pathological and healthy conditions. Only a few studies have established first and second stage HAT disease CSF protein profiles. Previous studies have shown a large increase in the amount of immunoglobulins for stage 2 patients [46, 48], but they also show 73 proteins which are differentially expressed between the two stages. Two of these proteins, osteopontin and beta-2-microglobulin, were confirmed to be accurate markers of first and second stage patients [58]. It is important to research and study new protein biomarkers, particularly for discriminating stage 2 and stage 1 of the disease, and this is possible thanks to progress in matters of protein and peptide analysis with the evolution of mass spectrometry, for example, [59].

3.2.4. Polysomnography. In recent years, research has been conducted on the most typical clinical manifestation of HAT: the alteration of the normal sleep-wake cycle [1]. Polysomnography has been used for these studies. Polysomnography is a medical examination which involves the recording of several physiological variables, such as

respiratory and heart rate, and carrying out other tests including an electroencephalogram, an electromyogram, and an electrooculogram, during patient sleep, in order to investigate sleep disorders. Studies show a high number of Sleep Onset Rapid Eye Movement Periods (SOREMP) in stage 2 patients during their sleep, not only restricted to nighttime, but also during daytime sleep too. Treatment with Melarsoprol seems to reduce the appearance of SOREMPs. In spite of the successful outcomes of these studies and the noninvasive nature of this diagnostic tool, polysomnography is largely neglected due to the difficulty in establishing the necessary environment for such examinations, which require high-tech and bulky material, trained personnel, and extended examination periods [32]. It is therefore difficult to use as a diagnostic tool in the field. Moreover, this diagnostic tool is not specific because the observed increase in SOREMPs may be attributed to other sleep disorders. In addition, SOREMPs may be detected early in the disease and so are not specific markers of stage 2 HAT.

3.2.5. DNA Amplification. Carrying out PCR to amplify specific parasite DNA sequences obtained from blood, CSF, urine, or saliva samples has been proposed for staging of the disease. The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technic for staging HAT disease is promising and shows high specificity and sensitivity. Furthermore, for this technic, the target DNA is amplified at a constant temperature, so this test can be used in the field with minimal equipment or in the low level laboratories available in HAT endemic countries. The test can be performed on fresh blood samples, or even on blood samples which are dried on microscopy slides or on ordinary filter papers. Moreover, no gel electrophoresis is required, as positive results can be visually identified (fluorescence, white precipitate, or color change) and the analysis of several samples may be carried out simultaneously. Sets of specific primers were designed and validated and the reproducibility was verified using samples obtained from HAT patients [60–62]. This test is currently used mainly in DRC and Angola to see if there is a good candidate disease staging and is employed up to 24 months after treatment is completed, to see if it can be used to confirm disease remission (http://www.finddiagnostics.org/programs/hat-ond/hat/molecular_diagnosis.html). A similar technic for RNA amplification has recently been introduced. The Trypanozoon-specific real-time nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) assay allows the detection of parasite 18S ribosomal RNA [63].

Recent study using CSF PCR of *T. b. gambiense* patients for stage determination indicated a good staging accuracy of PCR especially for stage 2 patients before treatment. But the presence of parasite DNA or RNA in CSF of stage 2 HAT patients should be interpreted with care as the low specificity of molecular test [63].

However, for the posttreatment follow-up, molecular biology seems to be for several authors not a good marker. The specificity and sensitivity of a diagnostic PCR mainly depends on the DNA sequence targeted by the primers. Therefore it is important to continue research for optimizing amplification,

by designing new primers [64]. This technic is not quite optimal in a the field and is still debatable within scientific community.

4. Conclusion

After more than 50 years of neglect, the international community has recognized the need to eliminate sleeping sickness in Africa. The signing of a partnership agreement in 2001 between the WHO and Aventis announced the advent of a new era in the fight to eliminate the *Trypanosoma* parasite from the African continent. Private partners, Non-government Organizations (NGOs), institutional partners, and the Belgian and French governments are fully engaged, working hand in hand with relevant organizations (WHO, FAO, etc.), with the objective to find new diagnosis tests. The successful elimination of the disease in Africa needs a better management of patients. The research for new stage biomarkers for sleeping sickness is a key for the eradication of the disease since actually no dependent stage treatment is accessible by all the people concerned by HAT.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

References

- [1] R. Brun, J. Blum, F. Chappuis, and C. Burri, "Human African trypanosomiasis," *The Lancet*, vol. 375, no. 9709, pp. 148–159, 2010.
- [2] T. N. Baral, "Immunobiology of African trypanosomes: need of alternative interventions," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 389153, 24 pages, 2010.
- [3] J. M. Sternberg and L. Maclean, "A spectrum of disease in Human African trypanosomiasis: the host and parasite genetics of virulence," *Parasitology*, vol. 137, no. 14, pp. 2007–2015, 2010.
- [4] J. R. Franco, P. P. Simarro, A. Diarra, and J. G. Jannin, "Epidemiology of human African trypanosomiasis," *Clinical Epidemiology*, vol. 6, no. 1, pp. 257–275, 2014.
- [5] S. Aksoy, A. Caccone, A. P. Galvani, and L. M. Okedi, "Glossina fuscipes populations provide insights for human African trypanosomiasis transmission in Uganda," *Trends in Parasitology*, vol. 29, no. 8, pp. 394–406, 2013.
- [6] WHO, "Control and surveillance of human African trypanosomiasis," Report of a WHO Expert Committee 984, WHO, 2013.
- [7] P. P. Simarro, A. Diarra, J. A. R. Postigo, J. R. Franco, and J. G. Jannin, "The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the world health organization 2000–2009: the way forward," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 2, Article ID e1007, 2011.
- [8] C. Ripert, "Epidémiologie des maladies parasitaires, protozooses et helminthoses réservoirs, vecteurs et transmission," *Editions Médicales Internationales*, vol. 1, 1996.
- [9] M. Gentilini and B. Duflo, *Médecine Tropicale*, Flammarion, 4th edition, 1986.
- [10] J. Pépin and H. Méda, "The epidemiology and control of human African trypanosomiasis," *Advances in Parasitology*, vol. 49, pp. 71–132, 2001.
- [11] F. Checchi, J. A. N. Filipe, D. T. Haydon, D. Chandramohan, and F. Chappuis, "Estimates of the duration of the early and late stage of gambiense sleeping sickness," *BMC Infectious Diseases*, vol. 8, article 16, 2008.
- [12] C. Burri, "Chemotherapy against human African trypanosomiasis: is there a road to success?" *Parasitology*, vol. 137, no. 14, pp. 1987–1994, 2010.
- [13] G. N. Sekhar, C. P. Watson, M. Fidanboyly, L. Sanderson, and S. A. Thomas, "Delivery of antihuman African trypanosomiasis drugs across the blood-brain and blood-CSF barriers," *Advances in Pharmacology*, vol. 71, pp. 245–275, 2014.
- [14] P. G. E. Kennedy, "Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 113, no. 4, pp. 496–504, 2004.
- [15] G. Priotto, L. Pinoges, I. B. Fursa et al., "Safety and effectiveness of first line eflornithine for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Sudan: cohort study," *British Medical Journal*, vol. 336, no. 7646, pp. 705–708, 2008.
- [16] J. C. Munday, A. A. Eze, N. Baker et al., "Trypanosoma brucei aquaglyceroporin 2 is a high-affinity transporter for pentamidine and melaminophenyl arsenic drugs and the main genetic determinant of resistance to these drugs," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 69, no. 3, Article ID dkt442, pp. 651–663, 2014.
- [17] E. Torreele, B. Bourdin Trunz, D. Tweats et al., "Fexinidazole: a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 4, no. 12, article e923, 2010.
- [18] G. Eperon, M. Balasegaram, J. Potet, C. Mowbray, O. Valverde, and F. Chappuis, "Treatment options for second-stage gambiense human African trypanosomiasis," *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 12, no. 11, pp. 1407–1417, 2014.
- [19] A. Tarral, S. Blesson, O. V. Mordt et al., "Determination of an optimal dosing regimen for Fexinidazole, a novel oral drug for the treatment of Human African trypanosomiasis: first-in-human studies," *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 53, no. 6, pp. 565–580, 2014.
- [20] R. T. Jacobs, B. Nare, S. A. Wring et al., "SCYX-7158, an orally-active benzoxaborole for the treatment of stage 2 human african trypanosomiasis," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 6, Article ID e1151, 2011.
- [21] L. Penchenier, P. Grébaud, F. Njokou, V. Eboo Eyenga, and P. Büscher, "Evaluation of LATEX/*T.b.gambiense* for mass screening of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Central Africa," *Acta Tropica*, vol. 85, no. 1, pp. 31–37, 2003.
- [22] A. K. Ebeja, "Journée scientifique THA à Kinshasa. Bulletin HAT Platform," 2013, http://www.dndi.org/images/stories/strengthening_capacities/newsletter.final.ENGLISH.THA12.pdf.
- [23] F. Checchi, F. Chappuis, U. Karunakara, G. Priotto, and D. Chandramohan, "Accuracy of five algorithms to diagnose gambiense human african trypanosomiasis," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 7, Article ID e1233, 2011.
- [24] P. Dukes, W. C. Gibson, J. K. Gashumba et al., "Absence of the LiTat 1.3 (CATT antigen) gene in *Trypanosoma brucei gambiense* stocks from Cameroon," *Acta Tropica*, vol. 51, no. 2, pp. 123–134, 1992.
- [25] H. Edeghere, P. O. Olise, and D. S. Olatunde, "Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): new endemic foci in Bendel State, Nigeria," *Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 40, no. 1, pp. 16–20, 1989.
- [26] W. O. Inojosa, I. Augusto, Z. Bisoffi et al., "Diagnosing human African trypanosomiasis in Angola using card agglutination

- test: observational study of active and passive case finding strategies," *The British Medical Journal*, vol. 332, no. 7556, pp. 1479–1483, 2006.
- [27] F. Chappuis, E. Stivanello, K. Adams, S. Kidane, A. Pittet, and P. A. Bovier, "Card agglutination test for trypanosomiasis (CATT) end-dilution titer and cerebrospinal fluid cell count as predictors of human African trypanosomiasis (*Trypanosoma brucei gambiense*) among serologically suspected individuals in Southern Sudan," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 71, no. 3, pp. 313–317, 2004.
- [28] P. P. Simarro, J. A. Ruiz, J. R. Franco, and T. Josenando, "Attitude towards CATT-positive individuals without parasitological confirmation in the African trypanosomiasis (*T. b. gambiense*) focus of Quicama (Angola)," *Tropical Medicine and International Health*, vol. 4, no. 12, pp. 858–861, 1999.
- [29] P. Lutumba, J. Robays, C. Miaka et al., "Validity, cost and feasibility of the mAECT and CTC confirmation tests after diagnosis of African of sleeping sickness," *Tropical Medicine and International Health*, vol. 11, pp. 470–478, 2006.
- [30] P. Büscher, D. M. Ngoyi, J. Kaboré et al., "Improved models of mini anion exchange centrifugation technique (mAECT) and modified single centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 3, no. 11, article e471, 2009.
- [31] S. Bisser, V. Lejon, P. M. Preux et al., "Blood-cerebrospinal fluid barrier and intrathecal immunoglobulins compared to field diagnosis of central nervous system involvement in sleeping sickness," *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 193, no. 2, pp. 127–135, 2002.
- [32] A. Buguet, S. Bisser, T. Josenando, F. Chapotot, and R. Cespuglio, "Sleep structure: a new diagnostic tool for stage determination in sleeping sickness," *Acta Tropica*, vol. 93, no. 1, pp. 107–117, 2005.
- [33] A. Buguet, R. Cespuglio, and B. Buguet, "Trypanosomose humaine Africaine," in *Les Troubles du Sommeil*, vol. 2, chapter 33, pp. 399–406, 2012.
- [34] K. G. Ghanem, R. D. Moore, A. M. Rompalo, E. J. Erbeling, J. M. Zenilman, and K. A. Gebo, "Lumbar puncture in HIV-infected patients with syphilis and no neurologic symptoms," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 48, no. 6, pp. 816–821, 2009.
- [35] F. E. McKenzie, W. A. Prudhomme, A. J. Magill et al., "White blood cell counts and malaria," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 192, no. 2, pp. 323–330, 2005.
- [36] G. Thwaites, M. Caws, T. T. H. Chau et al., "Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 46, no. 4, pp. 1363–1368, 2008.
- [37] J. Flegr and I. Stříž, "Potential immunomodulatory effects of latent toxoplasmosis in humans," *BMC Infectious Diseases*, vol. 11, article 274, 2011.
- [38] D. R. Bernardo and N. Chahin, "Toxoplasmic encephalitis during mycophenolate mofetil immunotherapy of neuromuscular disease," *Neurology: Neuroimmunology and Neuroinflammation*, vol. 2, article e63, 2015.
- [39] G. A. Posthuma-Trumpie, J. Korf, and A. van Amerongen, "Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 393, no. 2, pp. 569–582, 2009.
- [40] B. O'Farrell, "Lateral flow immunoassay systems: evolution from the current state of the art to the next generation of highly sensitive, quantitative rapid assays," in *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA, and Related Techniques*, D. Wild, Ed., pp. 89–107, Elsevier, Oxford, UK, 2013.
- [41] P. Büscher, Q. Gilleman, and V. Lejon, "Rapid diagnostic test for sleeping sickness," *The New England Journal of Medicine*, vol. 368, no. 11, pp. 1069–1070, 2013.
- [42] FIND Diagnostics, *The First Rapid Test to Screen for Sleeping Sickness is Launched*, FIND Diagnostics, 2012.
- [43] J. M. Sternberg, M. Gierliński, S. Biéler, M. A. J. Ferguson, and J. M. Ndung'u, "Evaluation of the diagnostic accuracy of prototype rapid tests for human African trypanosomiasis," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 8, no. 12, Article ID e3373, 2014.
- [44] L. Sullivan, S. J. Wall, M. Carrington, and M. A. J. Ferguson, "Proteomic selection of immunodiagnostic antigens for human African trypanosomiasis and generation of a prototype lateral flow immunodiagnostic device," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 2, Article ID e2087, 2013.
- [45] K. Ziegelbauer, G. Multhaupt, and P. Overath, "Molecular characterization of two invariant surface glycoproteins specific for the bloodstream stage of *Trypanosoma brucei*," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 15, pp. 10797–10803, 1992.
- [46] B. Courtioux, C. Boda, G. Vatunga et al., "A link between chemokine levels and disease severity in human African trypanosomiasis," *International Journal for Parasitology*, vol. 36, no. 9, pp. 1057–1065, 2006.
- [47] H. Reiber and J. B. Peter, "Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs," *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 184, no. 2, pp. 101–122, 2001.
- [48] N. Tiberti, A. Hainard, and J.-C. Sanchez, "Translation of human African trypanosomiasis biomarkers towards field application," *Translational Proteomics*, vol. 1, no. 1, pp. 12–24, 2013.
- [49] B. Courtioux, L. Pervieux, G. Vatunga et al., "Increased CXCL-13 levels in human African trypanosomiasis meningo-encephalitis," *Tropical Medicine and International Health*, vol. 14, no. 5, pp. 529–534, 2009.
- [50] K. Kristensson, M. Nygård, G. Bertini, and M. Bentivoglio, "African trypanosome infections of the nervous system: parasite entry and effects on sleep and synaptic functions," *Progress in Neurobiology*, vol. 91, no. 2, pp. 152–171, 2010.
- [51] N. Tiberti, A. Hainard, V. Lejon et al., "Cerebrospinal fluid neopterin as marker of the meningo-encephalitic stage of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 7, Article ID e40909, 2012.
- [52] N. Tiberti, E. Matovu, A. Hainard et al., "New biomarkers for stage determination in *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness patients," *Clinical and Translational Medicine*, vol. 2, article 1, 2013.
- [53] S. Bühner-Sekula, F. F. V. Hamerlinck, T. A. Out, L. G. Bordewijk, and P. R. Klatser, "Simple dipstick assay for semi-quantitative detection of neopterin in sera," *Journal of Immunological Methods*, vol. 238, no. 1–2, pp. 55–58, 2000.
- [54] L. MacLean, M. Odiit, and J. M. Sternberg, "Intrathecal cytokine responses in *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness patients," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 100, no. 3, pp. 270–275, 2006.
- [55] X. Yuan and D. M. Desiderio, "Proteomics analysis of human cerebrospinal fluid," *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 815, no. 1–2, pp. 179–189, 2005.

- [56] A. Hainard, N. Tiberti, X. Robin et al., "A combined CXCL10, CXCL8 and H-FABP panel for the staging of human African trypanosomiasis patients," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 3, no. 6, article e459, 2009.
- [57] L. MacLean, H. Reiber, P. G. E. Kennedy, and J. M. Sternberg, "Stage progression and neurological symptoms in *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness: role of the CNS inflammatory response," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 10, Article ID e1857, 2012.
- [58] N. Tiberti, A. Hainard, V. Lejon et al., "Discovery and verification of osteopontin and beta-2-microglobulin as promising markers for staging human African trypanosomiasis," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 9, no. 12, pp. 2783–2795, 2010.
- [59] A. Geiger, G. Simo, P. Grébaud, J.-B. Peltier, G. Cuny, and P. Holzmüller, "Transcriptomics and proteomics in human African trypanosomiasis: current status and perspectives," *Journal of Proteomics*, vol. 74, no. 9, pp. 1625–1643, 2011.
- [60] Z. K. Njiru, A. S. J. Mikosza, T. Armstrong, J. C. Enyaru, J. M. Ndung'u, and A. R. C. Thompson, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 2, no. 2, article e147, 2008.
- [61] Z. K. Njiru, A. S. J. Mikosza, E. Matovu et al., "African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA," *International Journal for Parasitology*, vol. 38, no. 5, pp. 589–599, 2008.
- [62] E. Matovu, A. J. Kazibwe, C. M. Mugasa, J. M. Ndungu, and Z. K. Njiru, "Towards point-of-care diagnostic and staging tools for human African trypanosomiasis," *Journal of Tropical Medicine*, vol. 2012, Article ID 340538, 9 pages, 2012.
- [63] C. M. Mugasa, G. J. Schoone, R. A. Ekangu, G. W. Lubega, P. A. Kager, and H. D. F. H. Schallig, "Detection of *Trypanosoma brucei* parasites in blood samples using real-time nucleic acid sequence-based amplification," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 61, no. 4, pp. 440–445, 2008.
- [64] S. Deborggraeve and P. Büscher, "Molecular diagnostics for sleeping sickness: what is the benefit for the patient?" *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 10, no. 6, pp. 433–439, 2010.

Objectifs

L'institut de Neuroépidémiologie Tropicale de Limoges (UMR INSERM 1094) et FIND ont mis en place une étude clinique sur une cohorte de patients atteints de THA en Angola entre 2008 et 2011. Cette cohorte regroupe des patients et des contrôles issus de 3 régions endémiques. Les patients inclus ont été traités puis suivis jusqu'à leur guérison. Le travail de terrain effectué par le Dr Bisser a permis de constituer une biobanque d'échantillons conservée à l'Université de Limoges.

Notre travail de thèse a consisté à exploiter cette biobanque pour identifier de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi des patients.

Les objectifs secondaires à ce travail sont :

- La caractérisation et la compréhension du « stade intermédiaire » de la THA
- L'identification des biomarqueurs de la maladie et des biomarqueurs de stade dans les fluides biologiques « classiques » (sérum, LCR) et dans des fluides peu exploités et plus faciles d'accès sur le terrain (urines et salive)
- Ré-évaluer ces biomarqueurs à 12 mois post-traitement.

Matériels et Méthodes

3.1. Cohorte FIND Angola

3.1.1. Présentation de l'Angola et du contexte de la création de la biobanque

Ce travail est basé sur une bio-banque d'échantillons obtenus à partir de patients angolais atteints de THA à *T. b. gambiense*, faisant partie de la cohorte financée par l'organisation FIND. Cette cohorte a été constituée par le Dr Sylvie BISSER à l'occasion d'une enquête prospective menée entre 2008 et 2011 au niveau de 3 provinces angolaises : Ûige, Bengo et Cuanza Norte (**Figure 25**).

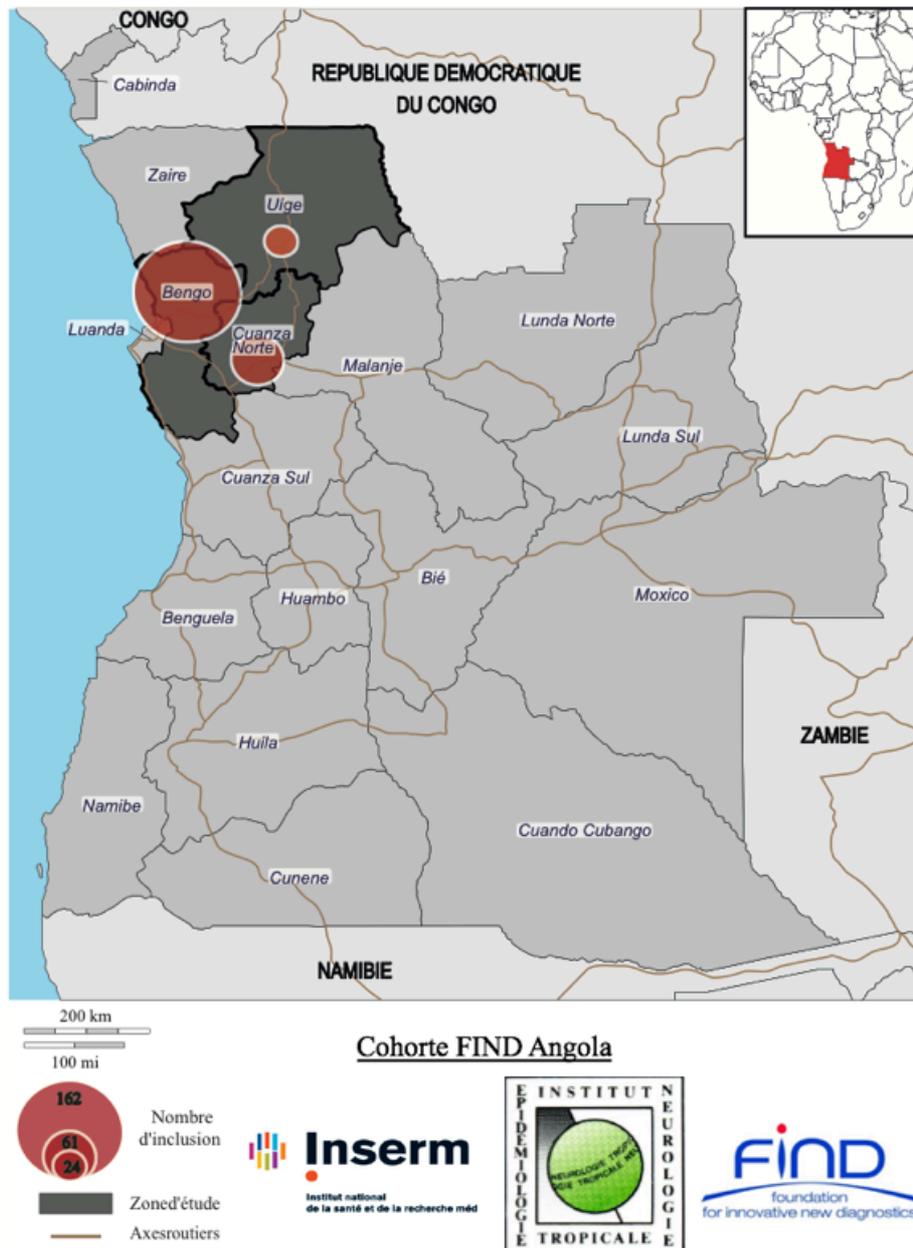


Figure 25 : Zone d'échantillonnage de la cohorte FIND Angola.

L'Angola est un pays d'Afrique centrale d'une superficie totale de 1 246 700 Km² dont la capitale est Luanda. La langue officielle parlée par les 29,5 millions d'habitants est le portugais (Institut national de statistique d'Angola). Ce pays a connu 27 ans de guerre civile avant un cessez-le-feu signé en avril 2002. D'un point de vue économique, ce pays dispose d'un potentiel exceptionnel (pétrole, gaz, minerais de fer, cuivre, uranium, diamants...) ce qui lui a permis jusqu'en 2013 d'entretenir un taux de croissance supérieur à 7% (record à 24,4% en 2007). L'Angola ayant une forte dépendance économique vis à vis du pétrole, la chute du cours du baril a eu un très fort impact sur son économie depuis 2014 (Encyclopédie Universalis, 2017).

En ce qui concerne la THA, l'Angola fait partie des foyers historiques de la maladie. On note depuis 2006 une nette diminution du nombre de nouveaux cas par an (WHO, 2016). Toutefois, une étude menée en Angola en 2012 a montré que, depuis 2001, 80% des nouveaux cas dépistés (par dépistage passif ou actif) étaient en stade 2 de la maladie, mais avec une diminution du nombre de nouveaux cas par an (Truc et al., 2012). Dans ce pays, un diagnostic actif de la population est fait en routine et le système de détection passif de cas de THA a été renforcé (WHO, 2016).

Afin d'améliorer les techniques de dépistage, FIND (*Foundation for Innovative New Diagnostics*) finance différents projets visant la mise en place de nouvelles stratégies pour intensifier la surveillance de la THA et d'autres pathologies. Ces projets sont menés au niveau de 8 pays : le Tchad, le Congo, la République Démocratique du Congo, la Guinée, le Nigéria, le Sud-Soudan, l'Ouganda et l'Angola. La mise en place de nouveaux outils de diagnostic rapides est la priorité de cette fondation.

3.1.2. Constitution de la cohorte, 1^{ère} étape : le dépistage

Au cours d'une étude menée en Angola entre 2008 et 2011, 72 788 individus ont été dépistés de manière active et passive. Parmi ces individus, 247 ont été inclus dans la cohorte FIND Angola : 19 individus contrôles, 67 patients en stade 1, 34 patients en stade intermédiaire et 127 patients en stade 2 avancé.

La constitution de cette cohorte a été validée par le comité d'éthique dépendant de la "*Direcção Nacional de Saude Publica, Ministerio da Saude*" d'Angola. Chaque individu inclus a été informé de la constitution de cette cohorte après avoir signé le consentement éclairé. Dans les cas des mineurs, les parents ou un tuteur ont été informés et un consentement éclairé a également été signé. Pour les personnes ne souhaitant pas être incluses dans la cohorte, le diagnostic, le

traitement et le suivi ont été réalisés selon la même procédure sans qu'il n'y ait d'échantillon biologique collecté.

Les enfants de moins de 12 ans ont été exclus car trop jeunes pour participer à cette étude (Kjeldsberg and Knight, 1993).

3.1.3. Le diagnostic de la maladie

Sur les 72 788 individus dépistés, 601 présentent un CATT positif. Pour les sujets positifs au CATT sur sang total, 1 mL de plasma a été prélevé pour effectuer une titration. L'examen du suc ganglionnaire a été réalisé chez tous les sujets pour lesquels des ganglions lymphatiques étaient palpables, afin de rechercher la présence des trypanosomes. Dix mL de sang veineux ont été recueillis pour tous les sujets positifs au CATT, ainsi que pour les patients positifs à la palpation ganglionnaire. Six cent μL de sang ont été utilisés pour effectuer le test de la centrifugation en tube capillaire (CTC) (4 tubes capillaires de 75 μL) et la technique de mAECT (300 μL) (Büscher et al., 2009).

Les cas confirmés par examen parasitologique (recherche de parasite dans le suc ganglionnaire, mAECT et CTC) et les cas jugés positifs au test CATT à une dilution de 1/16 (négatifs pour l'examen parasitologique) ont eu une ponction lombaire pour déterminer le stade de la maladie.

3.1.4. Le diagnostic de stade de la maladie

L'examen parasitologique du LCR a été réalisé après une étape de centrifugation (Büscher et al., 2009). Les patients ont été classés en stade 1 lorsqu'aucun trypanosome n'a été observé dans le LCR et lorsque la cytorachie était inférieure ou égale à 5 cellules/ μL . Ceux qui avaient des trypanosomes dans le LCR ou une cytorachie supérieur à 20 cellules/ μL ont été classés en stade 2 avancé. Les patients de stade intermédiaire présentaient une cytorachie entre 5 et 20 cellules/ μL de LCR ou des trypanosomes dans le LCR sans augmentation de la cytorachie (<5 cellules/ μL).

Tous les patients en stade 1 de la maladie ont été traités avec de la pentamidine et tous les patients en stade 2 avancé ont été traités avec du DFMO, excepté un. Ce patient a été traité avec de la pentamidine à la suite d'une erreur entraînant un mauvais diagnostic de stade. La majorité des patients en stade intermédiaire (79%) ont été traités avec de la pentamidine, les 21% restants ont été traités avec du DFMO.

3.1.5. Synthèses

Parmi les 601 individus positifs au test CATT, 228 patients ont été inclus dans la cohorte FIND Angola. Soixante-sept patients inclus dans la cohorte ont été diagnostiqués en stade 1 de la maladie, 34 patients en stade intermédiaire et 127 patients en stade 2 avancé. Dix-neuf individus contrôles ont également été inclus dans la cohorte (**Tableau 6**).

La cohorte FIND Angola a été constituée à partir de 162 individus dépistés dans la province de Bengo, 61 dans la province de Cuanza Norte et 24 dans la province de Uíge. Cette cohorte est composée de 126 hommes et 121 femmes pour un âge moyen de 35 ans. Au total, 7 ethnies sont représentées dans notre échantillonnage. Les trois groupes ethniques majoritaires sont l'ethnie Umbundo, l'ethnie Kimbundo et l'ethnie Kikongo.

Tableau 6 : Composition et données épidémiologiques de la cohorte FIND Angola.

Zones d'échantillonnages	Nombre de participants enrôlés	Sexe ratio	Moyenne d'âge (ans)	Nombre de patients			Nombre de Contrôles
				Stade 1	Stade Intermédiaire	Stade 2 avancé	
Bengo	162	1,38	35,41	38	16	92	16
Cuanza Norte	61	0,74	32,39	14	12	32	3
Uíge	24	0,33	35,66	15	6	3	0
Total	247	1,04	34,69	67	34	127	19

3.1.6. Origine des individus contrôles

Il n'est pas acceptable sur le plan éthique d'effectuer une ponction lombaire sur un patient pour lequel aucune pathologie neurologique n'est suspectée. Des contrôles angolais séronégatifs pour la THA n'ont donc pas pu être intégrés à cette étude.

Ainsi les 19 contrôles sont issus des 601 patients présentant un test CATT positif. Initialement, ces individus étaient suspectés de THA et finalement considérés comme sains à la suite d'examens complémentaires négatifs (**Figure 26**). Compte tenu du niveau élevé de suspicion clinique et d'une cytorachie élevée, 2 sujets ont été traités avec de l'éflornithine. Sept autres contrôles ont été traités avec de la pentamidine. Dix contrôles ont été suivis sans aucun traitement et 6 se sont négativés durant le suivi et les 4 derniers ont été perdus vue lors du suivi.

3.1.7. Le suivis des patients

Les individus inclus ont été examinés au moment du diagnostic (inclusion) et ensuite après leurs traitements uniquement pour les patients en stade intermédiaire et en stade 2 avancé. Un suivi clinique des patients a été organisé aux 6^{ème}, 12^{ème}, 18^{ème} et 24^{ème} mois après l'administration du traitement. Après traitement, 214 patients ont été revus puis 188 patients au suivi à 6 mois. Cent cinquante-huit patients se sont présentés au suivi à 12 mois, 138 patients au suivi à 18 mois et 131 patients au suivi à 24 mois. Trois patients sont morts au cours des suites de la THA, dont 1 à la suite d'une erreur de traitement. Six autres patients décèderont d'autres pathologies pendant cette étude ; pour 5 d'entre eux le paludisme est mis en cause et 1 présentait une co-infection et des problèmes cardiaques. Parmi les patients de cette cohorte 11 sont suspectés de rechutes, 4 au 12^{ème} mois, 2 au 18^{ème} mois et 5 au 24^{ème} mois (**Figure 26**).

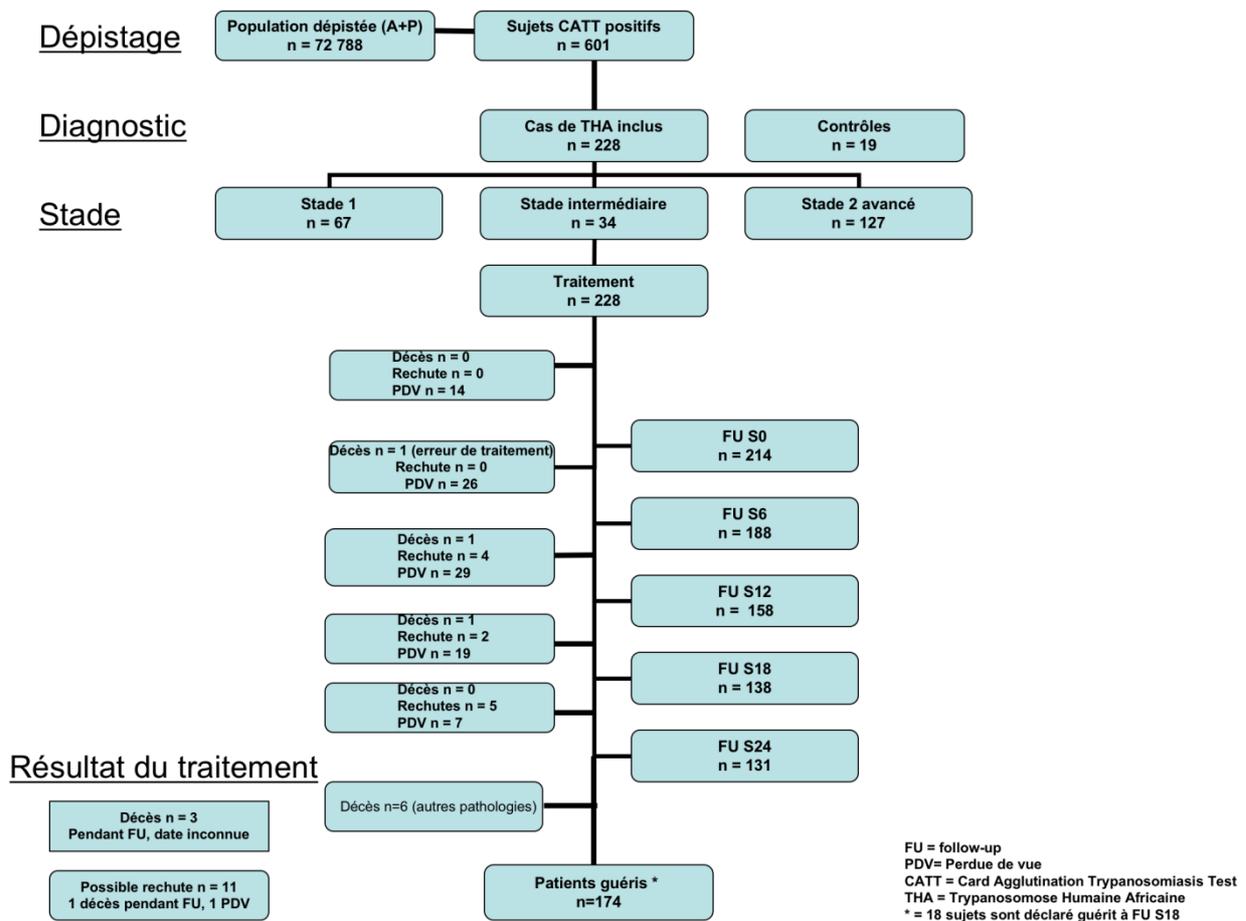


Figure 26 : Diagramme représentant l'inclusion et le suivi des patients et des individus contrôles de la cohorte FIND Angola.

3.1.8. Autres examens réalisés

Tous les participants ont subi des examens cliniques, physiques, neurologiques et psychiatriques.

Au cours de l'examen clinique, le clinicien demande aux individus inclus dans la cohorte s'ils ont noté la présence de fièvres, de céphalées, d'adénomégalies, d'œdèmes, de prurits ou de lésions cutanées, de palpitations, de douleurs thoraciques ou précordiales, de dyspnées et de toux. Des données relatives aux troubles gastro-intestinaux sont également rapportées comme la survenue de douleurs abdominales, de constipations, de diarrhées et de nausées. Des informations sur la stérilité et sur la survenue de douleurs ou d'écoulements urinaires sont recueillies auprès des individus inclus dans la cohorte. Les cas d'aménorrhée et les antécédents d'avortement chez les femmes, ainsi que les cas d'impuissance chez les hommes sont répertoriés. Les troubles du comportement et de la marche ainsi que la présence d'arthralgies et de myalgies sont observés par le clinicien en charge de l'examen. La perte d'appétit, la perte de poids ou une fatigue inhabituelle sont également recensés lors de cet examen. Le patient est interrogé sur la qualité de son sommeil. Enfin, les mensurations, la tension artérielle ainsi que la température de chaque individu sont mesurées.

L'examen physique comprend l'observation des muqueuses, des cheveux, des lésions cutanées, des adénomégalies, des poumons et du cœur. Une palpation de l'abdomen permet de mettre en évidence une splénomégalie, une hépatomégalie ou la présence de douleurs ou d'une dilatation de l'abdomen. L'aspect et la douleur à la palpation du système génito-urinaire, du squelette, de la nuque et des muscles sont aussi vérifiés. Les troubles du comportement (TICs, mouvements anormaux du tronc ou de la face, tremblements, myoclonie, athétose et chorée), de la marche (mouvements anormaux des membres et paralysie des membres supérieurs ou inférieurs) et du langage ainsi qu'une altération de la conscience sont observés. Les patients présentant une altération de la conscience sont répertoriés avec le score de Glasgow.

L'examen neurologique a permis de discerner certains signes neurologiques en lien avec le stade 2 de la THA tels que le signe de Romberg, une dysmétrie, une hyper ou une hypotonie ainsi que l'altération de certains réflexes (réflexe péri-oral, réflexe chéiro-oral, réflexe de Babinski, réflexe bicipital ou rotulien et sensibilité spontanée ou objective). L'acuité visuelle, l'audition et l'olfaction sont évaluées. La présence d'un syndrome méningé, extrapyramidal, pyramidal, cérébelleux ou frontal ainsi que de troubles du sommeil, de troubles sensitifs ou de troubles des fonctions supérieures sont aussi évalués.

Les troubles psychiatriques ont été évalués grâce au test du Mini-International (Sheehan et al., 1998) et l'échelle de dépression de Hamilton (Hamilton, 1967) a été utilisée pour évaluer l'état de dépression. L'interview neuropsychiatrique du Mini-International et l'échelle de notation de Hamilton pour la dépression ont été réalisés à l'inclusion et aux suivis à 6 mois et 24 mois.

Tous les participants ont subi un examen approfondi pour mettre en évidence d'éventuelles co-infections (paludisme, filariose et schistosomose). Cette investigation clinique et biologique a eu lieu à l'inclusion et à chaque suivi.

Les dépistages du VIH et de la syphilis ont été déterminés rétrospectivement à Limoges sur les échantillons prélevés et stockés en utilisant le test VIKIA HIV 1/2 (Biomérieux®, France), RPR-Nosticon II (Biomérieux®, France) et le test TPHA (Biorad®, France) respectivement. Vingt-trois patients et individus contrôles ont été testés positifs au VIH. Ces patients ont été informés de leur séropositivité et des possibilités de traitement. Une analyse récente de leur sérum a montré que parmi ces cas de VIH, 2 ont été confirmés par ELISA et Western blot. Cinq patients ont présenté un test positif à la syphilis par RPR-Nosticon II et ont été confirmés par le test TPHA.

3.1.9. Constitution de la biobanque

La biobanque FIND Angola rassemble des échantillons de plasma, de sang total, de LCR, de salive, d'urine et de larmes prélevés pour tous les individus. Ces prélèvements ont été réalisés à l'inclusion, à la fin du traitement ainsi qu'à chaque suivi.

Ces échantillons ont été répartis en aliquotes et stockés dans de l'azote liquide avant d'être acheminés à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Limoges, puis stockés à -80°C. Les échantillons de larmes ont été récupérés sur papiers filtres et sont conservés à température ambiante à l'abri de la lumière.

3.1.10. Informatisation des données

Les données personnelles et médicales des patients et des contrôles, rassemblées à la suite des différents examens ont été compilées informatiquement sous la forme d'une base de données à l'aide du logiciel Clinsight®. C'est un logiciel de gestion des données et de supervision des essais cliniques. Cette base de données est gérée au niveau du Centre d'Epidémiologie, de Biostatistique et de Méthodologie de la Recherche (CEBIMER). Le

CEBIMER est une composante du Centre Hospitalier Universitaire de Limoges (CHU de Limoges).

Ce projet a fait l'objet d'une demande d'autorisation à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) en 2008.

Les données médicales et personnelles des patients et des contrôles ont été anonymisées par l'attribution d'un numéro.

3.2. Sous Cohorte utilisée pour l'article : Neopterin and CXCL-13 in diagnosis and follow up of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: lessons from the field in Angola.

3.2.1. Inclusion

La sous cohorte a été constituée dans le but de déterminer les seuils de néoptérine et CXCL-13 dans le LCR permettant de discriminer les différents stades de la maladie et de les comparer aux critères classiques de stade préconisés par l'OMS.

Pour cette étude :

- Les patients ont été classés en stade 1 lorsqu'aucun trypanosome n'a été observé dans le LCR et lorsque la cytorachie est inférieure ou égale à 5 cellules/ μL .
- Les patients qui présentent un ou plusieurs trypanosomes dans le LCR ou qui ont une cytorachie supérieure à 20 cellules/ μL ont été classés comme stade 2 avancé.
- Les patients de stade intermédiaire sont définis par une cytorachie comprise entre 6 et 20 cellules/ μL ou avec des trypanosomes dans le LCR sans augmentation cellulaire (≤ 5 cellules/ μL).

Les patients sélectionnés pour cette étude sont les patients pour lesquels nous avons le maximum de données de concentrations de néoptérine et de CXCL-13 dans le LCR à chaque moment du suivi. Lors du suivi à 24 mois après le traitement, seuls les examens cliniques, physiques et neurologiques ainsi que le dépistage de rechute (par recherche du trypanosome dans le LCR et mesure de la cytorachie) ont été effectués. Il n'y a donc pas de données de concentrations de néoptérine et de CXCL-13 dans le LCR 24 mois après le traitement.

Cette sous cohorte inclut 83 patients : 30 patients en stade 1, 19 individus en stade intermédiaire et 34 en stade 2 avancé. Soixante-seize (90%) patients ont été revus lors du suivi à 6 mois (S6), 75 patients (89%) lors du suivi à 12 mois (S12) et 75 patients (89%) lors

du suivi à 18 mois (S18). À la fin du suivi, 64 patients ont été déclarés guéris et 11 patients ont été déclarés en rechute (**Figure 27**).

3.2.2. Données biologiques, cliniques

Les données démographiques, cliniques et biologiques des 83 patients à l'inclusion sont résumées dans la **Figure 27A**. Le sex-ratio est de 0,44 (37/83) et l'âge varie de 13 à 83 ans avec une moyenne de 42,7 pour le stade 1, 35,37 pour le stade intermédiaire et 34,38 pour le stade 2. Les tests CATT ont été positifs chez tous les sujets. Des trypanosomes ont été trouvés dans 48 sucs ganglionnaires, 50 prélèvements de sang et 34 prélèvements de LCR.

- Les patients de stade 1 ont un nombre moyen de cellules dans le LCR de 1,83/ μ L et aucun trypanosome n'a été détecté.
- Les patients de stade intermédiaire ont une cytorachie moyenne de 10,05 cellules/ μ L et pour 3 d'entre eux, des trypanosomes ont été détectés dans leur LCR (avec une cytorachie à 5/ μ L).
- Les patients en stade 2 avancé ont une moyenne de 226 cellules/ μ L de LCR et des trypanosomes ont été détectés dans le LCR de 31 patients sur 34.

Les troubles du sommeil sont présents chez 27% des patients en stade 1, 16% des patients en stade intermédiaire et 88% des patients en stade 2 avancé. Trente-deux des 34 patients de stade 2 avancé (94%) souffrent de troubles neurologiques. Ces troubles sont également présents chez 11 patients en stade 1 (37%) et 4 patients en stade intermédiaire (21%). Tous les patients en stade 1 ont été traités avec de la pentamidine et 33 des 34 patients en stade 2 avancé ont été traités avec du DFMO, le dernier a reçu de la pentamidine. Pour les patients en stade intermédiaire, 16 ont été traités avec de la pentamidine et 3 avec du DFMO.

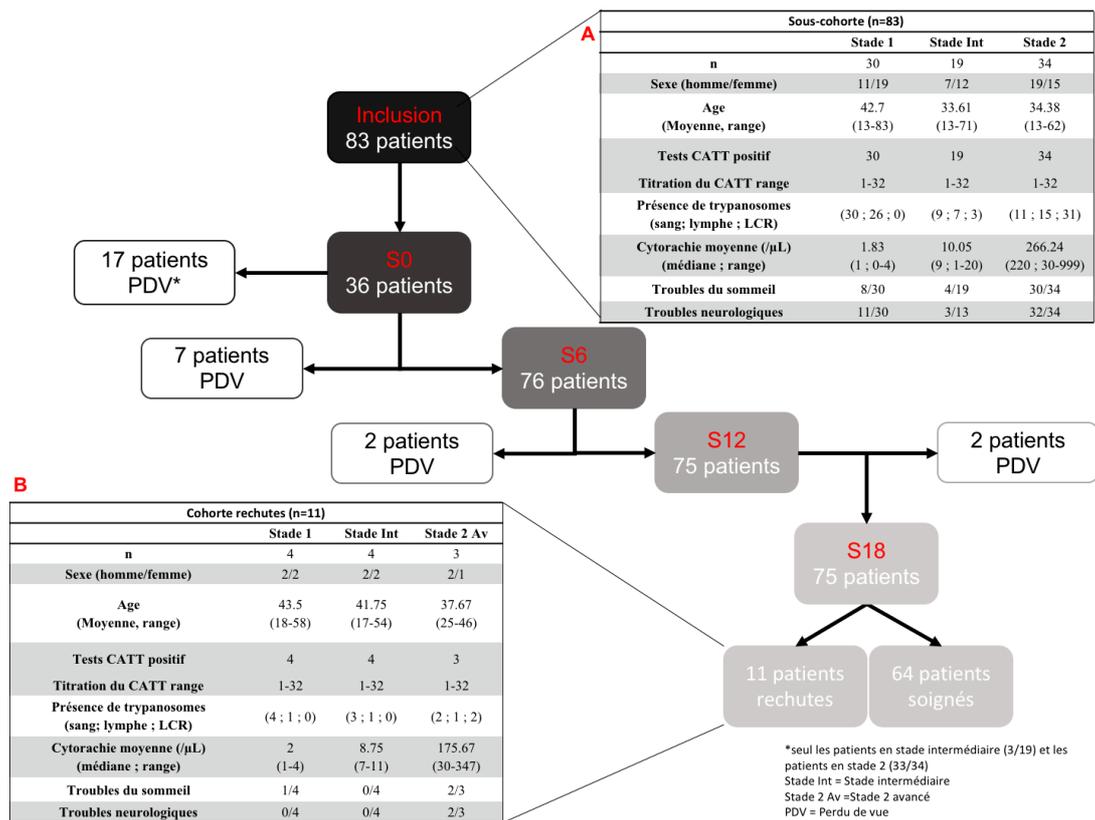


Figure 27 : Flowchart du suivi des patients avec (A) les caractéristiques de la sous-cohorte à l'inclusion et (B) les caractéristiques des 11 patients ayant rechutés.

Dans cette sous-cohorte, 11 patients ont rechuté. Les données démographiques, cliniques et biologiques à l'inclusion de ces patients sont résumées dans la **Figure 27B**.

Parmi ces 11 patients ayant rechutés, 4 ont été diagnostiqués en stade 1 lorsqu'ils ont été inclus dans l'étude. Le parasite n'a pu être détecté dans aucun LCR et leur cytorachie était comprise entre 0 et 4 cellules/ μ L à l'inclusion. Aucun n'a montré de signe neurologique et les troubles du sommeil ont été diagnostiqués chez un seul patient.

Quatre autres patients ayant rechutés ont été inclus dans la cohorte en stade intermédiaire. Aucun signe neurologique ou troubles du sommeil n'a été décelé pour ces 4 patients. Aucun n'avait de trypanosome dans son LCR et la cytorachie était comprise entre 7 et 11 cellules/ μ L (moyenne = 8,75 cellules/ μ L).

Les 3 derniers patients ayant rechutés ont été inclus en stade 2 de la maladie. Des trypanosomes ont pu être observés dans le LCR de 2 patients sur les 3 rechutes et tous avaient une cytorachie supérieure à 30 cellules/ μ L.

Les informations complémentaires détaillant ces patients sont disponibles dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Caractéristiques des 11 patients issus de la sous-cohorte ayant rechutés.

N°	Stade	Age	Sexe	Traitement	Troubles Neurologique	Troubles du sommeil	Trypanosome Dans LCR	Diagnostic de la rechute (critère de rechute)
P1	1	46	F	Pentamidine	Abs	Abs	Négatif	S24 (Trypanosomes LCR positif et 7 cellules/ μ L)
P2	1	51	F	Pentamidine	Abs	Abs	Négatif	post S24 (NA)
P3	1	58	M	Pentamidine	Abs	Abs	Négatif	S24 (Trypanosomes LCR positif et 66 cellules/ μ L)
P4	1	19	M	Pentamidine	Abs	Présent	Négatif	S18 (Trypanosomes LCR positif et 159 cellules/ μ L)
P5	INT	53	F	Pentamidine	Abs	Abs	Négatif	S12 (Trypanosomes LCR positif et 120 cellules/ μ L)
P6	INT	17	M	Pentamidine	Abs	Abs	Négatif	S24 (Trypanosomes LCR positif et 156 cellules/ μ L)
P7	INT	54	F	Pentamidine	Abs	Abs	Négatif	S24 (Trypanosomes LCR positif et 44 cellules/ μ L)
P8	INT	43	M	Pentamidine	Abs	Abs	Négatif	S12 (Présence de trypanosomes dans sang)
P9	2	42	M	DFMO	Présent	Présent	Positif	S18 (Trypanosomes LCR positif et 2 cellules/ μ L)
P10	2	25	F	DFMO	Présent	Présent	Positif	S12 (Trypanosomes LCR positif et 270 cellules/ μ L)
P11	2	46	M	Pentamidine	Abs	Abs	Négatif	S12 (113 cellules/ μ L et symptomatologie évocatrice de THA)

N° : code anonymisé du patient ; S : Suivi ; Abs : Absent



3.3. Sous-cohortes utilisées pour les travaux de spectrométrie de masse

La recherche de nouveaux biomarqueurs de stade a été réalisée en utilisant des patients issus de la cohorte FIND Angola. Nous avons choisi de rechercher des biomarqueurs potentiellement efficaces pour diagnostiquer la THA et différencier les stades de la maladie dans 4 fluides biologiques : le sang (sérum), LCR, la salive et l'urine.

Cette étude a été réalisée en deux étapes. La première étape consiste à recenser l'ensemble des protéines présentes dans ces fluides biologiques sur un petit échantillon de la cohorte (n=10) par une technique de chromatographie liquide couplée à un instrument de mesure spectrométrique en tandem (LC-MS/MS). Par la suite, l'abondance relative de chaque protéine identifiée est estimée par quantification en « label-free ». Cette méthode consiste à comparer l'abondance relative d'un peptide (et par extrapolation d'une protéine) dans un échantillon par rapport à un autre. Enfin, l'analyse des données a permis de sélectionner les protéines les plus prometteuses en se basant sur leur significativité statistique, les différences des moyennes d'abondances relatives normalisées observées entre les groupes, et l'intérêt biologique de ces protéines défini via une recherche bibliographique.

La deuxième étape consiste à valider le potentiel discriminant de ces protéines en les dosant par ELISA sur un échantillon plus important de la cohorte avec des fluides prélevés à l'inclusion (n = 80) et à 12 mois (n = 51).

3.3.1. Cohorte de screening par protéomique

Les échantillons des patients utilisés pour le screening par méthode protéomique (LC-MS/MS) proviennent de la cohorte FIND Angola. Il s'agit de 7 patients (3 patients en stade 1 et 4 patients en stade 2) et de 3 individus contrôles.

Pour cette étude :

- Les patients ont été classés en stade 1 lorsque aucun trypanosome n'a été observé dans le LCR et lorsque le nombre de globules blancs dans le LCR est inférieur ou égal à 5 cellules/ μL .
- Les patients ont été classés en stade 2 lorsqu'un ou plusieurs trypanosomes sont observés dans le LCR ou lorsque la cytorachie est supérieure à 5 cellules/ μL .

Pour les 10 individus sélectionnés, aucune dépendance (alcool, drogue et médicament) et aucune co-infection n'a été décelée. Le dépistage du VIH et de la syphilis s'est révélé négatif pour chacun des patients. Pour éviter toute fluctuation d'origine hormonale dans nos résultats, nous avons choisi de sélectionner uniquement des hommes majeurs (plus de 18 ans). Seul

un contrôle avait déjà contracté la maladie du sommeil diagnostiquée en stade 1 en 1997. Il avait été traité à l'époque avec succès avec de la pentamidine.

Pour cette étude, nous avons sélectionné 3 patients représentatifs du stade 1, sans trypanosome dans le LCR et avec une cytorachie inférieure ou égale à 5 cellules/ μL . Nous avons ensuite sélectionné 4 patients représentatifs du stade 2 avec des trypanosomes dans le LCR et une cytorachie supérieure à 20 cellules/ μL (**Tableau 8**). Tous ces patients en stade 2 présentent à la fois des troubles du sommeil et des troubles nerveux (agitation, signe de Romberg, mouvements anormaux ...). Les contrôles sélectionnés font partis des 6 contrôles qui n'ont reçu aucun traitement et sont devenus séronégatifs au cours du suivi.

L'étape de screening des protéines dans le sérum, le LCR et l'urine a été réalisée sur des échantillons provenant de ces 10 individus. Pour la salive, le screening a été réalisé pour les mêmes individus mais les données d'un des trois contrôles n'ont pas pu être exploitées suite à une erreur d'étiquetage (probable inversion salive/LCR), l'analyse protéomique de cet échantillon montrant plusieurs protéines caractéristiques du LCR.

Tableau 8 : Caractéristiques des patients inclus dans la cohorte de screening par protéomique.

Patient	Stade	Sexe	Age	CATT	Trypanosome dans le sang	Trypanosome dans le LCR	Cytorachie (cellules/ μL)
A003C	Contrôle	M	68	Positif	Négatif	Négatif	4
A004C	Contrôle	M	20	Positif	Négatif	Négatif	8
A013C	Contrôle	M	22	Positif	Négatif	Négatif	2
A060P	S1	M	58	Positif	Positif	Négatif	1
A068P	S1	M	55	Positif	Positif	Négatif	1
C010P	S1	M	18	Positif	Positif	Négatif	2
A002P	S2	M	58	Positif	Positif	Positif	83
A046P	S2	M	26	Positif	Positif	Positif	360
A063P	S2	M	23	Positif	Positif	Positif	60
A083P	S2	M	18	Positif	Positif	Positif	280

3.3.2. Cohorte de validation

Les protéines définies comme étant les plus prometteuses pour le diagnostic de stade ont ensuite été dosées par ELISA sur 80 individus issus de l'ensemble de la cohorte angolaise. La sélection des échantillons de patients en stade 1 et en stade 2 respecte les mêmes critères que pour l'étape de dépistage. Pour tous les individus admis dans cette cohorte, nous avons un volume d'échantillons (sérum, LCR, salive et urine) suffisant pour effectuer toutes les analyses. Les échantillons des patients utilisés pour l'étape de screening des protéines ont

également été utilisés pour l'étape de validation par dosage ELISA. Nous avons inclus tous les contrôles pour lesquels nous avons une quantité d'échantillons suffisante ($n = 14$) ainsi que 23 échantillons de patients en stade 1 et 43 échantillons de patients en stade 2 (**Tableau 9**). Sept patients ayant rechuté sont intégrés dans cette cohorte : 4 patients en stade 1 et 3 patients dont la cytorachie est comprise entre 5 et 20 cellules/ μL sans trypanosome dans le LCR (stade intermédiaire). Tous ont été traités avec de la pentamidine.

Tableau 9 : Caractéristiques des individus inclus dans la cohorte de validation.

		Contrôles	S1	S2
	n	14	23	43
	Sex-ratio	0,89	0,92	0,54
Age	Moy (SD)	38 (20,11)	39,09 (14,03)	34,55 (12,93)
	Min	12	15	14
	Max	70	58	58
Troubles neurologiques		0/14	6/23	30/43
Troubles du sommeil		2/14	10/23	29/43
Cytorachie	Moy (SD)	2,64 (1,91)	1,35 (0,93)	137,82 (165,73)
	Min	0	0	6
	Max	8	4	597
Trypanosome dans le sang		Négatif	Positif	Positif
Trypanosome dans le LCR		Négatif	Négatif	Positif (23/43)

3.4. Technique de spectrométrie de masse

La protéomique est l'étude de l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un tissu ou d'un liquide biologique. Pour ce travail, nous nous focalisons sur les protéines différemment exprimées selon l'état physiologique et pathologique de patients atteints de THA et d'individus contrôles. La détection et l'identification de ces protéines sont possibles grâce à la spectrométrie de masse. Cette technique permet de séparer et d'analyser des molécules chargées (des ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) (Aebersold and Mann, 2003).

La technique utilisée pour analyser les protéines dans cette étude est une technique de chromatographie liquide couplée à un instrument de mesure spectrométrique en tandem (LC-MS/MS). Les protéines contenues dans les différents échantillons sont tout d'abord digérées en peptides. Une micro-séparation de ces peptides est ensuite réalisée à l'aide d'une colonne de chromatographie liquide. Enfin, en sortie de la colonne les peptides sont ionisés avant d'être analysés dans le spectromètre de masse. Pour notre analyse, on parle de spectrométrie de

masse en tandem car le spectromètre se compose de deux systèmes de lecture : un quadripôle et un Orbitrap. Le schéma général du spectromètre utilisé est représenté **figure 28**.

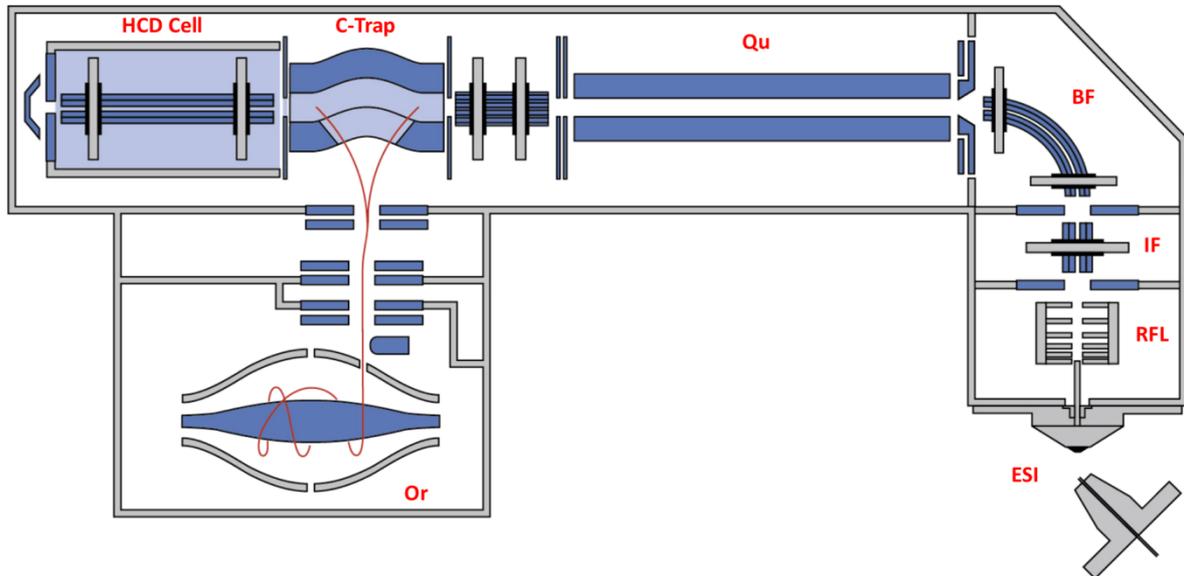


Figure 28 : Schéma du spectromètre Q Exactive plus.
(Image Thermo Fisher)

ESI : Source d'ionisation par électronébuliseur (ESI pour *Electrospray Ionization*), **RFL** : Lentilles RF, **IF** : Injection Flatapole, **BF** : Bente flatapole, **Qu** : Quadripôle, **C-Trap** : Piège à ions, **HCD Cell** : Cellule de fragmentation, **Or** : Orbitrap.

3.4.1. Préparation des échantillons

En premier lieu, un dosage par méthode Bradford est réalisé afin de déterminer la concentration en protéines présentes dans chaque fluide et dans chaque échantillon. Cette étape permet de déterminer le volume d'échantillons nécessaires pour l'analyse.

Le protocole de préparation des échantillons est adapté du protocole utilisé par la plateforme Protéomique/Spectrométrie de masse de l'Institut Jacques-Monod (UMR CNRS 7592 de l'Université Paris Diderot) (Rouillon et al., 2014). Ce protocole se déroule en 4 étapes :

- Etape de déplétion : Cette étape permet de diminuer la quantité de protéines majoritaires présentes dans nos échantillons sans pour autant éliminer complètement ces protéines. Le kit utilisé (Proteome purify 12 Human, R&D Systems®) est composé d'une résine capable de dépler 12 protéines : la glycoprotéine acide $\alpha 1$, l'antitrypsine $\alpha 1$, macroglobuline $\alpha 2$, l'albumine, l'apolipoprotéine A1, l'apolipoprotéine A2, le fibrinogène, l'haptoglobine, l'IgA,

l'IgG, l'IgM et la transferrine. La gamme dynamique de concentrations de protéines présentes dans les différents fluides humains peut être grande. Sans cette étape, la forte abondance de ces 12 protéines majoritaires écraserait les données obtenues pour l'analyse des protéines à faible abondance.

-Étape de concentration : Cette étape permet de concentrer les protéines déplétées afin d'obtenir un volume de travail plus confortable pour la suite du protocole.

- Étape de digestion en solution : pour assurer une digestion optimale des protéines, la réaction est obtenue en présence d'urée et de dithiothréitol. L'urée est un dénaturant qui va permettre de déplier la protéine pour rendre le site actif de l'enzyme accessible. Le dithiothréitol intervient pour l'étape de réduction. Il permet d'éliminer les ponts dissulfures qui sont ensuite fixés avec un agent alkylant : l'iodoacétamide. Les protéines contenues en solution sont alors pré-digérées avec l'endopeptidase Lys-C puis digérées avec de la trypsine. Pour finir la réaction est stoppée par addition d'acide formique, la trypsine étant inactive à pH acide. De plus, l'acidification de la mixture de peptides permet une purification plus efficace.

-Étape de purification : Cette dernière étape est réalisée à l'aide d'une membrane filtrante fixée à l'extrémité d'un cône (colonne Zip Tip). Elle permet de débarrasser le digestat des impuretés et des contaminants pouvant nuire à la qualité de l'analyse protéomique. Cette membrane permet de filtrer uniquement les protéines, les peptides et les oligonucléotides.

3.4.1.1 Sérum et LCR

Un volume d'échantillon contenant 10 µg de protéines, après déplétion (Proteome purify 12 Human, R & D Systems®) et concentration (AMICON ULTRA, Merck Millipore®), est ajusté à 120 µL du mélange réactionnel contenant de l'urée 4 M, du thiourée 1,5 M et du Tris-HCl 50 mM à pH 8,3. Les protéines sont ensuite réduites avec 10 mM de dithiothréitol pendant 30 minutes puis alkylées avec 55 mM d'iodoacétamide pendant 20 minutes. Les protéines alkylées ont d'abord été pré-digérées avec 500 ng d'endopeptidase lys-C (Wako®) pendant 3 heures à température ambiante. Ensuite, le mélange a été dilué avec 3 volumes d'eau MilliQ et traité avec 500 ng de trypsine (Sequence Grade Trypsin, Promega®) pendant 16h à température ambiante. L'activité enzymatique est stoppée au bout de 16h par addition d'acide formique à une concentration finale de 3%. Enfin, les digestats sont purifiés sur colonne Zip Tip C18® (U-C18, Merck millipore®). Les 3,5 µL de filtrat (80% acétonitrile et 20% acide formique à 0,1%) récupérés sont ensuite mis à évaporer sous vide. Après évaporation, les échantillons sont stockés à -20°C jusqu'à leur analyse.

Au moment de la lecture par spectrométrie de masse, les échantillons sont repris dans 12 μ L d'acide formique à 0,1%.

3.4.1.2 Urine

Le protocole de préparation des urines est le même que celui utilisé pour la préparation des LCR. Toutefois, ce protocole est prévu pour une quantité initiale d'urine de 20 mL par échantillon. Nous n'avons que 2 mL d'échantillon à disposition pour chaque patient. Nous avons donc utilisé l'ensemble des échantillons pour chaque patient et nous n'avons pas réalisé le dosage Bradford ainsi que les étapes de déplétion et de centrifugation pour éviter toute perte protéique.

3.4.1.3 Salive

Dans le cas de la salive, le protocole de préparation des échantillons suivi a été adapté à partir d'un protocole utilisé par Blanchard et al (2015). Une étape préliminaire de précipitation des protéines à l'acétone est réalisée. Chaque échantillon est mis à précipiter avec 5 volumes d'acétone (100%) à -20°C. Cette étape de précipitation permet de concentrer les protéines et d'éliminer les impuretés présentes dans la salive. Les échantillons n'ont pas été déplétés à la suite de cette étape de concentration.

Par la suite, les échantillons ont subi le même protocole de préparation que pour les échantillons de LCR.

3.4.2. Chromatographie liquide (LC)

Un passage en chromatographie liquide (LC pour *Liquid Chromatography*) est réalisé avant la lecture. Cette étape est réalisée à l'aide d'une pré-colonne Acclaim™PepMap™ (ThermoFisher Scientific®) et d'une mini colonne EASY-Spray PepMap (ThermoFisher Scientific®). La pré-colonne permet d'augmenter la sensibilité du spectromètre en minimisant l'effet d'ion-suppression. La présence simultanée de plus d'un composant dans la source d'ions peut entraîner une concurrence dans le processus d'ionisation et une réduction ultérieure des signaux. La limitation de l'effet ion-suppression permet l'analyse à la fois de peptides peu abondants et peptides très abondants dans des échantillons protéiques complexes (Pitt, 2009). Ensuite la mini colonne permet une microséparation des peptides en phase "reverse" en fonction de leurs propriétés d'hydrophobicité.

En sortie de la mini colonne, l'ionisation des peptides se fait par électronébulisation au niveau de la source ESI (Electrospray Ionization). La phase d'électronébulisation se découpe en deux étapes : la nébulisation et la désorption (Yamashita and Fenn, 1984).

-La nébulisation : à la sortie du capillaire, un fort champ électrique est appliqué sur la solution contenant l'échantillon. Le champ électrique positif (ou négatif) provoque une accumulation de charges négatives (ou positives) à la surface du liquide. Les ions se forment dans la phase liquide. Sous l'effet des mouvements de ces charges et de la tension de surface, le liquide prend la forme d'un cône (cône de Taylor) et des gouttelettes chargées sont projetées à partir du capillaire (Taylor, 1964; Raynor et al., 1997).

-La désorption : l'objectif est de libérer les ions en phase gazeuse grâce à des fissions en continue des gouttelettes (explosion coulombienne) permettant l'évaporation du solvant. On estime que l'évaporation totale du solvant est obtenue pour une gouttelette d'un rayon critique de 100 Å. On obtient donc des molécules intactes, dans notre cas des peptides, chargés et dépourvus de solvant (Dole et al., 1968).

L'analyse de ces peptides chargés, sous forme de nébulisat, est ensuite réalisée à l'aide du spectromètre Q Exactive plus®.

3.4.3. Instrument de mesure en tandem (MS/MS)

Le nébulisat va ensuite traverser un empilement de lentilles RF (radio fréquence). La lentille RF est un dispositif qui capture, focalise les ions dans un faisceau serré et augmente leur vitesse. Cette série de lentilles est en fait un empilement d'électrodes en forme d'anneaux plats auxquelles sont appliqués des tensions RF. Les charges de ces électrodes génèrent un champ électrique de confinement qui isole le faisceau d'ions. Les diamètres d'orifice des électrodes annulaires à l'entrée de la lentille RF sont plus grands pour capturer le plus possible d'ions émanants de l'ESI. Les diamètres d'orifice des électrodes annulaires diminuent ensuite progressivement pour focaliser le faisceau. À partir de l'entrée, l'espacement entre chaque électrode annulaire augmente ce qui induit la projection vers l'avant du faisceau d'ion. Cette étape permet d'augmenter la sensibilité de la technique (Olsen et al., 2009).

Le faisceau d'ions va ensuite traverser 2 multipôles de transfert aussi nommés flatapôle. Le flatapôle d'injection (IF) permet de calibrer le diamètre et la vitesse du faisceau avant de passer au niveau du Bent Flatapôle (BF). Le Bent flatapôle est un multipôle de transfert courbé qui va permettre de débarrasser le faisceau d'ions des agrégats d'ions, des neutres et d'éventuelles gouttes de solvant restantes. Les neutres, étant non chargés, ne pourront pas suivre la courbe électromagnétique imprimée par le BF. De même pour les agrégats d'ions et

gouttelettes de solvant qui auront une vitesse trop importante, en raison de leur masse plus élevée, pour suivre la courbe (Scheltema et al., 2014).

Une fois le faisceau d'ion débarrassé de tout ce qui pourrait nuire à la lecture, les ions passent au niveau du premier instrument de mesure : le quadripôle. Un analyseur quadripolaire est constitué de 4 électrodes parallèles (2 anodes et 2 cathodes) créant un champ électrostatique quadripolaire dans la région entre les 4 électrodes (**Figure 29**). Dans le quadripôle, les ions entrent en résonance et progressent dans l'analyseur en conservant leur vitesse longitudinale. Ainsi, pour une tension et un voltage fixé, seuls les ions de valeur m/z définie auront une trajectoire stable et seront détectés. L'objectif est d'obtenir un gradient ionique d'un pas égal à 0,4 Da. Pour chaque pas, les 20 précurseurs les plus intenses sont sélectionnés, passent au travers de la C-Trap (piège à ions) et sont envoyés au niveau de la cellule HCD (Michalski et al., 2011).



Figure 29 : Schéma d'un analyseur quadripolaire.
(Image de Sarah Cianferani)

Document non libre de droits, non reproduit par respect du droit d'auteur

La cellule HCD ou HCD Cell (pour Higher-energy Collisional Dissociation Cell) permet la fragmentation des 20 meilleurs ions précurseurs. Cette fragmentation des ions moléculaires est obtenue par dissociation induite par collision en phase gazeuse. Les ions précurseurs, qui ont conservé leur vitesse, entrent en collision avec des molécules neutres (souvent de l'hélium, de l'azote ou de l'argon). Lors de la collision, une partie de l'énergie cinétique est convertie en énergie interne, ce qui entraîne une rupture des liaisons et la fragmentation de l'ion en plus petits fragments (Mitchell Wells and McLuckey, 2005; Olsen et al., 2007). Les

fragments produits sont à nouveau capturés par le piège à ions et sont envoyés vers le second instrument de mesure : l'Orbitrap.

L'Orbitrap a été développé initialement pour piéger les ions (Kingdon, 1923). Il est maintenant utilisé comme un instrument de mesure spectrométrique de haute résolution. Il se compose d'une électrode externe concave à l'intérieur de laquelle est placée une électrode cylindrique en forme de fuseau (**Figure 30**). La forme particulière des électrodes induit la formation d'un champ électrique orbital dans l'espace présent entre les deux électrodes. Les fragments d'ions sont injectés tangentiellement à ce champ avec une vitesse connue et vont adopter une orbite (oscillation) qui leur est propre en fonction du rapport m/z autour de l'électrode centrale. Comme l'Orbitrap est un piège ionique, l'orbitale des fragments d'ions est stable et conservée. Des capteurs vont pouvoir mesurer la fréquence d'oscillation des fragments d'ions et l'amplifier. Cette dernière est directement corrélée à leur rapport charge sur masse. L'utilisation d'une transformée de Fourier (opération permettant de représenter en fréquence des signaux qui ne sont pas périodiques) permet de traiter le signal obtenu (Michalski et al., 2011).

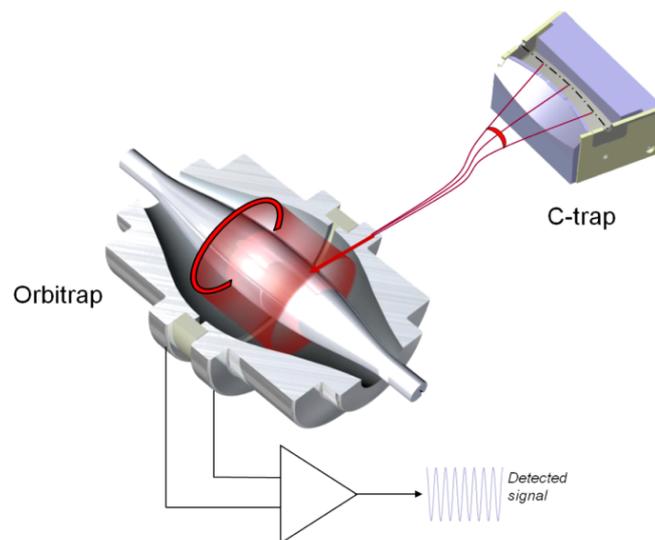


Figure 30 : Schéma de l'Orbitrap utilisé par le spectromètre G Exactive plus®.
(Image Thermo Fisher Scientific)

Par la suite, un super ordinateur reconstitue les peptides puis les protéines en comparant les données obtenues pour chaque fragment d'ion à une base de données. Pour tous les échantillons, 3 runs de lecture sont réalisés et les données brutes obtenues sont traitées à l'aide de deux logiciels : Proteome Discoverer 1.4 et Progenesis LC-MS software.

3.4.4. Logiciels de traitement des données

Les données de spectrométrie ont été traitées avec le logiciel Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher scientific®) couplé à un serveur de recherche Mascot interne (Matrix Science®, version 2.3.2 213) à l'aide de la base de données SwissProt Human et *Trypanosoma brucei gambiense* (Rouillon et al., 2014). Avec ce logiciel il nous est possible de visualiser le protéome humain complet identifié par spectrométrie de masse.

L'Abondance relative normalisée (Arn) de chaque protéine identifiée dans tous les fluides analysés, pour tous les patients, a été estimée par quantification en label-free (relative ou comparative) à l'aide du logiciel LC-MS Progenesis (Nonlinear Dynamics®, version 4.0). Une méthode de quantification Hi3 est utilisée ce qui signifie que les 3 peptides les plus abondants sont utilisés pour la quantification. L'Arn est déterminée en fonction de l'AUC (*Area under the curve*) directement corrélée à la quantité de peptides. L'AUC dérive des chromatogrammes d'ions extraits représentant l'intensité au cours du temps d'un *m/z* donné. L'Arn permet de comparer relativement, d'un échantillon à l'autre, le même peptide puis par extrapolation, la quantité relative d'une protéine.

On réalise ensuite une ANOVA (analysis of variance) à partir des abondances relatives déterminées. Les conditions d'application de ce test ont été vérifiées : les patients sont indépendants, les données sont normalisées et les variances sont stabilisées grâce à une ArcSinh (Arc sinus hyperbolique). Cela permet, pour une protéine identifiée, de vérifier la distribution des Arn obtenues pour chaque échantillon. En d'autres termes, cela permet de vérifier que pour une protéine donnée les Arn de chaque individu sont différentes entre elles. Une moyenne de l'Arn (ou ANA pour *Average Normalised Abundance*) est calculée pour chaque protéine identifiée et pour chaque groupe d'individus (contrôles, patients en stade 1 et en stade 2). Enfin, le logiciel détermine le *Fold Change*. Le *Fold Change* est un outil emprunté à la génomique, discipline dans laquelle il permet d'évaluer le changement dans le niveau d'expression d'un gène. Dans le cas de notre étude, il nous permet de vérifier que les Arn obtenues sont différentes entre chaque groupe d'individus.

On considère que l'on peut se fier à des données d'Arn obtenues pour une ANOVA significative ($p < 0,05$) et un *Fold Change* > 2 .

Pour vérifier que la collecte ainsi que les étapes de stockage, de congélation et de préparation des échantillons en vue de l'analyse protéomique n'ont pas altéré le protéome présent dans chaque échantillon, une interrogation de la base de données en semi-trypsine a été effectuée. Cette analyse consiste à interroger la base de données en appliquant un degré de liberté, au

niveau des acides aminés en bout de chaîne peptidique, pour l'identification. Une différence majeure entre les résultats d'identification en trypsine et en semi-trypsine est révélatrice d'une dégradation du protéome par des protéases *in vivo* ou endogènes. À l'inverse, si les résultats d'identifications en trypsine et en semi-trypsine sont proches, cela signifie que toutes les protéines identifiées l'ont été à partir de peptides issus d'une lyse triptyque et donc qu'il n'y a pas eu de dégradation protéique des échantillons.

3.4.5. Critères de sélection des protéines les plus prometteuses

À la suite de l'analyse de nos données acquises par spectrométrie de masse, nous avons obtenu une quantification relative des protéines. Nous avons sélectionné les protéines les plus prometteuses parmi les protéines identifiées afin de les doser par ELISA sur une fraction de la cohorte. Ce dosage nous permet d'obtenir une quantification absolue des protéines choisies. Les protéines les plus prometteuses sont sélectionnées en fonction de 3 critères :

-La significativité statistique : Seules les protéines pour lesquelles nous avons obtenu des ANA fiables ont pu être sélectionnées (ANOVA $p < 0,05$ et *Fold Change* > 2).

-La différence d'Arn entre les groupes : L'objectif de notre travail est de définir des biomarqueurs permettant le diagnostic de la maladie ou le diagnostic de stade de la THA. Pour cela, nous avons sélectionné des protéines qui présentent un maximum de différences d'expression entre les groupes contrôles, patients en stade 1 et en stade 2.

-L'intérêt biologique : Nous avons étudié le rôle biologique de chaque protéine via une recherche bibliographique. La plupart des biomarqueurs déjà proposés dans le cas de la THA sont des acteurs du système immunitaire. La réponse immunitaire n'étant pas spécifique d'une infection par le trypanosome, les protéines intervenant au cours de cette réponse ne le sont pas non plus. Nous nous sommes donc concentrés sur des protéines jouant un rôle physiologique en lien probable avec la physiopathologie de la THA.

Nous avons également privilégié les protéines pour lesquelles il existe des kits ELISA commerciaux.

3.5. Technique ELISA

L'ensemble des dosages a été réalisé avec des kits ELISA disponibles dans le commerce en suivant les recommandations du fabricant. Les densités optiques (DO) sont mesurées avec le spectromètre Multiskan go (Thermo Scientific®).

3.5.1. ELISA utilisées pour l'article : Neopterin and CXCL-13 in diagnosis and follow up of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: lessons from the field in Angola.

Les concentrations de néoptérine et de CXCL-13 dans le LCR ont été mesurées à l'aide de kits ELISA disponibles dans le commerce respectivement chez Brahms (Thermo Fisher Scientific®, Allemagne) et R&D Systems® (Royaume-Uni). La variabilité inter-dosage a été évaluée à l'aide de contrôles internes. Une partie des dosages avait été réalisée avant le début de cette étude, à l'aide des deux mêmes kits par Tiberti et al et 2012 et 2013.

3.5.2. ELISA complémentaires au travail de dépistage

-Dans le LCR

Les concentrations de neuroserpine dans le LCR ont été dosées grâce au kit Human Neuroserpin ELISA (BioVendor®, République Tchèque) et les concentrations de sécrétogranine-2 à l'aide du kit Human SCG2 ELISA (Elabscience Biotechnology®, USA). Les concentrations de néogenine ont été dosées à l'aide du kit Human NEO1 ELISA Kit (Mybiosource®, USA).

-Dans la salive

Le taux d'intélectine 2 dans la salive a été mesuré à l'aide du kit ELISA ITLN2 humain (Elabscience®).

-Dans les urines

Le taux de moésine dans l'urine a été mesuré avec le kit ELISA humain Moesin (Abnova Ltd®).

3.6. Outils Statistiques

Les données descriptives relatives aux différentes cohortes utilisées ont été obtenues à partir des données brutes analysées sur Excel.

Pour les protéines dosées par ELISA nous avons défini, lorsque cela était possible, un *cut-off* (ou seuil de positivité) discriminant les patients atteints de THA, des individus contrôles puis un seuil discriminant les patients en stade 1 et stade 2. Le seuil est déterminé par l'analyse de courbes ROC (Receiver Operating Characteristic), il représente le meilleur compromis entre spécificité et sensibilité pour chaque valeur de concentration obtenue par un biomarqueur potentiel. La significativité du potentiel classificateur d'un seuil est ensuite vérifiée en utilisant le test de Kruskal-Wallis.

Les régressions logistiques permettant d'estimer la corrélation entre les concentrations des différentes protéines et les données biologiques des patients ont été effectuées grâce à des modèles linéaires généralisés. La régression logistique permet d'évaluer l'association existante entre un vecteur de variables aléatoires (dans notre cas, la concentration des différentes protéines dans les différents fluides étudiés) et une variable binomiale (sexe, présence de troubles du sommeil, présence de troubles neurologiques et présence de trypanosomes dans le LCR).

Le coefficient Kappa a été utilisé pour estimer le niveau d'accord entre 2 méthodes de classification. Dans le cas du diagnostic de la maladie, le coefficient Kappa estime le niveau d'accord entre le diagnostic posé à l'issue des examens de laboratoires (CATT et CTC) et les seuils déterminés via les courbes ROC. Dans le cas du diagnostic de stade de la maladie, ce coefficient estime le niveau d'accord entre la classification via les critères OMS et la classification réalisée avec les *cut-offs* déterminés via les courbes ROC.

Résultats

4.1. Article 1: Neopterin and CXCL-13 in diagnosis and follow up of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: lessons from the field in Angola.

L'existence d'un stade intermédiaire au cours de la THA, défini par l'invasion précoce du SNC par le parasite sans augmentation de la cytorachie (≤ 20 cellules/ μL), ou bien défini par l'augmentation de la cytorachie (comprise entre 5 et 20 cellules/ μL) en l'absence de parasite dans le LCR, est une question à ce jour sans réelle preuve physiologique. En effet, la survenue de troubles nerveux chez des patients en stade 1 ainsi que la guérison de patients présentant des trypanosomes dans le LCR (stade 2) à la suite d'un traitement avec des molécules de stade 1 ne sont pas cohérentes avec la classification décrite par l'OMS.

Les résultats de l'article « Neopterin and CXCL-13 in diagnosis and follow up of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness : lessons from the field in Angola. » démontrent que la néoptérine et CXCL-13 sont de potentiels biomarqueurs de stade de la THA et plus particulièrement marqueurs d'une invasion précoce du SNC. Ces deux protéines interviennent lors de la réponse immunitaire mise en place au cours d'une neuro-infection à *T. b. gambiense*. La néoptérine est un facteur d'activation macrophagique et lymphocytaire exprimé tôt au cours de l'infection et CXCL-13 est un chimio-attractant lymphocytaire intervenant dans l'extravasation leucocytaire.

En analysant les concentrations de néoptérine et de CXCL-13 dans le LCR de 83 patients issus de la cohorte FIND Angola, nous avons pu définir, pour chacune de ces protéines, un seuil en dessous duquel les patients sont considérés en stade 1 de la maladie et un seuil au dessus duquel les patients sont considérés en stade 2 avancé. Les patients qui présentent une concentration comprise entre les deux seuils (pour chaque protéine respectivement) sont considérés en stade intermédiaire. De plus, l'évolution du taux de ces deux protéines dans le LCR au cours du suivi du patient a été analysée. Nous avons également défini, pour ces deux protéines, des seuils marquant l'apparition des troubles du sommeil, des troubles nerveux ainsi que la présence du parasite dans le SNC.

Les résultats de ce travail montrent que la néoptérine et CXCL-13 sont de bons biomarqueurs de stade de la maladie et peuvent être utiles lors du suivi du patient pour la mise en évidence des cas de rechutes. Nous avons également pu apporter des éléments étayant la thèse de la réalité biologique et clinique du stade intermédiaire de la THA. Ce travail a montré que les cas de rechutes ne sont pas plus fréquents chez les patients en stade intermédiaire par rapport aux patients en stade 1 et stade 2 avancé. Dans cette sous-cohorte, 16 patients en stade intermédiaire avec des trypanosomes dans le LCR sans augmentation de la cytorachie ou

avec une cytorachie comprise entre 5 et 20 cellules/ μ L ont été traités avec de la pentamidine. Il a été montré également que l'apparition de signes neurologiques et de troubles du sommeil n'est pas forcément corrélée avec la présence du parasite dans le LCR.



Neopterin and CXCL-13 in diagnosis and follow up of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: lessons from the field in Angola.

Julien BONNET^{1*}, Philippe VIGNOLES¹, Natalia TIBERTI², Vatunga GEDEAO³, Alexandre HAINARD², Natacha TURCK², Theophile JOSENANDO³, Joseph NDUNG'U⁴, Jean-Charles SANCHEZ², Bertrand COURTIUOX¹, Sylvie BISSER^{1,5}.

En correction en vue d'une soumission au journal *Biomedical Research International*.

Résumé :

Dans la prochaine décennie, il est possible que le traitement du stade de la THA soit facilité avec l'arrivée de nouvelles molécules thérapeutiques actives sur les deux stades de la maladie. Cependant, les questions relatives aux mécanismes d'invasion précoce du SNC restent non résolues. Cette étude sur une cohorte angolaise de patients infectés par des trypanosomes (avec un suivi sur 24 mois) a pour objectif la recherche de biomarqueurs en utilisant d'autres critères de classification de stade que ceux recommandés par l'OMS. Nous avons comparé les critères de stade de l'OMS avec deux nouveaux marqueurs (la néoptérine et CXCL-13) qui ont un potentiel pour le diagnostic de stade de la THA ou l'identification de rechutes.

Les données biologiques, cliniques et neurologiques de 83 patients issus de la cohorte FIND Angola ont été analysées (30 au stade 1, 19 au stade intermédiaire et 34 au stade 2), du diagnostic jusqu'à la fin du suivi (à 6, 12, 18, 24 mois post-traitement). Soixante-quinze pourcents des patients en stade intermédiaire ont été guéris avec de la pentamidine. Pour chaque patient, les niveaux de néoptérine et de CXCL-13 dans le LCR ont été mesurés pour déterminer le potentiel de ces molécules en tant que biomarqueurs de stade. Les niveaux de néoptérine et de CXCL-13 ont également été comparés avec l'apparition des signes cliniques, avec la cytorachie et avec la présence du parasite dans le LCR. Des seuils pour chaque condition ont été définis par une analyse des courbes ROC.

Cette étude indique qu'une concentration en néoptérine inférieure à 15,5 nmol/L de LCR est caractéristique des patients en stade 1 (sensibilité de 90% [73% ; 98%], spécificité de 86% [74% ; 94%]) et une concentration supérieure à 60,3 nmol/L caractérise les patients en stade 2 avancé (sensibilité de 97% [85% ; 100%], spécificité de 100% [93% ; 100%]). Un taux de CXCL-13 inférieur à 91,2 pg/mL définit des patients en stade 1 (sensibilité de 90% [73% ;

98%], spécificité de 79% [66% ; 89%]) et une concentration de CXCL-13 supérieure à 395,4 pg/mL caractérise des patients en stade 2 avancé (sensibilité de 90% [85% ; 100%], spécificité de 86% [93% ; 100%]). Les patients présentant des concentrations, pour ces deux protéines, comprises entre les deux seuils pourraient être classifiés en stade intermédiaire.

1 Neopterin and CXCL-13 in diagnosis and follow up of *Trypanosoma brucei*
2 *gambiense* sleeping sickness: lessons from the field in Angola.

3

4 Julien Bonnet^{1*}, Philippe Vignoles¹, Natalia Tiberti², Vatunga Gedeão³, Alexandre Hainard², Natacha Turck²,
5 Theophile Josenando³, Joseph Ndung'u⁴, Jean-Charles Sanchez², Bertrand Courtioux¹, Sylvie Bisser^{1,5}.

6

7 **1** Institute of Neuroepidemiology and Tropical Neurology, School of Medicine, CNRS FR 3503 GEIST,
8 University of Limoges, INSERM UMR1094 Tropical Neuroepidemiology, Limoges, France.

9 **2** Translational Biomarker Group, Department of Human Protein Sciences, University of Geneva, Geneva,
10 Switzerland.

11 **3** Instituto de Combate e Controlo das Tripanossomias (ICCT), Luanda, Angola.

12 **4** Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND), Geneva, Switzerland.

13 **5** Pasteur Institute in French Guiana, 23 Boulevard Pasteur, 973006 Cayenne Cedex.

14

15 *Corresponding author

16 E-mail: julien.bonnet@unilm.fr

17

18 **Abstract**

19 Human African Trypanosomiasis may become manageable in the next decade with Fexinidazole. However,
20 currently stage diagnosis remains difficult to implement in the field and requires a lumbar puncture. Our study of
21 an Angolan cohort of *T. b. gambiense*-infected patients used other staging criteria than those recommended by
22 the WHO. We compared WHO criteria (cell count and parasite identification in the CSF) with two biomarkers
23 (neopterin and CXCL-13) which have proven potential to diagnose disease stage or relapse. Biological, clinical
24 and neurological data were analysed from a cohort of 83 patients from diagnosis to end of follow-up (24
25 months). A neopterin concentration below 15.5 nmol/L in the CSF denoted patients with stage 1 disease, and a
26 concentration above 60.31 nmol/L characterized patients with advanced stage 2 (trypanosomes in CSF and/or
27 cytotoxicity higher than 20 cells) disease. CXCL-13 levels below 91.208 pg/mL denoted patients with stage 1
28 disease, and levels of CXCL-13 above 395.45 pg/mL denoted patients with advanced stage 2 disease. Values
29 between these cut-offs may represent patients with intermediate stage disease. Our work shows the existence of a
30 intermediate stage in HAT, and CXCL-13 and neopterin levels may help to characterize it.

31 **Keywords:** Human African Trypanosomiasis, Biomarkers, Neopterin, CXCL-13, diagnostic.

1

32 It is hoped that sleeping sickness will become manageable within the next decade, as suggested by the WHO [1],
33 [2]. In 2016, the number of patients with sleeping sickness has been reported by the WHO as fewer than 4,000
34 and the availability of easy-to-use molecules such as Fexinidazole (oral intake) go in this direction [3,4]
35 However, there are many unreported cases, and the estimate of actual cases is around 20,000 infected people in
36 the remaining endemic countries in Africa. In addition, the new treatment with fexinidazole has only been tested
37 for the replacement of NECT (second stage therapy). Pentamidine (for gambiense-HAT) remains the molecule
38 indicated for the treatment of stage 1 of the disease. Stage diagnosis of the disease is therefore still necessary at
39 present. Furthermore, fexinidazole has so far only been used in the context of field trials. What will happen when
40 it is used routinely? Moreover, the infection mechanism remains incompletely understood, the disease may
41 reappear at cyclic intervals as chronically infected individuals without clinical signs of disease or animal
42 reservoirs can lead to re-emergence [5,6]. Recently, the skin has been suggested as possible reservoir of latent
43 infection, leading to relapse [7], and several authors have suggested that relapses can occur from parasites living
44 in the meningeal spaces and recirculating through the cervical lymph node system [8,9]. As the knowledge of
45 pathogen-invasion mechanisms in the central nervous system (CNS) improves, new concepts help us to integrate
46 data from the field and enhance our knowledge of sleeping sickness infection mechanisms. Establishing disease
47 stages is necessary for effective treatment, and the discovery of new markers in order to do this relies on the
48 understanding of mechanisms of CNS invasion [10].
49 During stage 1 of the disease, the invasion of the host by the trypanosome is accompanied by inflammation
50 caused by recognition of two pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), the parasite VSG coat and DNA,
51 by the immune system [11]. This triggers a cascade of activation of various immune cells, which is regulated by
52 cytokines and chemokines [11–15]. During the course of sleeping sickness, trypanosomes cross the blood–brain
53 barrier and invade the CNS, leading to the second stage of the disease. This tropism of the parasite for CNS
54 induces neuroinflammation and lymphocyte infiltration in the cerebrospinal fluid (CSF). At present, only a
55 lumbar puncture showing cytorachia of greater than 5 cells/ μ L or evidence of trypanosomes in the CSF allows
56 the diagnosis of stage 2 of the disease [16,17]. Alternatively, expression levels of various cytokines and
57 chemokines may track inflammatory changes earlier and may be more relevant for the diagnosis as already
58 demonstrated in various inflammatory conditions, including sleeping sickness [18]. Neopterin is a pyrazino-
59 pyrimidine compound that is synthesized by monocytes and macrophages in response to the production of
60 interferon- γ by activated T cells. The increase in the level of expression of neopterin therefore follows the
61 increase in macrophage and T cell activation [19]. In fact, increased neopterin levels are seen early in various

62 pathologies, including malignant tumours such as CNS lymphomas [20] and viral infections [21,22] including
63 HIV [23,24]; justifying its use as a screen to exclude infected blood from blood donors [25,26]. CXC-chemokine
64 ligand 13 (CXCL-13) is expressed by B cells and dendritic cells and is involved in B cell migration [27].
65 Perturbations of plasma levels of CXCL-13 is associated with activation of the host's immune response [28], and
66 CXCL-13 is used as an indicator of breast cancer, cutaneous vasculitis various lupus-like condition and bacterial
67 infections [29–32]. CSF CXCL-13 levels are clearly associated with neuroborreliosis [33], neuro-syphilis
68 concomitant with HIV [34] and multiple sclerosis [35]. Previous studies have shown that increased levels of
69 CXCL-13 and neopterin could be a good diagnostic marker for sleeping sickness and an indicator of the disease
70 stage [36–38]; rapid detection tests (RDTs) based on the neopterin concentration in the CSF are under
71 investigation.

72 In this study, classical staging criteria, clinical signs and new potential biomarkers (namely, neopterin
73 and CXCL-13) were re-evaluated in patients from a cohort study in Angola [37,38]. These results are discussed
74 in the context of the patients' management strategy, including an intermediate disease stage, that is used by the
75 national control programme in Angola [39].

76

Article en cours de soumission



77 **Patients and methods**

78 Ethics Statement

79 Ethical clearance was obtained from the 'Angolan Direccao Nacional de Saude Publica, Ministerio da Saude'.
80 Written informed consent was received from these individuals prior to enrolment and/or from their parents or
81 guardians for participants below 18 years of age. Any individual who declined to participate was followed up
82 according to the standard procedures of the national control programme of Angola.

83 Case definition, inclusion and exclusion criteria.

84 Samples were obtained retrospectively from a cohort study conducted in Angola between 2008 and 2011 (Figure
85 1). The study aimed to collect appropriate clinical, neurological, psychiatric and biological data from a cohort of
86 247 *Trypanosoma brucei gambiense*-infected patients (n=228) from diagnosis to the end of follow-up (6, 12, 18,
87 24 months), and non-infected controls (n=19). Controls and patients were enrolled during both active and
88 passive screening activities by teams of the national sleeping sickness control programme. The CATT (Card
89 Agglutination Trypanosomiasis Test) screen was used [40] and followed by confirmation using microscopy of
90 concentrated blood and CSF. Patients with sleeping sickness were defined as individuals in whom trypanosomes
91 were demonstrated either in blood, lymph node aspirate or CSF by microscopy. Disease cases were classified as
92 stage 1 when no trypanosomes were observed in CSF and when the CSF white blood cell (WBC) count was
93 lower than or equal to 5 cells/ μ L, whereas those with trypanosomes in the CSF and/or a CSF WBC count above
94 20 cells/ μ L were classified as advanced stage 2. Patients who were deemed to be in the intermediate stage were
95 those in between stage 1 and advanced stage 2 with a CSF WBC count between 5 and 20 cells/ μ L and/or with
96 trypanosomes in CSF without an increase in CSF WBC numbers. The Angolan national control programme
97 differentiates the intermediate stage, as they treat those patients with first-stage drugs unless some clinical signs
98 are suggestive of CNS involvement, in which case second-stage drugs are used. All participants were examined
99 clinically, and a questionnaire was used to note all clinical and neurological characteristics (Romberg, Babinski's
100 reflex, dysmetry, meningeal syndrome...), including sleep and psychiatric disturbances using the Mini-
101 International neuropsychiatric interview [41] and the Hamilton rating scale for depression. These two scales
102 include sleep examination criteria. All participants were checked clinically and microscopically for the presence
103 of the main parasitic co-infections (malaria by blood smear, filariasis during blood examination by capillary tube
104 centrifugation and schistosomiasis when blood was detected in urine samples). The HIV and syphilis status was
105 determined retrospectively on stored samples using the VIKIA HIV 1/2 test (Biomérieux, France) and the RPR-

4

106 Nosticon II (Biomérieux, France) and TPHA (Biorad, France) tests, respectively. These analyses aimed to
107 exclude individuals with interfering parameters for CSF analysis. Children under 12 years were also excluded to
108 avoid complications in obtaining lumbar puncture samples and also possible difficulties in interpretation [42].
109 Patients were examined at diagnosis and then subsequently at post-treatment for intermediate and advanced stage
110 2 patients only (M0). For all included patients, follow-ups were organized subsequently at 6, 12, 18 and 24
111 months post-treatment. For each follow-up, patients had the same clinical and biological investigation as at
112 inclusion. The follow-up after 24 months, however, comprised collecting only the descriptive data and
113 investigating for possible relapses by detection of trypanosomes or WBCs in the CSF.
114 For our analysis of neopterin and CXCL-13, we selected 83 patients for whom we had maximum of neopterin
115 and CXCL-13 CSF concentrations data at each time of follow-up. When the concentration data were missing and
116 we had CSF samples available in the bio-bank, we determined the neopterin and CXCL-13 concentration in the
117 CSF via ELISA. The ELISA kits for the dosage of neopterin and CXCL-13 used are the same throughout the
118 study.

119 Sample collection and selection

120 A lymph node aspirate was taken from any subject who presented with swollen lymph nodes and examined for
121 trypanosomes by microscopy. Ten mL venous blood with heparin as anticoagulant was collected from CATT-
122 positive individuals, as well as from patients with swollen lymph nodes. Blood was performed for capillary tube
123 centrifugation test (600 μ L : 4 capillary tubes of 75 μ L), and for the miniature anion exchange centrifugation
124 technique (300 μ L) [43]. For individuals who were positive by CATT on whole blood, 1 mL plasma was used to
125 perform CATT dilutions. Confirmed cases of parasite infection and/or individuals found positive by CATT at a
126 dilution of 1/16 who had negative results for all other performed tests for parasite infection underwent a lumbar
127 puncture, in accordance with national guidelines for stage determination and/or parasitological confirmation in
128 CSF, when there were suggestive neurological signs. Parasitological examination of CSF was done using the
129 modified single centrifugation technique [43]. This optimized parasitological confirmation method permits
130 sensitivity of parasite detection similar to that of molecular testing [44].

131 All plasma, buffy coat and CSF samples that remained after the diagnostic procedures were aliquoted and stored
132 in liquid nitrogen before being transported to Limoges on dry ice, then stored at -80°C. Patient medical data were
133 anonymized. Samples were further selected for neopterin and CXCL-13 determination at diagnosis, and during
134 follow-up in 2011, and analysed at this stage. Samples were selected on the basis of available follow-up,

135 resulting in 83 diagnosis samples with a complete follow up until 18 months and available results on disease
136 outcome at 24 months; 11 patients from the cohort experienced relapse (6 during the follow-up between M0 and
137 18 months post-treatment and 5 after 18 months post-treatment).

138 Test procedures

139 Commercially available ELISA assays were used to measure CSF levels of neopterin (Brahms, Thermo Fisher
140 Scientific, Germany) and CXCL-13 (R&D Systems, UK and RayBiotech, GA, USA) as performed previously by
141 Tiberti *et al* [37,38]. All assays were performed according to manufacturer's instructions and the inter-assay
142 variability was evaluated using quality controls (coefficient of variation (CV) < 20%). A limit of detection
143 corresponding to the mean concentration measured for the lowest standard less than 2 standard deviations was
144 calculated for each assay. All data were obtained using the same ELISA assays than previous authors and data
145 were compared to those obtained by Tiberti *et al* [37,38].

146 Statistical analysis

147 Descriptive analysis was carried out on Microsoft Excel. Receiver operating characteristic (ROC) curves were
148 drawn to determine cut-off points as the best sensitivity/specificity ratio for each marker (CXCL-13, neopterin,
149 leucocyte count, sleep disturbances, neurological signs, presence of trypanosomes). ROC curves were further
150 used to determine the disease stage (that is, stage 1, intermediate or advanced stage 2) on diagnostic samples.
151 The significance was assessed using the Kruskal–Wallis test and Fisher's exact test for testing the null of
152 independence ($p < 0.05$). Tests were performed using R Core Team version 3.3.2 [45] and the following
153 packages were used: ROCR for drawing curves and determine the values of specificity and sensitivity that will
154 make it possible to find the cut-off [46] and PMCMR for the pairwise comparisons post-hoc test of the Kruskal-
155 Wallis test [47].

156 One of the difficulties encountered was to define cut-off points for markers of stage 1 disease in the absence of
157 healthy controls in our cohort. When the values of the CXCL-13 and neopterin biomarkers from the stage 1
158 patients are represented on the same curve (Figure 2A), there is no definite cut-off value with an acceptable
159 sensitivity and specificity. We have thus grouped all patients not in stage 1 (that is patients with intermediate
160 stage and advanced stage 2 disease) and defined a cut-off discriminating non-stage 1 patients (Figure 2B).
161 Patients with values below these cut-off points are considered to be in stage 1.

162 Cut-off points used for comparison have been used in accordance with previous data for neopterin and CXCL-13
163 [37,38].

Article en cours de soumission

164 **Results**

165 Population characteristics at inclusion

166 Demographic, clinical and biological data are summarized in Figure 3. Sex ratio was 0.44 (37/83), and ages
167 ranged from 13 to 83, with median ages of 42.7, 35.37 and 34.38 years for stage 1, intermediate and advanced
168 stage 2 disease groups, respectively. CATT serology was positive in all individuals, as it was the screening
169 method used, and titres ranged from 1/8 to 1/32. Trypanosomes were found in 48 lymph node aspirates, 50 blood
170 samples and 34 CSF samples. Patients with stage 1 disease had a mean CSF WBC count of 1.83 cells/ μ L, and no
171 trypanosomes were detected in the CSF. Patients with intermediate stage disease had a mean WBC count of
172 10.05, and three patients had trypanosomes in their CSF, although the WBC counts of these patients were less
173 than 5 cells/ μ L. Patients with advanced stage 2 disease had a mean cell count of 226 cells/ μ L, and trypanosomes
174 were detected in the CSF of 31 out of 34 patients. Sleep disorders were present in 27% of patients with stage 1
175 disease, 16% of patients with intermediate stage disease and 88% of patients with advanced stage 2 disease, with
176 a clear increase in their severity with disease stage. Eleven (37%) patients in stage 1 and four (21%) patients in
177 the intermediate stage showed neurological signs, and there was an increase in neurological signs in advanced
178 stage 2 patients (32 out of the 34 (94%)) compared with previous stages (Figure 3B). All patients with stage 1
179 disease were treated with pentamidine; 33 out of 34 patients with advanced stage 2 disease were treated with
180 eflornithine (DFMO), and one was treated with pentamidine; 16 out of 19 patients with intermediate stage
181 disease were treated with pentamidine, and three of them were treated with DFMO. The choice of treatment for
182 intermediate stage patients was made by the medical team based on the severity of the clinical symptoms of
183 these patients.
184 Seventy-six (90%) patients returned for the follow-up appointment at 6 months, 75 (89%) at 12 months and 75
185 (89%) patients at 18 months. At the end of follow-up, 64 patients were declared cured, and 11 patients relapsed
186 (Figure 3A).

187

188 Neopterin and CXCL-13 levels during diagnosis and follow-up

189 Neopterin and CXCL-13 concentrations at inclusion and during follow up are presented in Table 1. At diagnosis,
190 the mean concentrations of neopterin and CXCL-13 in the CSF were higher in patients with advanced stage 2
191 disease (280.62 nmol/L and 3919.32 pg/mL, respectively) than patients with intermediate disease (18.72 nmol/L

8

192 and 111.85 pg/mL, respectively) and patients with stage 1 disease (12.15 nmol/L and 26.42 pg/mL,
193 respectively).

194 At 6 months following diagnosis, levels of both neopterin and CXCL-13 in the CSF had decreased;
195 patients with advanced stage 2 disease had mean concentrations of 17.20 nmol/L and 104 pg/mL, respectively.
196 Patients with intermediate stage disease had mean concentrations of 22.82 nmol/L and 65.67 pg/mL,
197 respectively. Patients with stage 1 disease had mean concentrations of 11.01 nmol/L and 11.37 pg/mL
198 respectively.

199 At 12 months following diagnosis, patients with advanced stage 2 disease had mean concentrations of
200 27.10 nmol/L and 250.25 pg/mL of neopterin and CXCL-13. Patients with intermediate stage disease had mean
201 concentrations of 18.16 nmol/L neopterin and 95.30 pg/mL CXCL-13. Patients with stage 1 disease had mean
202 concentrations of 22.67 nmol/L neopterin and 23.33 pg/mL CXCL-13, respectively.

203 At 18 months, neopterin and CXCL-13 mean concentrations in CSF were 14.18 nmol/L and 23.03
204 pg/mL for patients with advanced stage 2, 16.12 nmol/L and 37.42 pg/mL for patients with intermediate stage
205 and 14.69 nmol/L and 46.78 pg/mL for patients with stage 1 disease, respectively.

206

207 Neopterin and CXCL-13 levels during relapse

208 Before 24 months following diagnosis, 6 of 11 patients relapsed, and their neopterin and CXCL-13 data were
209 subsequently removed from statistical analysis at the point of relapse diagnosis. Four patients were in relapse at
210 the 12-months follow-up (two patients at stage 1 and two patients at advanced stage 2), and two patients were in
211 relapse at the 18-months follow-up (one patient at stage 1 and one patient at advanced stage 2). The three
212 patients who had relapses at advanced stage 2 had CSF WBC counts above 30 cells/ μ L, and two of these patients
213 had trypanosomes in the CSF. One of the relapsed advanced stage 2 patients was treated with pentamidine in
214 error as the CSF WBC count was 30 cells/ μ L. All patients who had relapse in the intermediate stage were treated
215 with pentamidine. Fisher's exact test was performed on the data, which showed the number of observed relapses
216 were uniformly distributed in the three disease stages ($p = 0.64$). There was no association between the treatment
217 received by the patient and the occurrence of relapses ($p = 0.57$).

218 The two patients who relapsed with advanced stage 2 disease at 12 months both had mean CSF neopterin levels
219 and mean CSF CXCL-13 levels higher than those seen in non-relapsed advanced stage 2 patients at this time-
220 point (72.16 and 302.33 compared to 27.10 nmol/L for neopterin; 5022.85 and 866.52 compared to 250.25

9

221 pg/mL for CSF CXCL-13). Data regarding neopterin and CXCL-13 levels are available for only one of the two
222 patients who relapsed at the intermediate stage at 12 months; this patient had 65.29 nmol/L neopterin and 72.83
223 pg/mL CXCL-13 in the CSF. Of the two patients who relapsed at 18 months, the patient with stage 1 disease had
224 578.84 nmol/L neopterin and 206.34 pg/mL CXCL-13 in the CSF; the patient with advanced stage 2 disease had
225 12.81 nmol/L neopterin and 24.37 pg/mL CXCL-13 in the CSF.

226

227 New neopterin and CXCL-13 cut-off points for defining disease stages

228 Our study suggests that a CSF neopterin concentration less than or equal to 15.56 nmol/L defines stage 1 disease
229 with 90% sensitivity and 86% specificity (AUC = 0.91), whereas a concentration above 60.31 nmol/L
230 characterizes advanced stage 2 disease (AUC = 0.99; 97 % sensitivity and 100 % specificity). Values between
231 these two cut-off points could be used to characterize an intermediate stage (Table 2).

232 Our findings also suggest that CSF CXCL-13 levels below 91.21 pg/mL defines stage 1 disease (AUC = 0.89; 90
233 % sensitivity and 79 % specificity), and CXCL-13 levels above 395.45 pg/mL defines advanced stage 2 disease
234 (AUC = 0.93; 90 % sensitivity and 86% specificity). Values between these two cut-off points could be used to
235 characterize an intermediate stage (Neopterin: 65 % sensitivity and 94% specificity; CXCL-13: 52 % sensitivity
236 and 95% specificity) (Table 2).

237

238 Comparison of neopterin and CXCL-13 concentrations to clinical manifestations (neurological signs, sleep 239 disorders), leucocyte count and presence of trypanosomes in CSF

240 ROC curves show that neurological signs and sleep disorders appeared when CSF neopterin concentrations were
241 above 21.20 nmol/L (AUC = 0.79 and 0.81, respectively) and/or CXCL-13 concentrations were above 330.26
242 pg/mL (AUC = 0.78 and 0.80, respectively). Trypanosomes were found in the CSF when neopterin
243 concentrations were higher than 31.40 nmol/L (AUC = 0.94) and/or CXCL-13 concentrations were higher than
244 688.85 pg/mL (AUC = 0.94). Sleep and neurological disorders were associated with the presence of a minimum
245 of 16 cells/ μ L of CSF (AUC = 0.80), and the invasion of the CNS by trypanosomes was associated with the
246 presence of more than 50 cells/ μ L of CSF (AUC = 0.93). The sensitivity and specificity of each of these cut-off
247 points are shown in Table 3.

248

10

249 Discussion

250 Our study addressed and characterized a specific group of patients with intermediate stage sleeping sickness, or
251 early stage of CNS involvement. There have been reports of patients cured with first-line drugs at this disease
252 stage, which suggests that either pentamidine [39,48,49] or host immunity can contribute to eradication of the
253 parasite [44,50]. Our results showed that 75% (12/16) of patients with intermediate stage disease were cured
254 following pentamidine treatment, confirming earlier data and supporting evidence of the existence of that stage
255 [39,51]. Current WHO recommendations for clinical trials do not usually take the intermediate stage of disease
256 into account in order to simplify treatment protocols; therefore, stage 2 disease is characterized as having a CSF
257 WBC of above 5 cells/ μ L [52]. However, the relevance and the importance of the intermediate stage are still not
258 completely understood [10]. In three patients with intermediate stage disease, trypanosomes were present in the
259 CSF without an increase in WBC count, and none of these patients relapsed after pentamidine treatment. Clearly,
260 classical staging criteria are misleading, and new biomarkers should be implemented [53]. The accuracy of using
261 neopterin and CXCL-13 as biomarkers for sleeping sickness has been demonstrated previously in larger cohorts,
262 and their links with early inflammatory processes of sleeping sickness have been shown [36–38]. In our study,
263 we assessed the ability of those markers to potentially characterize disease stages; it was shown that levels of
264 CSF neopterin and CXCL-13 can define stage 1 and advanced stage 2 disease, and that the range of biomarker
265 concentrations between those assigned to stage 1 and advanced stage 2 could indicate an intermediate disease
266 stage.

267 Previously, CSF neopterin levels below 14.3 nmol/L was indicative of stage 1 disease, and neopterin levels
268 greater than this was indicative of stage 2 disease (determined from 412 samples) [38]. Similarly, CSF
269 concentrations of CXCL-13 lower than 125.5 pg/mL was indicative of stage 1 disease, whereas levels greater
270 than this were indicative of stage 2 disease (determined from 97 samples) [37]. In our study, it was shown that
271 the cut-off point of CSF neopterin to define stage 1 disease is below 15.56 nmol/L, which is close to that
272 established by Tiberti *et al* in 2013 [38]. However, we have established a cut-off point marking the entry of
273 patients in advanced stage 2 at 60.31 nmol/L, introducing a gap between two cut-off values that represents the
274 levels of neopterin found in the intermediate stage of disease.

275 In our study, the cut-off point of CSF CXCL-13 to define stage 1 disease was found to be a concentration of less
276 than 91.21 pg/mL; a CSF CXCL-13 concentration greater than 395.45 pg/mL was indicative of advanced stage 2
277 disease. Concentrations of CXCL-13 between these two values were indicative of the intermediate stage. The
278 concentrations of CXCL-13 that define stage 1 and stage 2 disease were originally found in the study by Tiberti

279 *et al* in 2012 [37]; their data suggested that a CSF CXCL-13 concentration below 125.5 pg/mL was indicative of
280 stage 1 disease, whereas values above this threshold were indicative of stage 2 disease. This cut-off value falls
281 between the two cut-off points found in our study (below 91.21 pg/mL for stage 1 disease and above 395.45
282 pg/mL for advanced stage 2).

283 This observed difference between the CXCL-13 and neopterin cut-off points is due to the fact that in the studies
284 by Tiberti *et al* [37,38], patients in intermediate stages of disease are included in stage 2. Here we have
285 demonstrated that a change in the CSF neopterin and CXCL-13 concentration does not correspond simply to
286 stage 1 or 2 (a WBC count of greater than 5 cells/ μ L), but rather to an intermediate stage between stage 1 (a
287 WBC count below 5 cells/ μ L) and an advanced stage 2 (a WBC count greater than 20 cells/ μ L).

288 The differences in levels of neopterin and CXCL-13 in patients with sleeping sickness may be explained by their
289 production mechanisms. Neopterin is produced by microglial cells in response to the parasite [54,55], whereas
290 CXCL-13 occurs when the parasite is already in the CNS and induce, in conjunction with CXCL-12, leucocyte
291 extravasation into the CSF [56]. This is correlated with a late response of the B cell populations, as described in
292 the literature [57].

293 In our study, 11 patients relapsed. The number of relapses in our cohort was not sufficient to be able to draw any
294 conclusion with regards to treatment efficiency. However, according to Fisher's exact test, the number of
295 observed relapses was uniformly distributed in the 3 disease stages (stage 1, intermediate stage and advanced
296 stage 2) and was not associated with the treatment protocols. This suggests that first stage drugs are efficacious
297 in treating patients with intermediate stage disease.

298 Among the relapse group only five had complete data regarding neopterin and CXCL-13 concentrations at the
299 time of their relapse.

300 Among them, a patient with stage 1 disease who had relapsed (after 18 months) had a neopterin and CXCL-13
301 concentration well above the mean concentrations of cured patients who had stage 1 disease. The same
302 phenomenon was observed for the two patients with advanced stage 2 disease who were diagnosed with relapse
303 at the 12 months follow-up. One of these two patients was erroneously treated with pentamidine because his
304 WBC count was reported as 3 cells/ μ L at the time of treatment but was in fact 30 cells/ μ L. One of the two
305 patients with intermediate stage disease who relapsed at the 12-months follow-up, had a higher CSF neopterin
306 concentration (65.29 nmol/L) than cured individuals (12.16 nmol/L); however, other data were not available.
307 However, in the patient with advanced stage 2 disease who relapsed at the 18-months follow-up, there was no
308 difference in the level of neopterin or CXCL-13 in CSF compared with cured patients. For this patient, 18

309 months after treatment with DFMO, parasites were found in the CSF following centrifugation without an
310 increase in cytorachia. It is possible that in this case, the relapse was extremely recent and that it had not yet led
311 to the increase of neuroinflammatory markers (such as cytorachia, CXCL-13 and neopterin). Among the six
312 patients that relapsed, three had comparable CSF neopterin and CXCL-13 data to the disease stage cut-off points
313 published by Tiberti *et al.* (at 12 months, levels were 41.4 nmol/L and 76.7 pg/mL for neopterin and CXCL13,
314 respectively) [38]. Using the levels of CXCL-13 as a biomarker in these three relapsed patients, two patients can
315 be classified as being in relapse, and all three patients can be characterized as relapsed by their neopterin levels.
316 Our data are insufficient for a statistically significant conclusion; nevertheless, for patients with complete data,
317 100% were detected to have relapsed by using at least one of two biomarkers. At the end of follow-up (at 24-
318 months follow-up and beyond) five of the 11 patients relapsed. In the cases of these patients, it is difficult to
319 know whether this was true relapse or re-infection, which must be taken into account [58].
320 The main criticism of this work is the absence of a control population, which is justified because it is not ethical
321 to perform a lumbar puncture on a healthy person. It is for this reason that we had to define cut-off points for
322 neopterin and CXCL-13 above which patients are considered non-stage 1; all patients with values below these
323 thresholds are thus stage 1. According to the literature, the normal concentration of neopterin is less than 5.1
324 nmol/L of CSF [20], and the normal concentration of CXCL-13 is less than 11.5 pg/mL of CSF [59], but we do
325 not know the true concentration values for these two biomarkers in healthy Angolan individuals. In our study,
326 cut-off values (as well as their sensitivities and specificities) were defined on a limited sample size. These values
327 would be improved using a larger sample of patients.
328 The difficulty in all studies of neurological stage discrimination during sleeping sickness, is the definition of the
329 gold standard as recently reviewed [53]. The current gold standard is defined by the criteria of the WHO [52]
330 based on the cytorachia and/or the presence of the parasite in the CSF. The only specific test confirming stage 2
331 is the presence of trypanosomes in the CSF (neurological invasion) [60]. In our study, the presence of
332 trypanosomes is a good marker when CSF WBC count is over 50 cells/ μ L of CSF (82% sensitivity and 84%
333 specificity) and confirms the lack of sensitivity of parasite detection. The most sensitive and current test to
334 define CNS involvement is cytorachia but this test lacks specificity [52,61]. The onset of neurological signs and
335 sleep disorders may be associated with cytorachia of less than 5 cells/ μ L, this has been reported previously
336 [62,63], confirmed in our study with 37 % of stage one patients with neurological signs and shown also more
337 recently in *T. b. rhodesiense* infection where patients are cured with first stage drugs [17]. Thus the appearance
338 of WBC in the CSF does not always correlate with the appearance of neurological signs and sleep disorders; this

339 would also suggest that cytorachia is not a reliable biomarker for staging. In our study, neurological signs and
340 sleep disorders appeared when mean cytorachia was greater than 12 cells/ μ L and 16 cells/ μ L, respectively. We
341 established cut-off points for neopterin and CXCL-13 related to the onset of clinical signs of the disease instead
342 of using cytorachia but the neopterin and CXCL-13 cuts-off points were not discriminative enough to be used as
343 diagnostic markers.
344

Article en cours de soumission

345 **Conclusion**

346 Our findings show that the intermediate stage of disease should be taken into account, and therefore the standard
347 criteria should be redefined to better tailor the treatments to the patient's need. In the future, with the possible
348 discovery of new stage-independent therapeutics, the treatment protocols will be simplified, and there will be
349 less need to accurately gauge the disease-state of the patient; however, post-therapeutic follow-up of patients will
350 still be required, and using accurate biomarkers will effectively monitor disease progression. This monitoring
351 should not be neglected, as parasite-reservoir elimination in humans is an important component to the
352 eradication of sleeping sickness.

353 Our work suggests that the levels of the two biomarkers, neopterin and CXCL-13, are good markers of disease
354 staging, and might be used to identify relapse in the patient. Using the two biomarkers in conjunction, rather than
355 individually, could be a stronger predictor of disease.

356 Biomarker identification should not be limited to the CSF and should be continued on other biological fluids to
357 avoid lumbar puncture; with the development of new methods to identify specific markers, diagnosis algorithms
358 should be simplified in the near future.

359

360 **Conflict of Interest:** BC and SB were employed for the Foundation for New Innovative Diagnostics (FIND) at
361 the moment of the samples collection. JMN is employee of the Foundation for New Innovative Diagnostics
362 (FIND). All other authors have declared that no competing interests exist.

363

364 **Acknowledgements:** The manuscript has been revised for the English by an independent scientific language
365 editing service.

366

367

Article en cours de soumission



368 **Table 1: CXCL-13 and neopterin levels in the three stages of disease**

369

		Inclusion	M0	M6	M12	M18
		Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)
Stage 1	CXCL-13 ¹	26.42 (36.38)	NA	11.37 (3.44)	23.33 (65.54)	46.78 (145.02)
	Neopterin ²	12.15 (4.95)	NA	11.01 (4.12)	22.67 (51.67)	14.69 (16.69)
Int stage	CXCL-13 ¹	111.85 (119.30)	12.72 (0)	65.67 (161.53)	95.30 (257.42)	37.42 (110.09)
	Neopterin ²	18.72 (8.5)	23.20 (5.63)	22.82 (27.18)	18.16 (24.70)	16.12 (18.69)
Ad stage	CXCL-13 ¹	3919.32 (1856.06)	537.91 (494.06)	104.00 (173.68)	250.25 (929.58)	23.03 (43.68)
	Neopterin ²	280.62 (220.69)	34.83 (20.83)	17.20 (15.14)	27.10 (54.38)	14.18 (6.09)

370

371 The mean and standard deviation (SD) of CSF concentration of neopterin and CXCL-13 are shown for patients
 372 with stage 1, intermediate (Int), and advanced (Ad) stage 2 disease at inclusion and at each follow-up point: post-
 373 treatment (M0), at 6 months (M6), 12 months (M12) and 18 months (M18). No data are available for patients
 374 with stage 1 at M0 because they were not involved in this follow-up. Four patients relapsed at 12 months and
 375 two at 18 months, they were removed for the calculation of these averages at 12 and 18 months, respectively.

376 ¹ pg/mL. ² nmol/L.

377

Article en cours de soumission



378 **Table 2: Sensitivity and specificity of new tests for staging**

379

	Neopterin (nmol/L)	CXCL-13 (pg/mL)
Non-stage 1	15.57	91.21
Sensitivity [IC]	0.90 [0.73 ; 0.98]	0.90 [0.73 ; 0.98]
Specificity [IC]	0.86 [0.74 ; 0.94]	0.79 [0.66 ; 0.89]
Int stage		
Sensitivity [IC]	0.65 [0.43 ; 0.84]	0.52 [0.31 ; 0.73]
Specificity [IC]	0.94 [0.85 ; 0.98]	0.95 [0.87 ; 0.99]
Ad stage 2	60.31	395.45
Sensitivity [IC]	0.97 [0.85 ; 1.00]	0.90 [0.85 ; 1.00]
Specificity [IC]	1.00 [0.93 ; 1.00]	0.86 [0.93 ; 1.00]

380

381 Table 2 shows the cut-off values established for neopterin and CXCL-13 expressed in nmol/L and pg/mL,
 382 respectively. The sensitivity and specificity values for each cut-off points determined by ROC analysis are
 383 shown in the table. We defined cut-off values of neopterin and CXCL-13 for non-stage 1 patients, under which
 384 patients are considered to be in stage 1 of sleeping sickness.

385

Article en cours de soumission



386 **Table 3:** Comparison of neopterin and CXCL-13 results to classical markers (quantitative and
 387 qualitative data)
 388

Cut-off	Neurological signs	Sleep disorders	Trypanosomes in CSF
CXCL-13 ²	310.52	330.26	310.52
Sensitivity [IC]	0.63 [0.49 ; 0.76]	0.63 [0.48 ; 0.77]	0.79 [0.63 ; 0.90]
Specificity [IC]	0.92 [0.77 ; 0.99]	0.92 [0.78 ; 0.98]	0.90 [0.78 ; 0.97]
Neopterin ³	21.20	21.20	31.41
Sensitivity [IC]	0.69 [0.54 ; 0.81]	0.69 [0.55 ; 0.82]	0.84 [0.69 ; 0.94]
Specificity [IC]	0.83 [0.67 ; 0.94]	0.82 [0.68 ; 0.92]	0.90 [0.78 ; 0.97]
WBC count ⁴	12	16	50
Sensitivity [IC]	0.71 [0.56 ; 0.83]	0.71 [0.57 ; 0.83]	0.82 [0.66 ; 0.92]
Specificity [IC]	0.92 [0.78 ; 0.98]	0.89 [0.76 ; 0.97]	0.84 [0.70 ; 0.93]

389

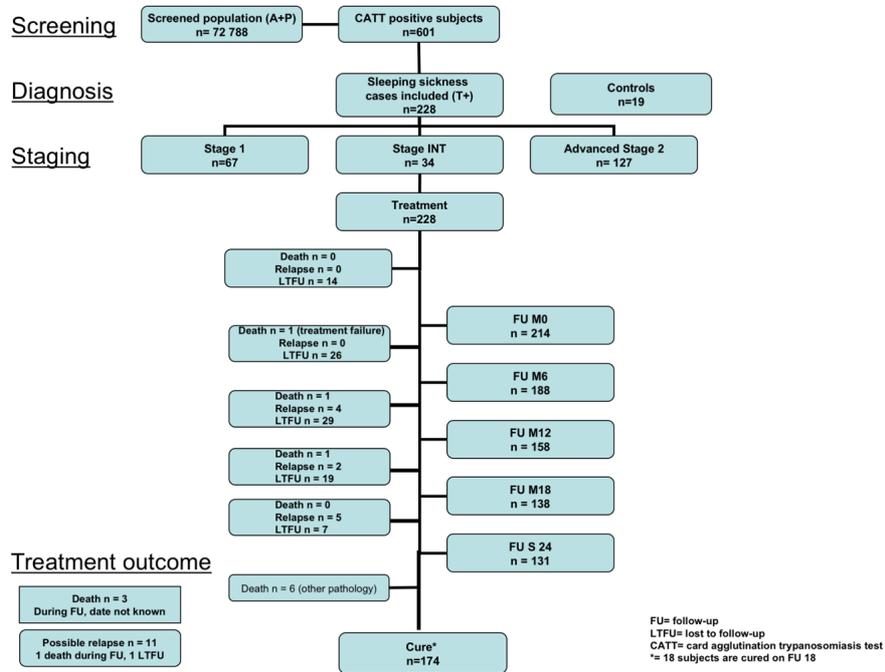
390 The determined cut-off values of neopterin, CXCL-13 and leucocyte numbers at the appearance of clinical signs
 391 of the disease (neurological signs and sleep disorders) and CNS invasion by the parasite. ¹[Sensitivity;
 392 specificity]. ²pg/mL. ³ nmol/L. ⁴cells/ μ L CSF.

393

Article en cours de soumission



394 **Figure 1:** Flow diagram of cohort study conducted in Angola between 2008 and 2011.



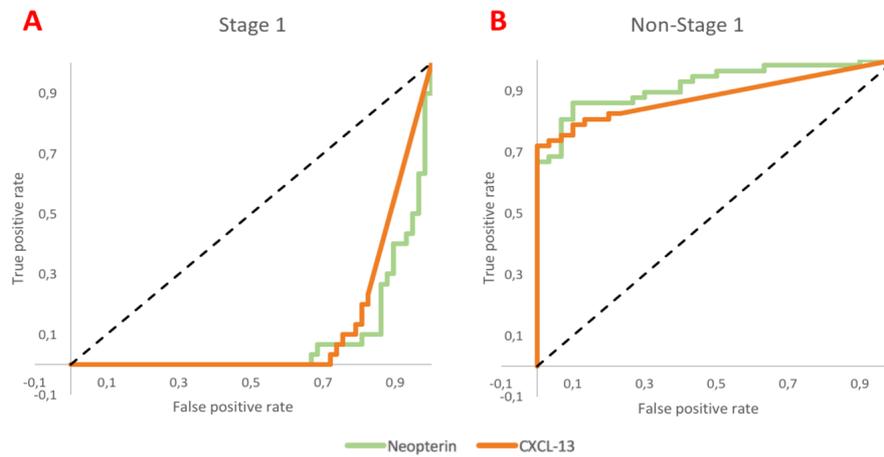
395

396 Flow diagram shows the enrolment process of 247 *Trypanosoma brucei gambiense*-infected patients and
 397 controls; and their follow-up from diagnosis to the end of follow-up (6, 12, 18, 24 months). This cohort is
 398 composed of 19 controls, 67 patients with stage 1, 34 patients with intermediate stage and 127 patients with
 399 advanced stage 2. All HAT patients were treated according to their stage. At the end of this study, 11 individuals
 400 were reported relapsed and 174 patients were reported cured.

401



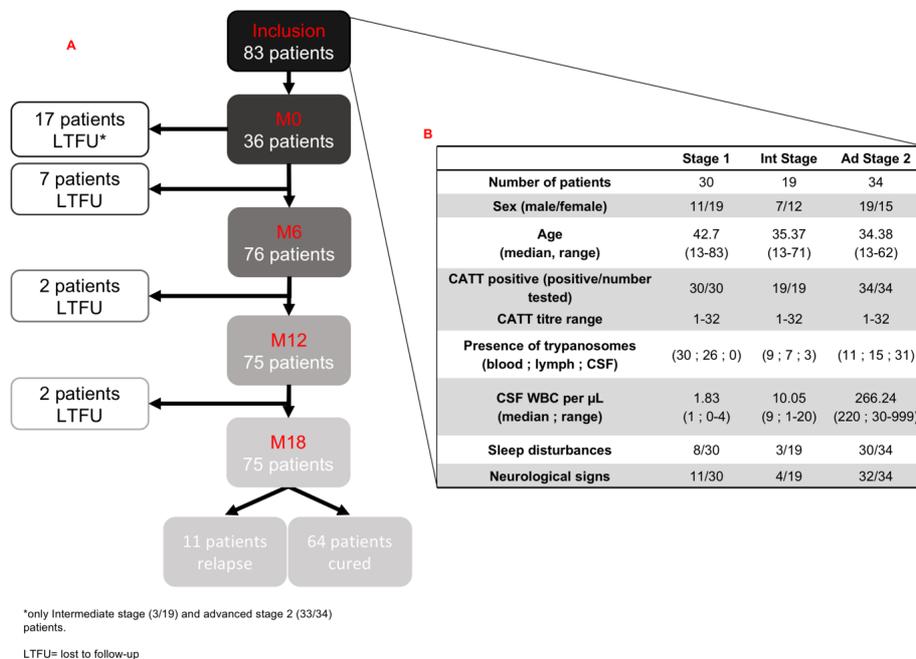
402 **Figure 2.** ROC curves for all threshold values for neopterin and CXCL-13 in patients with
403 stage 1 disease and in patients with non-stage 1 disease (intermediate stage and advanced
404 stage 2).



405
406 ROC curves representing sensitivity as a function of the complement of specificity (1-specificity) for all
407 threshold values for neopterin and CXCL-13 in patients with stage 1 disease (A) and in patients with non-stage 1
408 disease (B).

409
410

411 **Figure 3:** Flowchart of samples and patients' follow-up with population characteristics at
 412 inclusion.



413
 414 Flowchart (Figure 3A) shows the number of patients at each step of the follow-up. At inclusion (n = 83), after
 415 treatment (M0) (n = 36), 6 months (n = 76), 12 months (n = 75) and 18 months (n = 75). At the end of the
 416 follow-up 64 patients were declared cured and 11 patients relapsed, 6 during follow-up and 5 after 24 months.
 417 Table (Figure 3B) represents the epidemiological and biological data of the 30 patients with stage 1 disease, the
 418 19 patients with intermediate stage disease and the 34 patients with advanced (Ad) stage 2 disease who constitute
 419 the inclusion cohort.

420



421 **References**

- 422 [1] J. R. Franco, P. P. Simarro, A. Diarra, and J. G. Jannin, "Epidemiology of human African
423 trypanosomiasis," *Clin. Epidemiol.*, vol. 6, pp. 257–275, Aug. 2014.
- 424 [2] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, and G. Priotto, "Human African trypanosomiasis," *The Lancet*, vol.
425 0, no. 0, Jun. 2017.
- 426 [3] WHO, *Report of the second WHO stakeholders meeting on gambiense human African trypanosomiasis*
427 *elimination*. 2016.
- 428 [4] V. K. B. K. Mesu *et al.*, "Oral fexinidazole for late-stage African *Trypanosoma brucei* gambiense
429 trypanosomiasis: a pivotal multicentre, randomised, non-inferiority trial," *The Lancet*, vol. 391, no. 10116,
430 pp. 144–154, Jan. 2018.
- 431 [5] P. Babokhov, A. O. Sanyaolu, W. A. Oyibo, A. F. Fagbenro-Beyioku, and N. C. Iriemenam, "A current
432 analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis," *Pathog. Glob.*
433 *Health*, vol. 107, no. 5, pp. 242–252, Jul. 2013.
- 434 [6] M. Balasegaram, S. Harris, F. Checchi, C. Hamel, and U. Karunakara, "Treatment outcomes and risk
435 factors for relapse in patients with early-stage human African trypanosomiasis (HAT) in the Republic of
436 the Congo," *Bull. World Health Organ.*, vol. 84, no. 10, pp. 777–782, Oct. 2006.
- 437 [7] P. Capewell *et al.*, "The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African
438 trypanosomes," *eLife*, vol. 5, Sep. 2016.
- 439 [8] M. Keita, B. Bouteille, B. Enanga, J. M. Vallat, and M. Dumas, "*Trypanosoma brucei brucei*: a long-term
440 model of human African trypanosomiasis in mice, meningo-encephalitis, astrocytosis, and neurological
441 disorders," *Exp. Parasitol.*, vol. 85, no. 2, pp. 183–192, Feb. 1997.
- 442 [9] S. Mogk *et al.*, "Cyclical Appearance of African Trypanosomes in the Cerebrospinal Fluid: New Insights
443 in How Trypanosomes Enter the CNS," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3, Mar. 2014.
- 444 [10] P. G. E. Kennedy, "Diagnosing central nervous system trypanosomiasis: two stage or not to stage?,"
445 *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 102, no. 4, pp. 306–307, Apr. 2008.
- 446 [11] J. M. Mansfield and D. M. Paulnock, "Regulation of innate and acquired immunity in African
447 trypanosomiasis," *Parasite Immunol.*, vol. 27, no. 10–11, pp. 361–371, Nov. 2005.
- 448 [12] P. Vincendeau and B. Bouteille, "Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis," *An.*
449 *Acad. Bras. Ciênc.*, vol. 78, no. 4, pp. 645–665, Dec. 2006.
- 450 [13] J. Musaya, E. Matovu, M. Nyirenda, and J. Chisi, "Role of cytokines in *Trypanosoma brucei*-induced
451 anaemia: A review of the literature," *Malawi Med. J.*, vol. 27, no. 2, pp. 45–50, 2015.
- 452 [14] A. Ponte-Sucre, "An Overview of *Trypanosoma brucei* Infections: An Intense Host–Parasite Interaction,"
453 *Front. Microbiol.*, vol. 7, Dec. 2016.
- 454 [15] J. Cnops, M. Radwanska, and S. Magesz, "Immunopathology during African Trypanosomiasis," *J. Trop.*
455 *Dis. Public Health*, Jan. 2016.
- 456 [16] "WHO | Report of the second WHO stakeholders meeting on gambiense human African trypanosomiasis
457 elimination," *WHO*. [Online]. Available:
458 http://www.who.int/trypanosomiasis_african/resources/9789241511520/en/. [Accessed: 20-Feb-2017].
- 459 [17] L. MacLean, H. Reiber, P. G. E. Kennedy, and J. M. Sternberg, "Stage Progression and Neurological
460 Symptoms in *Trypanosoma brucei* rhodesiense Sleeping Sickness: Role of the CNS Inflammatory
461 Response," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, no. 10, Oct. 2012.
- 462 [18] M. C. Okomo-Assoumou, S. Daulouede, J. L. Lemesre, A. N'Zila-Mouanda, and P. Vincendeau,
463 "Correlation of high serum levels of tumor necrosis factor-alpha with disease severity in human African
464 trypanosomiasis," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 53, no. 5, pp. 539–543, Nov. 1995.
- 465 [19] R. R. Brown, C. M. Lee, P. C. Kohler, J. A. Hank, B. E. Storer, and P. M. Sondel, "Altered tryptophan and
466 neopterin metabolism in cancer patients treated with recombinant interleukin 2," *Cancer Res.*, vol. 49, no.
467 17, pp. 4941–4944, Sep. 1989.
- 468 [20] A. Viacoz *et al.*, "CSF neopterin level as a diagnostic marker in primary central nervous system
469 lymphoma," *Neuro-Oncol.*, vol. 17, no. 11, pp. 1497–1503, Nov. 2015.
- 470 [21] A. Berdowska and K. Zwirska-Korczala, "Neopterin measurement in clinical diagnosis," *J. Clin. Pharm.*
471 *Ther.*, vol. 26, no. 5, pp. 319–329, Oct. 2001.
- 472 [22] C. Murr, B. Widner, B. Wirleitner, and D. Fuchs, "Neopterin as a marker for immune system activation,"
473 *Curr. Drug Metab.*, vol. 3, no. 2, pp. 175–187, Apr. 2002.
- 474 [23] B. Wirleitner, K. Schroecksnadel, C. Winkler, and D. Fuchs, "Neopterin in HIV-1 infection," *Mol.*
475 *Immunol.*, vol. 42, no. 2, pp. 183–194, Feb. 2005.
- 476 [24] L. Hagberg *et al.*, "Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system
477 immune activation in HIV-1 infection," *AIDS Res. Ther.*, vol. 7, p. 15, Jun. 2010.
- 478 [25] R. Renneberg *et al.*, "Neopterin Screening to Improve Safety of Blood Transfusion," *Pteridines*, vol. 17,
479 no. 4, pp. 103–104, 2013.

- 480 [26] A. Ashfaq, A. Ejaz, and G. Abbas, "Serum Neopterin: A Potential Marker for Screening Blood Donors," *J.*
481 *Coll. Physicians Surg.--Pak. JCPSP*, vol. 27, no. 1, pp. 30–33, Jan. 2017.
- 482 [27] E. K. Rainey-Barger, J. M. Rumble, S. J. Lalor, N. Esen, B. M. Segal, and D. N. Irani, "The lymphoid
483 chemokine, CXCL13, is dispensable for the initial recruitment of B cells to the acutely inflamed central
484 nervous system," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 25, no. 5, pp. 922–931, Jul. 2011.
- 485 [28] C. Havenar-Daughton *et al.*, "CXCL13 is a plasma biomarker of germinal center activity," *Proc. Natl.*
486 *Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 10, pp. 2702–2707, Mar. 2016.
- 487 [29] J. Panse *et al.*, "Chemokine CXCL13 is overexpressed in the tumour tissue and in the peripheral blood of
488 breast cancer patients," *Br. J. Cancer*, vol. 99, no. 6, pp. 930–938, Sep. 2008.
- 489 [30] D. Sansonno *et al.*, "Increased serum levels of the chemokine CXCL13 and up-regulation of its gene
490 expression are distinctive features of HCV-related cryoglobulinemia and correlate with active cutaneous
491 vasculitis," *Blood*, vol. 112, no. 5, pp. 1620–1627, Sep. 2008.
- 492 [31] H.-T. Lee *et al.*, "Serum BLC/CXCL13 concentrations and renal expression of CXCL13/CXCR5 in
493 patients with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis," *J. Rheumatol.*, vol. 37, no. 1, pp. 45–52,
494 Jan. 2010.
- 495 [32] C. K. Wong, P. T. Y. Wong, L. S. Tam, E. K. Li, D. P. Chen, and C. W. K. Lam, "Elevated production of
496 B cell chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity," *J. Clin.*
497 *Immunol.*, vol. 30, no. 1, pp. 45–52, Jan. 2010.
- 498 [33] J. Hytönen, E. Kortela, M. Waris, J. Puustinen, J. Salo, and J. Oksi, "CXCL13 and neopterin
499 concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis and other diseases that cause
500 neuroinflammation," *J. Neuroinflammation*, vol. 11, p. 103, Jun. 2014.
- 501 [34] C. M. Marra, L. C. Tantaló, S. K. Sahi, C. L. Maxwell, and S. A. Lukehart, "CXCL13 as a cerebrospinal
502 fluid marker for neurosyphilis in HIV-infected patients with syphilis," *Sex. Transm. Dis.*, vol. 37, no. 5,
503 pp. 283–287, May 2010.
- 504 [35] M. Khademi *et al.*, "Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for
505 the disease course," *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.*, vol. 17, no. 3, pp. 335–343, Mar. 2011.
- 506 [36] B. Courtioux *et al.*, "Increased CXCL-13 levels in human African trypanosomiasis meningo-encephalitis,"
507 *Trop. Med. Int. Health*, vol. 14, no. 5, pp. 529–534, May 2009.
- 508 [37] N. Tiberti *et al.*, "Cerebrospinal fluid neopterin as marker of the meningo-encephalitic stage of
509 Trypanosoma brucei gambiense sleeping sickness," *PLoS One*, vol. 7, no. 7, p. e40909, 2012.
- 510 [38] N. Tiberti *et al.*, "Neopterin Is a Cerebrospinal Fluid Marker for Treatment Outcome Evaluation in
511 Patients Affected by Trypanosoma brucei gambiense Sleeping Sickness," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 7,
512 no. 2, p. e2088, févr 2013.
- 513 [39] F. Doua, T. W. Miezán, J. R. Sanon Singaro, F. Boa Yapó, and T. Baltz, "The efficacy of pentamidine in
514 the treatment of early-late stage Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis," *Am. J. Trop. Med.*
515 *Hyg.*, vol. 55, no. 6, pp. 586–588, Dec. 1996.
- 516 [40] U. Zillmann and E. J. Albiez, "The Testryp CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis): a field
517 study on gambiense sleeping sickness in Liberia," *Trop. Med. Parasitol. Off. Organ Dtsch.*
518 *Tropenmedizinische Ges. Dtsch. Ges. Tech. Zusammenarbeit GTZ*, vol. 37, no. 4, pp. 390–392, Dec. 1986.
- 519 [41] D. V. Sheehan *et al.*, "The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and
520 validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10," *J. Clin. Psychiatry*,
521 vol. 59 Suppl 2, pp. 22–33-57, Jan. 1998.
- 522 [42] C. R. Kjeldsberg and J. A. Knight M. D., *Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic,*
523 *Cerebrospinal, Seminal, Serous & Synovial Fluids*, 3 Sub edition. Chicago: Amer Society of Clinical,
524 1993.
- 525 [43] P. Büscher *et al.*, "Improved Models of Mini Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT) and
526 Modified Single Centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging," *PLoS Negl. Trop.*
527 *Dis.*, vol. 3, no. 11, p. e471, Jan. 2009.
- 528 [44] S. Deborggraeve *et al.*, "Diagnostic accuracy of PCR in gambiense sleeping sickness diagnosis, staging
529 and post-treatment follow-up: a 2-year longitudinal study," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 2, p. e972,
530 Feb. 2011.
- 531 [45] R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation
532 for Statistical Computing, 2016.
- 533 [46] T. Sing, O. Sander, N. Beerenwinkel, and T. Lengauer, *ROCR: Visualizing the Performance of Scoring*
534 *Classifiers*. 2015.
- 535 [47] T. Pohlert, *PMCMR: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums*. 2016.
- 536 [48] J. Pépin and F. Milord, "The treatment of human African trypanosomiasis," *Adv. Parasitol.*, vol. 33, pp. 1–
537 47, 1994.
- 538 [49] V. Lejon *et al.*, "Intrathecal Immune Response Pattern for Improved Diagnosis of Central Nervous System
539 Involvement in Trypanosomiasis," *J. Infect. Dis.*, vol. 187, no. 9, pp. 1475–1483, May 2003.

- 540 [50] V. Jamonneau *et al.*, "Stage determination and therapeutic decision in human African trypanosomiasis:
541 value of polymerase chain reaction and immunoglobulin M quantification on the cerebrospinal fluid of
542 sleeping sickness patients in Côte d'Ivoire," *Trop. Med. Int. Health*, vol. 8, no. 7, pp. 589–594, Jul. 2003.
- 543 [51] J. Pépin and N. Khonde, "Relapses following treatment of early-stage *Trypanosoma brucei gambiense*
544 sleeping sickness with a combination of pentamidine and suramin," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol.
545 90, no. 2, pp. 183–186, Mar. 1996.
- 546 [52] WHO, *Control and surveillance of human African trypanosomiasis: report of a WHO expert committee*.
547 Switzerland: World Health Organization, 2013.
- 548 [53] A. K. Njamnshi, G. Gettinby, and P. G. E. Kennedy, "The challenging problem of disease staging in
549 human African trypanosomiasis (sleeping sickness): a new approach to a circular question," *Trans. R. Soc.*
550 *Trop. Med. Hyg.*, pp. 1–5, 2017.
- 551 [54] B. J. Rollins, "Chemokines," *Blood*, vol. 90, no. 3, pp. 909–928, Aug. 1997.
- 552 [55] M. P. Brenier-Pinchart, H. Pelloux, D. Derouich-Guergour, and P. Ambroise-Thomas, "Chemokines in
553 host-protozoan-parasite interactions," *Trends Parasitol.*, vol. 17, no. 6, pp. 292–296, Jun. 2001.
- 554 [56] M. Krumbholz *et al.*, "Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is
555 differentially linked to CNS immune cell recruitment," *Brain J. Neurol.*, vol. 129, no. Pt 1, pp. 200–211,
556 Jan. 2006.
- 557 [57] C. Boda *et al.*, "Immunophenotypic Lymphocyte Profiles in Human African Trypanosomiasis," *PLOS*
558 *ONE*, vol. 4, no. 7, p. e6184, juil 2009.
- 559 [58] S. Mogk, C. M. BoBelmann, C. N. Mudogo, J. Stein, H. Wolburg, and M. Duszenko, "African
560 trypanosomes and brain infection – the unsolved question," *Biol. Rev.*, p. n/a-n/a, Oct. 2016.
- 561 [59] B. Țilea, S. Voidazan, R. Balasa, A. Hutanu, and A. Fodor, "CXCL13 levels are more increased in
562 cerebrospinal fluid and plasma of patients with acute infectious than in non-infectious diseases of the
563 central nervous system," *Rev. Romana Med. Lab.*, vol. 25, no. 1, pp. 63–73, Nov. 2016.
- 564 [60] N. V. Meirvenne, "Biological diagnosis of human African trypanosomiasis," in *Progress in Human*
565 *African Trypanosomiasis, Sleeping Sickness*, Springer, Paris, 1999, pp. 235–252.
- 566 [61] D. Mumba Ngoyi, J. Menten, P. P. Pyana, P. Büscher, and V. Lejon, "Stage determination in sleeping
567 sickness: comparison of two cell counting and two parasite detection techniques," *Trop. Med. Int. Health*
568 *TM IH*, vol. 18, no. 6, pp. 778–782, Jun. 2013.
- 569 [62] E. Bertrand *et al.*, "Symptomatologie générale de la trypanosomiase humaine africaine au moment du
570 dépistage.," Jan. 1973.
- 571 [63] Y. Boa, M. Traore, F. Doua, M. Kouassi-Traore, B. Kouassi, and C. Giordano, "Present clinical aspects of
572 african human trypanosomiasis due to *T. B. Gambiense* analysis of 300 cases of the epidemic focus of
573 Daloa
," *Bull. Société Pathol. Exot.*, vol. 81, no. 3, pp. 427–444, 1988.
- 574

4.2. Article 2: Proteome characterization in various biological fluids of *Trypanosoma brucei gambiense*-infected subjects.

Le diagnostic de la THA est difficile. Actuellement, il nécessite une ponction lombaire pour déterminer le stade de la maladie et sélectionner le traitement approprié. L'identification de nouveaux marqueurs de stade de la maladie est un défi depuis de nombreuses années.

Dans cette étude, nous avons utilisé une technique couplant la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) pour identifier par stratégie *bottom-up*, le protéome contenu dans le sérum, le LCR, l'urine et la salive d'individus contrôles ainsi que de patients issus de la cohorte. Pour ce screening des protéines, nous avons sélectionné des échantillons de patients en stade 1 sans trypanosome dans le LCR et avec une cytorachie inférieure à 5 cellules et des patients en stade 2 avec des trypanosomes dans le LCR ou une cytorachie supérieure à 5 cellules.

Nous avons pu identifier par LC-MS/MS un total de 269 protéines humaines dans le sérum, 491 protéines dans le LCR, 664 protéines dans les urines et 954 protéines dans la salive. L'analyse globale de ces données montre une diminution du nombre moyen de protéines différentes exprimées dans le LCR en fonction de l'évolution de la maladie. En effet, en moyenne 219 et 289 protéines différentes sont identifiées dans le LCR des contrôles et des patients en stade 1 respectivement, par rapport à une moyenne de 67 protéines identifiées dans le LCR des patients en stade 2. Une base de données Uniprot pour *T. b. gambiense* a également été interrogée et a permis d'identifier 14 protéines parasitaires dans le sérum, 6 protéines dans le LCR, 9 protéines dans les urines et 24 protéines dans la salive. Par ailleurs, l'analyse en semi-trypsine de nos échantillons n'a révélé aucune altération de la qualité du protéome à cause de la congélation de nos échantillons.

Ces données sont disponibles sur la plateforme PRIDE sous l'identifiant : PDX007842.

Parmi les protéines humaines identifiées nous avons sélectionné 69 protéines intéressantes (37 dans le LCR, 8 dans la salive et 24 dans l'urine) qui pourraient potentiellement permettre de faire un diagnostic de la THA ou de différencier le stade de la maladie. Enfin, 5 protéines sont dosées par ELISA sur 80 patients et individus contrôles : la neuroserpine, la néogénine et la sécrétogranine 2 dans le LCR ; la moésine dans l'urine et l'intélectine 2 dans la salive.

L'analyse des données obtenues par dosage ELISA de la neuroserpine dans le LCR indique qu'elle est un biomarqueur capable de différencier les patients en stade 1 des patients en stade 2. L'analyse des courbes ROC obtenues montre qu'une diminution de la concentration en neuroserpine en dessous du seuil de 4,99 ng/mL est caractéristique des patients en stade

2 de la maladie (AUC = 0,72 ; sensibilité 0,58 et spécificité 0,94). Nous avons également pu déterminer un seuil à 5,09 ng/mL en dessous duquel le patient présente des troubles du sommeil (AUC = 0,79 ; sensibilité 0,72 et spécificité 0,67), un seuil à 4,97 ng/mL en dessous duquel le patient présente des troubles neurologiques (AUC = 0,77 ; sensibilité 0,90 et spécificité 0,59) et un seuil à 4,83 ng/mL en dessous duquel on retrouve des trypanosomes dans le LCR du patient (AUC = 0,95 ; sensibilité 0,98 et spécificité 0,91).

L'analyse des données obtenues par dosage ELISA de la moésine dans l'urine montre que cette protéine est capable de discriminer les patients en stade 2. L'analyse par courbe ROC montre qu'une concentration en moésine dans les urines supérieures à 0,60 ng/mL (AUC = 0,72 ; Sensibilité 0,63 et spécificité 0,65) est révélatrice du stade 2 de la THA.

Cependant, l'analyse des données obtenues par dosage ELISA de l'intélectine 2 dans la salive n'a pas montré de différence d'expression significative de cette protéine entre les individus contrôles et les patients en stade 1 ou en stade 2.

Un autre point important révélé par notre étude est la nette diminution de la diversité de protéines identifiées dans le LCR des patients en stade 2 par rapport aux patients en stade 1 et aux contrôles. Cette diminution pourrait être due à deux phénomènes : l'immunosuppression induite par le trypanosome ou une résorption des protéines du LCR vers la circulation sanguine due à la perméabilisation de la BHE.

Proteome characterization in various biological fluids of *Trypanosoma brucei gambiense*-infected subjects

Julien BONNET^{1*}, Camille GARCIA², Thibault LEGER², Marie-Pauline COUQUET¹, Philippe VIGNOLES¹, Vatunga GEDEAO³, Joseph NDUNG'U⁴, Clotilde BOUDOT¹, Sylvie BISSER^{1, 5}, Bertrand COURTILOUX¹.

Soumis le 12 octobre 2017 dans PLOS Neglected Tropical Diseases (IF=3,834).

Résumé :

La THA est une maladie tropicale négligée qui est endémique en Afrique subsaharienne et qui peut évoluer vers des épidémies lorsque les systèmes de santé existants sont inefficaces. Le contrôle de la maladie a été amélioré récemment grâce à l'évolution des stratégies de dépistage et de traitement. Cette maladie figure sur la liste, constituer par l'OMS, des pathologies en voie d'élimination. Cependant, certains aspects physiopathologiques de la maladie restent énigmatiques, et des biomarqueurs de progression et de suivi de la maladie, faciles à utiliser, font encore défaut. Dans ce travail, nous proposons une nouvelle approche protéomique pour identifier de nouveaux biomarqueurs de la maladie. Ce travail a été fait sur les fluides classiquement associés à la THA (sérum et liquide céphalo-rachidien) mais aussi sur les fluides biologiques plus facilement accessibles, l'urine et la salive.

Le profil protéomique de patients atteints de THA à *T. b. gambiense* en stade 1 et 2 a été établi par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Le sérum, le LCR, l'urine et la salive de 3 contrôles non infectés, de 3 patients en stade 1 et 4 patients en stade 2 ont été analysés. Parmi les 491, 664 et 954 protéines identifiées, respectivement dans le LCR, l'urine et la salive, 159, 32 et 137 étaient différemment exprimées chez les contrôles et les patients en stade 1 et 2. Parmi ces protéines, 37 protéines dans le LCR, 8 protéines dans l'urine et 24 protéines dans la salive présentaient un intérêt particulier en fonction de leur rôle biologique et de leur présence chez les contrôles et chez les patients en stade 1 et 2. Les protéines les plus prometteuses ont été quantifiées par dosage ELISA sur une cohorte de 14 contrôles non infectés, 23 patients en stade 1 et 43 patients en stade 2. L'analyse de deux protéines, la neuroserpine (dans le LCR) et la moésine (dans les urines), ont été davantage étudiés.

Nos résultats ont montré le potentiel de l'analyse protéomique pour découvrir de nouveaux biomarqueurs et fournissent la base de l'établissement d'un nouveau catalogue protéomique appliqué aux contrôles et patients atteints de la THA.

1 **Proteome characterization in various biological fluids of *Trypanosoma***

2 ***brucei gambiense*-infected subjects**

3 **Short title: Proteomic analysis of biological fluids in patients with HAT**

4
5 Julien Bonnet^{1*}, Camille Garcia², Thibaut Leger², Marie-Pauline Couquet¹, Philippe Vignoles¹,
6 Vatinga Gedeao³, Joseph Ndung'u⁴, Clotilde Boudot¹, Sylvie Bisser^{1,5}, Bertrand Courtioux¹.

7
8 **1** Institute of Neuroepidemiology and Tropical Neurology, School of Medicine, CNRS FR 3503
9 GEIST, University of Limoges, INSERM UMR 1094 Tropical Neuroepidemiology, Limoges,
10 France.

11 **2** Jacques Monod Institute, Proteomics Facility, University Paris Diderot Sorbonne Paris Cité,
12 Paris, France.

13 **3** Instituto de Combate e Controlo das Tripanossomias (ICCT), Luanda, Angola.

14 **4** Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND), Geneva, Switzerland.

15 **5** Pasteur Institute in French Guiana, 23 Boulevard Pasteur, 973006 Cayenne Cedex, French
16 Guiana.

17
18 *Corresponding author

19 E-mail : julien.bonnet@unilim.fr

20

21 **Abstract**

22 **Background:** Human African trypanosomiasis (HAT) is a neglected tropical disease that is
23 endemic in sub-Saharan Africa with a potential to evolve to epidemic outbreaks when existing
24 health systems are inefficient. Control of the disease has been recently improved by better
25 screening and treatment strategies, and the disease is on the WHO list of possible elimination.
26 However, some physiopathological aspects of the disease transmission and progression remain
27 unclear, and easy-to-use markers of disease progression and cure are still lacking. We propose a
28 new proteomic approach to identify new targets and thus possible new biomarkers of the disease.
29 We also focused our attention on fluids classically associated with HAT (serum and cerebrospinal
30 fluid (CSF)) and on the more easily accessible biological fluids urine and saliva.

31 **Methods and Findings:** Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)
32 established the proteomic profile of patients with early and late stage disease. The serum, CSF,
33 urine and saliva of 3 uninfected controls, 3 early stage patients and 4 late stage patients were
34 analyzed. Among 491, 664, and 954 proteins identified, in CSF, urine and saliva, respectively,
35 159, 32 and 137 were differentially expressed in early versus late stage patients, and 37, 8 and 24
36 proteins showed particular interest with regards to their function for the three described fluids,
37 respectively. The most promising proteins (Neogenin, Neuroserpin, secretogranin 2 in CSF;
38 moesin in urine and intelectin 2 in saliva) were quantified by enzyme-linked immunosorbent
39 assay in a confirmatory cohort of 14 uninfected controls, 23 patients with early stage disease and
40 43 patients with late stage disease. The potential of two proteins, neuroserpin and moesin, with
41 the latter present in urine, were further characterized.



42 **Conclusion:** Our results showed the potential of proteomic analysis to discover new biomarkers
43 and provide the basis of the establishment of a new proteomic catalogue applied to HAT-infected
44 subjects and controls.

45 **Author summary**

46 Sleeping sickness, also called Human African Trypanosomiasis (HAT), is a parasitic infection
47 caused by a parasitic protozoan, *Trypanosoma gambiense* or *T. rhodesiense* which is transmitted
48 via an infected tsetse fly: *Glossina palpalis*. The first stage of the disease is characterizing by
49 fevers, headaches, itchiness, and joint pains and progressive lethargy corresponding to the second
50 stage with confusion, poor coordination, numbness and trouble sleeping. Actually, diagnosing
51 HAT requires specialized expertise and significant resources such as well-equipped health centers
52 and qualified staff. Such resources are lacking in many endemic areas that are often in rural
53 locales, so many individuals with HAT die before the diagnosis is established. In this study, we
54 analysed by mass spectrometry the proteome of serum, CSF, urine and saliva samples from
55 infected and non-infected Angolan individuals to define new biomarkers of the disease. This
56 work of proteomics analysis is a preliminary stage to the characterization of the whole proteome,
57 of these 4 biological fluids, of HAT patients. We have identified 69 candidate biomarkers. Five
58 of them have been thoroughly investigated by ELISA quantification. Neuroserpine and Moesin
59 are respectively promising new biomarkers in CSF and urine's patient for a better diagnosis.

60

Article en cours de soumission

61 **Introduction [1st level heading]**

62 Human African trypanosomiasis (HAT), also known as sleeping sickness, is a parasitic disease,
63 caused by subspecies of *Trypanosoma brucei*, that mainly affects poor and rural communities in
64 20 sub-Saharan African countries [1]. HAT is one of 20 neglected tropical diseases (NTDs)
65 recognized by the World Health Organization (WHO) [2], and it is estimated that 55 million
66 people live at risk of contracting HAT infection [3]. In the human population, *T.b. gambiense* is
67 responsible for more than 98% of HAT cases in central and western Africa, *T.b. rhodesiense* is
68 responsible of the remaining 2% of cases, which is prevalent in eastern and southern Africa [3–
69 5].

70 Trypanosomes are inoculated into human hosts by tsetse fly vectors; the trypanosomes then
71 multiply and spread into the blood and lymphatic system. *T.b. gambiense* causes a chronic form
72 of disease that develops in two stages. The first stage (S1), or hemolymphatic stage, is generally
73 characterized by intermittent fever, lymphadenopathy, hepatosplenomegaly and headaches [5].
74 These symptoms are discrete and nonspecific for HAT. After a variable duration of time,
75 trypanosomes cross the blood–brain barrier and reach the central nervous system (CNS); this
76 stage is called the second stage (S2) or nervous stage [6,7].

77 Currently, several tests adapted to the field are used to diagnose HAT, the card agglutination test
78 for trypanosomiasis (CATT) is still the most widely used screening test although single-format
79 rapid diagnostic tests have been recently validated [8]. When the screening test is positive, the
80 disease must be confirmed by demonstrating the presence of the parasite by microscopy. The
81 tests used include blood concentration techniques such as the capillary tube centrifugation (CTC)
82 and mini anion exchange centrifugation technique (mAECT) [9,10] or examination of lymph
83 node aspirates when lymph nodes are swollen. Once diagnosis of the disease is established by

84 one or more of these tests, it is important to stage the disease to guide treatment regimen. The
85 staging criteria defined by the WHO are the absence of trypanosomes in the cerebrospinal fluid
86 (CSF), and fewer than 5 white blood cells (WBC)/ μL CSF for patients with S1 disease, and the
87 presence of trypanosomes in the CSF and/or more than 6 WBC/ μL CSF for patients with S2
88 disease. These staging criteria are not always easy to use in settings where the disease occurs;
89 microscopy is not a sensitive enough technique to reliably detect the parasite in the CSF, and the
90 CSF WBC count is not specific for HAT [11]. Without the right diagnosis, S1 disease may
91 progress to S2 disease, and patients may not get the correct treatment. Patients with S1 *T.b.*
92 *gambiense* HAT are treated with pentamidine. S2 patients require treatments that can cross the
93 blood–brain barrier. Second stage can be treated with a nifurtimox–eflornithine combination
94 therapy (NECT) but this treatment is given by infusion which is invasive and difficult to perform
95 in some areas [12]. A new easy-to-use treatment, named Fexinidazole, is expected to be available
96 in 2018. However, this treatment, even if it appears to be active in both stages of the disease, is
97 proposed as an alternative to NECT, therefore for the treatment of stage 2. The use of
98 pentamidine to treat Stage 1 remains the current course of action [13]. Even if we can hope for
99 the arrival of a molecule that will allow us to treat both stages of the disease, greatly facilitating
100 the diagnostic and therapeutic plan of patients, the determination of the stage of the disease is still
101 necessary at this time.

102

103 The composition of the proteome of different biological fluids change with disease progression
104 and may lead to the generation of biomarkers that could be used in diagnosing and staging of the
105 disease [14]. Currently, proteome mapping is experiencing substantial growth owing to very
106 high-resolution techniques such as liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-

107 MS/MS). Tandem mass spectrometry analysis allows a large proteome screen compared with
108 more specific techniques such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunoblotting
109 techniques and others that focus only on a single protein or small part of the proteome. The data
110 obtained with this technique, compared with the current human protein database, allow
111 identification and categorization of the proteins present in a biological sample with extensive
112 proteome coverage. Studies using LC-MS/MS have already discovered new biomarkers in many
113 diseases, such as Duchenne muscular dystrophy, amyotrophic lateral sclerosis, oral cavity
114 squamous cell carcinoma and breast cancer [15–18]. To enable the discovery of new biomarkers
115 from the proteome of biological fluids, it is important to characterize the entire proteomes of both
116 healthy and infected individuals. In this study, the serum, CSF, saliva and urine proteomes
117 obtained in patients with S1 and S2 *T.b. gambiense* HAT were compared with uninfected
118 controls. Using a high-resolution mass spectrometer coupled to a nano-ultra-performance liquid
119 chromatography (UPLC) system, several proteins with variable abundance levels between the
120 different groups were revealed by label-free protein quantification analysis.

121 The objective of this study was to characterize the proteome of serum, CSF, urine and saliva from
122 patients with *T.b. gambiense* HAT and to identify biological markers that could be used in
123 disease diagnosis and staging.

124 **Methods [1st level heading]**

125 **Subjects and sample collection [2nd level heading]**

126 The samples used in this study were collected during a prospective cohort study carried out
127 between 2009 and 2011 in three provinces in Angola: Bengo, Uíge and Kwanza Norte. The
128 study, enrolled 247 Angolan subjects: 67 were classified as S1 patients, 161 as S2 patients, and
129 19 as controls. All patients were designated HAT positive by CATT (with or without titration),
130 and trypanosomes demonstration by microscopy in the blood or in lymph node aspiration.
131 Patients in the cohort had *T. b. gambiense* HAT, and were staged before treatment. Patients with
132 no trypanosomes in the CSF and normal WBC counts (≤ 5 WBC/ μ L CSF) were classified as S1
133 patients. Patients with a WBC counts of more than 5 WBC/ μ L CSF and/or presence of
134 trypanosomes in the CSF were classified as S2 patients. Controls were subjects who had tested
135 positive for HAT by CATT but without parasite confirmation in blood, lymph node or CSF and
136 without development of the disease during the whole follow-up period. Every subject was
137 examined clinically and submitted to a questionnaire to document clinical and neurological
138 characteristics. Neurological data included an index of depression, measured with the Hamilton
139 rating scale [19], and the sleep and psychiatric disturbance using the Mini-International
140 neuropsychiatric interview [20]. Main co-infections were excluded in the field by microscopy for
141 common parasitic co-infections (blood smear for malaria, CTC for detection of filariasis,
142 examination of a urine sediment for schistosomiasis when urine was positive for blood).
143 Retrospectively, samples were tested for HIV and syphilis, and all positive samples were
144 excluded from the study.

145 For both controls and patients, serum, CSF, urine and saliva samples were stored in liquid
146 nitrogen, transported to Limoges (France), in dry tanks and further stored at -80°C. Samples used

7

147 for this study were carefully selected among the cohort and common co-infections were
148 excluded.

149 **Ethics statement [2nd level heading]**

150 Ethical clearance was obtained from the Direccao National de Saude Publica, Ministerio da
151 Saude, Angola. Written informed consent was obtained from all participants and, for participants
152 below 18 years of age, from their parents or guardians, prior to enrolment. Any individual who
153 declined to participate was managed according to the standard procedures of the national HAT
154 control program.

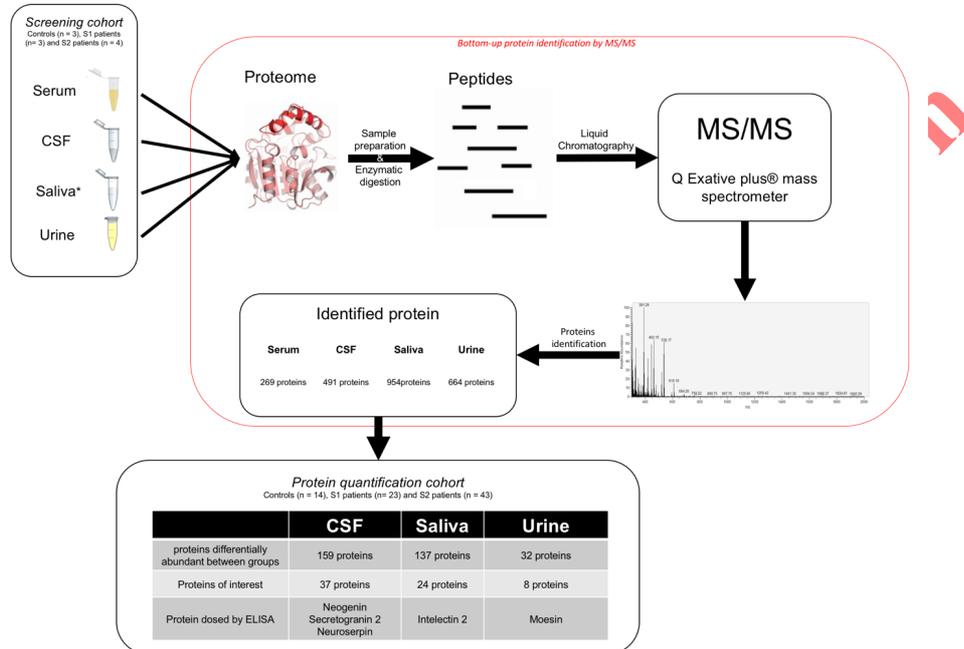
155 **Study design [2nd level heading]**

156 Potential biomarkers were first screened in serum, CSF, urine and saliva on a small population of
157 controls and patients by mass spectrometry and, second, the most promising biomarkers were
158 then quantified on a larger cohort (see a summary of the general study flow in figure 1).

159

Article en cours de soumission

160 **Figure 1: Study procedure analysis**



161

162 Samples of sera, CSF, saliva and urine from screening cohort were prepared for LC-MS/MS
 163 analysis. Bottom-up identification of proteins allows to categorize 269 proteins in the serum, 491
 164 proteins in the CSF, 954 proteins in the saliva and 664 proteins in the urine. Among these
 165 proteins identified, 37 proteins in the CSF, 24 proteins in the saliva and 8 proteins in the urine
 166 were differentially abundant between the control, the S1 or the S2 patients and were of interest
 167 for HAT diagnosis. Among these proteins, 5 were assayed by ELISA in the protein quantification
 168 cohort: neogenin, secretogranin 2 and neuroserpin in the CSF; intelectin 2 in the saliva and
 169 moesin in the urine. *For saliva screening cohort: controls (n = 2), S1 patients (n = 3) and S2
 170 patients (n = 4).



171 **The screening cohort (n = 10) [3rd level heading]**

172 LC-MS/MS analysis was done on uninfected controls (n = 3), S1 patients (n = 3) and S2 patients
173 (n = 4). Only adult males were included to avoid variations of the proteome linked to the
174 expression of hormonal proteins.

175 **Quantitative analysis of the validation cohort by ELISA (n = 80) [3rd level heading]**

176 Protein quantification was done on samples collected after inclusion for controls (n = 14), S1
177 patients (n = 23) and S2 patients (n = 43). All samples used for the LC-MS/MS analysis were
178 included for protein quantification.

179 Two analyses were done: the first to identify among the detected proteins those that differentiated
180 controls from patients with HAT (n = 66); the second to verify whether these proteins could
181 discriminate S1 from S2 patients. The most promising proteins that could differentiate S1 and S2
182 patients were also quantified at 12 months follow-up to verify their potential to be a marker of
183 cure.

184 **LC-MS/MS analysis [2nd level heading]**

185 **Sample preparation [3rd level heading]**

186 Serum, CSF, saliva and urine samples were used in this analysis. A preliminary step of depletion
187 has been carried out to reduce the quantity of predominant proteins (α 1-Acid Glycoprotein, α 1-
188 Antitrypsin, α 2-Macroglobulin, Albumin, Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein A-II,
189 Fibrinogen, Haptoglobin, IgA, IgG, IgM, Transferrin) in these biological fluids. The dynamic
190 range of protein concentrations in different human fluids can be large. Without this step, the high
191 abundance of these predominant proteins would overwhelm the data obtained for the analysis of
192 low abundance proteins. Samples containing 10 μ g of protein, after depletion (Proteome Purify
193 12 Human, R&D Systems®) and concentration (AMICON ULTRA, Merck Millipore®), were

194 adjusted to 120 μ L of the reaction mixture containing 4 M urea, 1.5 M thiourea and 50 mM tris-
195 HCl pH 8.3. Proteins were reduced with 10 mM dithiothreitol for 30 min and then alkylated with
196 55 mM iodoacetamide for 20 min. Alkylated proteins were first digested with 500 ng of
197 endopeptidase lys-C (Wako®) for 3 h at room temperature (RT). Then the mixture was diluted
198 with 3 volumes of MilliQ-water and treated with 500 ng of trypsin (Sequence Grade Trypsin,
199 Promega®) for 16 h at RT. Enzymatic activity was stopped by addition of formic acid to a final
200 concentration of 3%. Samples were stored at -20 °C until use. In the case of saliva, a preliminary
201 acetone (100%) precipitation step at -20 °C was carried out. The saliva and urine samples were
202 not depleted to avoid a loss of proteins as the sample volume was low (1.5mL).

203 ***Sample analysis [3rd level heading]***

204 Peptide mixtures (10 corresponding to patients) were analyzed by a Q-Exactive Plus coupled to a
205 Nano-LC Proxeon 1000 equipped with an easy spray ion source (all from Thermo Scientific).
206 Peptides were separated by chromatography with the following parameters: Acclaim PepMap100
207 C18 pre-column (2 cm, 75 μ m i.d., 3 μ m, 100 Å), Pepmap-RSLC Proxeon C18 column (50 cm,
208 75 μ m i.d., 2 μ m, 100 Å), 300 nL/min flow rate, gradient from 95 % solvent A (water, 0.1%
209 formic acid) to 35% solvent B (100 % acetonitrile, 0.1% formic acid) over a period of 98
210 minutes, followed by a column regeneration for 23 min, giving a total run time of 2 hours.
211 Peptides were analyzed in the Orbitrap cell, in full ion scan mode, at a resolution of 70,000 (at
212 m/z 200), with a mass range of m/z 375–1500 and an AGC target of 3×10^6 . Fragments were
213 obtained by high collision-induced dissociation (HCD) activation with a collisional energy of
214 30%, and a quadrupole isolation window of 1.4 Da. MS/MS data were acquired in the Orbitrap
215 cell in a Top20 mode, at a resolution of 17,500, with an AGC target of 2×10^5 , with a dynamic
216 exclusion of 30 seconds. The most intense precursor ions were acquired first by MS/MS. Peptides

217 with unassigned charge states or monocharged were excluded from the MS/MS acquisition. The
218 maximum ion accumulation time was set to 50 ms for MS acquisition and 45 ms for MS/MS
219 acquisition.

220 ***Peptide and protein identification [3rd level heading]***

221 For the peptide and protein identification step, all MS and MS/MS data were processed with
222 Proteome Discoverer software (Thermo Scientific, version 2.1) and with Mascot search engine
223 (Matrix Science, version 5.1). The mass tolerance was set to 6 ppm for precursor ions and 0.02
224 Da for fragments. The maximum number of missed cleavages was limited to two for the trypsin
225 protease. The SwissProt database with the *Homo sapiens* and the *T.b. gambiense* taxonomies was
226 used for the MS/MS identification step. The following variable modifications (2 maximum per
227 peptide) were allowed: oxidation (M) and carbamidomethylation (C). Peptide identification in all
228 fluids analyzed were validated using a 1% FDR (false discovery rate) threshold calculated with
229 the Percolator algorithm [21].

230 ***Peptide and protein abundance quantification and statistical validation [3rd level heading]***

231 Progenesis QI for Proteomics software (version 4.0, Waters) was used for the relative
232 quantification of the protein abundances by using co-detection to eliminate missing values. No
233 filters based on peptide by protein occurrences were applied for the protein quantification. The
234 relative quantitation of proteins according to the three groups (Control, S1 and S2 patients) was
235 performed using a between subject analysis and a Hi-3 method for which the three most abundant
236 peptides were used for protein quantification. Abundance variations of proteins with an ANOVA
237 *p*-value under 0.05 were further considered. The protein fold change makes it possible to show a
238 difference of this protein expression according to the groups when it is greater than 2. The
239 potential biological role of each selected protein was verified and completed by a complete
240 bibliographic review to confirm its interest.

241 **Validation of protein abundance variations by ELISA [2nd level heading]**

242 *Selection of ELISA assays [3rd level heading]*

243 Human neuroserpin ELISA, BioVendor®, human NEO1 ELISA Kit, Mybiosource® and human
244 SCG2 ELISA Kit, Elabscience Biotechnology® were selected to detect levels of neuroserpin,
245 neogenin and secretogranin 2 in CSF respectively. The level of neuroserpin detection on
246 diagnosis samples allowed further detection at 12 months follow-up. Human moesin ELISA kit,
247 Abbexa Ltd® and human ITLN2 ELISA kit, Elabscience® were used to detect levels of moesin
248 in urine and levels of ITNL2 in saliva respectively. For each ELISA test, the protocol provided
249 by the manufacturer was followed. Optical densities (OD) were measured with a Multiskan go
250 (Thermo Scientific®) spectrophotometer.

251 *Statistical analysis [3rd level heading]*

252 Using the data obtained by ELISA, cut offs and receiver operating characteristic (ROC) curves
253 were made to determine the best sensitivity/specificity ratio for each marker. The significance has
254 been evaluated using Kruskal–Wallis test and Fisher's exact test for testing the null of
255 independence. The level of agreement with cut offs found in the literature was estimated using
256 Cohen's kappa coefficient and generalized linear models were used to make logistic regressions.
257 Tests were performed using R Core Team [22]. The following packages were used: ROCR for
258 drawing curves [23] and PMCMR for pairwise comparisons of Kruskal–Wallis test [24].

259 .

260

261 **Results [1st level heading]**

262 **Population characteristics [2nd level heading]**

263 Demographic, clinical and biological data are summarized in Table 1. All screening cohort
264 selected patients and controls were male. Biological, neurological and parasitological
265 examination showed that no controls suffered from sleep or neurological disorders, no
266 trypanosomes were found in their blood or CSF, and their average WBC count was 4.61
267 WBC/ μ L CSF. S1 patients had similar clinical characteristics to the control group but with
268 presence of trypanosomes in blood and an average of 1.33 WBC/ μ L CSF. S2 patients had
269 confirmed neurological signs and sleep disorders; their average WBC count was 195.79 WBC/ μ L
270 CSF.

271 The protein quantification cohort included 14 controls (sex ratio: 0.56), 23 S1 patients (sex ratio:
272 0.92) and 43 S2 patients (sex ratio: 0.54). Biological, neurological and parasitological
273 examination showed that no controls had trypanosomes in the blood or CSF. The CSF
274 examination of one of these controls revealed the presence of 8 WBC/ μ L, but no co-infection was
275 detected for this patient, and the neurological examination did not reveal any disorders. Among
276 the controls only 2 patients had sleep disorders. All S1 patients had trypanosomes in the blood
277 and a WBC count between 0 and 4 WBC/ μ L CSF. None of the S1 patients had trypanosomes in
278 the CSF, and the neurological examination showed that 6 patients had neurological disorders, and
279 10 had sleep disorders. All S2 patients had trypanosomes in the blood, and 23 out of 43 patients
280 had trypanosomes in the CSF. The WBC count of these patients ranged from 6 to 597 WBC/ μ L
281 CSF. Neurological examinations showed that 70% (30/43) of these patients had neurological
282 disorders, and 67% (29/43) had sleep disorders.

283 For the quantification of proteins in urine and saliva, samples were not available for all controls
284 and patients. For urine samples, the analysis was done on 13 controls, 21 S1 patients and 38 S2
285 patients. For saliva samples, the analysis was done on 13 controls, 22 S1 patients and 38 S2
286 patients.
287

Article en cours de soumission



288 Table 1: Characteristics of the screening and protein quantification cohort

Screening cohort		Control	S1	S2
	n	3	3	4
	Sex-ratio (M/F)	3/0	3/0	4/0
	Age (Average)	37 (27.15)	44 (21.13)	31 (18.14)
Sleep disorders	Neurological disorders	0	0	4
		0	0	4
	Mean cell count (SD)	4.61 (3.05)	1.33 (0.58)	195.79 (147.44)
	Trypanosome in blood	0	3	4
	Trypanosome in CSF	0	0	4
Protein quantification cohort		Control	S1	S2
	n *	14	23	43
	Sex ratio (M/F)	5/9	11/12	15/28
Age	Mean (SD)	38 (20.14)	39.09 (14.17)	34.55 (12.93)
	Min	12	15	14
	Max	70	58	58
	Neurological disorders	0	6	30
	Sleep disorders	2	10	29
Cell count	Mean cell count (SD)	2.64 (1.90)	1.34 (0.93)	137.82 (165.73)
	Min	0	0	6
	Max	8	4	597
	Trypanosome in blood	0	23	43
	Trypanosome in CSF	0	0	23

289

290

291 This table represents the epidemiological and biological data of 3 controls, 3 patients with stage 1

292 (S1) disease and 4 patients with stage 2 (S2) disease who constituted the screening cohort, as well

293 as the 14 controls, the 23 patients with S1 disease and the 43 patients with S2 disease enrolled in

294 protein quantification cohort. For urine and saliva analysis, some samples were not present in the

295 protein quantification cohort. *For urine (n = 72): 13 Controls, 21 S1 and 38 S2. For saliva (n =

296 73): 13 controls, 22 S1 and 38 S2.

297

298 **Global LC-MS/MS analysis [2nd level heading]**

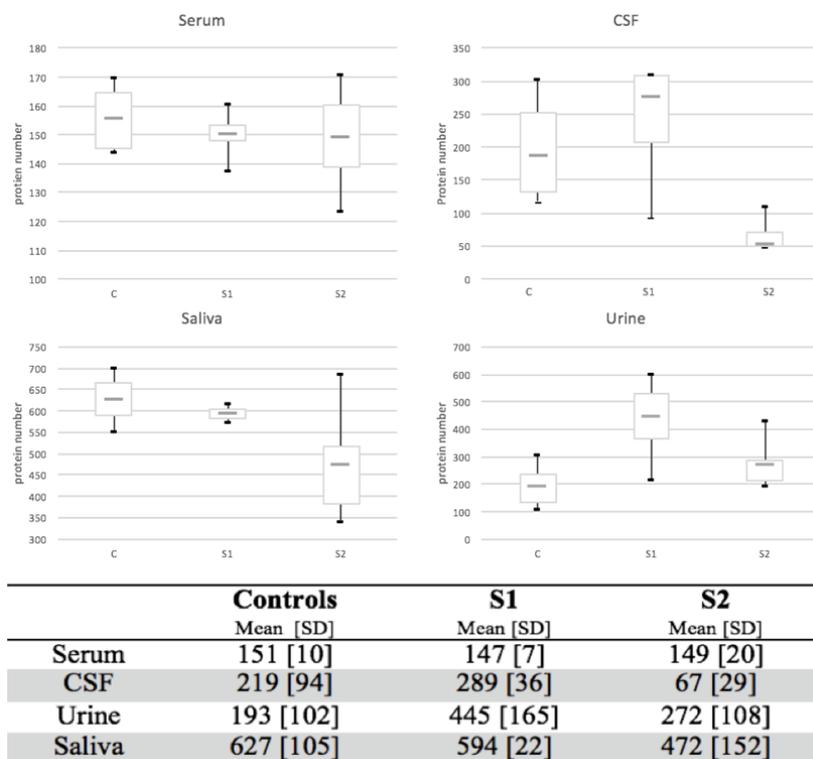
299 Searching the LC-MS/MS data for semi-tryptic peptides in the protein database allows the
300 identification of any possible protein degradation of the samples caused by the method and
301 duration of freezing. There were no major differences between the samples of occurrences of
302 peptides derived from non-tryptic endogenous proteases. This analysis was carried out on the
303 screening cohort samples and showed that the biological samples of these patients had not been
304 degraded.

305 The samples were tested for the presence of peptides described in the *T.b. gambiense* protein
306 database; however, although parasite proteins were identified in each of the 4 biological fluids
307 tested, they were not studied further owing to a lack of validation of protein identification.
308 However, they are present in the database published in supplementary files.

309 Analysis of the total number of different proteins identified in serum, CSF, saliva and urine for
310 each group of individuals (controls, S1 patients and S2 patients) (Figure 2) showed that S2
311 patients had a decrease in the number of different proteins expressed in the CSF compared with
312 control and S1 patients. For saliva, the mean total number of different proteins identified in S2
313 patients (472 different proteins) was less than the total number of different proteins identified in
314 S1 patients (594 different proteins) and by the control group (627 different proteins). The total
315 number of proteins expressed in sera was similar in the different groups. For urine, the lowest
316 total number of proteins identified was found in the controls.

317

318 Figure 2: Distribution of the number of proteins identified in the serum, CSF, saliva and urine of
 319 the screening cohort with respect to disease stage.



320
321

322 The total number of different proteins identified by LC-MS/MS analysis in serum, cerebrospinal
 323 fluid (CSF), urine and saliva in boxplots and a table. For serum, CSF and urine data there are 3
 324 controls (C), 3 patients with stage 1 (S1) disease and 4 patients with Stage 2 (S2) disease. For
 325 saliva there are 2 controls, 3 patients with S1 disease and 4 patients with S2 disease.

326 **LC-MS/MS analysis and protein quantification in sera** [2nd level heading]

327 The proteomic analysis of the 10 screening cohort serum samples showed the presence of 269
328 proteins. The 10 best-scored proteins are presented in table 2. These data are heavily skewed
329 owing to the very high levels of some serum proteins, such as albumin and immunoglobulins,
330 despite the use of depletion protocols. This is highlighted by the presence of proteins with high
331 identification scores, which are normally depleted, in table 2. As such, any changes in protein
332 levels specific to HAT are not statistically pertinent.

333

Article en cours de soumission

334 Table 2: Top-10 best scored proteins identified in serum

Accession	Description	Score	ANOVA	Max Fold Change	Average normalized abundances		
					Control	S1	S2
CO3_HUMAN	Complement C3	8016.88	0.82	1.31	1.91e+007	1.74e+007	1.46e+007
AZMG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	5874.13	0.94	1.37	1.52e+007	1.67e+007	1.22e+007
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	5127.27	0.87	1.11	9.21e+006	8.29e+006	8.67e+006
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100	4819.10	0.35	2.68	2.89e+006	1.08e+006	1.08e+006
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	4375.11	0.67	1.54	8.19e+006	1.26e+007	1.18e+007
CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	4249.73	0.18	1.47	3.09e+007	2.30e+007	2.10e+007
HPT_HUMAN	Haptoglobin	3150.25	0.36	4.37	9.20e+006	1.34e+007	4.02e+007
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	3085.22	0.63	1.22	3.80e+007	4.45e+007	3.64e+007
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region	2899.80	0.89	2.05	4.60e+007	3.58e+007	2.25e+007
IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	2880.99	0.63	2.20	8.53e+007	7.25e+007	3.88e+007
IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	2813.11	0.33	3.20	1.29e+007	4.14e+007	1.72e+007

335

336 S1: stage 1 disease; S2: stage 2 disease. Score: mascot protein score

337

Article en cours de soumission



338 **LC-MS/MS analysis and protein quantification in CSF** [2nd level heading]

339 The proteomic analysis of the screening cohort CSF samples showed the presence of 491
340 proteins. The relative abundances of these proteins were estimated by label-free quantification
341 with Progenesis QI software. Among these proteins, 159 were found differentially abundant
342 (ANOVA *p*-value lower than 0.05 and Fold Change higher than 2) between controls, S1 or S2
343 patients. After analysis of these 159 proteins on the basis of their statistical data (ANOVA *p*-
344 value and fold change), their differences attributable to disease stage, and their biological role, 37
345 proteins presented potential interest in HAT characterization (Table 3). Neogenin, secretogranin 2
346 and neuroserpin were chosen for protein quantification in CSF samples as their results showed
347 the best combination of our defined criteria. Briefly, the ANOVA *p*-value calculated for neogenin
348 is 3.82×10^{-5} , and the fold change is close to infinity; the average normalized abundance (ANA)
349 calculations showed an expression of this protein only in controls and S1 patients (2.72×10^4 and
350 2.17×10^4 , respectively) (Table 3). The ANOVA *p*-value calculated for secretogranin 2 is 5.45×10^{-5}
351 and the fold change is 11.27 (Table 3). More secretogranin 2 is found in the CSF of healthy
352 controls (ANA: 2.49×10^6) and S1 patients (ANA: 2.01×10^6) than in S2 patients (ANA: 2.21×10^5).
353 The most significant ANOVA result was obtained for neuroserpin at 2.61×10^{-8} , and the Fold
354 Change was close to infinity (Table 3). This protein is present in the CSF of healthy controls
355 (ANA: 2.5×10^4) and S1 patients (ANA: 2.32×10^4) but not in S2 patients.
356

357 Table 3: Most notable proteins in the CSF with altered abundance levels between control, S1 and

358 S2 patients (classified by the increase in ANOVA *p*-value)

359

Accession	Description	Score	ANOVA	Max Fold Change	Average normalized abundances		
					Control	S1	S2
NEUS_HUMAN	Neuroserpin *	33.73	2.61e-008	Infinity	2.50e+004	2.32e+004	0.00
MCH_HUMAN	Pro MCH	18.23	2.53e-006	51.23	2.67e+004	2.31e+004	520.50
VGf_HUMAN	Neurosecretory protein VGF	768.70	6.20e-006	17.49	1.46e+006	1.59e+006	9.10e+004
NDRG2_HUMAN	Protein NDRG2	26.38	9.85e-006	Infinity	3.65e+004	2.53e+004	0.00
NEO1_HUMAN	Neogenin *	27.68	3.82e-005	Infinity	2.72e+004	2.17e+004	0.00
PTPRS_HUMAN	Receptor type tyrosine protein phosphatase 5	28.48	4.39e-005	Infinity	2.31e+004	1.55e+004	0.00
SCG2_HUMAN	Secretogranin 2 *	732.53	5.45e-005	11.27	2.49e+006	2.01e+006	2.21e+005
NCAM2_HUMAN	Neural cell adhesion molecule 2	123.80	2.49e-004	12.57	1.50e+005	1.43e+005	1.19e+004
AT1B1_HUMAN	Sodium/potassium transporting ATPase subunit beta 1	37.94	2.62e-004	6864.45	1361.14	2311.93	0.34
DHPH_HUMAN	Dihydropteridine reductase	112.47	3.39e-004	212.16	2.41e+004	2.52e+004	118.73
NFASC_HUMAN	Neurofascin	106.58	3.98e-004	19.75	4.44e+004	4.74e+004	2400.82
SCG3_HUMAN	Secretogranin 3	1068.39	4.07e-004	9.94	1.20e+006	1.46e+006	1.47e+005
SCG1_HUMAN	Secretogranin 1	4373.28	4.41e-004	6.14	1.59e+007	1.30e+007	2.58e+006
PEBP4_HUMAN	Phosphatidylethanolamine binding protein 4	23.40	4.51e-004	151.57	3.44e+004	1.89e+004	227.04
PCDH9_HUMAN	Protocadherin 9	42.21	4.54e-004	473.46	6.07e+004	6.17e+004	130.22
TICN3_HUMAN	Testican 3	111.74	1.24e-003	5.13	3.32e+004	2.87e+004	6478.72
NRX3A_HUMAN	Neurexin 3	37.45	1.33e-003	745.63	4182.12	9806.72	13.15
PTMA_HUMAN	Prothymosin alpha	78.55	1.40e-003	38.11	1.07e+005	6.51e+004	2.48e+006
PENK_HUMAN	Proenkephalin A	268.45	2.12e-003	4.34	4.07e+006	3.54e+006	9.39e+005
COL12_HUMAN	Collectin 12	134.26	3.30e-003	7.21	1.18e+005	7.12e+004	1.64e+004
SPON1_HUMAN	Spondin 1	77.80	3.35e-003	11.26	8.09e+004	4.53e+004	7181.93
CNTN2_HUMAN	Contactin 2	347.42	3.99e-003	78.73	6.75e+004	6.28e+004	857.46
TICN2_HUMAN	Testican 2	119.88	6.92e-003	9.75	5.79e+004	3.79e+004	5938.73
NCAM1_HUMAN	Neural cell adhesion molecule 1	709.91	8.60e-003	4.76	4.33e+005	3.25e+005	9.09e+004
CSTN1_HUMAN	Calsyntenin 1	293.93	9.35e-003	28.52	1.17e+005	1.24e+005	4346.68
CNTN1_HUMAN	Contactin 1	469.45	0.01	5.46	2.21e+005	1.60e+005	4.04e+004
CAD13_HUMAN	Cadherin 13	144.25	0.01	386.59	3.18e+004	4.65e+004	120.35
TIMP2_HUMAN	Metalloproteinase inhibitor 2	135.16	0.01	7.69	2.31e+005	1.47e+005	3.01e+004
L1CAM_HUMAN	Neural cell adhesion molecule L1	67.55	0.01	8.76	1.97e+004	1.95e+004	2254.34
TETN_HUMAN	Tetranectin	473.62	0.02	6.41	2.20e+005	2.53e+005	3.95e+004
OMGP_HUMAN	Oligodendrocyte myelin glycoprotein	296.85	0.02	3.60	3.26e+005	2.25e+005	9.03e+004
NEUM_HUMAN	Neuromodulin	129.92	0.02	2.67	1.58e+005	2.67e+005	9.99e+004
CBLN4_HUMAN	Cerebellin 4	24.53	0.02	2214.50	5630.78	4124.35	2.54
ECM1_HUMAN	Extracellular matrix protein 1	136.66	0.03	2.25	1.08e+006	1.16e+006	5.15e+005
PEBP1_HUMAN	Phosphatidylethanolamine binding protein 1	268.07	0.03	12.41	1.54e+005	1.94e+005	1.56e+004
TICN1_HUMAN	Testican 1	124.56	0.05	11.39	5.19e+004	5.17e+004	4556.89
MIF_HUMAN	Macrophage migration inhibitory factor	56.43	0.05	13.45	1.82e+004	2.73e+004	2031.17

360

361 All shown proteins passed thresholds of a fold change ≥ 2 and a *p*-value ≤ 0.05 . Score: mascot

362 protein score. * Protein quantified by ELISA. S1: stage 1 disease; S2: stage 2 disease.

363

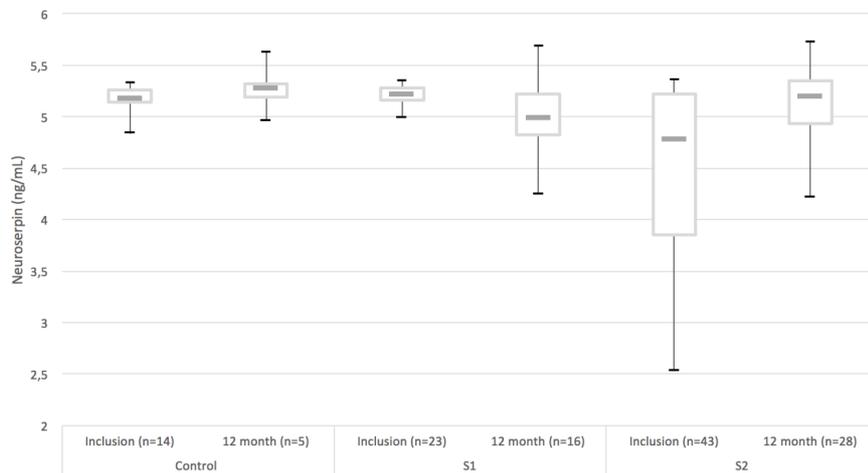


364 Protein quantification by ELISA was performed for the 3 proteins meaningful results were not
365 obtained for neogenin and secretogranin 2. For neogenin, the amount was too low to be detected
366 by ELISA, and for secretogranin 2, similar concentrations were found for controls, S1 and S2
367 patients. Mean values obtained were 0.27 ng/mL, with a standard deviation of 0.003. It was thus
368 not possible to use secretogranin 2 as a possible marker of differentiation for patients or controls.
369 Only the neuroserpin ELISA results showed significant differences (Figure 3) and allowed
370 statistical tests to be performed for further analysis. There was no difference in neuroserpin CSF
371 concentration between the control and patients at inclusion when analyzed by the Kruskal–Wallis
372 test; however, neuroserpin levels were significantly different ($p < 0.05$) between S1 and S2
373 patients. ROC curve analysis was used to determine the threshold level of neuroserpin for
374 discriminating S2 patients from S1 patients (area under the curve (AUC): 0.72). It was
375 determined that a level of CSF neuroserpin below 4.99 ng/mL was indicative of a patient having
376 S2 disease (sensitivity: 0.58 and specificity: 0.94). Logistic regression analysis showed that age
377 and sex of individuals have no effect on CSF neuroserpin concentration; however, there was a
378 correlation between neuroserpin concentration and presence of sleep disorders (odds ratio:
379 2.1×10^{-02} (CI: 1.0×10^{-3} ; 1.47×10^{-1}), $p < 0.01$) and neurological disorders (odds ratio: 6.3×10^{-2} (CI:
380 0.9×10^{-2} ; 2.32×10^{-1}), $p < 0.001$). Similarly, a link could be made between the presence of
381 trypanosomes in the CSF and the concentration of neuroserpin (odds ratio: 5.09×10^{-4} (CI:
382 1.93×10^{-4} ; 4.22×10^{-2}), $p < 0.001$).

383

384 Figure 3: Changes in the neuroserpin concentration in CSF of controls and patients with stage 1
 385 and stage 2 HAT at inclusion and after 12 months

386



387

388

389 Neuroserpin concentrations in the CSF for 14 healthy controls, 23 S1 patients and 43 S2 patients;
 390 the concentrations for 5/14 of the controls 16/23 of the S1 patients and 28/43 of the S2 patients
 391 after 12 months of treatment are also shown.

392

Article en cours

393 Neuroserpin levels were then tested for association with sleep and neurological disorders and the
394 presence of trypanosomes in the CSF. The Kruskal–Wallis test revealed that CSF neuroserpin
395 could act as a marker for these disease-associated pathologies ($p < 0.05$). A ROC curve was used
396 to determine the threshold of 5.09 ng/mL, below which patients had sleep disorders (AUC: 0.79;
397 sensitivity: 0.72 and specificity: 0.67). The ROC curve analysis also allowed us to determine a
398 threshold of 4.97 ng/mL of CSF neuroserpin (AUC: 0.77), below which the patients had
399 neurological disorders (sensitivity: 0.9 and specificity: 0.59). The threshold of CSF neuroserpin
400 determined by ROC curve analysis for discriminating the presence of trypanosomes in the CSF
401 (AUC = 0.95) is 4.83 ng/mL, below which is indicative of CSF invasion by trypanosomes
402 (sensitivity: 0.98 and specificity: 0.91). The discriminating power of CSF neuroserpin was tested
403 against the parasitological examination of CSF (gold standard) with an agreement of 0.88
404 (Cohen's kappa coefficient), which is an excellent concordance.

405 At follow-up, at 12 months following treatment, the neuroserpin concentration was quantified in
406 the CSF in 5/14 of the controls, 16/23 of the S1 patients and 28/43 of the S2 patients. Kruskal–
407 Wallis analysis showed that there was no difference in neuroserpin levels between the 3 groups
408 after 12 months post-treatment, and the concentrations at 12 months were close to those found in
409 the control and S1 patients at inclusion. The mean neuroserpin concentration in the CSF in all the
410 groups is 5.13 ng/mL (Figure 3).

411

412 **LC-MS/MS analysis and protein quantification in urine [2nd level heading]**

413 The proteome analysis of urine samples showed the presence of 664 proteins, and 32 proteins
414 were differentially abundant (ANOVA p -value lower than 0.05 and Fold Change higher than 2)
415 between the control and the S1 or the S2 patients. From these 32 proteins, 8 were chosen as
416 interesting (Table 4). Moesin appeared to be the most promising protein for quantification by

25

417 ELISA at inclusion. The ANOVA p -value for moesin analysis was 9.38×10^{-3} and its fold change
418 was 47.11 (Table 4). Moesin is increased in S1 patients (ANA: 7.12×10^4) and S2 patients (ANA:
419 1.57×10^4) compared with the controls (ANA: 1511.77). Quantification of moesin at 12 months
420 follow-up was not possible owing to the low number of urine samples available.
421

Article en cours de soumission



422 Table 4: Most notable proteins in the urine with altered levels between control, S1 and S2
 423 patients (classified by increase in ANOVA *p*-value)

	Description	Score	ANOVA	Fold Change	Average normalized abundances		
					Control	S1	S2
P51688	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase	89.58	1.51e-004	Infinity	0.00	5.23e+004	1856.39
P16870	Carboxypeptidase E	23.90	1.61e-004	Infinity	0.00	2.06e+004	8488.37
P25774	Cathepsin S	151.85	5.80e-003	371.97	37.12	1.38e+004	621.63
P26038	Moesin *	319.43	9.38e-003	47.11	1511.77	7.12e+004	1.57e+004
P59190	Ras-related protein Rab-15	47.97	0.02	Infinity	0.00	1.74e+005	2088.10
P29622	Kallistatin	120.72	0.02	170.86	5936.72	4.28e+004	250.56
Q9H8L6	Multimerin 2	52.32	0.05	Infinity	0.00	8618.93	4.37e+004
P02766	Transthyretin	78.07	0.05	17.94	1.36e+004	1.42e+005	2.44e+005

424

425

426 All shown proteins passed thresholds of a fold change ≥ 2 and a *p*-value ≤ 0.05 . Score: mascot

427 protein score. * Protein quantified by ELISA. S1: stage 1 disease; S2: stage 2 disease.

428

Article en cours de soumission



429 The moesin ELISA was performed on samples from 59 patients from both S1 and S2 patients and
430 13 uninfected controls. The Kruskal–Wallis test revealed a significant difference in moesin levels
431 ($p < 0.05$) between controls and patients with HAT. The threshold for discriminating controls
432 from patients was determined with ROC curve analysis (AUC = 0.70). A level of moesin above
433 0.448 ng/mL (sensitivity: 0.64 and specificity: 0.61) in urine is indicative of HAT disease.
434 Further characterization of moesin levels between S1 (n = 21) and S2 patients (n = 38) compared
435 with uninfected controls (n=13) was performed. No statistical difference in moesin abundance
436 levels was observed between uninfected controls and S1 patients and no significant difference
437 was observed between S1 and S2 patients. However, when comparing the uninfected controls and
438 S2 patients, a significant difference in moesin levels was found ($p < 0.05$). ROC curve analysis
439 (AUC: 0.72) was used to determine a urine moesin threshold of 0.60 ng/mL (sensitivity: 0.63 and
440 specificity: 0.65) above which patients had S2 HAT. Using logistic regression, it was shown that
441 the moesin concentrations were not influenced by sex, age, presence of trypanosomes in CSF, or
442 sleep and neurological disorders.

443

444 **LC-MS/MS analysis and protein quantification in saliva [2nd level heading]**

445 The screening was carried out on the screening cohort but with only 2 controls (owing to an error
446 in tube labelling). The proteome screening of saliva allows the identification of 954 proteins.
447 Among these 954 proteins, 137 were found to be differentially abundant (ANOVA p -value lower
448 than 0.05 and fold change higher than 2) between the control and the S1 or the S2 patients, and
449 24 were chosen for their particular interest (Table 5). Among them intelectin 2 (ITLN2) was
450 chosen for quantification by ELISA. ITLN2 had an ANOVA of 1.23×10^{-4} and a Fold Change of
451 120.23 as determined by quantitative proteomics; ANA, determined by Progenesis QI software

28

452 analysis, showed lower ITLN2 concentration in the saliva of patients in both stages (S1 ANA:
453 258.69; S2 ANA: 350.60) than controls (ANA: 3.11×10^4).
454

Article en cours de soumission

455 Table 5: Most notable proteins in the saliva with altered levels between control, S1 and S2

456 patients (classified by increase in ANOVA *p*-value)

457

Accession	Description	Score	ANOVA	Fold Change	Average normalized abundances		
					Control	S1	S2
P19878	Neutrophil cytosol factor 2	26.41	1.21e-005	Infinity	0.00	1207.94	8375.66
Q8WWU7	Intelectin 2 *	44.75	1.23e-004	120.23	3.11e+004	258.69	350.60
Q15643	Thyroid receptor-interacting protein 11	25.42	3.24e-004	Infinity	0.00	0.00	1.06e+005
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	36.48	1.87e-003	7.52	2.34e+004	4.61e+004	1.76e+005
Q04446	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	40.31	0.01	28.76	515.25	7843.70	1.48e+004
P35241	Radixin	357.98	0.02	2.48	3.30e+005	3.79e+005	8.19e+005
P27348	14-3-3 protein theta	106.60	0.02	11.21	2444.76	1.19e+004	2.74e+004
Q04323	UBX domain-containing protein 1	101.23	0.02	408.77	27.88	5286.01	1.14e+004
P49913	Cathelicidin antimicrobial peptide	93.06	0.02	13.27	1.99e+004	3.28e+004	2.65e+005
O00602	Ficolin-1	84.63	0.02	43.65	620.60	1512.69	2.71e+004
Q9BQ10	Allograft inflammatory factor 1-like	41.75	0.02	Infinity	0.00	914.27	7081.79
P02753	Retinol-binding protein 4	24.27	0.02	3.59	2.92e+004	3.97e+004	1.05e+005
O60437	Periplakin	353.95	0.02	16.22	6164.29	1.30e+004	1.00e+005
Q9HC84	Mucin-5B	2457.44	0.03	11.30	2.98e+007	2.64e+006	5.98e+006
P05120	Plasminogen activator inhibitor 2	255.32	0.03	25.13	2266.87	3.00e+004	5.70e+004
P62136	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	130.27	0.03	23.02	1150.30	1.80e+004	2.65e+004
Q15631	Translin	49.17	0.03	20.39	722.18	2713.99	1.47e+004
P51888	Prolargin	22.23	0.03	17.73	3887.41	2.59e+004	6.89e+004
Q13813	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	257.23	0.04	11.90	2035.25	4051.54	2.42e+004
P99999	Cytochrome c	231.53	0.04	4.55	2.80e+004	4.21e+004	1.27e+005
P04632	Calpain small subunit 1	220.74	0.04	5.69	9299.74	2.29e+004	5.29e+004
P31997	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	60.26	0.04	26.63	3450.76	1.15e+004	9.19e+004
P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	52.04	0.04	6.29	1660.25	6513.70	1.04e+004
Q15907	Ras-related protein Rab-11B	43.85	0.04	6.84	4755.71	2.47e+004	3.25e+004

458

459 All shown proteins passed thresholds of a fold change ≥ 2 and a *p*-value ≤ 0.05 . Score: mascot

460 protein score. * Protein quantified by ELISA, S1: stage 1 disease; S2: stage 2 disease.

461

462 Saliva ITLN2 concentrations measured by ELISA of controls (n = 13) and those of patients (n =
463 60) were compared with the Kruskal–Wallis test. There was no significant difference between the
464 two populations ($p = 0.40$). Saliva ITLN2 concentrations were then compared between S1
465 patients (n = 22), the S2 patients (n = 38) and uninfected controls (n = 13) using the Kruskal–
466 Wallis test. There was no significant difference in ITLN2 levels between controls, S1 and S2
467 patients ($p = 0.06$). Therefore, it was not possible to determine a threshold for this protein (AUC
468 = 0.59).

Article en cours de soumission

469 **Discussion [1st level heading]**

470 This is, to our knowledge, the first simultaneous proteomic characterization of 4 biological fluids
471 (serum, CSF, saliva and urine) from the same HAT patients. The proteome screening analysis by
472 LC-MS/MS has revealed 69 proteins (37 proteins in CSF, 8 proteins in saliva and 24 proteins in
473 urine), which could be interesting for diagnosis or staging of the disease. The potential of 5
474 proteins (3 proteins in CSF, 1 protein in urine and 1 protein in saliva) were further verified as
475 biomarkers in diagnosis or staging. These assays are a preliminary step in the identification of the
476 entire proteome of HAT patients.

477 The semi-tryptic peptide analysis of the database showed that the method and the freezing
478 duration of our samples did not alter the proteome quality. However, very few proteins or
479 degraded fragments from the parasite were identified with poor Mascot scores. This may be due
480 to the low quantity of parasitic proteins relative to the amount of human proteins and/or to
481 limitations or absence of *T.b. gambiense* proteins in the existing database. This need to be further
482 investigated and that is why our study was focused on the human proteome and the detection of
483 biomarkers for S2 patients and not on parasite proteins.

484 In sera, the label-free quantification did not identify any protein of notable interest (ANOVA: <
485 0.05 and Fold Change: > 2). The quantification by LC-MS/MS of an exhaustive set of proteins in
486 serum is difficult; this is partly due to the complexity of the serum, which contains a large
487 number of different proteins with an extremely large range of expression [25,26]. In this case,
488 despite the depletion step carried out, the presence of a large quantity of proteins (mainly
489 albumins and globulins) impedes quantification of other proteins as shown in other studies [27].

490 In the CSF, the protein composition showed a clear decrease in the diversity and number of
491 identified proteins in patients with S2 disease. This result is surprising but can be explained by

492 two physiopathological mechanisms that may act together. The first is trypanosome-induced
493 immunosuppression [28–30], which is a marked weakening of the humoral response owing to
494 massive B cell death [31,32]. Furthermore, it has been described that the release of trypanosome
495 suppression immunomodulating factor by the parasite triggers the development of suppressive
496 M1 macrophages [33] and blocks T cell proliferation [34]. This immunosuppression could
497 explain the decrease in the number of proteins found in the CSF of the patients with S2 disease
498 because the disappearance of the immune cells implies a decrease of the proteins related to them.
499 The second explanation is a leakage or resorption of nervous system proteins owing to the
500 permeabilization of the blood–brain barrier [35,36]. The loss of nervous system proteins and
501 increase in plasma-associated protein, such as complement system proteins, albumin,
502 transthyretin and apolipoproteins has been described by others in CNS infections altering the
503 blood–brain barrier [37–39] and was corroborated in the CSF analysis of our study.

504

505 In CSF, the analysis allowed the identification of 491 proteins, of which many had been
506 previously associated with HAT, such as vascular cell adhesion protein 1 (VCAM1) [40,41] and
507 osteopontin (SPP1) [42]. The study focused on 37 proteins that were differentially expressed
508 between the uninfected controls, S1 and S2 patients, and 3 proteins — namely neogenin,
509 secretogranin 2 and neuroserpin — were chosen for further analysis by ELISA [43–50].
510 Neogenin and secretogranin 2 are proteins associated with the nervous system, and they have
511 already been proposed as biomarkers in other pathologies [45,50]. In the brain, neogenin is a
512 receptor for many proteins, including repulsive guidance molecule (RGM) family members,
513 which is involved in axon guidance, apoptosis and neuronal differentiation [46,50]. The use of
514 the RGMa–neogenin signaling pathway as a therapeutic target to overcome inflammatory and
515 neurodegenerative diseases has already been proposed [50]. Secretogranin 2 is a soluble member

33

516 of the granin protein family, which are widely distributed in neuroendocrine and nervous system
517 tissues. Granins are stored in large dense-core vesicles within neurons; secretogranin 2 can also
518 be detected in glial cells [43]. Secretogranin 2 has numerous functions, including neurite
519 outgrowth and chemoattractive effects on monocytes, eosinophils and endothelial cells [43]. In
520 2013, Jakobsson *et al* proposed secretogranin 2 as a CSF marker for severe forms of bipolar
521 disorder. Patients with bipolar disorder have defects in the regulatory secretory pathway; one of
522 the altered proteins is secretogranin 2 [48], and reduction is linked to severe forms. Reduced
523 levels of secretogranin 2 and secretogranin 3 were observed in serum and CSF samples of
524 patients with multiple sclerosis [45,47,49]. In our HAT sample collection, neogenin and
525 secretogranin 2 were highlighted by LC-MS/MS analysis; however, the ELISA assay used
526 seemed unable to detect these proteins, which may be due to the detection limit of the
527 commercial ELISA test being too high for the samples in this study.

528 Finally, among the tested proteins, only neuroserpin allowed the discrimination of disease stage
529 with a decrease in neuroserpin concentrations with disease progression. This is the first study
530 showing a link between neuroserpin and HAT. Neuroserpin is a protein belonging to the serine
531 protease inhibitor superfamily, which is expressed throughout the nervous system but more
532 particularly at the latter stages of the development of neuronal cells [44,51,52]. Neuroserpin
533 inhibits the activation of tissue plasminogen and has an essential role in axogenesis, synaptic
534 plasticity [53], memory and brain development [54,55]. Neuroserpin is linked to familial
535 encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies (FENIB) [56]. This dementia is due to point
536 mutations favoring the polymerization of neuroserpin and its retention in endoplasmic reticulum
537 of neurons [56–58]. This protein is also associated with Alzheimer disease, but its role is not yet
538 clearly identified [59–61]. To date, we have no knowledge of work studying the relationship
539 between neuroserpin and HAT. The decrease in late stage disease could be due to the fact that

540 neuroserpin is predominantly expressed in the neurons of the hippocampus, caudate and cerebral
541 cortex [62], [63]. The hippocampus and the caudate are close to the choroid plexus, which is
542 described in the literature as the first route of entry of the parasite into the brain owing to the
543 absence of the blood–brain barrier at this location [64–66]. It is probable that these regions are
544 the first to be affected by the presence of the trypanosome. ELISA quantification allowed us to
545 determine a cut-off point for neuroserpin, below which HAT patients may be considered to be in
546 S2 (4.99 ng/mL; sensitivity: 0.58 and specificity: 0.94) at diagnosis. Patients with a neuroserpin
547 concentration greater than 4.99 ng/mL are considered in S1 of the disease. Levels had returned to
548 normal at 12 months follow up, suggesting that the decrease is directly linked to the presence of
549 the parasite or the elicited immune reaction. It was also possible to determine that the onset of
550 sleep disorders was associated with a CSF neuroserpin concentration of less than 5.09 ng/mL.
551 This last cut-off could explain that some patients with S1 disease present symptoms of sleep
552 disorders [67,68]. Similarly, the presence of trypanosome in the CSF was correlated with a CSF
553 neuroserpin concentration of less than 4.84 ng/mL. Each of these cut-offs correlate with classical
554 stage markers, indicating that neuroserpin may be considered as a good additional or unique
555 marker if its concentration is easy to quantify.

556
557 The identification of biomarkers in alternative fluids such as urine and saliva is extremely
558 interesting for field screenings or use in resource limited countries. Access to these fluids is
559 noninvasive, and collection can be done by non-qualified people, or they can even can be used
560 for self-diagnosis [69,70]. Currently, saliva is a source of biomarkers for neurological diseases
561 [71], HIV [72], diabetes [73–75] and cancer [76,77]; urine is used for the diagnosis of
562 osteoclastogenesis [78], urological cancer [79], and proteins in the urine have been identified as
563 potential biomarkers for breast cancer [80], Alzheimer disease [81] and Parkinson disease [82].

35

564 In urine, proteins linked to infectious processes have been highlighted. Moesin was the most
565 interesting according to our identification criteria. This protein belongs to the family of ezrin–
566 radixin–moesin (ERM) proteins, and it is involved in angiogenesis. In fact, the phosphorylation
567 of moesin allows the mediation of endothelial angiogenesis [83]. This protein also participates in
568 the connection between the cytoskeleton and the plasma membrane of human cells. This property
569 allows this protein to limit infection with herpes simplex virus 1 [84]. It has been shown to have a
570 role in invasion of *Trypanosoma cruzi* amastigotes into human cells [85]. Moesin is also involved
571 in the regulation, proliferation and adhesion of human lymphoid cells [86]. A mutation of this
572 protein leads to primary immunodeficiency [87]. The involvement of moesin in kidney lesions
573 was established by Chen *et al* [88]; however, its role is not clear. The ERM complex intervenes in
574 the cellular dynamics by taking part in the mobility of cancer cells described in oral cancers and
575 carcinomas [89,90]. In our study, moesin levels were elevated in urine samples from S1 and S2
576 patients compared with uninfected controls. This result was corroborated by the ELISA
577 quantification. ELISA quantification shows that there is a significant difference between moesin
578 concentrations in uninfected controls compared with patients. Furthermore, a difference in
579 moesin concentration was observed between the uninfected controls and S2 patients, which could
580 make it possible to discriminate stage when the presence of the parasite is established in the
581 blood. It was subsequently impossible to carry out the analysis at 12-months follow-up as not
582 enough samples were available.

583

584 In saliva, 24 potential interesting proteins were identified in saliva that are differentially
585 expressed and ITLN2 was chosen as a potential candidate biomarker owing to its
586 physiopathological background. However, ITLN2 levels detected by ELISA could not
587 discriminate controls from patients, nor S1 from S2 patients ($p = 0.06$). It does not appear

36

588 aberrant to find this protein in an inflammatory pathology such as HAT [91,92]. The intelectin
589 families, and particularly ITLN2, are proteins expressed principally in the small intestine. ITLN2
590 is involved in host–pathogen interactions [93] and iron metabolism [94] and allergic
591 inflammation [91]. Studies are currently determining any potential antimicrobial and anti-
592 parasitic activity of ITLN2 [91,92,95]. However, the presence of ITLN2 and its role in saliva
593 remains unexplained. The quantification of this protein on a larger sample could make it possible
594 to identify the pathophysiological role of this protein in HAT.

595

596 There can be some bias in saliva and urine analysis. In case of saliva, intra- and inter-individual
597 composition variations can be influenced by many parameters, such as salivary flow, sex, age, the
598 subject's emotional state, season, nycthemeral rhythm and medication [96]. In the same way,
599 external elements to the salivary system, such as nasal and bronchial secretions, the gingival
600 fluid, epithelial cells, microbial flora and food debris, can modify its composition [97,98]. It is
601 recommended to perform the saliva collection before brushing the teeth and at least 30 minutes
602 after any ingestion of food [99]. For urine, the time of sample collection was not calibrated
603 (between 7 am and 1 pm) and thus may lead to variations in urine composition and concentration.
604 In this study, these variations could not all be controlled and may constitute a bias.

605 One weakness of this study is the number of patients that were selected for the screening by LC-
606 MS/MS analysis. Indeed, for practical reasons 10 patients among were selected among the 247
607 included in the cohort for the analysis of screening, for which there is homogeneous data (age,
608 sex and no co-infection detected). Despite the low number of patient samples analyzed by LC-
609 MS/MS, the patient sampling in each group (controls, S1 and S2) is statistically homogenous.
610 Another possible criticism is the lack of uniformity in the sampling times, which is especially
611 important in the case of urine and saliva.

37

612 In conclusion, our work allowed the characterization of a large number of proteins presenting an
613 interest in the understanding of HAT pathophysiology and diagnosis. The high sensitivity of new
614 technologies such as LC-MS/MS allow the discovery of new candidate disease marker and open
615 the path to other more accessible biological fluids like urine or saliva. Our work identified two
616 potential new markers, neuroserpin and moesin, the latter of which is found in urine, which could
617 simplify diagnostic strategies in the field.

618

Article en cours de soumission



619 **Data availability [1st level heading]**

620 The complete data sets are available in the PRIDE partner repository [100] under the
621 identification number : PXD007842 as .raw files, Proteome Discoverer 2.1 .pdResult file,
622 associated pep.xml and xlsx files, and label-free report generated by Progenesis QI.

623 **Username:** reviewer10851@ebi.ac.uk

624 **Password:** NL6d28RK

625

626 **Supporting Information Legends [1st level heading]**

627 Identification and relative quantification of all peptides/proteins from the proteomics experiments
628 and according to the different experimental conditions are publicly available via
629 ProteomeXchange and the PRIDE partner repository under the identification number:
630 PXD007842 as .raw files, Proteome Discoverer 2.1 .pdResult file, associated pep.xml and xlsx
631 files, and label-free report generated by Progenesis QI.

632

633 **Acknowledgements [1st level heading]**

634 The manuscript has been revised for the English by an independent scientific language editing
635 service.

Article en cours de soumission

636 References [1st level heading]

- 637 [1] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, and G. Priotto, "Human African trypanosomiasis,"
638 *The Lancet*, vol. 0, no. 0, Jun. 2017.
- 639 [2] Strategic and Technical Advisory Group on NTDs (STAG), "10th meeting of the Strategic
640 and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases," WHO, Geneva,
641 Switzerland, Mar. 2017.
- 642 [3] WHO, *Report of the second WHO stakeholders meeting on gambiense human African*
643 *trypanosomiasis elimination*. 2016.
- 644 [4] P. P. Simarro, A. Diarra, J. A. Ruiz Postigo, J. R. Franco, and J. G. Jannin, "The Human
645 African Trypanosomiasis Control and Surveillance Programme of the World Health
646 Organization 2000–2009: The Way Forward," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 2, p.
647 e1007, Feb. 2011.
- 648 [5] J. R. Franco, P. P. Simarro, A. Diarra, and J. G. Jannin, "Epidemiology of human African
649 trypanosomiasis," *Clin. Epidemiol.*, vol. 6, pp. 257–275, Aug. 2014.
- 650 [6] R. Brun, J. Blum, F. Chappuis, and C. Burri, "Human African trypanosomiasis," *The*
651 *Lancet*, vol. 375, no. 9709, pp. 148–159, Jan. 2010.
- 652 [7] S. Mogk *et al.*, "Cyclical Appearance of African Trypanosomes in the Cerebrospinal Fluid:
653 New Insights in How Trypanosomes Enter the CNS," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3, Mar. 2014.
- 654 [8] S. Bisser *et al.*, "Sensitivity and Specificity of a Prototype Rapid Diagnostic Test for the
655 Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* Infection: A Multi-centric Prospective
656 Study," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 10, no. 4, Apr. 2016.
- 657 [9] P. Lutumba *et al.*, "[Validity, cost and feasibility of the mAECT and CTC confirmation
658 tests after diagnosis of African of sleeping sickness]," *Trop. Med. Int. Health TM IH*, vol.
659 11, no. 4, pp. 470–478, Apr. 2006.
- 660 [10] P. Büscher *et al.*, "Improved Models of Mini Anion Exchange Centrifugation Technique
661 (mAECT) and Modified Single Centrifugation (MSC) for Sleeping Sickness Diagnosis and
662 Staging," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 3, no. 11, Nov. 2009.
- 663 [11] D. Mumba Ngoyi, J. Menten, P. P. Pyana, P. Büscher, and V. Lejon, "Stage determination
664 in sleeping sickness: comparison of two cell counting and two parasite detection
665 techniques," *Trop. Med. Int. Health TM IH*, vol. 18, no. 6, pp. 778–782, Jun. 2013.
- 666 [12] A. H. Fairlamb, "Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future
667 prospects," *Trends Parasitol.*, vol. 19, no. 11, pp. 488–494, Nov. 2003.
- 668 [13] V. K. B. K. Mesu *et al.*, "Oral fexinidazole for late-stage African *Trypanosoma brucei*
669 *gambiense* trypanosomiasis: a pivotal multicentre, randomised, non-inferiority trial," *The*
670 *Lancet*, vol. 391, no. 10116, pp. 144–154, Jan. 2018.
- 671 [14] Z. Meng and T. D. Veenstra, "Proteomic analysis of serum, plasma, and lymph for the
672 identification of biomarkers," *Proteomics Clin. Appl.*, vol. 1, no. 8, pp. 747–757, Aug.
673 2007.
- 674 [15] J. Rouillon *et al.*, "Proteomics profiling of urine reveals specific titin fragments as
675 biomarkers of Duchenne muscular dystrophy," *Neuromuscul. Disord. NMD*, vol. 24, no. 7,
676 pp. 563–573, Jul. 2014.
- 677 [16] J. Beretov, V. C. Wasinger, E. K. A. Millar, P. Schwartz, P. H. Graham, and Y. Li,
678 "Proteomic Analysis of Urine to Identify Breast Cancer Biomarker Candidates Using a
679 Label-Free LC-MS/MS Approach," *PloS One*, vol. 10, no. 11, p. e0141876, 2015.

- 680 [17] C.-C. Wu, H.-W. Chu, C.-W. Hsu, K.-P. Chang, and H.-P. Liu, "Saliva proteome profiling
681 reveals potential salivary biomarkers for detection of oral cavity squamous cell
682 carcinoma," *Proteomics*, vol. 15, no. 19, pp. 3394–3404, Oct. 2015.
- 683 [18] M. A. Collins, J. An, B. L. Hood, T. P. Conrads, and R. P. Bowser, "Label-Free LC-
684 MS/MS Proteomic Analysis of Cerebrospinal Fluid Identifies Protein/Pathway Alterations
685 and Candidate Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis," *J. Proteome Res.*, vol. 14,
686 no. 11, pp. 4486–4501, Nov. 2015.
- 687 [19] M. Hamilton, "A RATING SCALE FOR DEPRESSION," *J. Neurol. Neurosurg.
688 Psychiatry*, vol. 23, no. 1, pp. 56–62, Feb. 1960.
- 689 [20] D. V. Sheehan *et al.*, "The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the
690 development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV
691 and ICD-10," *J. Clin. Psychiatry*, vol. 59 Suppl 20, pp. 22-33-57, 1998.
- 692 [21] M. Brosch, L. Yu, T. Hubbard, and J. Choudhary, "Accurate and sensitive peptide
693 identification with Mascot Percolator," *J. Proteome Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 3176–3181, Jun.
694 2009.
- 695 [22] R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria:
696 R Foundation for Statistical Computing, 2016.
- 697 [23] T. Sing, O. Sander, N. Beerenwinkel, and T. Lengauer, *ROCR: Visualizing the
698 Performance of Scoring Classifiers*. 2015.
- 699 [24] T. Pohlert, *PMCMR: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums*. 2016.
- 700 [25] L. Anderson, "Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular
701 disease," *J. Physiol.*, vol. 563, no. Pt 1, pp. 23–60, Feb. 2005.
- 702 [26] S. Hu, J. A. Loo, and D. T. Wong, "Human body fluid proteome analysis," *Proteomics*,
703 vol. 6, no. 23, pp. 6326–6353, Dec. 2006.
- 704 [27] N. L. Anderson and N. G. Anderson, "The Human Plasma Proteome History, Character,
705 and Diagnostic Prospects," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 1, no. 11, pp. 845–867, Nov. 2002.
- 706 [28] G. Low and A. Castellani, "Report of the Sleeping Sickness Commission," Proc R Soc
707 London, London, 1903.
- 708 [29] K. A. Taylor, "Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or
709 pathogenic?," *Int. J. Parasitol.*, vol. 28, no. 2, pp. 219–240, Feb. 1998.
- 710 [30] T. N. Baral, "Immunobiology of African trypanosomes: need of alternative interventions,"
711 *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, p. 389153, 2010.
- 712 [31] M. Radwanska, P. Guirnalda, C. D. Trez, B. Ryffel, S. Black, and S. Magez,
713 "Trypanosomiasis-Induced B Cell Apoptosis Results in Loss of Protective Anti-Parasite
714 Antibody Responses and Abolishment of Vaccine-Induced Memory Responses," *PLOS
715 Pathog.*, vol. 4, no. 5, p. e1000078, mai 2008.
- 716 [32] V. Bockstal *et al.*, "T. brucei Infection Reduces B Lymphopoiesis in Bone Marrow and
717 Truncates Compensatory Splenic Lymphopoiesis through Transitional B-Cell Apoptosis,"
718 *PLOS Pathog.*, vol. 7, no. 6, p. e1002089, juin 2011.
- 719 [33] J. Gómez-Rodríguez *et al.*, "Identification of a parasitic immunomodulatory protein
720 triggering the development of suppressive M1 macrophages during African
721 trypanosomiasis," *J. Infect. Dis.*, vol. 200, no. 12, pp. 1849–1860, Dec. 2009.
- 722 [34] B. Stijlemans, G. Caljon, J. Van Den Abbeele, J. A. Van Ginderachter, S. Magez, and C.
723 De Trez, "Immune Evasion Strategies of Trypanosoma brucei within the Mammalian Host:
724 Progression to Pathogenicity," *Front. Immunol.*, vol. 7, Jun. 2016.
- 725 [35] D. J. Grab *et al.*, "African trypanosome interactions with an in vitro model of the human
726 blood-brain barrier," *J. Parasitol.*, vol. 90, no. 5, pp. 970–979, Oct. 2004.

- 727 [36] D. J. Grab *et al.*, “Protease Activated Receptor Signaling Is Required for African
728 Trypanosome Traversal of Human Brain Microvascular Endothelial Cells,” *PLoS Negl.*
729 *Trop. Dis.*, vol. 3, no. 7, p. e479, juil 2009.
- 730 [37] R. Jurado and H. K. Walker, “Cerebrospinal Fluid,” in *Clinical Methods: The History,*
731 *Physical, and Laboratory Examinations*, 3rd ed., H. K. Walker, W. D. Hall, and J. W.
732 Hurst, Eds. Boston: Butterworths, 1990.
- 733 [38] H. Reiber and J. B. Peter, “Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and
734 evaluation programs,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 184, no. 2, pp. 101–122, Mar. 2001.
- 735 [39] B. J. Blyth *et al.*, “Validation of Serum Markers for Blood-Brain Barrier Disruption in
736 Traumatic Brain Injury,” *J. Neurotrauma*, vol. 26, no. 9, pp. 1497–1507, Sep. 2009.
- 737 [40] C. Mulenga, J. D. Mhlanga, K. Kristensson, and B. Robertson, “Trypanosoma brucei
738 brucei crosses the blood-brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat
739 chronic disease model,” *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 27, no. 1, pp. 77–85, Feb.
740 2001.
- 741 [41] A. Hainard *et al.*, “Matrix metalloproteinase-9 and intercellular adhesion molecule 1 are
742 powerful staging markers for human African trypanosomiasis,” *Trop. Med. Int. Health*,
743 vol. 16, no. 1, pp. 119–126, Jan. 2011.
- 744 [42] N. Tiberti *et al.*, “Discovery and verification of osteopontin and Beta-2-microglobulin as
745 promising markers for staging human African trypanosomiasis,” *Mol. Cell. Proteomics*
746 *MCP*, vol. 9, no. 12, pp. 2783–2795, Dec. 2010.
- 747 [43] R. Fischer-Colbrie, R. Kirchmair, A. Schobert, C. Olenik, D. K. Meyer, and H. Winkler,
748 “Secretogranin II Is Synthesized and Secreted in Astrocyte Cultures,” *J. Neurochem.*, vol.
749 60, no. 6, pp. 2312–2314, Jun. 1993.
- 750 [44] G. A. Hastings *et al.*, “Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen
751 activator is localized primarily in neurons. Implications for the regulation of motor
752 learning and neuronal survival,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 52, pp. 33062–33067, Dec.
753 1997.
- 754 [45] N. Mattsson *et al.*, “Cerebrospinal fluid concentrations of peptides derived from
755 chromogranin B and secretogranin II are decreased in multiple sclerosis,” *J. Neurochem.*,
756 vol. 103, no. 5, pp. 1932–1939, Dec. 2007.
- 757 [46] N. H. Wilson and B. Key, “Neogenin: one receptor, many functions,” *Int. J. Biochem. Cell*
758 *Biol.*, vol. 39, no. 5, pp. 874–878, 2007.
- 759 [47] F. Li *et al.*, “Dysregulated expression of secretogranin III is involved in neurotoxin-
760 induced dopaminergic neuron apoptosis,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 90, no. 12, pp. 2237–
761 2246, Dec. 2012.
- 762 [48] J. Jakobsson *et al.*, “Decreased cerebrospinal fluid secretogranin II concentrations in severe
763 forms of bipolar disorder,” *J. Psychiatry Neurosci. JPN*, vol. 38, no. 4, pp. E21-26, Jul.
764 2013.
- 765 [49] I. Begcevic, D. Brinc, A. P. Drabovich, I. Batruch, and E. P. Diamandis, “Identification of
766 brain-enriched proteins in the cerebrospinal fluid proteome by LC-MS/MS profiling and
767 mining of the Human Protein Atlas,” *Clin. Proteomics*, vol. 13, May 2016.
- 768 [50] Y. Fujita and T. Yamashita, “The roles of RGMa-neogenin signaling in inflammation and
769 angiogenesis,” *Inflamm. Regen.*, vol. 37, p. 6, Mar. 2017.
- 770 [51] S. R. Krueger *et al.*, “Expression of neuroserpin, an inhibitor of tissue plasminogen
771 activator, in the developing and adult nervous system of the mouse,” *J. Neurosci. Off. J.*
772 *Soc. Neurosci.*, vol. 17, no. 23, pp. 8984–8996, Dec. 1997.

- 773 [52] T. W. Lee, V. W. K. Tsang, E. J. Loef, and N. P. Birch, "Physiological and pathological
774 functions of neuroserpin: Regulation of cellular responses through multiple mechanisms,"
775 *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 62, pp. 152–159, Feb. 2017.
- 776 [53] S. Caccia, S. Ricagno, and M. Bolognesi, "Molecular bases of neuroserpin function and
777 pathology," *Biomol. Concepts*, vol. 1, no. 2, pp. 117–130, Aug. 2010.
- 778 [54] T. Osterwalder, J. Contartese, E. T. Stoeckli, T. B. Kuhn, and P. Sonderegger,
779 "Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor," *EMBO J.*, vol. 15, no. 12,
780 pp. 2944–2953, Jun. 1996.
- 781 [55] T. W. Lee, V. W. K. Tsang, and N. P. Birch, "Physiological and pathological roles of
782 tissue plasminogen activator and its inhibitor neuroserpin in the nervous system," *Front.*
783 *Cell. Neurosci.*, vol. 9, Oct. 2015.
- 784 [56] R. L. Davis *et al.*, "Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin,"
785 *Nature*, vol. 401, no. 6751, pp. 376–379, Sep. 1999.
- 786 [57] E. Miranda *et al.*, "The intracellular accumulation of polymeric neuroserpin explains the
787 severity of the dementia FENIB," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 17, no. 11, pp. 1527–1539, Jun.
788 2008.
- 789 [58] R. Noto *et al.*, "The Tempered Polymerization of Human Neuroserpin," *PLoS ONE*, vol. 7,
790 no. 3, Mar. 2012.
- 791 [59] K. J. Kinghorn *et al.*, "Neuroserpin binds Abeta and is a neuroprotective component of
792 amyloid plaques in Alzheimer disease," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 39, pp. 29268–29277,
793 Sep. 2006.
- 794 [60] A. Chiou *et al.*, "Probing neuroserpin polymerization and interaction with amyloid-beta
795 peptides using single molecule fluorescence," *Biophys. J.*, vol. 97, no. 8, pp. 2306–2315,
796 Oct. 2009.
- 797 [61] B. Subhadra, K. Schaller, and N. W. Seeds, "Neuroserpin up-regulation in the Alzheimer's
798 disease brain is associated with elevated thyroid hormone receptor- β 1 and HuD
799 expression," *Neurochem. Int.*, vol. 63, no. 5, pp. 476–481, Nov. 2013.
- 800 [62] T. Teesalu *et al.*, "Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in
801 the human central nervous system," *Thromb. Haemost.*, vol. 92, no. 2, pp. 358–368, Aug.
802 2004.
- 803 [63] M. Uhlén *et al.*, "Tissue-based map of the human proteome," *Science*, vol. 347, no. 6220,
804 p. 1260419, Jan. 2015.
- 805 [64] M. Schultzberg, M. Ambatsis, E. B. Samuelsson, K. Kristensson, and N. van Meirvenne,
806 "Spread of *Trypanosoma brucei* to the nervous system: early attack on circumventricular
807 organs and sensory ganglia," *J. Neurosci. Res.*, vol. 21, no. 1, pp. 56–61, Sep. 1988.
- 808 [65] O. V. Nikolskaia, Y. V. Kim, O. Kovbasnjuk, K. J. Kim, and D. J. Grab, "Entry of
809 *Trypanosoma brucei gambiense* into microvascular endothelial cells of the human blood-
810 brain barrier," *Int. J. Parasitol.*, vol. 36, no. 5, pp. 513–519, May 2006.
- 811 [66] O. V. Nikolskaia *et al.*, "Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires
812 calcium signaling induced by parasite cysteine protease," *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 10,
813 pp. 2739–2747, Oct. 2006.
- 814 [67] E. Bertrand *et al.*, "Symptomatologie générale de la trypanosomiase humaine africaine au
815 moment du dépistage." Jan. 1973.
- 816 [68] K. Urech, A. Neumayr, and J. Blum, "Sleeping Sickness in Travelers - Do They Really
817 Sleep?," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 11, Nov. 2011.
- 818 [69] D. Malamud, "Saliva as a diagnostic fluid," *Dent. Clin. North Am.*, vol. 55, no. 1, pp. 159–
819 178, Jan. 2011.

- 820 [70] L. A. S. Nunes, S. Mussavira, and O. S. Bindhu, "Clinical and diagnostic utility of saliva
821 as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review," *Biochem. Medica*, vol. 25, no. 2,
822 pp. 177–192, Jun. 2015.
- 823 [71] M. S. M. Al-Nimer, S. F. Mshatat, and H. I. Abdulla, "Saliva α -Synuclein and A High
824 Extinction Coefficient Protein: A Novel Approach in Assessment Biomarkers of
825 Parkinson's Disease," *North Am. J. Med. Sci.*, vol. 6, no. 12, pp. 633–637, Dec. 2014.
- 826 [72] K. Fransen *et al.*, "Using conventional HIV tests on oral fluid," *J. Virol. Methods*, vol. 194,
827 no. 1–2, pp. 46–51, Dec. 2013.
- 828 [73] A. J. Yoon, B. Cheng, E. Philipone, R. Turner, and I. B. Lamster, "Inflammatory
829 biomarkers in saliva: assessing the strength of association of diabetes mellitus and
830 periodontal status with the oral inflammatory burden," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 39, no. 5,
831 pp. 434–440, May 2012.
- 832 [74] M. B. Border *et al.*, "Exploring salivary proteomes in edentulous patients with type 2
833 diabetes," *Mol. Biosyst.*, vol. 8, no. 4, pp. 1304–1310, Apr. 2012.
- 834 [75] B. Zalewska-Szajda *et al.*, "Activity of N-acetyl- β -D-hexosaminidase in the saliva of
835 children with type 1 diabetes," *Postepy Hig. Med. Doswiadczalnej Online*, vol. 67, pp.
836 996–999, Sep. 2013.
- 837 [76] J. W. Jenzano, N. F. Courts, D. A. Timko, and R. L. Lundblad, "Levels of glandular
838 kallikrein in whole saliva obtained from patients with solid tumors remote from the oral
839 cavity," *J. Dent. Res.*, vol. 65, no. 1, pp. 67–70, Jan. 1986.
- 840 [77] C. Streckfus, L. Bigler, M. Tucci, and J. T. Thigpen, "A preliminary study of CA15-3, c-
841 erbB-2, epidermal growth factor receptor, cathepsin-D, and p53 in saliva among women
842 with breast carcinoma," *Cancer Invest.*, vol. 18, no. 2, pp. 101–109, 2000.
- 843 [78] S. P. Robins, "Collagen crosslinks in metabolic bone disease," *Acta Orthop. Scand. Suppl.*,
844 vol. 266, pp. 171–175, Oct. 1995.
- 845 [79] H. Mlcochova, R. Hezova, M. Stanik, and O. Slaby, "Urine microRNAs as potential
846 noninvasive biomarkers in urologic cancers," *Urol. Oncol.*, vol. 32, no. 1, p. 41.e1-9, Jan.
847 2014.
- 848 [80] V. P. Shichkin *et al.*, "TNF receptor p55 and IL-8(72) and IL-8(77) isoforms: blood and
849 urine levels in breast cancer patients," *J. Immunotoxicol.*, vol. 6, no. 4, pp. 235–242, Dec.
850 2009.
- 851 [81] H. Ghanbari, K. Ghanbari, I. Beheshti, M. Munzar, A. Vasauskas, and P. Averback,
852 "Biochemical assay for AD7C-NTP in urine as an Alzheimer's disease marker," *J. Clin.*
853 *Lab. Anal.*, vol. 12, no. 5, pp. 285–288, 1998.
- 854 [82] J. Connolly, A. Siderowf, C. M. Clark, D. Mu, and D. Pratico, "F2 isoprostane levels in
855 plasma and urine do not support increased lipid peroxidation in cognitively impaired
856 Parkinson disease patients," *Cogn. Behav. Neurol. Off. J. Soc. Behav. Cogn. Neurol.*, vol.
857 21, no. 2, pp. 83–86, Jun. 2008.
- 858 [83] Q. Wang *et al.*, "Role of Moesin in Advanced Glycation End Products-Induced
859 Angiogenesis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 22749,
860 Mar. 2016.
- 861 [84] M. S. Henning *et al.*, "PDZD8 is a novel moesin-interacting cytoskeletal regulatory protein
862 that suppresses infection by herpes simplex virus type 1," *Virology*, vol. 415, no. 2, pp.
863 114–121, Jul. 2011.
- 864 [85] E. R. de A. Ferreira, "The role of ezrin, radixin and moesin (ERM proteins) in cell invasion
865 by extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi*," Escola Paulista de Medicina (EPM).

- 866 Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Campus São Paulo. São Paulo, SP, Brazil,
867 2016.
- 868 [86] D. Pore and N. Gupta, "Ezrin-Radixin-Moesin family proteins in the regulation of B cell
869 immune response," *Crit. Rev. Immunol.*, vol. 35, no. 1, pp. 15–31, 2015.
- 870 [87] C. Lagresle-Peyrou *et al.*, "X-linked primary immunodeficiency associated with
871 hemizygous mutations in the moesin (MSN) gene," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 138, no.
872 6, p. 1681–1689.e8, Dec. 2016.
- 873 [88] Y.-X. Chen *et al.*, "Role of Moesin in Renal Fibrosis," *PLOS ONE*, vol. 9, no. 11, p.
874 e112936, Nov. 2014.
- 875 [89] T. Kinoshita *et al.*, "Tumor suppressive microRNA-133a regulates novel targets: moesin
876 contributes to cancer cell proliferation and invasion in head and neck squamous cell
877 carcinoma," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 418, no. 2, pp. 378–383, Feb. 2012.
- 878 [90] Y. Li, C.-X. Zhou, and Y. Gao, "Moesin regulates the motility of oral cancer cells via
879 MT1-MMP and E-cadherin/p120-catenin adhesion complex," *Oral Oncol.*, vol. 51, no. 10,
880 pp. 935–943, Oct. 2015.
- 881 [91] R. S. Peebles, "The intelectins: a new link between the immune response to parasitic
882 infections and allergic inflammation?," *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol.
883 298, no. 3, pp. L288–L289, Mar. 2010.
- 884 [92] D. A. Wesener *et al.*, "Recognition of Microbial Glycans by Human Intelectin," *Nat.*
885 *Struct. Mol. Biol.*, vol. 22, no. 8, pp. 603–610, Aug. 2015.
- 886 [93] J. K. Lee *et al.*, "Human homologs of the *Xenopus* oocyte cortical granule lectin XL35,"
887 *Glycobiology*, vol. 11, no. 1, pp. 65–73, Jan. 2001.
- 888 [94] J. Yan *et al.*, "Comparative genomic and phylogenetic analyses of the intelectin gene
889 family: implications for their origin and evolution," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 41, no. 2,
890 pp. 189–199, Oct. 2013.
- 891 [95] A. D. Pemberton *et al.*, "Innate BALB/c enteric epithelial responses to *Trichinella spiralis*:
892 inducible expression of a novel goblet cell lectin, intelectin-2, and its natural deletion in
893 C57BL/10 mice," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 173, no. 3, pp. 1894–1901, Aug.
894 2004.
- 895 [96] R. Vitorino *et al.*, "Identification of human whole saliva protein components using
896 proteomics," *PROTEOMICS*, vol. 4, no. 4, pp. 1109–1115, Apr. 2004.
- 897 [97] E. Kaufman and I. B. Lamster, "The diagnostic applications of saliva--a review," *Crit. Rev.*
898 *Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 197–212, 2002.
- 899 [98] D. Esser, G. Alvarez-Llamas, M. P. de Vries, D. Weening, R. J. Vonk, and H. Roelofsen,
900 "Sample Stability and Protein Composition of Saliva: Implications for Its Use as a
901 Diagnostic Fluid," *Biomark. Insights*, vol. 3, pp. 25–27, Feb. 2008.
- 902 [99] M. Gröschl, "Données actuelles sur l'analyse hormonale salivaire," *Ann. Biol. Clin.*
903 *(Paris)*, vol. 67, no. 5, pp. 493–504, Sep. 2009.
- 904 [100] J. A. Vizcaino *et al.*, "2016 update of the PRIDE database and its related tools," *Nucleic*
905 *Acids Res.*, vol. 44, no. D1, pp. D447–456, Jan. 2016.
- 906

4.3. Comparaisons Néoptérine, CXCL-13 et Neuroserpine

Dans cette dernière partie, nous avons comparé les biomarqueurs du LCR : la néoptérine, CXCL-13 à la neuroserpine chez les patients et les contrôles à l'inclusion et à 12 mois post-traitement. Cette comparaison a été faite sur une partie de la cohorte FIND (cf Article 2), en fonction des stade 1, stade intermédiaire et stade 2.

Le **tableau 10** résume les caractéristiques de classification :

Tableau 10: Composition de la cohorte de validation en incluant le stade intermédiaire.

Cohorte de validation Article 2	Contrôle	Stade 1	Stade intermédiaire	Stade 2 avancé
N patients	14	23	20	23
Cytorachie moyenne (/ μ L)	2,64	1,35	10,95	248,30
Trypanosome dans LCR	0	0	0	23

Avec les travaux de l'article 1, nous avons défini de nouveaux seuils en prenant en compte le stade intermédiaire (**Figure 31**).

Avec les travaux de l'article 2 nous avons montré qu'une diminution de la concentration de neuroserpine dans le LCR en dessous de 4,99 pg/mL est caractéristique du stade 2 de la THA (**Figure 31**).

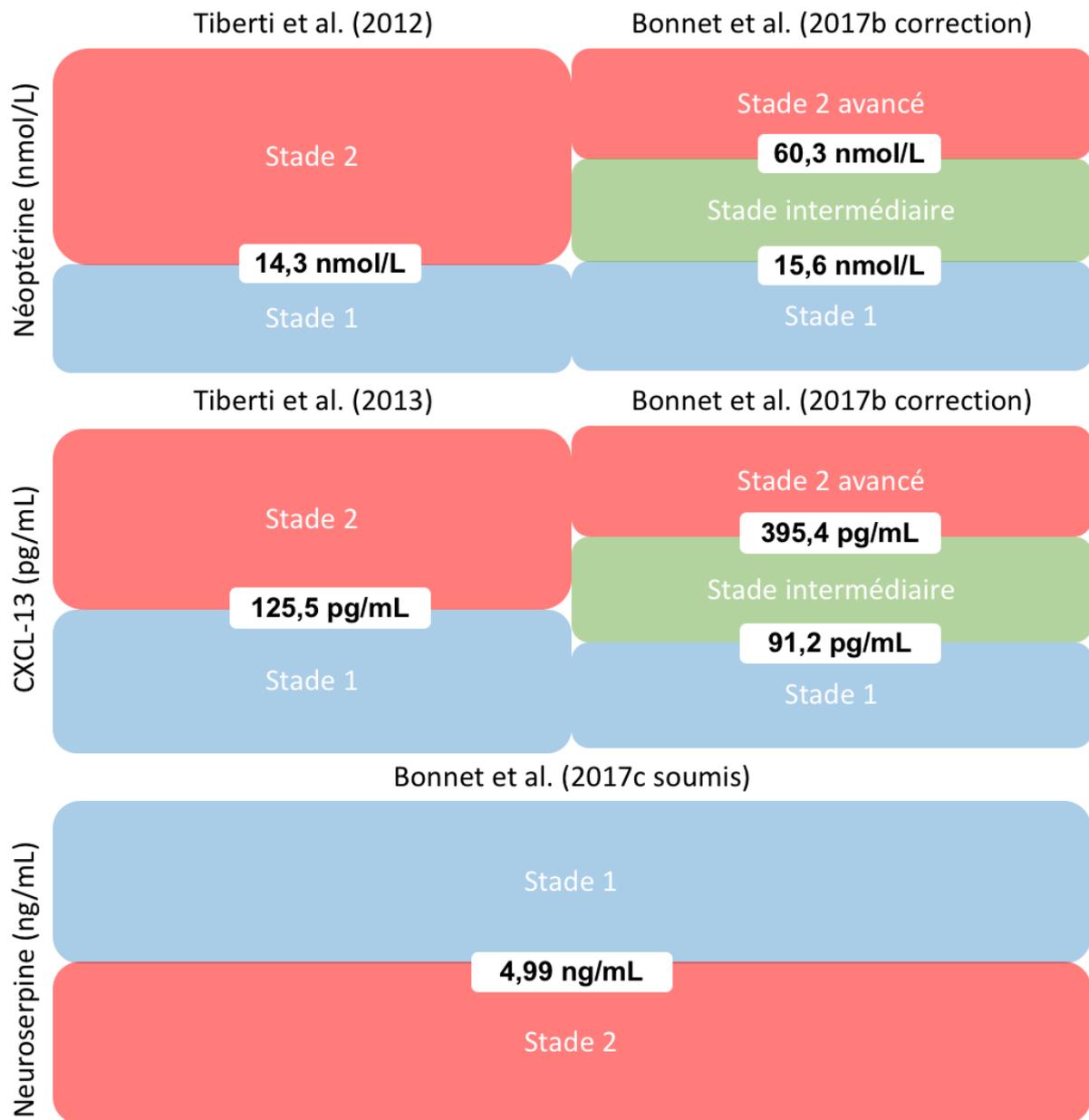


Figure 31 : Seuils « anciens » de néoptérine et CXCL-13 et nouveaux seuils de néoptérine, de CXCL-13 et de neuroserpine discriminant les différents stades de la THA.

Nous avons comparé les seuils définis dans l'article 1 aux précédents seuils établis par Tiberti et al en 2012 et 2013, à l'inclusion et au suivi à 12 mois post-traitement. Nous avons également comparé les seuils de néoptérine et de CXCL-13 discriminant le stade 2 avec le seuil discriminant le stade 2 obtenu pour la neuroserpine, à l'inclusion et au suivi à 12 mois post-traitement.

4.3.1. A l'inclusion

4.3.1.1 Néoptérine versus CXCL-13

Lorsque l'on représente les concentrations en néoptérine en fonction de celles de CXCL-13 pour chaque contrôle et chaque patient dans la **Figure 32**, on observe que certains patients en stade 1 ont des taux de néoptérine et/ou de CXCL-13 supérieurs aux seuils discriminant le stade 2 défini par Tiberti et al en 2012 et 2013. Inversement, des patients en stade intermédiaire (actuellement considérés en stade 2 par l'OMS) ont des taux en néoptérine ou en CXCL-13 inférieurs aux seuils discriminants le stade 2 défini par Tiberti et al en 2012 et 2013.

Par rapport aux seuils que nous avons définis dans l'article 1, seuls 2 patients (I et II) en stade intermédiaire ont des concentrations en CXCL-13 supérieures à 395,4 pg/mL.

- Dans le cas du patient I, des trypanosomes ont été identifiés à la suite d'une ponction ganglionnaire. Sa cytorachie est de 12 cellules/ μ L et aucun trypanosome n'a été retrouvé dans son LCR. Toutefois ce patient présente des troubles du sommeil. Ce patient a été traité avec de la pentamidine et a été déclaré guéri à la fin de l'étude.
- Pour le patient II, des trypanosomes ont également été retrouvés dans le suc ganglionnaire ainsi que dans le sang après une CTC. Ce patient ne présente aucune anomalie à l'examen physique ainsi qu'à l'examen neurologique. Cependant, certains symptômes sont présents comme la fièvre, des céphalées, une perte de poids et d'appétit ainsi qu'une adénomégalie. Il est également noté dans le rapport que ce patient est impuissant. La cytorachie de ce patient est de 20 cellules/ μ L et aucun trypanosome n'est retrouvé dans son LCR. Il a été traité avec du DFMO et a été déclaré guéri au bout de 24 mois post-traitement.

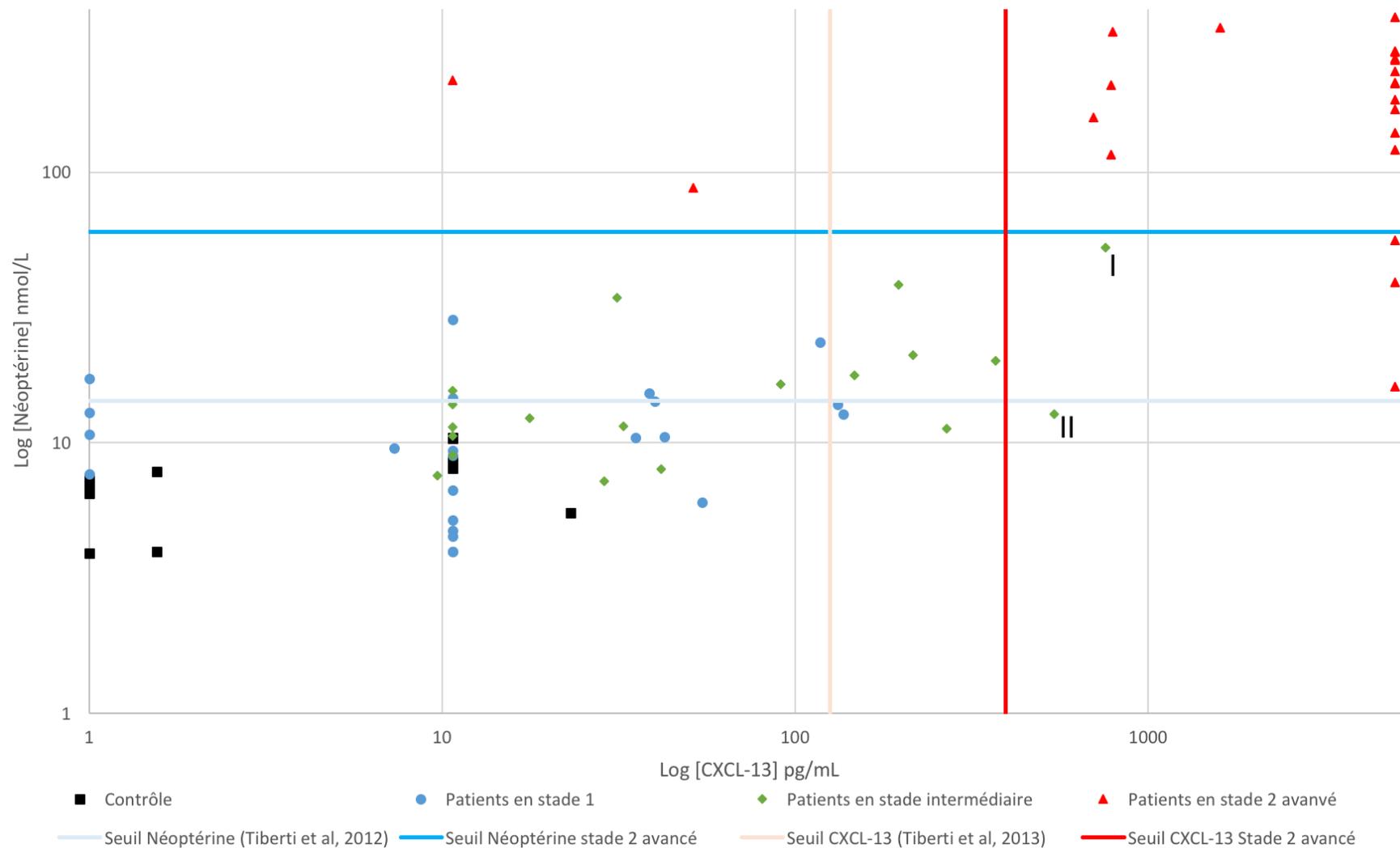


Figure 32 : Représentation du taux de néoptérine en fonction du taux de CXCL-13 pour chaque individu à l'inclusion.



4.3.1.2 Néoptérine versus Neuroserpine

De la même façon en représentant les concentrations en néoptérine en fonction des concentrations en neuroserpine pour les contrôles et les patients (**Figure 33**), on observe que de nombreux patients (16/20) en stade intermédiaire (classés en stade 2 par l'OMS) ne présentent pas de diminution de la concentration en neuroserpine dans le LCR (en dessous de 4,99 ng/mL) ce qui est caractéristique du stade 2. On note également que les individus III, IV, V et VI ont des taux de néoptérine ou de neuroserpine qui ne sont pas en adéquation avec le taux moyen des stades auxquels ils appartiennent.

- Les individus III et IV sont des contrôles, ils ont tous les deux un taux de neuroserpine dans le LCR faible.
 - o Le contrôle III n'a aucun antécédent de THA et a une cytorachie de 2 cellules/ μ L. Ses examens ne montrent aucune anomalie en lien direct avec la THA et aucun trypanosome n'a été retrouvé dans son sang ou son LCR. Cet individu a été revu 6 mois plus tard avec une symptomatologie évocatrice de microfilaires mais ce diagnostic n'a pas pu être confirmé par un examen parasitologique.
 - o Le Contrôle IV est un individu âgé de 12 ans qui n'a aucun antécédent de THA et a également une cytorachie de 2 cellules/ μ L. Aucun examen ne montre d'anomalie, mais son jeune âge pourrait expliquer ces taux.
- Les patients V et VI sont tous les deux en stade 2 avancé mais leurs taux de neuroserpine sont caractéristiques de patients en stade 1 de la THA.
 - o Le patients V est atteint de troubles du sommeil et souffre d'un syndrome dépressif. Des trypanosomes ont été retrouvés à la suite des ponctions ganglionnaire et lombaire. Ce patient a également une cytorachie élevée (99 cellules/ μ L), il a donc été traité avec succès par du DFMO.
 - o Le patient VI souffre également de troubles du sommeil. Des trypanosomes ont été trouvés dans son sang et son LCR et sa cytorachie est de 60 cellules/ μ L. Il a donc été traité avec du DFMO et a été déclaré guéri à la fin de l'étude. Il est à noter qu'au moment du diagnostic ce patient recevait déjà un autre traitement pour une infection intercurrente.

Une partie de ces travaux a été présentée à l'occasion du congrès de la Société Française de Parasitologie en 2016 sous la forme d'une communication affichée (**Annexe 1**).

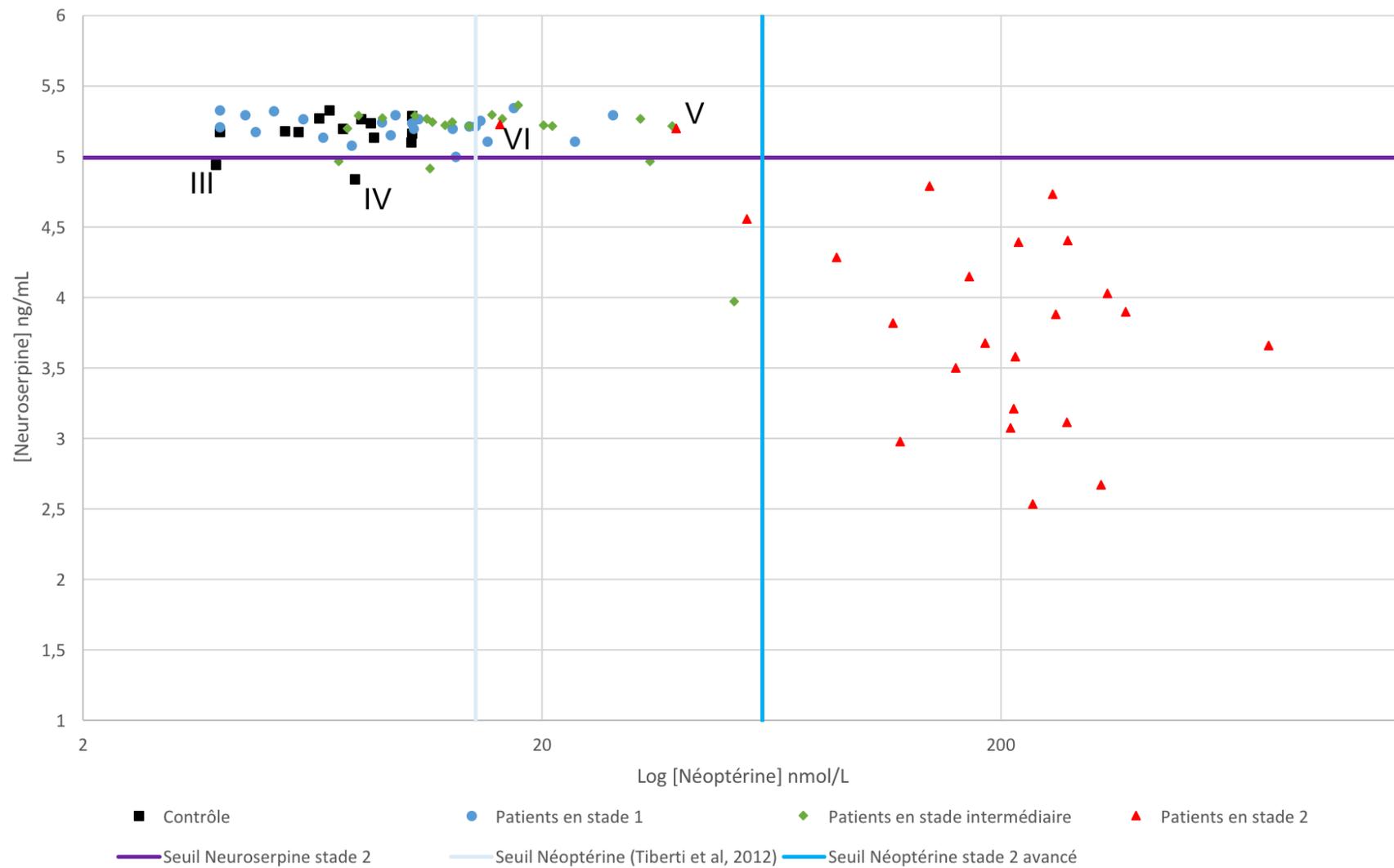


Figure 33 : Représentation du taux de néoptérine en fonction du taux de neuroserpine pour chaque individu à l'inclusion.



4.3.1.3 CXCL-13 versus Neuroserpine

La représentation des concentrations en CXCL-13 en fonction des concentrations de neuroserpine (**Figure 34**) montre que de nombreux patients (16/20) en stade intermédiaire (classés en stade 2 par l'OMS) ne présentent pas de diminution de la concentration en neuroserpine dans le LCR (en dessous de 4,99 ng/mL) ce qui est caractéristique du stade 2.

Les mêmes patients que ceux présentés dans la **Figure 33** (III, IV, V et VI) montrent des taux de neuroserpine qui ne sont pas en adéquation avec le stade auquel ils ont été diagnostiqués.

- Les individus III et IV sont des contrôles, ils ont tous les deux un taux de neuroserpine dans le LCR faible.
- Les patients V et VI sont en stade 2 avancé mais leurs taux de neuroserpine dans le LCR ne sont pas diminués et sont caractéristiques de patients en stade 1.

Une partie de ces travaux a été présentée à l'occasion du congrès de la Société Française de Parasitologie en 2016 sous la forme d'une communication affichée (**Annexe 1**).

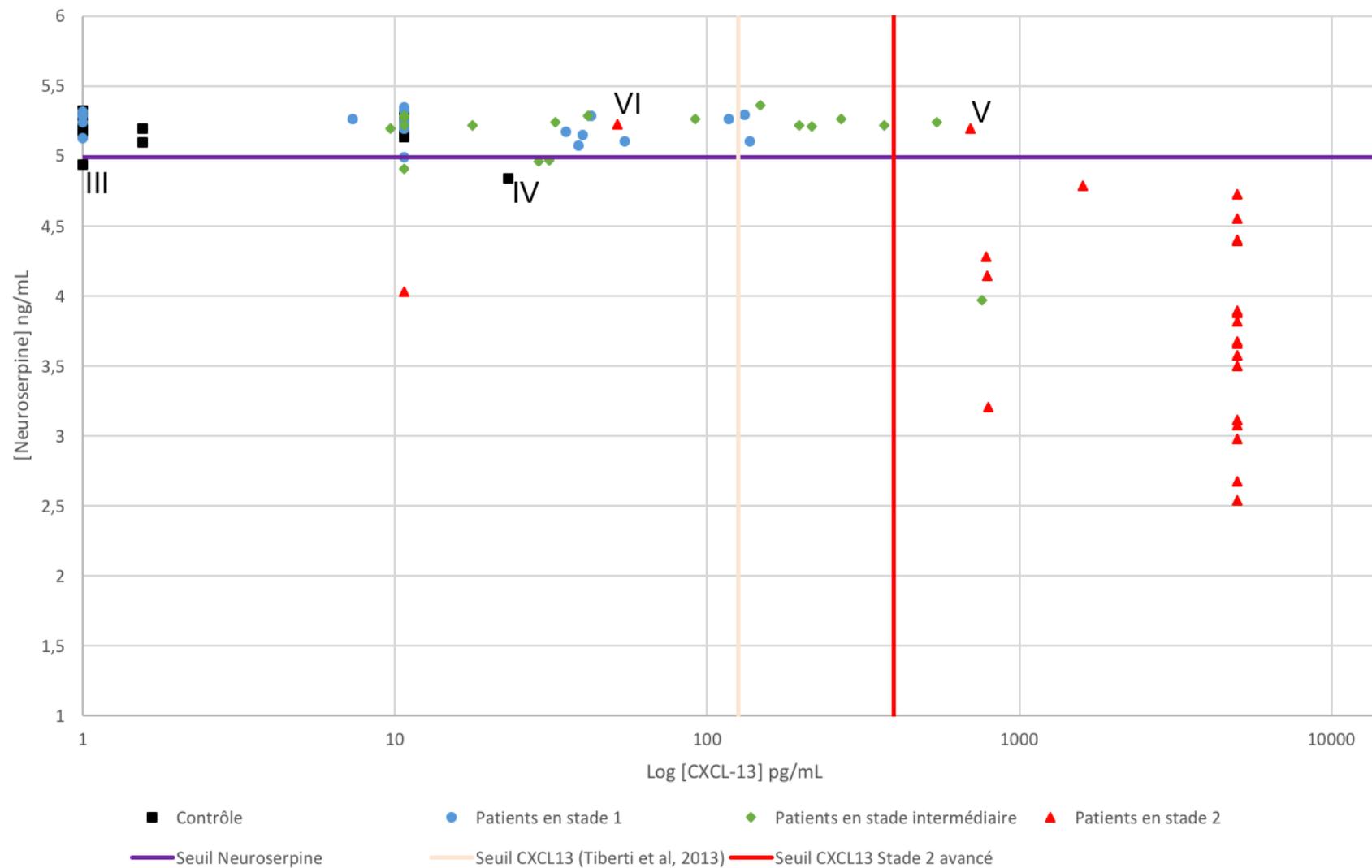


Figure 34 : Représentation du taux de neuroserpine en fonction du taux de CXCL-13 pour chaque individu à l'inclusion.



4.3.2. Douze mois après traitement

4.3.2.1 Néoptérine versus CXCL-13

A 12 mois post-traitement, nous avons pu comparer la concentration de néoptérine de 47 patients à celle de CXCL-13. Au moment du diagnostic de la maladie, 18 patients étaient en stade 1, 14 patients en stade intermédiaire et 15 patients étaient en stade 2 avancé (**Figure 35**). On peut observer que 7 patients (les patients A, B, C, D, E, F et G) ont des taux en néoptérine ou en CXCL-13, à 12 mois post-traitement, au dessus des seuils définis comme révélateur du stade neurologique de la THA à l'inclusion.

- Les patients A et B présentent des taux de néoptérine et de CXCL-13 supérieurs aux seuils discriminant le stade 2 avancé défini dans l'article 1. Ces deux patients ont été diagnostiqués en rechute au suivi du 12^{ème} mois. En effet à 12 mois, le patient A présente des trypanosomes dans son LCR et une cytorachie de 120 cellules/ μ L. Pour le patient B, des trypanosomes sont retrouvés dans son sang mais pas dans son LCR, sa cytorachie est de 29 cellules/ μ L.
- Le patient C a un taux de néoptérine dans le LCR supérieur au seuil discriminant le stade 2 avancé défini dans l'article 1 et son taux de CXCL-13 est supérieur au taux établi par Tiberti et al (2013). Au 12^{ème} mois de suivi, ce patient n'a pas de trypanosome dans son LCR et une cytorachie de 14 cellules/ μ L mais il sera diagnostiqué en rechute au 18^{ème} mois avec des trypanosomes dans le LCR et une cytorachie de 159 cellules/ μ L.
- Le patient D a un taux de CXCL-13 dans le LCR supérieur au seuil discriminant le stade 2 avancé défini dans l'article 1 et son taux de néoptérine est supérieur au taux établi par Tiberti et al (2012). Au 12^{ème} mois de suivi, ce patient n'a pas de trypanosome dans son LCR et sa cytorachie est de 22 cellules/ μ L mais il sera diagnostiqué en rechute au 24^{ème} mois en raison d'une cytorachie élevée (66 cellules/ μ L) et la découverte de trypanosomes dans son LCR.
- Le patient E a un taux de néoptérine en dessous des deux seuils fixés mais son taux de CXCL-13 est au dessus des seuils. Au 12^{ème} mois, l'examen du LCR de ce patient semble normal (pas de présence de trypanosome et cytorachie de 15 cellules/ μ L). Cependant, des trypanosomes seront retrouvés dans son LCR (cytorachie à 44 cellules/ μ L) au 24^{ème} mois de suivi et ce patient sera diagnostiqué en rechute.
- Enfin, les patients F et G ont des taux de néoptérine et de CXCL-13 inférieurs aux seuils déterminés dans l'article 1 mais ces taux sont supérieurs à ceux déterminés par

Tiberti et al (2012, 2013). Dans le cas du patient F, le LCR prélevé lors du suivi au 12^{ème} mois est hémorragique (500 hématies/ μ L), il ne présente pas de trypanosome et la cytorachie est de 5 cellules/ μ L. Le patient G, au 12^{ème} mois de suivi, n'a pas de trypanosome dans son LCR et a une cytorachie de 20 cellules/ μ L. Ces deux patients seront déclarés guéris à la fin du suivi.

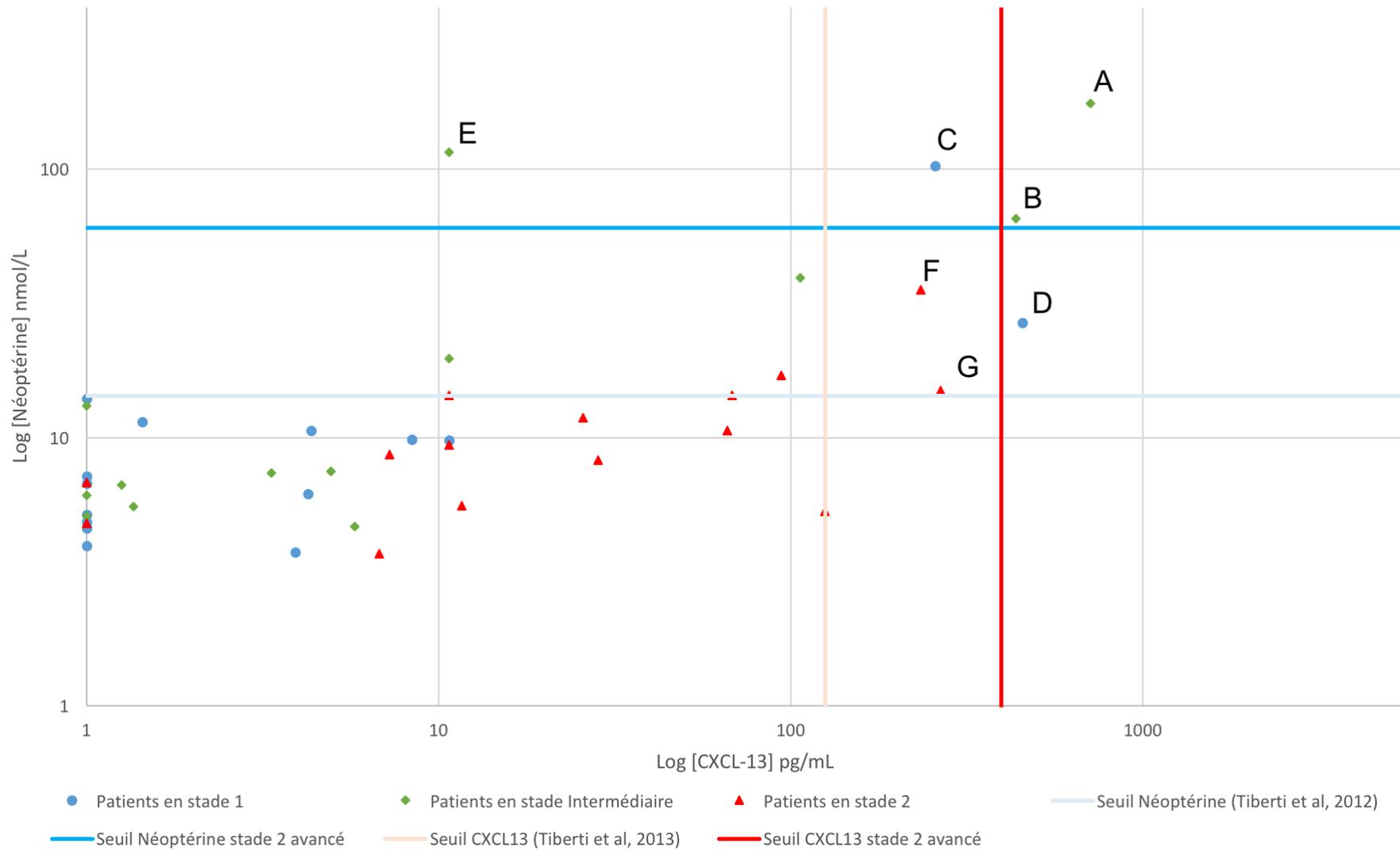


Figure 35 : Représentation du taux de néoptérine en fonction du taux de CXCL-13 pour chaque patient à 12 mois post-traitement.



4.3.2.2 Néoptérine versus Neuroserpine

Nous avons pu comparer, pour 44 patients à 12 mois post-traitement, la concentration de néoptérine à celle de neuroserpine. Au moment du diagnostic de la maladie, 16 patients étaient en stade 1, 14 patients en stade intermédiaire et 14 patients étaient en stade 2 avancé (**figure 36**). On peut observer que 8 patients (les patients A, B, C, E, H, I, J et K) ont des taux, après 12 mois de traitement, de néoptérine ou de neuroserpine supérieurs aux seuils définis comme indicateur du stade 2 ou du stade 2 avancé à l'inclusion.

- Les patients A, B, C et E sont les mêmes que ceux présents dans la **Figure 35**. Ils présentent des taux de neuroserpine et de néoptérine, à 12 mois post-traitement différents des moyennes obtenues.
 - Les patients A et B ont été diagnostiqués en rechute au 12^{ème} mois. En effet, le patient A présente des trypanosomes dans son LCR et une cytorachie de 120 cellules/ μ L. Pour le patient B, des trypanosomes sont retrouvés dans son sang mais pas dans son LCR, sa cytorachie est de 29 cellules/ μ L.
 - Le patient C a été diagnostiqué en rechute au suivi du 18^{ème} mois. Au 12^{ème} mois de suivi, il n'a pas de trypanosome dans son LCR et une cytorachie de 14 cellules/ μ L mais il sera diagnostiqué en rechute 6 mois plus tard avec des trypanosomes dans son LCR et une cytorachie de 159 cellules/ μ L.
 - Le patient E a un LCR qui semble normal à l'examen au 12^{ème} mois. Toutefois, des trypanosomes seront retrouvés dans son LCR ainsi qu'une cytorachie de 44 cellules/ μ L au 24^{ème} mois de suivi, il est donc déclaré en rechute.
- Le patient H présente également un taux de neuroserpine caractéristique d'un stade 2 à l'inclusion. Son taux de néoptérine est lui proche du seuil déterminé pour le stade 2 par Tiberti et al en 2012. Ce patient ne présente pourtant aucun signe évocateur d'une possible rechute (à 12 mois aucun trypanosome dans le LCR et une cytorachie à 4 cellules/ μ L) et sera déclaré guéri au 24^{ème} mois.
- Le patient I a un taux de néoptérine qui semble normal, cependant, son taux de neuroserpine est révélateur du stade 2. Au 12^{ème} mois de suivi, le LCR de ce patient est hémorragique, aucun parasite n'est retrouvé et la cytorachie est faible (2 cellules/ μ L). Il est à noter qu'au 18^{ème} mois de suivi, une infection par le paludisme a été suspectée sur la base de symptômes évocateurs mais n'a pas été confirmée par des examens parasitologiques. Ce patient à été déclaré guéri au 24^{ème} mois.

- Le patient J a un taux de neuroserpine inférieur à 4,99 ng/mL (caractéristique du stade 2 au moment du diagnostic) à 12 mois post-traitement. À ce suivi, sa cytorachie est de 2 cellules/ μ L et aucun trypanosome n'est retrouvé dans son LCR. Toutefois, une infection urinaire a été diagnostiquée chez ce patient. Au 18^{ème} mois de suivi, l'infection urinaire diagnostiquée est toujours présente. De plus, le diagnostic de paludisme est évoqué. Puis au 24^{ème} mois de suivi, ce patient rechute avec une cytorachie de 7 cellules/ μ L et présence de trypanosomes dans son LCR.
- Le patient K présente également un taux de neuroserpine révélateur du stade 2 au moment du diagnostic. Au suivi à 12 mois, ce patient présente encore des troubles du comportement (troubles des fonctions supérieures et syndromes cérébelleux) ainsi qu'une anxiété très prononcée. Toutefois, aucun trypanosome n'est retrouvé dans son LCR et il présente une cytorachie de 1 cellule/ μ L. Il sera déclaré indemne au suivi à 24 mois post-traitement.

Le patient D est le même que celui présent dans la **Figure 33**. Il sera diagnostiqué en rechute 24 mois après son traitement mais au suivi au 12^{ème} mois, ses taux de neuroserpine et de CXCL-13 ne sont pas anormaux.

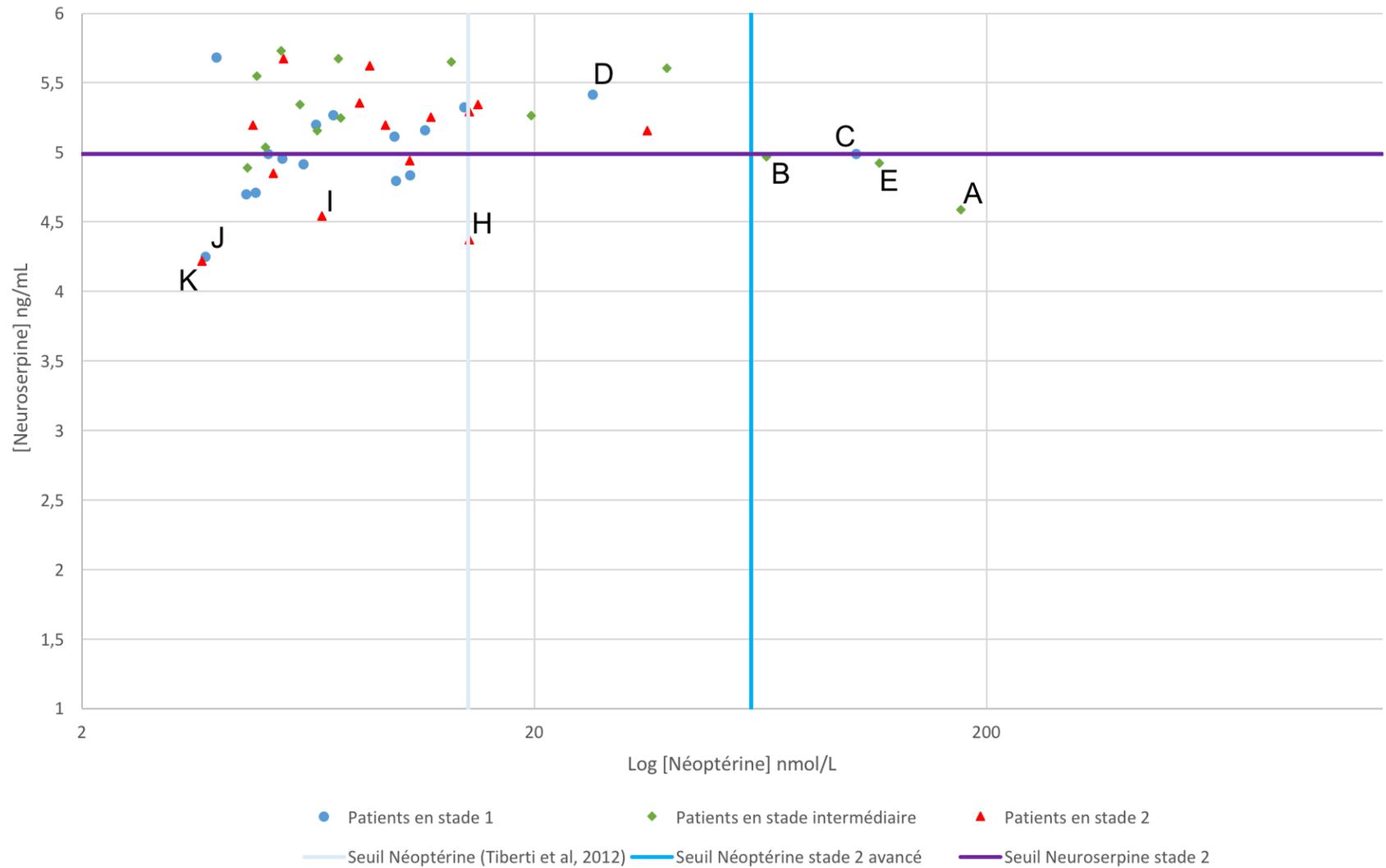


Figure 36 : Représentation du taux de néoptérine en fonction du taux de neuroserpine pour chaque à 12 mois post-traitement.



4.3.2.3 CXCL-13 versus Neuroserpine

Nous avons pu comparer la concentration de CXCL-13 de 44 patients, par rapport à leur concentration en neuroserpine à 12 mois post-traitement. Au moment du diagnostic de la maladie, 16 patients étaient en stade 1, 14 patients en stade intermédiaire et 14 patients étaient en stade 2 avancé (**Figure 37**). On peut observer que 7 patients (les patients A, B, D, H, I, J et K) ont des taux de CXCL-13 ou de neuroserpine caractéristiques du stade 2 à l'inclusion.

- Les patients A, B et D sont les mêmes que ceux présents dans les **Figures 35 et 36**. Ils présentent des taux de CXCL-13, après 12 mois de traitement, supérieurs au seuil défini comme caractéristique du stade 2 avancé à l'inclusion.
 - o Les patients A et B ont été diagnostiqués en rechute au suivi du 12^{ème} mois. À 12 mois, le patient A présente des trypanosomes dans son LCR et une cytorachie de 120 cellules/ μ L. Pour le patient B, des trypanosomes sont retrouvés dans son sang mais pas dans son LCR, sa cytorachie est de 29 cellules/ μ L.
 - o Le patient D a été diagnostiqué en rechute au suivi du 24^{ème} mois avec la découverte de trypanosomes dans son LCR et une cytorachie de 66 cellules/ μ L.
- Les patients H, I, J et K sont les mêmes que dans la **Figure 36**. Leurs taux de CXCL-13 semblent normaux mais ils ont tous un taux de neuroserpine supérieur au seuil pour discriminer le stade 2 à l'inclusion.
 - o Le patient H ne présente aucun signe de rechute ; aucun trypanosome dans son LCR et une cytorachie faible (4 cellules/ μ L) observée à 12 mois.
 - o Le LCR du patient I est hémorragique au 12^{ème} mois de suivi. Aucun parasite n'est retrouvé et la cytorachie est faible (2 cellules/ μ L). Au 18^{ème} mois de suivi, un paludisme a été suspecté.
 - o Le patient J a une cytorachie de 2 cellules/ μ L au suivi à 12 mois post-traitement et aucun trypanosome n'est retrouvé dans son LCR. Cependant, une infection urinaire a été détectée à l'examen. Cette dernière est à nouveau détectée au suivi à 18 mois post-traitement ainsi qu'un paludisme.

- Le patient K présente des troubles du comportement ainsi qu'une forte anxiété au suivi à 12 mois mais aucun trypanosome n'est retrouvé dans son LCR et il présente une cytorachie nulle.
- Les patients H, I et K seront déclarés guéris au 24^{ème} mois et le patient J rechute avec une cytorachie à 7 cellules/ μ L et avec des trypanosomes dans le LCR.

Les patients C, F et G sont les mêmes que ceux présents dans les **Figures 35 et 36**. Ils présentent tous les trois un taux de CXCL-13 supérieur à celui défini par Tiberti et al en 2013 mais leurs niveaux de neuroserpine sont normaux. Parmi ces 3 patients, le patient C sera diagnostiqué en rechute au 18^{ème} mois de suivi post-traitement. Au 12^{ème} mois de suivi, il n'a pas de trypanosome dans son LCR et une cytorachie à 14 cellules/ μ L mais il sera diagnostiqué en rechute 6 mois plus tard avec des trypanosomes dans son LCR et une cytorachie de 159 cellules/ μ L.

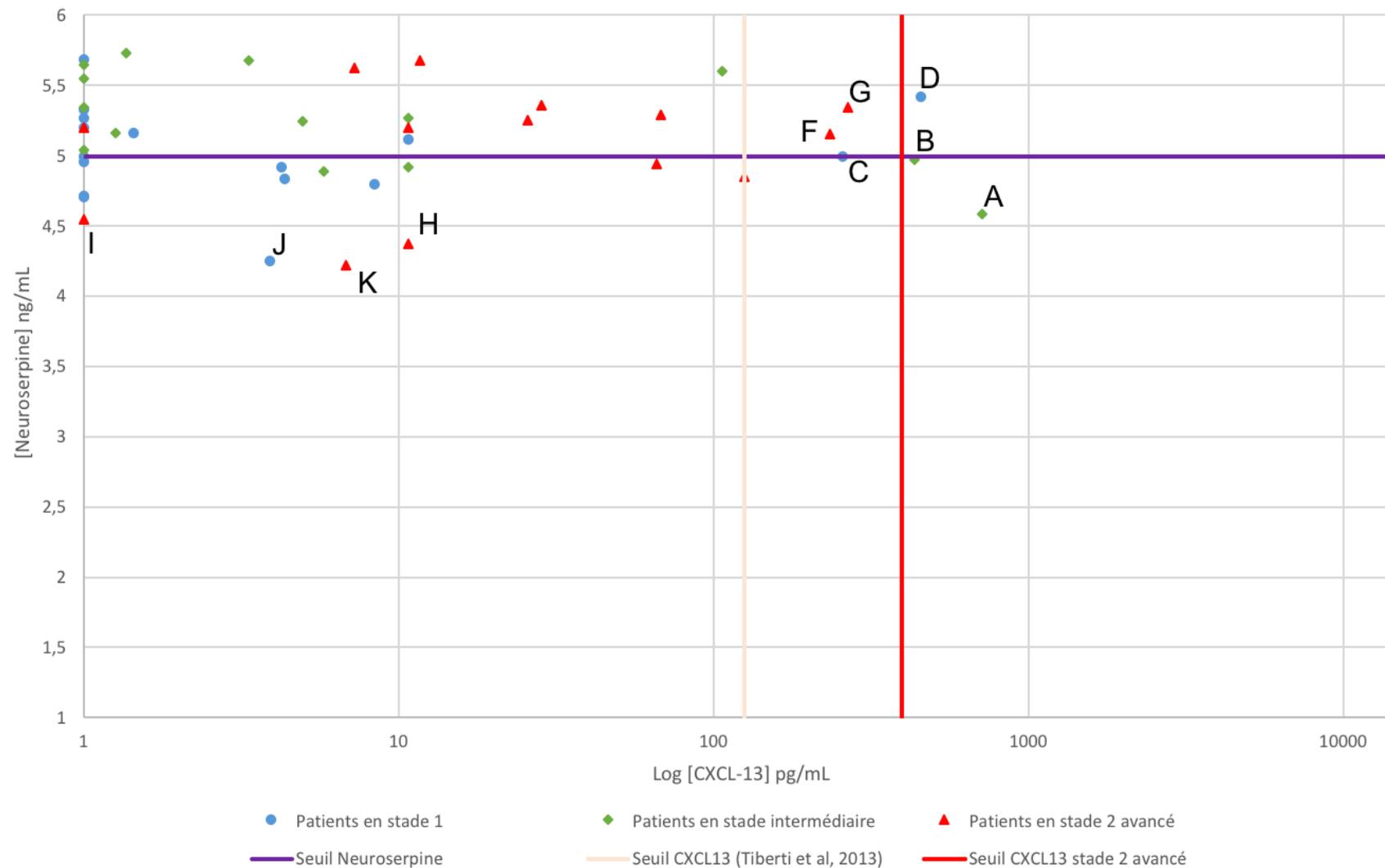


Figure 37 : Représentation du taux de neuroserpine en fonction du taux de CXCL-13 pour chaque patient à 12 mois post-traitement



Discussion

Par définition, la fin d'une épidémie signifie souvent le retour à une situation dite « normale ». Sur le terrain, cela se traduit notamment par l'abandon de certaines mesures pour la gestion de cette crise épidémiologique. Dans le cas de la THA, pourra-t-on vraiment parler de retour à la normale un jour ? Les derniers chiffres officiels de l'OMS pour 2016, font état de moins de 3 000 cas de THA à *T. b. gambiense* (WHO, 2016; Büscher et al., 2017). Ces chiffres traduisent-ils la réalité du terrain ? En effet, quelle est la situation en République Centrafricaine, au sud du Tchad et dans toutes les régions inaccessibles aux campagnes de prospections ? A l'heure actuelle, l'exploitation des biobanques d'échantillons de patients atteints de THA est la seule façon de continuer à étudier la biologie de cette parasitose. A Limoges, la présence de la biobanque financée par FIND entre 2008 et 2011 a pour objectif de répondre à certaines interrogations sur le diagnostic de cette maladie tropicale négligée.

Dans le cadre de notre thèse, nous avons pu orienter nos recherches sur l'identification de nouveaux biomarqueurs de la maladie et de stades de la THA. Nous nous sommes intéressés à la théorie du stade intermédiaire de la maladie dans un premier temps. Puis nous avons analysé, pour la première fois à notre connaissance, 4 fluides biologiques (sérum, LCR, salive et urine) issus de cette biobanque par une technique de LC MS/MS permettant une approche globale du protéome d'individus contrôles et de patients.

Le stade intermédiaire pourrait se définir comme une phase de transition entre le stade hémolympatique et le stade nerveux. A ce stade la présence parasitaire reste marginale dans le LCR, ce qui pourrait s'expliquer, en outre, par différents travaux mettant en avant le passage intra ou trans cellulaire du parasite. Ainsi les travaux de biologie cellulaire initiés par Abolarin et al (1982) sur *T. b. brucei* et ceux de Ormerod and Hussein (1986) sur *T. b. rhodesiense* ont montré la capacité du parasite à envahir différentes cellules constituant de l'épithélium des plexus choroïdes de la souris. Puis les travaux de Nikolskaia et al (2006) ont montré la capacité de *T. b. gambiense* à envahir les cellules endothéliales cérébrales humaines. D'autre part ces auteurs indiquent que la forme intracellulaire du parasite est largement minoritaire par rapport à la forme extracellulaire. Cependant, le rôle physiologique de ces formes intracellulaires du parasite n'est pas encore bien défini. Pour l'instant la viabilité du parasite intracellulaire ainsi que sa capacité à ressortir de la cellule n'ont pu être confirmées. La présence du trypanosome (*T. b. brucei*) a aussi été décrite dans des cellules gliales de rats présentes en périphérie des tissus nerveux (Stoppini et al., 2000) et nos travaux ont montré que *T. b. brucei* semble être également capable d'envahir les cellules gliales humaines *in vitro* suggérant que cette souche non pathogène pour l'Homme a l'équipement protéique et enzymatique adapté à ce genre de

migration (Bonnet et al., 2017a). Dans ce contexte, il est tentant d'imaginer que le trypanosome puisse pénétrer les cellules constituant de la BHE et envahir le SNC. Cette migration transcellulaire pourrait ainsi expliquer certaines manifestations biologiques et cliniques observées en stade 1 de la THA : on peut citer la synthèse d'IgM, d'IgG et d'anticorps spécifiques du trypanosome au niveau intrathécal ainsi que les mécanismes neuro-inflammatoire et d'altération de la BHE (Bisser et al., 2002; Girard et al., 2003; Lejon et al., 2003) ; sur le plan clinique, la présence de troubles neurologiques est décrite chez 20% des patients en stade 1 (Bertrand et al., 1973; Boa et al., 1988; WHO, 2013) ; des troubles du sommeil sont également observés chez des patients en stade 1 (sommolence chez 18% des patients et insomnie chez 73% des patients) ainsi que des troubles d'ordre psychiatrique (moins de 10%) (Boa et al., 1988; Blum et al., 2006b; WHO, 2013).

Les travaux que nous avons effectués sur les échantillons des patients susceptibles d'être en stade intermédiaire (cytorachie comprise entre 5 et 20 cellules et sans trypanosome dans le LCR) ont permis de définir dans le LCR des taux de néoptérine compris entre 15,6 nmol/L et 60,3 nmol/L et de CXCL-13 compris entre 91,2 pg/mL et 395,4 pg/mL (Bonnet et al., 2017b). La néoptérine est une ptéridine, un composé pyrazino-pyrimidine, synthétisé par les monocytes et les macrophages en réponse à la production d'INF- γ par des cellules T activées (Brown et al., 1989). Cette ptéridine est un marqueur d'inflammation précoce pour de nombreuses pathologies (Huber et al., 1984; Murr et al., 2002; Wirleitner et al., 2002) : Par exemple une augmentation du taux de néoptérine est observée au début de certaines formes de lymphomes du SNC (Viaccos et al., 2015), de certaines infections virales (Berdowska and Zwirska-Korczala, 2001; Murr et al., 2002), y compris le VIH (Fuchs et al., 1988; Wirleitner et al., 2005; Hagberg et al., 2010). Par ailleurs, elle est actuellement proposée comme outil pour contrôler les échantillons des donneurs de sang et améliorer la détection de maladies virales transmissibles lors de transfusions sanguines (Renneberg et al., 2013; Ashfaq et al., 2017). Quant à CXCL-13, c'est un chimio-attractant pour les lymphocytes et qui permet notamment l'extravasation leucocytaire (Lalor and Segal, 2010; Rainey-Barger et al., 2011). Une altération de la concentration plasmatique de CXCL-13 est associée à l'activation de la réponse immunitaire de l'hôte et peut-être utilisée comme indicateur du cancer du sein (Panse et al., 2008), de la vascularite cutanée (Sansonno et al., 2008) ou de divers lupus (Lee et al., 2010; Wong et al., 2010). Les niveaux de CXCL-13 dans le LCR sont aussi associés à la neuroborreliose (Hytönen et al., 2014), à la neurosyphilis associée à une infection par le VIH (Marra et al., 2010) ou à la sclérose en plaques (Khademi et al., 2011). Ces deux protéines sont impliquées dans la réponse immunitaire précoce. Dans le cas de THA, elles pourraient présenter un grand intérêt pour caractériser une réponse physiologique quant à la présence

du trypanosome lors de l'envahissement du SNC. Une altération des taux de néoptérine et de CXCL-13 dans le LCR chez des patients en stade intermédiaire indique donc la mise en place d'une réponse immunitaire précoce au niveau cérébral qui traduirait le début de la neuro-inflammation (Courtioux et al., 2009; Tiberti et al., 2012, 2013).

Notre travail indique que pour un taux de néoptérine inférieur à 15,6 nmol/L ou un taux de CXCL-13 inférieur à 91,2 pg/mL, les patients pourraient être considérés et traités comme des patients en stade 1 (Bonnet et al, 2017b). Un taux de néoptérine supérieur à 60,3 nmol/L ou un taux de CXCL-13 supérieur à 395,4 pg/mL pourrait être caractéristique des patients en stade 2. Les patients dont les taux de néoptérine et de CXCL-13 sont compris entre ces deux seuils pourraient être considérés en stade intermédiaire. Ces patients que l'on classifie en stade intermédiaire sont actuellement considérés en stade 2 par l'OMS qui ne se base que sur la cytorachie et sont donc traités avec des molécules pour des patients en stade 2. Pour notre cohorte d'étude, les troubles neurologiques et les troubles du sommeil n'apparaissent en moyenne que lorsque le patient a une cytorachie supérieure à 16 cellules et le parasite est trouvé que lorsque la cytorachie atteint 50 cellules en moyenne. Ces seuils sont bien sûr fonction de l'échantillon étudié, mais la tendance reste la même à savoir que la cytorachie définie par l'OMS à 5 cellules ne semble pas être un critère de diagnostic de stade satisfaisant. Un autre argument en faveur de ce choix inadapté de seuil est le nombre de rechutes thérapeutiques en fonction du stade. En prenant en compte, cette fois-ci, le suivi des patients ayant rechutés sur l'ensemble de la cohorte FIND Angola, 11 cas de rechutes sur les 228 patients inclus ont été identifiés (**Tableau 7**). Sur ces 11 cas, 1 semble être dû à une erreur de traitement (pentamidine administré à la place de DFMO). Pour les 10 autres cas, 2 patients en stade 2 avancé (avec une cytorachie supérieure à 20 cellules ou la présence de trypanosomes dans le LCR) ont rechuté à la suite d'un traitement à l'éflornithine. Ces deux patients, au moment du traitement, avaient une cytorachie supérieure à 150 cellules/ μ L et des trypanosomes ont pu être mis en évidence lors de l'examen du LCR. Les 8 autres cas de rechutes étaient des patients traités à la pentamidine. Parmi eux 4 étaient classés comme des stades 1 et les 4 autres étaient classés comme des stades intermédiaires. Ces données permettent d'évaluer les taux de rechutes en fonction des stades: 6% des patients en stade 1 ont rechuté avec un traitement à la pentamidine et 2% des patients en stade 2 avancé (> 20 cellules/ μ L de LCR) ont rechuté avec un traitement au DFMO. Pour les patients en stade intermédiaire (cytorachie comprise entre 5 et 20 cellules et sans trypanosome dans le LCR) il est plus difficile de tirer des conclusions car 79% patients ont été traités avec la pentamidine et les patients restant (21%) ont été traités avec du DFMO. Pour ces patients en stade intermédiaire, le taux de rechutes s'élève à 11%. Une étude de Balasegaram et al (2006) sur

des patients présentant une cytorachie comprise entre 6 et 10 cellules par μL traités avec de la pentamidine indique que le taux de rechute est de 12%. Pour des patients en stade intermédiaire, des facteurs autres que la cytorachie méritent donc d'être pris en compte pour le choix thérapeutique.

En dosant la néoptérine et CXCL-13 sur ces échantillons de patients à 12 mois post-traitement, 5 ont des taux de néoptérine et de CXCL-13 supérieurs aux seuils que nous avons mis en évidence définissant un stade 2 avancé. Parmi ces patients, 2 sont déclarés en rechute au 12^{ème} mois, 1 au 18^{ème} mois et 2 autres au 24^{ème} mois post-traitement. Ceci semble indiquer que ces deux biomarqueurs pourraient permettre également un diagnostic précoce des rechutes, et cela à partir du 12^{ème} mois post-traitement. Cette recherche devra être vérifiée peut être plus précocement dès le 6^{ème} mois post-traitement. Deux autres patients ont rechuté avec des taux de néoptérine et de CXCL-13 dans les normes. Ce sont deux patients en stade 1 et traités avec de la pentamidine. La particularité de ces deux patients est qu'ils travaillent tous les deux dans la même exploitation agricole et plus précisément dans la même zone géographique. Pour ces deux patients, la probabilité d'une réinfection sur leur lieu de travail est fortement envisagée. Cette hypothèse expliquerait leurs faibles taux de néoptérine et de CXCL-13 dans leurs LCR. Les résultats des 4 autres patients ayant rechuté n'ont pas pu être exploités à ce stade.

Peu d'études se sont intéressées aux suivis des patients en utilisant la cinétique des biomarqueurs identifiés lors du diagnostic de stade. Seuls les travaux menés par Tiberti et al (2013), proposent l'utilisation de la néoptérine et de CXCL-13 comme marqueurs de rechute. Cette étude se focalisant uniquement sur les patients en stade 2 ayant rechuté et sur un suivi à 12 mois post-traitement. Il apparaît par ailleurs que la néoptérine est un meilleur marqueur que CXCL-13 pour détecter les patients en rechute (Tiberti et al., 2013). Notre travail confirme l'intérêt de la néoptérine comme biomarqueur de rechutes à 12 mois post-traitement. L'association de la néoptérine et de la CXCL-13 amplifie ce pouvoir prédictif des rechutes.

Les résultats de nos travaux sur le dosage de la néoptérine et de CXCL-13 pourraient permettre de formuler de nouvelles recommandations :

- 1) traiter des patients en stade intermédiaire (5-20 cellules/ μL de LCR et sans trypanosome) avec de la pentamidine.
- 2) réaliser un dosage de néoptérine et de CXCL-13 à 12 mois pour tous les patients quelque soit le traitement permettant ainsi un meilleur contrôle des rechutes.

Cette discussion autour de la définition de stade et la prise en charge thérapeutique a fait l'objet d'autres études (Pépin and Milord, 1994; Doua et al., 1996). La mise en place d'un

traitement pour les stades intermédiaires avec la pentamidine semble beaucoup plus indiquée que l'utilisation d'un traitement de stade 2 comme le NECT ou le mélarsozol qui sont plus contraignants ou plus à risque pour le patient. Il faut avoir à l'esprit que dans les prochaines années, le développement de nouvelles molécules thérapeutiques telles que le fexinidazole et le SCYX-7158, actives sur le stade hémolympatique et le stade nerveux, facilitera la prise en charge des patients (Torreele et al., 2010 ; Jacobs et al., 2011b; Mäser et al., 2012; Sutherland et al., 2017). Malgré tout, le suivi des patients post-traitement devrait rester un élément clé de la lutte contre la réémergence de foyers de THA. Des cas d'échecs thérapeutiques pouvant s'apparenter à des rechutes ont été observés pour chacun des traitements utilisés actuellement dans le cas de la THA à *T. b. gambiense*. Pour les traitements avec la pentamidine, une étude rétrospective menée sur une cohorte de patients congolais par Balasegaram et al (2006) a montré que 4% des patients rechutent dans les 18 mois post-traitement. Ces taux ont ensuite été confirmés par les derniers chiffres de l'OMS, faisant état d'un taux d'échec variant de 4 à 7% (WHO, 2013). Pour ce qui est des traitements des patients en stade 2, le taux de rechutes à la suite d'un traitement avec du mélarsozol peut atteindre jusqu'à 59% (Yun et al., 2010). Plus récemment il a été montré que le taux de rechute oscille entre 10 et 30% en fonction des régions (Babokhov et al., 2013). De tels taux d'échecs thérapeutiques avec le mélarsozol suggèrent que l'apparition de résistances pourraient en être une des causes (Barrett et al., 2007; Yun et al., 2010). Une étude récente basée sur des données génétiques soutient cette hypothèse (Richardson et al., 2016). Ces taux de résistance aux traitements couplés aux effets toxiques observés ont contribué à l'abandon du mélarsozol comme traitement actif du stade 2 de la THA à *T. b. gambiense*. Pour les traitements à l'éflornithine (DFMO), le taux d'échecs thérapeutiques annoncé par l'OMS est de 3% lorsqu'il est administré sur une durée de 14 jours et de 13% lorsque la durée d'administration est de 7 jours (WHO, 2013). L'administration de la molécule sur 14 jours paraît être le plus efficace. Enfin, le NECT semble être le traitement entraînant le moins de rechutes avec tout de même 2% de rechutes entre le 5^{ème} et le 13^{ème} mois de suivi (Franco et al., 2012).

Même si de nouveaux schémas thérapeutiques sont proposés dans les années à venir l'OMS souligne que ces traitements doivent être associés à un outil de diagnostic fiable et adapté au terrain pour faciliter la gestion de la THA. Dans l'avenir, la mise au point d'un nouvel outil de détection rapide de la maladie, à la fois sensible, spécifique et le moins invasif possible, reste l'une des clés du contrôle de cette maladie négligée. La recherche et l'utilisation de biomarqueurs, applicables comme outils diagnostics, permettront de faciliter le contrôle de la pathologie chez l'Homme.

L'évolution des techniques protéomiques basées sur la spectrométrie de masse a permis de faire avancer la recherche médicale sur l'identification de nouveaux biomarqueurs grâce à une approche globale du protéome (Johann et al., 2004; Meng and Veenstra, 2007; Guest et al., 2013; Rouillon et al., 2014, 2015; Collins et al., 2015; Beretov et al., 2015; Wu et al., 2015). Cette recherche s'élargit maintenant à l'ensemble des fluides biologiques tels que le sérum, le LCR et l'urine. Ces innovations technologiques ont motivé nos choix d'exploitations des échantillons de la biobanque FIND.

Les fluides biologiques sont de compositions protéiques complexes variants d'un fluide à l'autre que l'on peut définir par des concentrations protéiques avec de larges gammes dynamiques (Frantzi et al., 2014). Ceci est d'autant plus vrai pour le sérum où la gamme dynamique peut atteindre 10 fois l'ordre de grandeur d'un LCR (Anderson, 2005; Anderson and Anderson, 2002; Hu et al., 2006). Millionni estime dans une étude que les protéines dont les concentrations dans le plasma sont inférieures à 100 ng/mL sont difficilement identifiables en spectrométrie de masse (Millioni et al., 2011). Une étude plus récente menée par Zubarev (2013) montre que l'analyse par spectrométrie de masse d'un fluide biologique ne peut couvrir que 3 à 4 ordres de grandeur de la gamme dynamique. Dans cette étude les auteurs montrent que les techniques modernes de spectrométrie de masse ne sont pas capables d'identifier les protéines les moins abondantes. En effet, sur 10 000 gènes exprimés, plus de 1 000 protéines ne seront pas identifiées par spectrométrie de masse. Zubarev définit donc le « dark corner » de la protéomique regroupant l'ensemble des protéines dont le nombre de copies par cellules est inférieur à 500 (Zubarev, 2013; Maes et al., 2015). Et pourtant, les meilleurs candidats biomarqueurs appartiennent majoritairement à cette catégorie. Leur détection dans le sérum est souvent complexe étant donné que plus de 95% de la teneur totale en protéines provient de seulement 5 protéines hyper-abondantes (Fountoulakis et al, 2004; Ramström et al, 2005). L'une des solutions pour faciliter la détection des protéines les moins abondantes est de réduire la complexité de l'échantillon, comme nous l'avons fait en déplaçant nos échantillons de sérum et de LCR (Bonnet et al, 2017c). Cette déplétion a permis de réduire l'abondance de ces protéines hyper représentées, comme l'albumine.

Pour l'étude en spectrométrie des échantillons de sérum, il n'a pas été possible de mettre en évidence des biomarqueurs pour la THA. La principale raison semble être la présence en grande quantité de protéines majoritaires malgré l'étape de déplétion. Cette absence de résultats sur les sérums ne signifie pas que ce fluide biologique est trop complexe à analyser. Ainsi une étude de métabolomique menée par Vincent et al (2016) sur 56 patients de la cohorte FIND Angola (16 contrôles, 20 patients en stade 1 et 20 patients en stade 2 avancé) a permis de mettre en évidence 2 métabolites avec des abondances relatives significativement

différentes chez des patients en stade 1 et 2 de la THA. Ces deux métabolites sont l'ornithine et l'acide aminododécanoïque. Ce fluide biologique présente donc un intérêt majeur pour la recherche de biomarqueur. De nouveaux protocoles de déplétion doivent permettre d'aboutir à l'identification de protéines d'intérêts dans ce fluide.

Le LCR est également un fluide d'intérêt pour le diagnostic de stade de la THA en raison de sa proximité avec le cerveau. La surveillance des modifications de compositions protéiques du LCR peut être utilisée comme un indicateur sensible des pathologies du SNC (Frantzi et al., 2014). Des études de protéomique ont permis de découvrir des biomarqueurs potentiels dans de nombreuses atteintes cérébrales telles que les maladies neurodégénératives comme la sclérose latérale amyotrophique (Barschke et al., 2017), la maladie d'Alzheimer (Finehout et al., 2007; Collins et al., 2015), pour le suivi de certaines tumeurs cérébrales (Khwaja et al., 2007) ou encore dans le cas d'hémorragies (Lad et al., 2012). Dans le LCR, en condition normale, la concentration en protéines est 100 à 400 fois moins élevée que dans le sérum (Aldred et al., 2004). L'identification de protéines spécifiques de l'altération du LCR en est donc facilitée.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence dans le LCR des patients atteints de THA 159 protéines d'origine humaine dont l'abondance est différente en fonction des individus contrôles, des patients en stade 1 et en stade 2 et 6 protéines d'origine parasitaire. Après une analyse bibliographique de chacune de ces protéines, nous avons identifié 37 protéines d'intérêt en raison de leurs activités biologiques au sein du SNC, de leurs liens avec les processus infectieux . Parmi ces protéines, on retrouve :

- des protéines impliquées dans la croissance et le maintien de l'intégrité des neurones comme la neurofascine. Cette protéine est impliquée dans la croissance et la protection des neurites (axones ou dendrites) (Koticha et al., 2005; Basak et al., 2007; Zonta et al., 2011). Elle intervient également lors de la formation et la croissance des nœuds de Ranvier lors des premiers stades du développement (Koticha et al., 2006).
- On retrouve également des protéines impliquées plus spécifiquement dans la régénération axonale comme la testican 1 (Iseki et al., 2011) et dans la régulation de la production de myéline comme la contactine 1 (Çolakoğlu et al., 2014) et la contactine 2 (Traka et al., 2002). Pour la THA, une démyélinisation est observée au stade 2 de la maladie (Courtioux et al., 2008; Malvy and Chappuis, 2011; Cnops et al., 2016; Ponte-Sucre, 2016) ainsi que la présence d'auto-anticorps dirigés contre les galactocérébrosides constituant la gaine de myéline (Amevigbe et al., 1992). Une

altération de la concentration de ces protéines en fonction du stade de la maladie semble donc cohérente.

- Certaines protéines identifiées interviennent aussi dans la plasticité synaptique et permettent donc un maintien des fonctions cognitives. C'est le cas de la cérébelline 4 (Eiberger and Schilling, 2012) et de la protéine VGF (Vereinigte Glanzstoff-Fabriken) (Levi et al., 1985) dont l'action permet le maintien des processus impliqués dans la mémoire (Alder et al., 2003).
- Parmi les 37 protéines retenues, on retrouve également des protéines en lien avec l'équilibre neuro-psychologique du patient. C'est le cas de la protéine VGF qui agit également comme un anti-dépresseur (Alder et al., 2003). La protéine MCH (Melanin Concentrating Hormone) permet elle de réguler l'anxiété et la prise alimentaire (sensation de satiété). Elle joue aussi un rôle dans la régulation de l'éveil et du cycle circadien (Hervieu, 2003; Verret et al., 2003).

L'ensemble de ces protéines pourraient avoir un lien fort avec la physiopathologie de la THA, c'est ce qui les rend particulièrement intéressantes dans cette recherche de biomarqueurs.

Parmi les 37 protéines, nous en avons sélectionné 3 afin de vérifier leur potentiel intérêt comme biomarqueur sur un nombre plus important d'individus issus de la cohorte FIND Angola. Ces trois protéines sont la **Neuroserpine**, la **Néogénine** et la **Sécrétogranin 2** :

- La neuroserpine intervient dans l'axogénèse, dans la plasticité synaptique ainsi que dans les processus liés à la mémorisation et au développement cérébral (Osterwalder et al., 1996; Caccia et al., 2010; Lee et al., 2015).
- La néogénine est une protéine impliquée dans l'apoptose et la différenciation neuronale ainsi que dans le guidage de l'axone lors de l'axogénèse (Wilson and Key, 2007; Fujita and Yamashita, 2017).
- Enfin, la sécrétogranine 2 est elle aussi impliquée dans la croissance des neurites et a un effet chémo-attractant pour les monocytes, les éosinophiles et les cellules dendritiques (Fischer-Colbrie et al., 2005).

Nos résultats sur les patients de la cohorte FIND, indiquent que la neuroserpine permet, de discriminer les patients en stade 1 des patients en stade 2. Une diminution du taux de neuroserpine dans le LCR des patients en dessous du seuil de 4,99 ng/mL apparaît comme caractéristique d'un stade 2 de la maladie. Toutefois, la sensibilité (58%) et la spécificité (94%) ne sont pas encore satisfaisantes dans l'optique d'un outil de terrain. La valeur de la sensibilité à 58% étant relativement faible, ceci indique que ce biomarqueur a 42% de chances de mettre

en lumière un faux positif. Les **Figures 33 et 34** montrent que 16 patients en stade intermédiaire sur 20 ont un taux de neuroserpine au dessus de 4,99 ng/mL alors que 21 patients en stade 2 avancé sur 23 ont un taux de neuroserpine inférieur à ce seuil. Ce résultat reste prometteur quant à la précocité d'expression de cette protéine dans un contexte de neuro-inflammation. Pour ce qui est de l'utilisation de la neuroserpine comme indicateur de rechute lors du suivi des patients, cette protéine ne semble pas être un bon indicateur comme on le voit sur les **Figures 36 et 37**. En effet à 12 mois post-traitement, 38% des patients (17/44) ont un taux de neuroserpine en dessous du seuil caractéristique des patients en stade 2. Parmi ces patients, 23% (4/17) sont des patients qui vont rechuter. Les 3 autres patients en rechute ont un taux de neuroserpine supérieur à 4,99 ng/mL de LCR. La cinétique de cette protéine semble indiquer une augmentation rapide en début d'infection avec une diminution franche à la suite du traitement, et cela avec ou sans rechute.

Notre étude protéomique menée sur le LCR a également montré d'un point de vue qualitatif que le nombre de protéines, chez les patients en stade 2 est moins élevé que chez les individus contrôles et les patients en stade 1. L'une des hypothèses pouvant expliquer cette baisse du nombre de protéines en fonction du stade infectieux pourrait être la fuite ou la résorption de ces protéines du LCR vers le compartiment sanguin en raison de la perméabilisation de la BHE (Jurado and Walker, 1990). Ce mécanisme de diffusion protéique est confirmée par l'identification de protéines présentes du sérum comme les apolipoprotéines, l'albumine, la transthyrétine et les protéines du complément dans le LCR des patients en stade 2. Ceci montre une transsudation possible à travers la BHE. Cette altération précoce ou transitoire de la BHE traitée tôt pourrait expliquer la rémission de certains patients en stade intermédiaire à la suite d'un traitement avec des molécules de stade 1 (Pépin and Milord, 1994; Ollivier and Legros, 2001; Ruiz et al., 2002; Balasegaram et al., 2006b, Bisser communication personnelle).

Dans la quête du biomarqueur « idéal », l'origine du fluide biologique est important tant il est plus aisé de prélever de la salive ou de l'urine. Ces fluides corporels présentent l'avantage d'être collectés de manière non invasive, non douloureuse et non stressante pour le patient. En outre, la possibilité d'un autodiagnostic est envisageable dans ce contexte (Malamud, 2011; Nunes et al., 2015; Lindsay and Costello, 2017; Prasad et al., 2016). D'un point de vue biologique ces fluides sont relativement pauvres en protéines interférentes et sont stables (leur activité moléculaire ne change pas beaucoup après l'échantillonnage). Actuellement, de nombreux biomarqueurs sont recherchés dans la salive pour le suivi et le diagnostic de diverses pathologies ; par exemple, dans le cas de pathologies neurologiques comme la maladie de Parkinson où une diminution de l' α -synucléine dans la salive semble être

caractéristique (Al-Nimer et al., 2014). D'autres biomarqueurs salivaires ont été proposés dans le cas de certains cancers (Jenzano et al., 1986; Streckfus et al., 2000) ; on retrouve notamment parmi ces biomarqueurs la kallikréine (Prezas et al., 2006) et la cathépsine également identifiées dans notre analyse. Certains marqueurs biologiques ont aussi été proposés pour le diagnostic et le suivi de certains types de diabètes (Border et al., 2012; Yoon et al., 2012; Zalewska-Szajda et al., 2013). L'analyse par protéomique de la salive a également permis de mettre en évidence des biomarqueurs de pathologies neurologiques (Shi et al., 2011; Rapado-González et al., 2016) et psychiatriques telles que la schizophrénie (Wormwood et al., 2015). Pour ce qui est de l'urine, d'autres études ont permis d'identifier plusieurs biomarqueurs potentiels avec notamment l'isoprostane F2 α dont l'abondance semble être diminuée dans l'urine de patients atteints de la maladie de Parkinson par rapport à des contrôles sains (Connolly et al., 2008). Pour poursuivre avec les biomarqueurs urinaires utilisés pour le diagnostic de maladies neurologiques, l'AD7c-NTP (*Alzheimer-associated neuronal thread protein*) est retrouvé dans les urines de patients atteints de la maladie d'Alzheimer dans des proportions significativement supérieures à celles présentes dans l'urine de contrôles sains (Ghanbari et al., 1998; Zhang and Shi, 2013). Par ailleurs, la mesure dans l'urine de la pyridinoline et de la deoxypyridinoline, qui sont des constituants spécifiques des collagènes squelettiques, est actuellement utilisée pour l'identification de troubles osseux liés aux mécanismes de résorption dans le cas de pathologies telles que l'ostéoporose (Robins, 1995; Seibel et al., 1992).

Notre analyse des urines nous a permis de mettre en évidence 8 protéines d'intérêts parmi les 32 protéines dont l'abondance est différente entre les contrôles, les patients en stade 1 et les patients en stade 2. Parmi elles, on retrouve plusieurs protéines du système lysosomal associées à de nombreuses pathologies humaines telles que la N-sulphoglucosamine sulphohydrolase impliquée dans la mucopolysaccharidiose de type 3 ou syndrome de Sanfilippo (Sharkia et al., 2014; Shapiro et al., 2016) et la cathépsin S associée à la pycnodysostose (Gelb et al., 1996) et aux néphropathies chroniques (Steubl et al., 2017). On retrouve également la transthyréline dans l'urine des contrôles et des patients en stade 1 et 2. Cette protéine est également très présente dans le sérum et le LCR (Aleshire et al., 1983; Fleming et al., 2009). Le dosage dans les urines de cette protéine a été proposé comme biomarqueur pour les pré-éclampsies (Liu et al., 2011; Zhu et al., 2014). Pour la quantification par ELISA, nous avons dosé la moésine car c'est une protéine impliquée dans une autre trypanosomose : la maladie de Chagas. Cette protéine fait partie d'un groupe nommé les protéines ERM composé de l'Ezrine, de la Radixine et de la Moésine. Ce sont des protéines qui font le lien entre la membrane et l'actine du cytosquelette cellulaire permettant le

remodelage des membranes cellulaires (Fehon et al., 2010). Ces protéines assurent l'angiogénèse et sont impliquées dans les processus d'invasion des cellules par le parasite *T. cruzi*. Il semble que la protéine rP21 présente chez *T. cruzi* soit capable d'inhiber les protéines ERM et notamment la moésine (Teixeira et al., 2017). Toutefois, aucun lien biologique n'a été établi à notre connaissance entre la moésine et *T. brucei*. Les résultats de l'analyse protéomique des urines montrent que le taux de moésine est moins élevé chez les individus contrôles que chez les patients en stade 1 et 2 de la THA. Toutefois, seule la différence observée entre les contrôles et les patients en stade 2 a pu être confirmée par dosage ELISA. Ainsi, le dosage de la moésine dans les urines pourrait être utilisé pour faire le diagnostic de stade de la maladie en s'affranchissant de la ponction lombaire. Il existe toutefois quelques biais dans notre analyse des urines, notamment le moment du prélèvement des échantillons d'urines qui n'est pas spécifié précisément dans la base de données. L'idéal serait d'effectuer l'analyse urinaire sur les premières urines du matin (Bottini et al., 2002; Siddiqui et al., 2015; Witte et al., 2009). Par ailleurs, il existe une variabilité inter-individus d'environ 10% au niveau du protéome urinaire (Molina et al., 2011). Ceci peut expliquer le faible nombre de protéines urinaires retenues par rapport aux 664 protéines identifiées par protéomique. Cette variabilité, lorsque l'on utilise peu d'échantillons d'urine pour une analyse par protéomique, peut conduire à une surestimation de la précision des biomarqueurs identifiés (Frantzi et al., 2014; Mischak et al., 2010). Ceci peut également expliquer la discordance entre les résultats obtenus par analyses protéomiques (différences significatives) et par dosages ELISA (absence de différence significative) pour discriminer les contrôles, des patients en stade 1 et 2.

Le dernier protéome analysé est le protéome salivaire qui peut avoir plusieurs origines, aussi bien buccale que systémique. Il est composé à la fois des protéines sécrétées par les glandes salivaires, la muqueuse buccale, le parodonte et la microflore buccale. Le spectre d'applications de la salive en matière de diagnostic est donc large (Hu et al., 2007; J. M. Lee et al., 2009; Al-Tarawneh et al., 2011). L'analyse de la salive a révélé 24 protéines potentiellement intéressantes parmi les 137 protéines dont l'abondance est différente en fonction des contrôles, des patients en stade 1 et en stade 2. Parmi ces protéines on retrouve la radixine qui fait aussi partie des protéines ERM. Un grand nombre des protéines identifiées comme biomarqueurs potentiels sont difficilement fiables biologiquement et cliniquement à l'infection à *T. b. gambiense*. Nous avons décidé de doser une protéine appartenant à la famille des lectines : l'intélectine 2. Cette lectine est synthétisée au niveau de l'intestin grêle (Lee et al., 1997; Komiya et al., 1998). Différentes études sur modèles animaux ont montré que les intélectines 1 et 2 sont des protéines impliquées dans l'embryogenèse, les interactions hôte-

pathogène et le métabolisme du fer (Yan et al., 2013). L'intélectine 2 pourrait également être impliquée lors de l'inflammation liée à l'infection parasitaire par des parasites intestinaux (Pemberton et al., 2004; Datta et al., 2005) et l'allergie due à des allergènes aériens (Gu et al., 2010; Peebles, 2010). Il ne semble donc pas aberrant de trouver cette protéine dans une pathologie inflammatoire telle que la THA. Cependant, les niveaux d'intélectine 2 détectés par ELISA n'ont pas permis de montrer une différence d'expression entre les contrôles et les patients et entre les patients en stade 1 et 2.

Certes ce travail est inachevé et doit être poursuivi en terme de quantification ELISA mais aussi d'analyse protéomique. En effet la technique évolue rapidement et s'améliore. Lors de notre analyse, des protéines comme l'albumine sérique ont pu constituer une entrave à la détection de biomarqueurs. En effet, l'albumine est une grosse protéine connue pour se lier à des protéines, des lipides ainsi qu'à de petites molécules comprenant diverses hormones peptidiques (Carter and Ho, 1994). Ces éléments liés à l'albumine sont collectivement appelés l'albuminome. L'étape de déplétion de l'albumine affecte donc également tous ces éléments (Gundry et al., 2007; Liu et al., 2017). L'albuminome éliminé en même temps que l'albumine peut contenir un grand nombre de molécules d'intérêt qui reflètent la pathophysiologie d'une maladie (Granger et al., 2005; Liu et al., 2017). Il est naturellement possible que certaines protéines qui composent l'albuminome soient des biomarqueurs potentiels (Mehta et al., 2003; Gundry et al., 2007, 2009). Par exemple, dans le cas de certains cancers, il a été montré qu'une protéine faisant partie de l'albuminome: la protéine BRCA2 est liée à l'évolution de la maladie (Lowenthal et al., 2005).

Enfin, il faut voir un intérêt pour ces biomarqueurs dans le suivi des patients, car si même un schéma thérapeutique stade indépendant voit le jour, le suivi du patient restera un élément incontournable. Ainsi l'efficacité de la neuroserpine pour le suivi des patients semble limitée, mais notre travail a permis de mettre en lumière un bon nombre de biomarqueurs qui pourront permettre ce suivi. Les principales raisons qui poussent les autorités de santé à limiter les suivis sont la nécessité de passer par la ponction lombaire pour établir le diagnostic de rechute et le coût que représentent ces suivis. Ces problématiques pourraient disparaître avec la découverte d'un biomarqueur de rechute urinaire ou salivaire permettant de limiter les actes invasifs nécessaires pour le diagnostic de rechute et qui pourrait permettre un autodiagnostic à l'aide de TDR.

Conclusion et perspectives

Pour conclure sur notre travail, nous avons vu que les grands principes de diagnostic de la THA, pratiqués depuis des décennies sont peut-être à revoir pour ce qui est du choix du seuil de la cytorachie, pour une prise en charge du patient plus raisonné et raisonnable vis-à-vis du rapport bénéfice/risque lié aux traitements actuellement utilisés sur le terrain.

Ces aspects de prises en charge pourraient également se voir améliorer avec une meilleure connaissance du protéome des patients. En effet, pour la première fois une analyse globale de ce protéome et cela pour 4 fluides biologiques est à disposition. Ce travail est complété par des dosages ELISA sur une fraction des protéines mises en évidence. Néanmoins, il reste beaucoup de travail à réaliser pour vérifier le potentiel biomarqueur des autres protéines identifiées. Le fruit de ce travail sera à disposition de la communauté scientifique via son dépôt sur ProteomeXchange via la base données PRIDE (sous l'identifiant PDX007842).

Ce travail ouvre de nouvelles perspectives pour le développement de TDR utilisables à la fois pour le diagnostic mais aussi pour le suivi de patients à court et moyen terme. D'autre part ce travail reste à compléter pour comprendre le rôle et l'implication de ces protéines dans les mécanismes physiopathologiques de la THA.

Certes on peut s'interroger sur l'utilité d'un tel travail pour la THA où les orientations actuelles sont sur des enjeux thérapeutiques. Mais il faut avoir à l'esprit que de nouvelles molécules efficaces à tous les stades de la maladie ne régleront pas tous les problèmes de cette MTN. En effet, qu'en sera-t-il du réservoir du parasite et de sa prise en charge ? Y aura-t-il des résistances à ces nouvelles molécules et avec quelles vitesses d'apparition ? L'éradication de la THA, à court ou moyen terme comme annoncée, peut sembler utopique même si c'est un souhait à formuler.

Références bibliographiques

Ouvrages généraux

- Abdulla, M.-H., O'Brien, T., Mackey, Z.B., Sajid, M., Grab, D.J., McKerrow, J.H., 2008. RNA Interference of *Trypanosoma brucei* Cathepsin B and L Affects Disease Progression in a Mouse Model. PLoS Negl. Trop. Dis. 2. doi: 10.1371/journal.pntd.0000298
- Abolarin, M.O., Evans, D.A., Tovey, D.G., Ormerod, W.E., 1982. Cryptic stage of sleeping-sickness trypanosome developing in choroid plexus epithelial cells. Br. Med. J. Clin. Res. Ed 285, 1380–1382
- Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. Nature 422, 198–207. doi: 10.1038/nature01511
- Agrawal, S., Anderson, P., Durbeej, M., van Rooijen, N., Ivars, F., Opdenakker, G., Sorokin, L.M., 2006. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Exp. Med. 203, 1007–1019. doi: 10.1084/jem.20051342
- Alarcon, A., Garcia-Alix, A., Cabañas, F., Hernanz, A., Pascual-Salcedo, D., Martin-Ancel, A., Cabrera, M., Tagarro, A., Quero, J., 2006. Beta2-microglobulin concentrations in cerebrospinal fluid correlate with neuroimaging findings in newborns with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. Eur. J. Pediatr. 165, 636–645. doi: 10.1007/s00431-006-0160-x
- Alder, J., Thakker-Varia, S., Bangasser, D.A., Kuroiwa, M., Plummer, M.R., Shors, T.J., Black, I.B., 2003. Brain-derived neurotrophic factor-induced gene expression reveals novel actions of VGF in hippocampal synaptic plasticity. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 23, 10800–10808
- Aldred, S., Grant, M.M., Griffiths, H.R., 2004. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. Clin. Biochem. 37, 943–952. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.09.002
- Aleshire, S.L., Bradley, C.A., Richardson, L.D., Parl, F.F., 1983. Localization of human prealbumin in choroid plexus epithelium. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. 31, 608–612
- Allan, S.M., Rothwell, N.J., 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. Nat. Rev. Neurosci. 2, 734–744. doi: 10.1038/35094583
- Al-Nimer, M.S.M., Mshatat, S.F., Abdulla, H.I., 2014. Saliva α -Synuclein and A High Extinction Coefficient Protein: A Novel Approach in Assessment Biomarkers of Parkinson's Disease. North Am. J. Med. Sci. 6, 633–637. doi: 10.4103/1947-2714.147980
- Al-Tarawneh, S.K., Border, M.B., Dibble, C.F., Bencharit, S., 2011. Defining Salivary Biomarkers Using Mass Spectrometry-Based Proteomics: A Systematic Review. OMICS J. Integr. Biol. 15, 353–361. doi: 10.1089/omi.2010.0134
- Amevigbe, M.D., Jauberteau-Marchan, M.O., Bouteille, B., Doua, F., Breton, J.C., Nicolas, J.A., Dumas, M., 1992. Human African trypanosomiasis: presence of antibodies to galactocerebrosides. Am. J. Trop. Med. Hyg. 47, 652–662

- Amin, D.N., Masocha, W., Ngan'dwe, K., Rottenberg, M., Kristensson, K., 2008. Suramin and minocycline treatment of experimental African trypanosomiasis at an early stage of parasite brain invasion. *Acta Trop.* 106, 72–74. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.01.005
- Amin, D.N., Ngoyi, D.M., Nkhwachi, G.-M., Palomba, M., Rottenberg, M., Büscher, P., Kristensson, K., Masocha, W., 2010. Identification of Stage Biomarkers for Human African Trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 983–990. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0770
- Amin, D.N., Rottenberg, M.E., Thomsen, A.R., Mumba, D., Fenger, C., Kristensson, K., Büscher, P., Finsen, B., Masocha, W., 2009. Expression and Role of CXCL10 during the Encephalitic Stage of Experimental and Clinical African Trypanosomiasis. *J. Infect. Dis.* 200, 1556–1565. doi: 10.1086/644597
- Anderson, L., 2005. Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J. Physiol.* 563, 23–60. doi: 10.1113/jphysiol.2004.080473
- Anderson, N.L., Anderson, N.G., 2002. The Human Plasma Proteome History, Character, and Diagnostic Prospects. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 845–867. doi: 10.1074/mcp.R200007-MCP200
- Antoine, P., 1977. Neurological and psychological studies of patients with sleeping sickness and their course. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 57, 227–248
- Ashfaq, A., Ejaz, A., Abbas, G., 2017. Serum Neopterin: A Potential Marker for Screening Blood Donors. *J. Coll. Physicians Surg.--Pak. JCPSP* 27, 30–33. doi: 2517
- Authié, E., Boulangé, A., Muteti, D., Lalmanach, G., Gauthier, F., Musoke, A.J., 2001. Immunisation of cattle with cysteine proteinases of *Trypanosoma congolense*: targeting the disease rather than the parasite. *Int. J. Parasitol.* 31, 1429–1433
- Authié, E., Duvallet, G., Robertson, C., Williams, D.J., 1993. Antibody responses to a 33 kDa cysteine protease of *Trypanosoma congolense*: relationship to “trypanotolerance” in cattle. *Parasite Immunol.* 15, 465–474
- Ayed, Z., Brindel, I., Bouteille, B., Van Meirvenne, N., Doua, F., Houinato, D., Dumas, M., Jauberteau, M.O., 1997. Detection and characterization of autoantibodies directed against neurofilament proteins in human African trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 1–6
- Babin, D., 2004. *Beyond Tropical Deforestation: From Tropical Deforestation to Forest Cover Dynamics and Forest Development.* Quae.
- Babokhov, P., Sanyaolu, A.O., Oyibo, W.A., Fagbenro-Beyioku, A.F., Iriemenam, N.C., 2013. A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. *Pathog. Glob. Health* 107, 242–252. doi: 10.1179/2047773213Y.0000000105
- Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B., 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55, 97–179
- Bai, X., Yao, H., Du, C., Chen, Y., Lai, R., Rong, M., 2015. An immunoregulatory peptide from tsetse fly salivary glands of *Glossina morsitans morsitans*. *Biochimie* 118, 123–128. doi: 10.1016/j.biochi.2015.09.001
- Bailey, J.W., Smith, D.H., 1994. The quantitative buffy coat for the diagnosis of trypanosomes.

Trop. Doct. 24, 54–56. doi: 10.1177/004947559402400204

Bailey, J.W., Smith, D.H., 1992. The use of the acridine orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 630

Bakhiet, M., Olsson, T., Edlund, C., Höjeberg, B., Holmberg, K., Lorentzen, J., Kristensson, K., 1993. A *Trypanosoma brucei brucei*-derived factor that triggers CD8+ lymphocytes to interferon-gamma secretion: purification, characterization and protective effects in vivo by treatment with a monoclonal antibody against the factor. *Scand. J. Immunol.* 37, 165–178

Balasegaram, M., Harris, S., Checchi, F., Hamel, C., Karunakara, U., 2006. Treatment outcomes and risk factors for relapse in patients with early-stage human African trypanosomiasis (HAT) in the Republic of the Congo. *Bull. World Health Organ.* 84, 777–782. doi: 10.1590/S0042-96862006001000011

Ballabh, P., Braun, A., Nedergaard, M., 2004. The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 16, 1–13. doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.016

Baral, T.N., 2010. Immunobiology of African Trypanosomes: Need of Alternative Interventions. *BioMed Res. Int.* 2010, e389153. doi: 10.1155/2010/389153

Barrett, M.P., Boykin, D.W., Brun, R., Tidwell, R.R., 2007. Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br. J. Pharmacol.* 152, 1155–1171. doi: 10.1038/sj.bjp.0707354

Barry, J.D., 1997. The relative significance of mechanisms of antigenic variation in African trypanosomes. *Parasitol. Today* 13, 212–218. doi: 10.1016/S0169-4758(97)01039-9

Barry, J.D., Emery, D.L., 1984. Parasite development and host responses during the establishment of *Trypanosoma brucei* infection transmitted by tsetse fly. *Parasitology* 88 (Pt 1), 67–84

Barschke, P., Oeckl, P., Steinacker, P., Ludolph, A., Otto, M., 2017. Proteomic studies in the discovery of cerebrospinal fluid biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev. Proteomics* 14, 769–777. doi: 10.1080/14789450.2017.1365602

Basak, S., Raju, K., Babiarz, J., Kane-Goldsmith, N., Koticha, D., Grumet, M., 2007. Differential expression and functions of neuronal and glial neurofascin isoforms and splice variants during PNS development. *Dev. Biol.* 311, 408–422. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.08.045

Becker, S., Franco, J.R., Simarro, P.P., Stich, A., Abel, P.M., Steverding, D., 2004. Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 50, 193–199. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2004.07.001

Berberof, M., Pérez-Morga, D., Pays, E., 2001. A receptor-like flagellar pocket glycoprotein specific to *Trypanosoma brucei gambiense*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113, 127–138

Berdowska, A., Zwirski-Korczała, K., 2001. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J. Clin. Pharm. Ther.* 26, 319–329

Beretov, J., Wasinger, V.C., Millar, E.K.A., Schwartz, P., Graham, P.H., Li, Y., 2015. Proteomic Analysis of Urine to Identify Breast Cancer Biomarker Candidates Using a Label-Free LC-MS/MS Approach. *PloS One* 10, e0141876. doi: 10.1371/journal.pone.0141876

Bertrand, E., Serie, F., Rive, J., Compaore, P., Sentilhes, L., Baudin, L., Renambot, J., Chauvet, J., Ekra, A., Assamoi, M.O., 1974. Current aspects of the cardiac symptoms in African human trypanosomiasis due to *Trypanosoma gambiense* (apropos of 194 cases). *Acta Cardiol.* 29, 363–381

Biéler, S., Matovu, E., Mitashi, P., Ssewanyana, E., Bi Shamamba, S.K., Bessell, P.R., Ndung'u, J.M., 2012. Improved detection of *Trypanosoma brucei* by lysis of red blood cells, concentration and LED fluorescence microscopy. *Acta Trop.* 121, 135–140. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.10.016

Bisser, S., Lejon, V., Preux, P.M., Bouteille, B., Stanghellini, A., Jauberteau, M.O., Büscher, P., Dumas, M., 2002. Blood-cerebrospinal fluid barrier and intrathecal immunoglobulins compared to field diagnosis of central nervous system involvement in sleeping sickness. *J. Neurol. Sci.* 193, 127–135

Bisser, S., Lumbala, C., Nguertoum, E., Kande, V., Flevaud, L., Vatunga, G., Boelaert, M., Büscher, P., Josenando, T., Bessell, P.R., Biéler, S., Ndung'u, J.M., 2016. Sensitivity and Specificity of a Prototype Rapid Diagnostic Test for the Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* Infection: A Multi-centric Prospective Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004608. doi: 10.1371/journal.pntd.0004608

Bisser, S., Ouwe-Missi-Oukem-Boyer, O.N., Toure, F.S., Taoufiq, Z., Bouteille, B., Buguet, A., Mazier, D., 2006. Harboring in the brain: A focus on immune evasion mechanisms and their deleterious effects in malaria and human African trypanosomiasis. *Int. J. Parasitol., Blood-brain Barrier in Parasitic Disease* 36, 529–540. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.02.001

Blanchard, A.A., Ezzati, P., Shamsurin, D., Nistor, A.C., Leygue, E., Wilkins, J.A., Myal, Y., 2015. Towards further defining the proteome of mouse saliva. *Proteome Sci.* 13. doi: 10.1186/s12953-015-0068-3

Blisnick, T., Buisson, J., Absalon, S., Marie, A., Cayet, N., Bastin, P., 2014. The intraflagellar transport dynein complex of trypanosomes is made of a heterodimer of dynein heavy chains and of light and intermediate chains of distinct functions. *Mol. Biol. Cell* 25, 2620–2633. doi: 10.1091/mbc.E14-05-0961

Blum, J., Schmid, C., Burri, C., 2006a. Clinical aspects of 2541 patients with second stage human African trypanosomiasis. *Acta Trop.* 97, 55–64. doi: 10.1016/j.actatropica.2005.08.001

Blum, J., Schmid, C., Burri, C., 2006b. Clinical aspects of 2541 patients with second stage human African trypanosomiasis. *Acta Trop.* 97, 55–64. doi: 10.1016/j.actatropica.2005.08.001

Blum, J.A., Zellweger, M.J., Burri, C., Hatz, C., 2008. Cardiac involvement in African and American trypanosomiasis. *Lancet Infect. Dis.* 8, 631–641. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70230-5

Boa, Y., Traore, M., Doua, F., Kouassi-Traore, M., Kouassi, B., Giordano, C., 1988. Present clinical aspects of african human trypanosomiasis due to *T. b. gambiense* analysis of 300 cases of the epidemic focus of Daloa. *Bull. Société Pathol. Exot.* 81, 427–444

Boda, C., Courtioux, B., Roques, P., Pervieux, L., Vatunga, G., Josenando, T., Ayenengoye, C.R., Bouteille, B., Jauberteau, M.-O., Bisser, S., 2009. Immunophenotypic Lymphocyte Profiles in Human African Trypanosomiasis. *PLOS ONE* 4, e6184. doi:

Bonnet, J., Boudot, C., Courtioux, B., 2017a. Does *Trypanosoma brucei brucei* have the Ability to Invade Human Microglial Cells? Arch. Parasitol. 1, 108

Bonnet, J., Boudot, C., Courtioux, B., Bonnet, J., Boudot, C., Courtioux, B., 2015. Overview of the Diagnostic Methods Used in the Field for Human African Trypanosomiasis: What Could Change in the Next Years?, BioMed Res. Int. 2015, e583262. doi: 10.1155/2015/583262,

Bonnet, J., Vignoles, P., Tiberti, N., Gedeão, V., Hainard, A., Turck, N., Josenando, T., Ndung'u, J., Sanchez, J.C., Courtioux, B., Bisser, S., 2017b. Neopterin and CXCL-13 in diagnosis and follow up of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: lessons from the field in Angola. *submitted to Parasite*.

Bonnet, J., Garcia, C., Leger, T., Couquet, M.P., Vignoles, P., Gedeão, V., Ndung'u, J., Boudot, C., Bisser, S., Courtioux, B., 2017c. Proteome characterization in various biological fluids of *Trypanosoma brucei gambiense*-infected subjects. *submitted to Plos Neglected tropical Diseases*.

Border, M.B., Schwartz, S., Carlson, J., Dibble, C.F., Kohltfarber, H., Offenbacher, S., Buse, J.B., Bencharit, S., 2012. Exploring salivary proteomes in edentulous patients with type 2 diabetes. Mol. Biosyst. 8, 1304–1310. doi: 10.1039/c2mb05079j

Bottini, P.V., Alves, M.A.V.F.R., Garlipp, C.R., 2002. Electrophoretic pattern of concentrated urine: Comparison between 24-hour collection and random samples. Am. J. Kidney Dis. 39, e2.1-e2.4. doi: 10.1053/ajkd.2002.29920

Bouteille, B., Mpandzou, G., Cespuglio, R., Ngampo, S., Peeling, R.W., Vincendeau, P., Buguet, A., 2010. Cerebrospinal fluid B lymphocyte identification for diagnosis and follow-up in human African trypanosomiasis in the field. Trop. Med. Int. Health 15, 454–461. doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02400.x

Brandenberger, G., Buguet, A., Spiegel, K., Stanghellini, A., Muanga, G., Bogui, P., Dumas, M., 1996. Disruption of Endocrine Rhythms in Sleeping Sickness With Preserved Relationship Between Hormonal Pulsatility and the REM-NREM Sleep Cycles. J. Biol. Rhythms 11, 258–267. doi: 10.1177/074873049601100307

Brenier-Pinchart, M.P., Pelloux, H., Derouich-Guergour, D., Ambroise-Thomas, P., 2001. Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. Trends Parasitol. 17, 292–296

Bringaud, F., Biran, M., Millerioux, Y., Wagnies, M., Allmann, S., Mazet, M., 2015. Combining reverse genetics and nuclear magnetic resonance-based metabolomics unravels trypanosome-specific metabolic pathways. Mol. Microbiol. 96, 917–926. doi: 10.1111/mmi.12990

Brown, R.R., Lee, C.M., Kohler, P.C., Hank, J.A., Storer, B.E., Sondel, P.M., 1989. Altered tryptophan and neopterin metabolism in cancer patients treated with recombinant interleukin 2. Cancer Res. 49, 4941–4944

Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., Burri, C., 2010. Human African trypanosomiasis. Lancet Lond. Engl. 375, 148–159. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60829-1

Bruzzone, R., Dubois-Dalcq, M., Grau, G.E., Griffin, D.E., Kristensson, K., 2009. Infectious



Diseases of the Nervous System and Their Impact in Developing Countries. PLoS Pathog. 5. doi: 10.1371/journal.ppat.1000199

Buguet, A., Bert, J., Tapie, P., Tabaraud, F., Doua, F., Lonsdorfer, J., Bogui, P., Dumas, M., 1993. Sleep-wake cycle in human African trypanosomiasis. J. Clin. Neurophysiol. Off. Publ. Am. Electroencephalogr. Soc. 10, 190–196

Buguet, A., Bisser, S., Josenando, T., Chapotot, F., Cespuglio, R., 2005. Sleep structure: a new diagnostic tool for stage determination in sleeping sickness. Acta Trop. 93, 107–117. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.10.001

Büscher, P., Cecchi, G., Jamonneau, V., Priotto, G., 2017. Human African trypanosomiasis. The Lancet O. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31510-6

Büscher, P., Draelants, E., Magnus, E., Vervoort, T., Van Meirvenne, N., 1991. An experimental latex agglutination test for antibody detection in human African trypanosomiasis. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 71, 267–273

Büscher, P., Gillemann, Q., Lejon, V., 2013. Rapid Diagnostic Test for Sleeping Sickness. N. Engl. J. Med. 368, 1069–1070. doi: 10.1056/NEJMc1210373

Büscher, P., Lejon, V., Magnus, E., Van Meirvenne, N., 1999. Improved latex agglutination test for detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense* infected patients. Acta Trop. 73, 11–20. doi: 10.1016/S0001-706X(99)00009-1

Büscher, P., Mertens, P., Leclipteux, T., Gillemann, Q., Jacquet, D., Mumba-Ngoyi, D., Pyana, P.P., Boelaert, M., Lejon, V., 2014. Sensitivity and specificity of HAT Sero-K-Set, a rapid diagnostic test for serodiagnosis of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a case-control study. Lancet Glob. Health 2, e359-363. doi: 10.1016/S2214-109X(14)70203-7

Büscher, P., Mumba Ngoyi, D., Kaboré, J., Lejon, V., Robays, J., Jamonneau, V., Bebronne, N., Van der Veken, W., Biéler, S., 2009. Improved Models of Mini Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT) and Modified Single Centrifugation (MSC) for Sleeping Sickness Diagnosis and Staging. PLoS Negl. Trop. Dis. 3. doi: 10.1371/journal.pntd.0000471

Caccia, S., Ricagno, S., Bolognesi, M., 2010. Molecular bases of neuroserpin function and pathology. Biomol. Concepts 1, 117–130. doi: 10.1515/bmc.2010.019

Caljon, G., De Ridder, K., De Baetselier, P., Coosemans, M., Van Den Abbeele, J., 2010. Identification of a Tsetse Fly Salivary Protein with Dual Inhibitory Action on Human Platelet Aggregation. PLoS ONE 5. doi: 10.1371/journal.pone.0009671

Caljon, G., Reet, N.V., Trez, C.D., Vermeersch, M., Pérez-Morga, D., Abbeele, J.V.D., 2016. The Dermis as a Delivery Site of *Trypanosoma brucei* for Tsetse Flies. PLOS Pathog. 12, e1005744. doi: 10.1371/journal.ppat.1005744

Camara, M., Camara, O., Ilboudo, H., Sakande, H., Kaboré, J., N'Dri, L., Jamonneau, V., Bucheton, B., 2010. Sleeping sickness diagnosis: use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test. Trop. Med. Int. Health TM IH 15, 796–799. doi: 10.1111/j.1365-3156.2010.02546.x

Camara, O., Camara, M., Lejon, V., Ilboudo, H., Sakande, H., Leno, M., Büscher, P., Bucheton,

- B., Jamonneau, V., 2014. Immune trypanolysis test with blood spotted on filter paper for epidemiological surveillance of sleeping sickness. *Trop. Med. Int. Health* 19, 828–831. doi: 10.1111/tmi.12316
- Cantor, H., Shinohara, M.L., 2009. Regulation of T-helper-cell lineage development by osteopontin: the inside story. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 137–141. doi: 10.1038/nri2460
- Capewell, P., Clucas, C., DeJesus, E., Kieft, R., Hajduk, S., Veitch, N., Steketee, P.C., Cooper, A., Weir, W., MacLeod, A., 2013. The TgsGP Gene Is Essential for Resistance to Human Serum in *Trypanosoma brucei gambiense*. *PLoS Pathog.* 9. doi: 10.1371/journal.ppat.1003686
- Capewell, P., Cren-Travaillé, C., Marchesi, F., Johnston, P., Clucas, C., Benson, R.A., Gorman, T.-A., Calvo-Alvarez, E., Crouzols, A., Jouvion, G., Jamonneau, V., Weir, W., Stevenson, M.L., O'Neill, K., Cooper, A., Swar, N.-R.K., Bucheton, B., Ngoyi, D.M., Garside, P., Rotureau, B., MacLeod, A., 2016. The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes. *eLife* 5. doi: 10.7554/eLife.17716
- Capewell, P., Veitch, N.J., Turner, C.M.R., Raper, J., Berriman, M., Hajduk, S.L., MacLeod, A., 2011. Differences between *Trypanosoma brucei gambiense* Groups 1 and 2 in Their Resistance to Killing by Trypanolytic Factor 1. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5. doi: 10.1371/journal.pntd.0001287
- Carter, D.C., Ho, J.X., 1994. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 45, 153–203
- Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M.-P., Fenart, L., 2007. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 650–661. doi: 10.1038/nrd2368
- Chabas, D., Baranzini, S.E., Mitchell, D., Bernard, C.C., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Sobel, R.A., Lock, C., Karpuj, M., Pedotti, R., Heller, R., Oksenberg, J.R., Steinman, L., 2001. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 294, 1731–1735. doi: 10.1126/science.1062960
- Chan, C.P.Y., Choi, J.W.Y., Cao, K.-Y., Wang, M., Gao, Y., Zhou, D.-H., Di, B., Xu, H.-F., Leung, M.-F., Bergmann, A., Lehmann, M., Nie, Y.-M., Cautherley, G.W.H., Fuchs, D., Renneberg, R., Zheng, B.-J., 2006. Detection of serum neopterin for early assessment of dengue virus infection. *J. Infect.* 53, 152–158. doi: 10.1016/j.jinf.2005.11.008
- Chappuis, F., Loutan, L., Simarro, P., Lejon, V., Büscher, P., 2005. Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 133–146. doi: 10.1128/CMR.18.1.133-146.2005
- Checchi, F., Chappuis, F., Karunakara, U., Priotto, G., Chandramohan, D., 2011. Accuracy of Five Algorithms to Diagnose Gambiense Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1233. doi: 10.1371/journal.pntd.0001233
- Checchi, F., Filipe, J.A.N., Barrett, M.P., Chandramohan, D., 2008. The Natural Progression of Gambiense Sleeping Sickness: What Is the Evidence? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2. doi: 10.1371/journal.pntd.0000303
- Ching, S., He, L., Lai, W., Quan, N., 2005. IL-1 type I receptor plays a key role in mediating the recruitment of leukocytes into the central nervous system. *Brain. Behav. Immun.* 19, 127–137. doi: 10.1016/j.bbi.2004.06.001

Cnops, J., Radwanska, M., Magez, S., 2016. Immunopathology during African Trypanosomiasis. *J. Trop. Dis. Public Health*. doi: 10.4172/2329-891X.1000197

Çolakoğlu, G., Bergstrom-Tyrberg, U., Berglund, E.O., Ranscht, B., 2014. Contactin-1 regulates myelination and nodal/paranodal domain organization in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E394–E403. doi: 10.1073/pnas.1313769110

Collins, M.A., An, J., Hood, B.L., Conrads, T.P., Bowser, R.P., 2015. Label-Free LC-MS/MS Proteomic Analysis of Cerebrospinal Fluid Identifies Protein/Pathway Alterations and Candidate Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Proteome Res.* 14, 4486–4501. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00804

Compton, J., 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350, 91–92. doi: 10.1038/350091a0

Connolly, J., Siderowf, A., Clark, C.M., Mu, D., Pratico, D., 2008. F2 isoprostane levels in plasma and urine do not support increased lipid peroxidation in cognitively impaired Parkinson disease patients. *Cogn. Behav. Neurol. Off. J. Soc. Behav. Cogn. Neurol.* 21, 83–86. doi: 10.1097/WNN.0b013e31817995e7

Courtioux, B., Boda, C., Vatunga, G., Pervieux, L., Josenando, T., M'Eyi, P.M., Bouteille, B., Jauberteau-Marchan, M.-O., Bisser, S., 2006. A link between chemokine levels and disease severity in human African trypanosomiasis. *Int. J. Parasitol.* 36, 1057–1065. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.04.011

Courtioux, B., Pervieux, L., Bisser, S., Bouteille, 2008. Marqueurs du stade neurologique de la Trypanosomose humaine africaine : actualités et perspectives. *Med Trop* 68, 17–23

Courtioux, B., Pervieux, L., Vatunga, G., Marin, B., Josenando, T., Jauberteau-Marchan, M.-O., Bouteille, B., Bisser, S., 2009. Increased CXCL-13 levels in human African trypanosomiasis meningo-encephalitis. *Trop. Med. Int. Health* 14, 529–534. doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02263.x

Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T., Diedrich, G., 1999. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.* 172, 21–28

D'Ambrosio, M.V., Bakalar, M., Bennuru, S., Reber, C., Skandarajah, A., Nilsson, L., Switz, N., Kamgno, J., Pion, S., Boussinesq, M., Nutman, T.B., Fletcher, D.A., 2015. Point-of-care quantification of blood-borne filarial parasites with a mobile phone microscope. *Sci. Transl. Med.* 7, 286re4-286re4. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa3480

Damper, D., Patton, C.L., 1976. Pentamidine Transport and Sensitivity in brucei-Group Trypanosomes. *J. Protozool.* 23, 349–356. doi: 10.1111/j.1550-7408.1976.tb03787.x

Datta, R., deSchoolmeester, M.L., Hedeler, C., Paton, N.W., Brass, A.M., Else, K.J., 2005. Identification of Novel Genes in Intestinal Tissue That Are Regulated after Infection with an Intestinal Nematode Parasite. *Infect. Immun.* 73, 4025–4033. doi: 10.1128/IAI.73.7.4025-4033.2005

De La Rocque, S., Diallo, M., César, J., 2004. Analysis of the anthropic causes of changes in riverbank formations in an agropastoral area of Burkina Faso (Sidéradougou). *Trop. Deforestation Trop. Deforestation For. Cover Dyn. For. Dev.*



De Sousa, K.P., Atouguia, J., Silva, M.S., 2010. Partial biochemical characterization of a metalloproteinase from the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei* parasites. *Protein J.* 29, 283–289. doi: 10.1007/s10930-010-9250-8

Deborggraeve, S., Büscher, P., 2010. Molecular diagnostics for sleeping sickness: what is the benefit for the patient? *Lancet Infect. Dis.* 10, 433–439. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70077-3

Deborggraeve, S., Claes, F., Laurent, T., Mertens, P., Leclipteux, T., Dujardin, J.C., Herdewijn, P., Büscher, P., 2006. Molecular Dipstick Test for Diagnosis of Sleeping Sickness. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2884–2889. doi: 10.1128/JCM.02594-05

Deborggraeve, S., Lejon, V., Ekangu, R.A., Mumba Ngoyi, D., Pati Pyana, P., Ilunga, M., Mulunda, J.P., Büscher, P., 2011a. Diagnostic Accuracy of PCR in gambiense Sleeping Sickness Diagnosis, Staging and Post-Treatment Follow-Up: A 2-year Longitudinal Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5. doi: 10.1371/journal.pntd.0000972

Deborggraeve, S., Lejon, V., Ekangu, R.A., Ngoyi, D.M., Pyana, P.P., Ilunga, M., Mulunda, J.P., Büscher, P., 2011b. Diagnostic Accuracy of PCR in gambiense Sleeping Sickness Diagnosis, Staging and Post-Treatment Follow-Up: A 2-year Longitudinal Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e972. doi: 10.1371/journal.pntd.0000972

Denhardt, D.T., Giachelli, C.M., Rittling, S.R., 2001. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 723–749. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.723

Devine, D.V., Falk, R.J., Balber, A.E., 1986. Restriction of the alternative pathway of human complement by intact *Trypanosoma brucei subsp. gambiense*. *Infect. Immun.* 52, 223–229.

Docampo, R., Moreno, S.N.J., 2011. Acidocalcisomes. *Cell Calcium, Special Issue: Ca²⁺ homeostasis in acidic organelles* 50, 113–119. doi: 10.1016/j.ceca.2011.05.012

Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., Alice, M.B., 1968. Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* 49, 2240–2249. doi: 10.1063/1.1670391

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

Drain, J., Bishop, J.R., Hajduk, S.L., 2001. Haptoglobin-related protein mediates trypanosome lytic factor binding to trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 30254–30260. doi: 10.1074/jbc.M010198200

Drennan, M.B., Stijlemans, B., Van den Abbeele, J., Quesniaux, V.J., Barkhuizen, M., Brombacher, F., De Baetselier, P., Ryffel, B., Magesz, S., 2005. The induction of a type 1 immune response following a *Trypanosoma brucei* infection is MyD88 dependent. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 2501–2509

Dufour, J.H., Dziejman, M., Liu, M.T., Leung, J.H., Lane, T.E., Luster, A.D., 2002. IFN- γ -Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking. *J. Immunol.* 168, 3195–3204. doi:10.4049/jimmunol.168.7.3195

Dukes, P., Gibson, W.C., Gashumba, J.K., Hudson, K.M., Bromidge, T.J., Kaukus, A.,



- Asonganyi, T., Magnus, E., 1992. Absence of the LiTat 1.3 (CATT antigen) gene in *Trypanosoma brucei gambiense* stocks from Cameroon. *Acta Trop.* 51, 123–134. doi: 10.1016/0001-706X(92)90054-2
- Dumas, M., Bisser, S., 1999. Clinical aspects of human African trypanosomiasis, in: *Progress in Human African Trypanosomiasis, Sleeping Sickness*. Springer, Paris, pp. 215–233. doi: 10.1007/978-2-8178-0857-4_13
- Dunn, J.S., 1980. The Concept of a Blood-Brain Barrier. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 43, 374–375
- Dwinger, R.H., Rudin, W., Mooloo, S.K., Murray, M., 1988. Development of *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. brucei* in the skin reaction induced in goats by infected *Glossina morsitans centralis*: a light and electron microscopical study. *Res. Vet. Sci.* 44, 154–163
- Dyer, N.A., Rose, C., Ejeh, N.O., Acosta-Serrano, A., 2013. Flying tryps: survival and maturation of trypanosomes in tsetse flies. *Trends Parasitol.* 29, 188–196. doi: 10.1016/j.pt.2013.02.003
- Eiberger, B., Schilling, K., 2012. Cerebellins: capstones to bridge the synaptic cleft. *J. Neurochem.* 121, 697–699. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07675.x
- Ekwanzala, M., Pépin, J., Khonde, N., Molisho, S., Bruneel, H., De Wals, P., 1996. In the heart of darkness: sleeping sickness in Zaire. *Lancet Lond. Engl.* 348, 1427–1430. doi: 10.1016/S0140-6736(96)06088-6
- Enanga, B., Burchmore, R.J.S., Stewart, M.L., Barrett, M.P., 2002. Sleeping sickness and the brain. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 59, 845–858.
- Engstler, M., Pfohl, T., Herminghaus, S., Boshart, M., Wiegertjes, G., Heddergott, N., Overath, P., 2007. Hydrodynamic Flow-Mediated Protein Sorting on the Cell Surface of Trypanosomes. *Cell* 131, 505–515. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.046
- Enyaru, J.C., Matovu, E., Akol, M., Sebikali, C., Kyambadde, J., Schmidt, C., Brun, R., Kaminsky, R., Ogwal, L.M., Kansiiime, F., 1998. Parasitological detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in serologically negative sleeping-sickness suspects from north-western Uganda. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92, 845–850
- Fairlamb, A.H., Cerami, A., 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 695–729. doi: 10.1146/annurev.mi.46.100192.003403
- Fehon, R.G., McClatchey, A.I., Bretscher, A., 2010. Organizing the Cell Cortex: The role of ERM proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 276–287. doi: 10.1038/nrm2866
- Field, M.C., Carrington, M., 2009. The trypanosome flagellar pocket. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 775–786. doi: 10.1038/nrmicro2221
- Figarella, K., Rawer, M., Uzcategui, N.L., Kubata, B.K., Lauber, K., Madeo, F., Wesselborg, S., Duszenko, M., 2005. Prostaglandin D2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death Differ.* 12, 335–346. doi: 10.1038/sj.cdd.4401564
- Finehout, E.J., Franck, Z., Choe, L.H., Relkin, N., Lee, K.H., 2007. Cerebrospinal fluid

proteomic biomarkers for Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 61, 120–129. doi:10.1002/ana.21038

Fischer-Colbrie, R., Kirchmair, R., Kähler, C.M., Wiedermann, C.J., Saria, A., 2005. Secretoneurin: a new player in angiogenesis and chemotaxis linking nerves, blood vessels and the immune system. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6, 373–385

Fleming, C.E., Nunes, A.F., Sousa, M.M., 2009. Transthyretin: More than meets the eye. *Prog. Neurobiol.* 89, 266–276. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.07.007

Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., Akira, S., Aderem, A., 2004. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432, 917–921. doi: 10.1038/nature03104

Fountoulakis, M., Juranville, J.F., Jiang, L., Avila, D., Röder, D., Jakob, P., Berndt, P., Evers, S., Langen, H., 2004. Depletion of the high) abundance plasma proteins. *Amino Acids*, 27, 249–259

Fox, J.A., Duszenko, M., Ferguson, M.A., Low, M.G., Cross, G.A., 1986. Purification and characterization of a novel glycan-phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 261, 15767–15771

Franco, J.R., Simarro, P.P., Diarra, A., Jannin, J.G., 2014. Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clin. Epidemiol.* 6, 257–275. doi: 10.2147/CLEP.S39728

Franco, J.R., Simarro, P.P., Diarra, A., Ruiz-Postigo, J.A., Samo, M., Jannin, J., 2012. Monitoring the use of nifurtimox-e ornithine combination therapy (NECT) in the treatment of second stage gambiense human African trypanosomiasis. *Research and Reports in Tropical Medicine* 93–101.

Frantzi, M., Bhat, A., Latosinska, A., 2014. Clinical proteomic biomarkers: relevant issues on study design & technical considerations in biomarker development. *Clin. Transl. Med.* 3, 7. doi: 10.1186/2001-1326-3-7

Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Werner, E.R., Dierich, M.P., Wachter, H., 1988. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in HIV infection. *Immunol. Today* 9, 150–155. doi: 10.1016/0167-5699(88)91203-0

Fujita, Y., Yamashita, T., 2017. The roles of RGMA-neogenin signaling in inflammation and angiogenesis. *Inflamm. Regen.* 37, 6. doi: 10.1186/s41232-017-0037-6

Garcia, A., Jamonneau, V., Magnus, E., Laveissière, C., Lejon, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., Van Meirvenne, N., Büscher, P., 2000. Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Côte d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population. *Trop. Med. Int. Health* 5, 786–793

Gelb, B.D., Shi, G.-P., Chapman, H.A., Desnick, R.J., 1996. Pycnodysostosis, a Lysosomal Disease Caused by Cathepsin K Deficiency. *Science* 273, 1236–1238

Ghanbari, H., Ghanbari, K., Beheshti, I., Munzar, M., Vasauskas, A., Averbach, P., 1998. Biochemical assay for AD7C-NTP in urine as an Alzheimer's disease marker. *J. Clin. Lab. Anal.* 12, 285–288

Gibson, W., Nemetschke, L., Ndung'u, J., 2010. Conserved sequence of the TgsGP gene in Group 1 *Trypanosoma brucei gambiense*. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 10, 453–458. doi: 10.1016/j.meegid.2010.03.005

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

Girard, M., Giraud, S., Courtioux, B., Jauberteau-Marchan, M.-O., Bouteille, B., 2005. Endothelial cell activation in the presence of African trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 139, 41–49. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.09.008

Gjini, E., Haydon, D.T., Barry, J.D., Cobbold, C.A., 2010. Critical interplay between parasite differentiation, host immunity, and antigenic variation in trypanosome infections. *Am. Nat.* 176, 424–439. doi: 10.1086/656276

Glatz, J.F., van Bilsen, M., Paulussen, R.J., Veerkamp, J.H., van der Vusse, G.J., Reneman, R.S., 1988. Release of fatty acid-binding protein from isolated rat heart subjected to ischemia and reperfusion or to the calcium paradox. *Biochim. Biophys. Acta* 961, 148–152

Gobert, A.P., Daulouede, S., Lepoivre, M., Boucher, J.L., Bouteille, B., Buguet, A., Cespuglio, R., Veyret, B., Vincendeau, P., 2000. L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect. Immun.* 68, 4653–4657

Gómez-Rodríguez, J., Stijlemans, B., De Muylder, G., Korf, H., Brys, L., Berberof, M., Darji, A., Pays, E., De Baetselier, P., Beschin, A., 2009. Identification of a parasitic immunomodulatory protein triggering the development of suppressive M1 macrophages during African trypanosomiasis. *J. Infect. Dis.* 200, 1849–1860. doi: 10.1086/648374

Gooding, R.H., Krafur, E.S., 2005. Tsetse genetics: contributions to biology, systematics, and control of tsetse flies. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 101–123. doi: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130443

Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., Hanaki, K.-I., 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques* 46, 167–172. doi: 10.2144/000113072

Grab, D.J., Garcia-Garcia, J.C., Nikolskaia, O.V., Kim, Y.V., Brown, A., Pardo, C.A., Zhang, Y., Becker, K.G., Wilson, B.A., Lima, A.P.C. de A., Scharfstein, J., Dumler, J.S., 2009. Protease Activated Receptor Signaling Is Required for African Trypanosome Traversal of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e479. doi: 10.1371/journal.pntd.0000479

Grab, D.J., Kennedy, P.G.E., 2008. Traversal of human and animal trypanosomes across the blood-brain barrier. *J. Neurovirol.* 14, 344–351. doi: 10.1080/13550280802282934

Grab, D.J., Nikolskaia, O., Kim, Y.V., Lonsdale-Eccles, J.D., Ito, S., Hara, T., Fukuma, T., Nyarko, E., Kim, K.J., Stins, M.F., Delannoy, M.J., Rodgers, J., Kim, K.S., 2004. African trypanosome interactions with an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J. Parasitol.* 90, 970–979. doi: 10.1645/GE-287R

Grandgenett, P.M., Otsu, K., Wilson, H.R., Wilson, M.E., Donelson, J.E., 2007. A function for



a specific zinc metalloprotease of African trypanosomes. *PLoS Pathog.* 3, 1432–1445. doi: 10.1371/journal.ppat.0030150

Granger, J., Siddiqui, J., Copeland, S., Remick, D., 2005. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. *Proteomics* 5, 4713–4718. doi: 10.1002/pmic.200401331

Greenwood, B.M., Whittle, H.C., 1980. The pathogenesis of sleeping sickness. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 716–725

Greenwood, B.M., Whittle, H.C., Oduleju, K.O., Dourmashkin, R.R., 1976. Lymphocytic infiltration of the brain in sleeping sickness. *Br. Med. J.* 2, 1291–1292.

Gu, N., Kang, G., Jin, C., Xu, Y., Zhang, Z., Erle, D.J., Zhen, G., 2010. Intelectin is required for IL-13-induced monocyte chemotactic protein-1 and -3 expression in lung epithelial cells and promotes allergic airway inflammation. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 298, L290–L296. doi: 10.1152/ajplung.90612.2008

Guest, P.C., Gottschalk, M.G., Bahn, S., 2013. Proteomics: improving biomarker translation to modern medicine? *Genome Med.* 5, 17. doi: 10.1186/gm421

Guillaume, E., Zimmermann, C., Burkhard, P.R., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.-C., 2003. A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* 3, 1495–1499. doi: 10.1002/pmic.200300478

Gundry, R.L., Fu, Q., Jelinek, C.A., Van Eyk, J.E., Cotter, R.J., 2007. Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. *Proteomics Clin. Appl.* 1, 73–88. doi: 10.1002/prca.200600276

Gundry, R.L., White, M.Y., Noguee, J., Tchernyshyov, I., Van Eyk, J.E., 2009. Assessment of albumin removal from an immunoaffinity spin column: Critical implications for proteomic examination of the albuminome and albumin-depleted samples. *Proteomics* 9, 2021–2028. doi: 10.1002/pmic.200800686

Gunn, M.D., Ngo, V.N., Ansel, K.M., Ekland, E.H., Cyster, J.G., Williams, L.T., 1998. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 391, 799–803. doi: 10.1038/35876

Hagberg, L., Cinque, P., Gisslen, M., Brew, B.J., Spudich, S., Bestetti, A., Price, R.W., Fuchs, D., 2010. Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. *AIDS Res. Ther.* 7, 15. doi: 10.1186/1742-6405-7-15

Hager, K.M., Hajduk, S.L., 1997. Mechanism of resistance of African trypanosomes to cytotoxic human HDL. *Nature* 385, 823–826. doi: 10.1038/385823a0

Hainard, A., Tiberti, N., Robin, X., Lejon, V., Ngoyi, D.M., Matovu, E., Enyaru, J.C., Fouda, C., Ndung'u, J.M., Lisacek, F., Müller, M., Turck, N., Sanchez, J.-C., 2009. A combined CXCL10, CXCL8 and H-FABP panel for the staging of human African trypanosomiasis patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e459. doi: 10.1371/journal.pntd.0000459

Hainard, A., Tiberti, N., Robin, X., Ngoyi, D.M., Matovu, E., Enyaru, J.C.K., Müller, M., Turck, N., Ndung'u, J.M., Lejon, V., Sanchez, J.-C., 2011. Matrix metalloproteinase-9 and intercellular adhesion molecule 1 are powerful staging markers for human African trypanosomiasis. *Trop.*



Med. Int. Health 16, 119–126. doi: 10.1111/j.1365-3156.2010.02642.x

Hamilton, M., 1967. Development of a Rating Scale for Primary Depressive Illness. Br. J. Soc. Clin. Psychol. 6, 278–296. doi: 10.1111/j.2044-8260.1967.tb00530.x

Harrington, J.M., Howell, S., Hajduk, S.L., 2009. Membrane permeabilization by trypanosome lytic factor, a cytolytic human high density lipoprotein. J. Biol. Chem. 284, 13505–13512. doi: 10.1074/jbc.M900151200

Hasker, E., Mitashi, P., Baelmans, R., Lutumba, P., Jacquet, D., Lejon, V., Kande, V., Declercq, J., Van der Veken, W., Boelaert, M., 2010. A new format of the CATT test for the detection of human African Trypanosomiasis, designed for use in peripheral health facilities. Trop. Med. Int. Health 15, 263–267. doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02446.x

Hervieu, G., 2003. Melanin-concentrating hormone functions in the nervous system: food intake and stress. Expert Opin. Ther. Targets 7, 495–511. doi: 10.1517/14728222.7.4.495

Hill, K.L., Hutchings, N.R., Grandgenett, P.M., Donelson, J.E., 2000. T lymphocyte-triggering factor of african trypanosomes is associated with the flagellar fraction of the cytoskeleton and represents a new family of proteins that are present in several divergent eukaryotes. J. Biol. Chem. 275, 39369–39378. doi: 10.1074/jbc.M006907200

Hirano, T., Akira, S., Taga, T., Kishimoto, T., 1990. Biological and clinical aspects of interleukin 6. Immunol. Today 11, 443–449

Hope-Rapp, E., Moussa Coulibaly, O., Klement, E., Danis, M., Bricaire, F., Caumes, E., 2009. Chancres cutanés révélant une trypanosomose africaine à *Trypanosoma brucei gambiense* chez un résident français au Gabon. Ann. Dermatol. Vénérologie 136, 341–345. doi: 10.1016/j.annder.2008.09.023

Hu, S., Loo, J.A., Wong, D.T., 2007. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. Expert Rev. Proteomics 4, 531–538. doi: 10.1586/14789450.4.4.531

Hu, S., Loo, J.A., Wong, D.T., 2006. Human body fluid proteome analysis. Proteomics 6, 6326–6353. doi: 10.1002/pmic.200600284

Huang, D., Han, Y., Rani, M.R., Glabinski, A., Trebst, C., Sørensen, T., Tani, M., Wang, J., Chien, P., O'Bryan, S., Bielecki, B., Zhou, Z.L., Majumder, S., Ransohoff, R.M., 2000. Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation. Immunol. Rev. 177, 52–67

Huber, C., Batchelor, J.R., Fuchs, D., Hausen, A., Lang, A., Niederwieser, D., Reibnegger, G., Swetly, P., Troppmair, J., Wachter, H., 1984. Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. J. Exp. Med. 160, 310–316. doi: 10.1084/jem.160.1.310

Huber, J.D., Egleton, R.D., Davis, T.P., 2001. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. Trends Neurosci. 24, 719–725.

Hytönen, J., Kortela, E., Waris, M., Puustinen, J., Salo, J., Oksi, J., 2014. CXCL13 and neopterin concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis and other diseases that cause neuroinflammation. J. Neuroinflammation 11, 103. doi: 10.1186/1742-2094-11-103

Iborra, C., Danis, M., Bricaire, F., Caumes, E., 1999. A traveler returning from Central Africa with fever and a skin lesion. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 28, 679–680. doi: 10.1086/517213

Iseki, K., Hagino, S., Zhang, Y., Mori, T., Sato, N., Yokoya, S., Hozumi, Y., Goto, K., Tase, C., 2011. Altered expression pattern of testican-1 mRNA after brain injury. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* 32, 373–378

Jacobs, R.T., Nare, B., Wring, S.A., Orr, M.D., Chen, D., Sligar, J.M., Jenks, M.X., Noe, R.A., Bowling, T.S., Mercer, L.T., Rewerts, C., Gaukel, E., Owens, J., Parham, R., Randolph, R., Beaudet, B., Bacchi, C.J., Yarlett, N., Plattner, J.J., Freund, Y., Ding, C., Akama, T., Zhang, Y.-K., Brun, R., Kaiser, M., Scandale, I., Don, R., 2011a. SCYX-7158, an Orally-Active Benzoxaborole for the Treatment of Stage 2 Human African Trypanosomiasis. *PLOS Negl Trop Dis* 5, e1151. doi: 10.1371/journal.pntd.0001151

Jamonneau, V., Bucheton, B., Kaboré, J., Ilboudo, H., Camara, O., Courtin, F., Solano, P., Kaba, D., Kambire, R., Lingue, K., Camara, M., Baelmans, R., Lejon, V., Büscher, P., 2010. Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e917. doi: 10.1371/journal.pntd.0000917

Jamonneau, V., Camara, O., Ilboudo, H., Peylhard, M., Koffi, M., Sakande, H., N'Dri, L., Sanou, D., Dama, E., Camara, M., Lejon, V., 2015. Accuracy of Individual Rapid Tests for Serodiagnosis of Gambiense Sleeping Sickness in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9. doi: 10.1371/journal.pntd.0003480

Jamonneau, V., Ilboudo, H., Kaboré, J., Kaba, D., Koffi, M., Solano, P., Garcia, A., Courtin, D., Laveissière, C., Lingue, K., Büscher, P., Bucheton, B., 2012. Untreated Human Infections by *Trypanosoma brucei gambiense* Are Not 100% Fatal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1691. doi: 10.1371/journal.pntd.0001691

Jamonneau, V., Solano, P., Garcia, A., Lejon, V., Djé, N., Miezán, T.W., N'Guessan, P., Cuny, G., Büscher, P., 2003. 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 Côte d'Ivoire. *Trop. Med. Int. Health* 8, 589–594. doi: 10.1046/j.1365-3156.2003.01079.x

Jenzano, J.W., Courts, N.F., Timko, D.A., Lundblad, R.L., 1986. Levels of glandular kallikrein in whole saliva obtained from patients with solid tumors remote from the oral cavity. *J. Dent. Res.* 65, 67–70. doi: 10.1177/00220345860650011201

Johann, D.J., McGuigan, M.D., Patel, A.R., Tomov, S., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Fishman, D.A., Whiteley, G.R., Petricoin, E.F., Liotta, L.A., 2004. Clinical proteomics and biomarker discovery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1022, 295–305. doi: 10.1196/annals.1318.045

Keita, M., Vincendeau, P., Buguet, A., Cespuglio, R., Vallat, J.-M., Dumas, M., Bouteille, B., 2000. Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine in the Central Nervous System of Mice Chronically Infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp. Parasitol.* 95, 19–27. doi: 10.1006/expr.2000.4505

Kennedy, P.G.E., 2010. Novel Biomarkers for Late-Stage Human African Trypanosomiasis—The Search Goes On. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 981–982. doi: 10.4269/ajtmh.2010.10-0172

- Kennedy, P.G.E., 2009. Cytokines in central nervous system trypanosomiasis: cause, effect or both? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 213–214. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.08.013
- Kennedy, P.G.E., 2008. Diagnosing central nervous system trypanosomiasis: two stage or not to stage? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 306–307. doi: 10.1016/j.trstmh.2007.11.011
- Kennedy, P.G.E., 2006. Human African trypanosomiasis–neurological aspects. *J. Neurol.* 253, 411–416. doi: 10.1007/s00415-006-0093-3
- Kennedy, P.G.E., 2004. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *J. Clin. Invest.* 113, 496–504. doi: 10.1172/JCI200421052
- Khademi, M., Kockum, I., Andersson, M.L., Iacobaeus, E., Brundin, L., Sellebjerg, F., Hillert, J., Piehl, F., Olsson, T., 2011. Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 17, 335–343. doi: 10.1177/1352458510389102
- Khwaja, F.W., Reed, M.S., Olson, J.J., Schmotzer, B.J., Gillespie, G.Y., Guha, A., Groves, M.D., Kesari, S., Pohl, J., Van Meir, E.G., 2007. Proteomic Identification of Biomarkers in the Cerebrospinal fluid (CSF) of Astrocytoma Patients. *J. Proteome Res.* 6, 559–570. doi: 10.1021/pr060240z
- Kieft, R., Capewell, P., Turner, C.M.R., Veitch, N.J., MacLeod, A., Hajduk, S., 2010. Mechanism of *Trypanosoma brucei gambiense* (group 1) resistance to human trypanosome lytic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16137–16141. doi: 10.1073/pnas.1007074107
- Kingdon, K.H., 1923. A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures. *Phys. Rev.* 21, 408–418. doi: 10.1103/PhysRev.21.408
- Komiya, T., Tanigawa, Y., Hirohashi, S., 1998. Cloning of the Novel Gene Intelectin, Which Is Expressed in Intestinal Paneth Cells in Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 759–762. doi: 10.1006/bbrc.1998.9513
- Koticha, D., Babiarz, J., Kane-Goldsmith, N., Jacob, J., Raju, K., Grumet, M., 2005. Cell adhesion and neurite outgrowth are promoted by neurofascin NF155 and inhibited by NF186. *Mol. Cell. Neurosci.* 30, 137–148. doi: 10.1016/j.mcn.2005.06.007
- Koticha, D., Maurel, P., Zanazzi, G., Kane-Goldsmith, N., Basak, S., Babiarz, J., Salzer, J., Grumet, M., 2006. Neurofascin interactions play a critical role in clustering sodium channels, ankyrinG and β IV spectrin at peripheral nodes of Ranvier. *Dev. Biol.* 293, 1–12. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.05.028
- Kristensson, K., Mhlanga, J.D.M., Bentivoglio, M., 2002. Parasites and the Brain: Neuroinvasion, Immunopathogenesis and Neuronal Dysfunctions, in: *Protective and Pathological Immune Responses in the CNS, Current Topics in Microbiology and Immunology.* Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 227–257. doi: 10.1007/978-3-662-09525-6_12
- Kristensson, K., Nygård, M., Bertini, G., Bentivoglio, M., 2010. African trypanosome infections of the nervous system: parasite entry and effects on sleep and synaptic functions. *Prog. Neurobiol.* 91, 152–171. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.12.001
- Kuboki, N., Inoue, N., Sakurai, T., Di Cello, F., Grab, D.J., Suzuki, H., Sugimoto, C., Igarashi,



I., 2003. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5517–5524.

Kuhn, W., Armstrong, D., Atteberry, S., Dewbrey, E., Smith, D., Hooper, N., 2010. Usefulness of the Paralens™ Fluorescent Microscope Adaptor for the Identification of Mycobacteria in Both Field and Laboratory Settings. *Open Microbiol. J.* 4, 30–33. doi: 10.2174/1874285801004010030

Kuriakose, S.M., Singh, R., Uzonna, J.E., 2016. Host Intracellular Signaling Events and Pro-inflammatory Cytokine Production in African Trypanosomiasis. *Front. Immunol.* 7. doi: 10.3389/fimmu.2016.00181

La Greca, F., Magez, S., 2011. Vaccination against trypanosomiasis. *Hum. Vaccin.* 7, 1225–1233. doi: 10.4161/hv.7.11.18203

Lad, S.P., Hegen, H., Gupta, G., Deisenhammer, F., Steinberg, G.K., 2012. Proteomic biomarker discovery in cerebrospinal fluid for cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* 21, 30–41. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2010.04.004

Lahrtz, F., Piali, L., Nadal, D., Pfister, H.W., Spanaus, K.S., Baggiolini, M., Fontana, A., 1997. Chemotactic activity on mononuclear cells in the cerebrospinal fluid of patients with viral meningitis is mediated by interferon-gamma inducible protein-10 and monocyte chemotactic protein-1. *Eur. J. Immunol.* 27, 2484–2489. doi: 10.1002/eji.1830271004

Lalor, S.J., Segal, B.M., 2010. Lymphoid chemokines in the CNS. *J. Neuroimmunol.* 224, 56–61. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.017

Lanham, S.M., Godfrey, D.G., 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* 28, 521–534

Lee, H.-T., Shiao, Y.-M., Wu, T.-H., Chen, W.-S., Hsu, Y.-H., Tsai, S.-F., Tsai, C.-Y., 2010. Serum BLC/CXCL13 concentrations and renal expression of CXCL13/CXCR5 in patients with systemic *lupus erythematosus* and *lupus nephritis*. *J. Rheumatol.* 37, 45–52. doi: 10.3899/jrheum.090450

Lee, J.K., Buckhaults, P., Wilkes, C., Teilhet, M., King, M.L., Moremen, K.W., Pierce, M., 1997. Cloning and expression of a *Xenopus laevis* oocyte lectin and characterization of its mRNA levels during early development. *Glycobiology* 7, 367–372. doi: 10.1093/glycob/7.3.367

Lee, J.M., Garon, E., Wong, D.T., 2009. Salivary diagnostics. *Orthod. Craniofac. Res.* 12, 206–211. doi: 10.1111/j.1601-6343.2009.01454.x

Lee, S., Lee, J., Kim, S., Park, J.-Y., Lee, W.-H., Mori, K., Kim, S.-H., Kim, I.K., Suk, K., 2007. A dual role of lipocalin 2 in the apoptosis and deramification of activated microglia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 3231–3241

Lee, S., Park, J.-Y., Lee, W.-H., Kim, H., Park, H.-C., Mori, K., Suk, K., 2009. Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrocytosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 234–249. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5273-08.2009

Lee, T.W., Tsang, V.W.K., Birch, N.P., 2015. Physiological and pathological roles of tissue plasminogen activator and its inhibitor neuroserpin in the nervous system. *Front. Cell.*



Lejon, V., Büscher, P., 2005. Review Article: cerebrospinal fluid in human African trypanosomiasis: a key to diagnosis, therapeutic decision and post-treatment follow-up. *Trop. Med. Int. Health TM IH* 10, 395–403. doi: 10.1111/j.1365-3156.2005.01403.x

Lejon, V., Jamonneau, V., Solano, P., Atchade, P., Mumba, D., Nkoy, N., Bébronne, N., Kibonja, T., Balharbi, F., Wierckx, A., Boelaert, M., Büscher, P., 2006. Detection of trypanosome-specific antibodies in saliva, towards non-invasive serological diagnosis of sleeping sickness. *Trop. Med. Int. Health TM IH* 11, 620–627. doi: 10.1111/j.1365-3156.2006.01620.x

Lejon, V., Lardon, J., Kenis, G., Pinoges, L., Legros, D., Bisser, S., N'Siesi, X., Bosmans, E., Büscher, P., 2002. Interleukin (IL)-6, IL-8 and IL-10 in serum and CSF of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness patients before and after treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 329–333. doi: 10.1016/S0035-9203(02)90115-X

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

Lejon, V., Reiber, H., Legros, D., Djé, N., Magnus, E., Wouters, I., Sindic, C.J.M., Büscher, P., 2003. Intrathecal Immune Response Pattern for Improved Diagnosis of Central Nervous System Involvement in Trypanosomiasis. *J. Infect. Dis.* 187, 1475–1483. doi: 10.1086/374645

Lejon, V., Rosengren, L.E., Buscher, P., Karlsson, J.E., Sema, H.N., 1999. Detection of light subunit neurofilament and glial fibrillary acidic protein in cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense*-infected patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 94–98

Lescuyer, P., Allard, L., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.-C., 2005. Heart-fatty acid-binding protein as a marker for early detection of acute myocardial infarction and stroke. *Mol. Diagn. J. Devoted Underst. Hum. Dis. Clin. Appl. Mol. Biol.* 9, 1–7

Letourneau, P.C., 1989. Intrinsic determinants of neuronal form and function. *Trends Neurosci.* 12, 122. doi:10.1016/0166-2236(89)90169-0

Levi, A., Eldridge, J.D., Paterson, B.M., 1985. Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science* 229, 393–395. doi: 10.1126/science.3839317

Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, I.J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F.G., 1980. A Newly Revised Classification of the *Protozoa*. *J. Protozool.* 27, 37–58. doi: 10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x

Levine, R.A., Wardlaw, S.C., Patton, C.L., 1989. Detection of haematoparasites using quantitative buffy coat analysis tubes. *Parasitol. Today Pers. Ed* 5, 132–134

Li, S.-Q., Yang, W.-B., Lun, Z.-R., Ma, L.-J., Xi, S.-M., Chen, Q.-L., Song, X.-W., Kang, J., Yang, L.-Z., 2009. Immunization with recombinant actin from *Trypanosoma evansi* induces protective immunity against *T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. b. brucei* infection. *Parasitol. Res.* 104, 429–435. doi: 10.1007/s00436-008-1216-9

- Lindsay, A., Costello, J.T., 2017. Realising the potential of urine and saliva as diagnostic tools in sport and exercise medicine. *Sports Med.* 47, 11-31. doi: 10.1007/s40279-016-0558-1
- Liu, C., Zhang, N., Yu, H., Chen, Y., Liang, Y., Deng, H., Zhang, Z., 2011. Proteomic analysis of human serum for finding pathogenic factors and potential biomarkers in preeclampsia. *Placenta* 32, 168–174. doi: 10.1016/j.placenta.2010.11.007
- Liu, M.K., Cattand, P., Gardiner, I.C., Pearson, T.W., 1989. Immunodiagnosis of sleeping sickness due to *Trypanosoma brucei gambiense* by detection of antiprocytic antibodies and trypanosome antigens in patients' sera. *Acta Trop.* 46, 257–266
- Liu, Z., Li, S., Wang, H., Tang, M., Zhou, M., Yu, J., Bai, S., Li, P., Zhou, J., Xie, P., 2017. Proteomic and network analysis of human serum albuminome by integrated use of quick crosslinking and two-step precipitation. *Sci. Rep.* 7. doi: 10.1038/s41598-017-09563-w
- Lowenthal, M.S., Mehta, A.I., Frogale, K., Bandle, R.W., Araujo, R.P., Hood, B.L., Veenstra, T.D., Conrads, T.P., Goldsmith, P., Fishman, D., Petricoin, E.F., Liotta, L.A., 2005. Analysis of albumin-associated peptides and proteins from ovarian cancer patients. *Clin. Chem.* 51, 1933–1945. doi: 10.1373/clinchem.2005.052944
- Lubega, G.W., Byarugaba, D.K., Prichard, R.K., 2002. Immunization with a tubulin-rich preparation from *Trypanosoma brucei* confers broad protection against African trypanosomiasis. *Exp. Parasitol.* 102, 9–22. doi: 10.1016/S0014-4894(02)00140-6
- Lutumba, P., Robays, J., Miaka, C., Kande, V., Mumba, D., Büscher, P., Dujardin, B., Boelaert, M., 2006. Validity, cost and feasibility of the mAECT and CTC confirmation tests after diagnosis of African of sleeping sickness. *Trop. Med. Int. Health TM IH* 11, 470–478. doi: 10.1111/j.1365-3156.2006.01591.x
- MacLean, L., Odiit, M., Sternberg, J.M., 2001. Nitric oxide and cytokine synthesis in human African trypanosomiasis. *J. Infect. Dis.* 184, 1086–1090. doi: 10.1086/323479
- MacLean, L., Reiber, H., Kennedy, P.G.E., Sternberg, J.M., 2012. Stage Progression and Neurological Symptoms in *Trypanosoma brucei rhodesiense* Sleeping Sickness: Role of the CNS Inflammatory Response. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6. doi: 10.1371/journal.pntd.0001857
- Maes, E., Mertens, I., Valkenburg, D., Pauwels, P., Rolfo, C., Baggerman, G., 2015. Proteomics in cancer research: Are we ready for clinical practice? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 96, 437–448. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.07.006
- Magez, S., Stijlemans, B., Radwanska, M., Pays, E., Ferguson, M.A.J., Baetselier, P.D., 1998. The Glycosyl-Inositol-Phosphate and Dimyristoylglycerol Moieties of the Glycosylphosphatidylinositol Anchor of the Trypanosome Variant-Specific Surface Glycoprotein Are Distinct Macrophage-Activating Factors. *J. Immunol.* 160, 1949–1956.
- Magnus, E., Van Meirvenne, N., Vervoort, T., Le Ray, D., Wery, M., 1978a. Use of freeze-dried trypanosomes in the indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of sleeping sickness. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 58, 103–109
- Magnus, E., Vervoort, T., Van Meirvenne, N., 1978b. A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 58, 169–176

- Malamud, D., 2011. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent. Clin. North Am.* 55, 159–178. doi: 10.1016/j.cden.2010.08.004
- Malvy, D., Chappuis, F., 2011. Sleeping sickness. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 986–995. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03536.x
- Manna, P.T., Boehm, C., Leung, K.F., Natesan, S.K., Field, M.C., 2014. Life and times: synthesis, trafficking, and evolution of VSG. *Trends Parasitol.* 30, 251–258. doi: 10.1016/j.pt.2014.03.004
- Manna, P.T., Kelly, S., Field, M.C., 2013. Adaptin evolution in kinetoplastids and emergence of the variant surface glycoprotein coat in African trypanosomatids. *Mol. Phylogenet. Evol.* 67, 123–128. doi: 10.1016/j.ympev.2013.01.002
- Mant, M.J., Parker, K.R., 1981. Two platelet aggregation inhibitors in tsetse (*Glossina*) saliva with studies of roles of thrombin and citrate in in vitro platelet aggregation. *Br. J. Haematol.* 48, 601–608
- Mariño, K., Güther, M.L.S., Wernimont, A.K., Amani, M., Hui, R., Ferguson, M.A.J., 2010. Identification, subcellular localization, biochemical properties, and high-resolution crystal structure of *Trypanosoma brucei* UDP-glucose pyrophosphorylase. *Glycobiology* 20, 1619–1630. doi: 10.1093/glycob/cwq115
- Marques, F., Rodrigues, A.-J., Sousa, J.C., Coppola, G., Geschwind, D.H., Sousa, N., Correia-Neves, M., Palha, J.A., 2008. Lipocalin 2 is a choroid plexus acute-phase protein. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 450–455. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600557
- Marra, C.M., Tantaló, L.C., Sahi, S.K., Maxwell, C.L., Lukehart, S.A., 2010. CXCL13 as a cerebrospinal fluid marker for neurosyphilis in HIV-infected patients with syphilis. *Sex. Transm. Dis.* 37, 283–287. doi: 10.1097/OLQ.0b013e3181d877a1
- Martinez, F.O., Sironi, M., Vecchi, A., Colotta, F., Mantovani, A., Locati, M., 2004. IL-8 induces a specific transcriptional profile in human neutrophils: synergism with LPS for IL-1 production. *Eur. J. Immunol.* 34, 2286–2292. doi: 10.1002/eji.200324481
- Mäser, P., Wittlin, S., Rottmann, M., Wenzler, T., Kaiser, M., Brun, R., 2012. Antiparasitic agents: new drugs on the horizon. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 562–566. doi: 10.1016/j.coph.2012.05.001
- Masocha, W., Kristensson, K., 2012. Passage of parasites across the blood-brain barrier. *Virulence* 3, 202–212. doi: 10.4161/viru.19178
- Masocha, W., Robertson, B., Rottenberg, M.E., Mhlanga, J., Sorokin, L., Kristensson, K., 2004. Cerebral vessel laminins and IFN-gamma define *Trypanosoma brucei* penetration of the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* 114, 689–694. doi: 10.1172/JCI22104
- Masocha, W., Rottenberg, M.E., Kristensson, K., 2006. Minocycline impedes African trypanosome invasion of the brain in a murine model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1798–1804. doi: 10.1128/AAC.50.5.1798-1804.2006
- Matovu, E., Mugasa, C.M., Ekangu, R.A., Deborggraeve, S., Lubega, G.W., Laurent, T., Schoone, G.J., Schallig, H.D., Büscher, P., 2010. Phase II evaluation of sensitivity and

specificity of PCR and NASBA followed by oligochromatography for diagnosis of human African trypanosomiasis in clinical samples from D.R. Congo and Uganda. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e737. doi: 10.1371/journal.pntd.0000737

Maudlin, I., Ellis, D.S., 1985. Association between intracellular rickettsial-like infections of midgut cells and susceptibility to Trypanosome infection in *Glossina spp.* *Z. Für Parasitenkd.* 71, 683–687. doi: 10.1007/BF00925601

McCulloch, R., Morrison, L.J., Hall, J.P.J., 2015. DNA Recombination Strategies During Antigenic Variation in the African Trypanosome. *Microbiol. Spectr.* 3. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0016-2014

McDowell, M.A., Ransom, D.M., Bangs, J.D., 1998. Glycosylphosphatidylinositol-dependent secretory transport in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* 335 (Pt 3), 681–689

Mehta, A.I., Ross, S., Lowenthal, M.S., Fusaro, V., Fishman, D.A., Petricoin, E.F., Liotta, L.A., 2003. Biomarker amplification by serum carrier protein binding. *Dis. Markers* 19, 1–10

Meirvenne, N.V., 1999. Biological diagnosis of human African trypanosomiasis, in: *Progress in Human African Trypanosomiasis, Sleeping Sickness.* Springer, Paris, pp. 235–252. doi: 10.1007/978-2-8178-0857-4_14

Meng, Z., Veenstra, T.D., 2007. Proteomic analysis of serum, plasma, and lymph for the identification of biomarkers. *Proteomics Clin. Appl.* 1, 747–757. doi: 10.1002/prca.200700243

Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J.-P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M., Horning, S., 2011. Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 10. doi: 10.1074/mcp.M111.011015

Miézan, T.W., Meda, H.A., Doua, F., Djè, N.N., Lejon, V., Büscher, P., 2000. Single centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 293

Millioni, R., Tolin, S., Puricelli, L., Sbrignadello, S., Fadini, G.P., Tessari, P., Arrigoni, G., 2011. High Abundance Proteins Depletion vs Low Abundance Proteins Enrichment: Comparison of Methods to Reduce the Plasma Proteome Complexity. *PLOS ONE* 6, e19603. doi: 10.1371/journal.pone.0019603

Mischak, H., Allmaier, G., Apweiler, R., Attwood, T., Baumann, M., Benigni, A., Bennett, S.E., Bischoff, R., Bongcam-Rudloff, E., Capasso, G., Coon, J.J., D’Haese, P., Dominiczak, A.F., Dakna, M., Dihazi, H., Ehrich, J.H., Fernandez-Llama, P., Fliser, D., Frokiaer, J., Garin, J., Girolami, M., Hancock, W.S., Haubitz, M., Hochstrasser, D., Holman, R.R., Ioannidis, J.P.A., Jankowski, J., Julian, B.A., Klein, J.B., Kolch, W., Luidner, T., Massy, Z., Mattes, W.B., Molina, F., Monsarrat, B., Novak, J., Peter, K., Rossing, P., Sánchez-Carbayo, M., Schanstra, J.P., Semmes, O.J., Spasovski, G., Theodorescu, D., Thongboonkerd, V., Vanholder, R., Veenstra, T.D., Weissinger, E., Yamamoto, T., Vlahou, A., 2010. Recommendations for biomarker identification and qualification in clinical proteomics. *Sci. Transl. Med.* 2, 46ps42. doi: 10.1126/scitranslmed.3001249

Mitashi, P., Hasker, E., Lejon, V., Kande, V., Muyembe, J.-J., Lutumba, P., Boelaert, M., 2012. Human African Trypanosomiasis Diagnosis in First-Line Health Services of Endemic Countries, a Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1919. doi:

Mitchell Wells, J., McLuckey, S.A., 2005. Collision-Induced Dissociation (CID) of Peptides and Proteins. *Methods Enzymol., Biological Mass Spectrometry* 402, 148–185. doi: 10.1016/S0076-6879(05)02005-7

Mkunza, F., Olaho, W.M., Powell, C.N., 1995. Partial protection against natural trypanosomiasis after vaccination with a flagellar pocket antigen from *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Vaccine* 13, 151–154

Mogk, S., Boßelmann, C.M., Mudogo, C.N., Stein, J., Wolburg, H., Duszenko, M., 2016. African trypanosomes and brain infection – the unsolved question. *Biol. Rev.* n/a-n/a. doi: 10.1111/brv.12301

Mogk, S., Meiwes, A., Shtopel, S., Schraermeyer, U., Lazarus, M., Kubata, B., Wolburg, H., Duszenko, M., 2014. Cyclical Appearance of African Trypanosomes in the Cerebrospinal Fluid: New Insights in How Trypanosomes Enter the CNS. *PLoS ONE* 9. doi: 10.1371/journal.pone.0091372

Molina, L., Salvetat, N., Ameer, R.B., Peres, S., Sommerer, N., Jarraya, F., Ayadi, H., Molina, F., Granier, C., 2011. Analysis of the variability of human normal urine by 2D-GE reveals a “public” and a “private” proteome. *J. Proteomics* 75, 70–80. doi: 10.1016/j.jprot.2011.06.031

Molina-Portela, M. del P., Lugli, E.B., Recio-Pinto, E., Raper, J., 2005. Trypanosome lytic factor, a subclass of high-density lipoprotein, forms cation-selective pores in membranes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 144, 218–226. doi: 10.1016/j.molbiopara.2005.08.018

Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O’Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683

Morgan, H.P., McNae, I.W., Nowicki, M.W., Zhong, W., Michels, P.A.M., Auld, D.S., Fothergill-Gilmore, L.A., Walkinshaw, M.D., 2011. The Trypanocidal Drug Suramin and Other Trypan Blue Mimetics Are Inhibitors of Pyruvate Kinases and Bind to the Adenosine Site. *J. Biol. Chem.* 286, 31232–31240. doi: 10.1074/jbc.M110.212613

Mugasa, C.M., Adams, E.R., Boer, K.R., Dyserinck, H.C., Büscher, P., Schallig, H.D.H.F., Leeflang, M.M.G., 2012. Diagnostic accuracy of molecular amplification tests for human African trypanosomiasis--systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1438. doi: 10.1371/journal.pntd.0001438

Mugasa, C.M., Laurent, T., Schoone, G.J., Kager, P.A., Lubega, G.W., Schallig, H.D.F.H., 2009. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification with Oligochromatography for Detection of *Trypanosoma brucei* in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* 47, 630–635. doi: 10.1128/JCM.01430-08

Mugasa, C.M., Schoone, G.J., Ekangu, R.A., Lubega, G.W., Kager, P.A., Schallig, H.D.F.H., 2008. Detection of *Trypanosoma brucei* parasites in blood samples using real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 61, 440–445. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.019

Mulenga, C., Mhlanga, J.D., Kristensson, K., Robertson, B., 2001. *Trypanosoma brucei brucei* crosses the blood-brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat chronic

disease model. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 27, 77–85

Mumba Ngoyi, D., Menten, J., Pyana, P.P., Büscher, P., Lejon, V., 2013. Stage determination in sleeping sickness: comparison of two cell counting and two parasite detection techniques. *Trop. Med. Int. Health* 18, 778–782. doi: 10.1111/tmi.12102

Murr, C., Widner, B., Wirleitner, B., Fuchs, D., 2002. Neopterin as a marker for immune system activation. *Curr. Drug Metab.* 3, 175–187

Mwangi, D.M., Hopkins, J., Luckins, A.G., 1990. Cellular phenotypes in *Trypanosoma congolense* infected sheep: the local skin reaction. *Parasite Immunol.* 12, 647–658

Namayanja, M., Dai, Y., Nerima, B., Matovu, E., Lun, Z.-R., Lubega, G.W., Zhengjun, C., 2017. *Trypanosoma brucei brucei* traverses different biological barriers differently and may modify the host plasma membrane in the process. *Exp. Parasitol.* 174, 31–41. doi: 10.1016/j.exppara.2016.12.012

Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B.K., Ganz, T., 2004. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.* 113, 1271–1276. doi: 10.1172/JCI20945

Ngotho, M., Maina, N., Kagira, J., Royo, F., Farah, I.O., Hau, J., 2006. IL-10 is up regulated in early and transitional stages in vervet monkeys experimentally infected with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Parasitol. Int.* 55, 243–248. doi: 10.1016/j.parint.2006.06.004

Ngoyi, D.M., Lejon, V., Pyana, P., Boelaert, M., Ilunga, M., Menten, J., Mulunda, J.P., Nieuwenhove, S.V., Tamfum, M., Jacques, J., Büscher, P., 2010. How to Shorten Patient Follow-Up after Treatment for *Trypanosoma brucei gambiense* Sleeping Sickness. *J. Infect. Dis.* 201, 453–463. doi: 10.1086/649917

Nikolskaia, O.V., de A Lima, A.P.C., Kim, Y.V., Lonsdale-Eccles, J.D., Fukuma, T., Scharfstein, J., Grab, D.J., 2006a. Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. *J. Clin. Invest.* 116, 2739–2747. doi: 10.1172/JCI27798

Nikolskaia, O.V., Kim, Y.V., Kovbasnjuk, O., Kim, K.J., Grab, D.J., 2006b. Entry of *Trypanosoma brucei gambiense* into microvascular endothelial cells of the human blood–brain barrier. *Int. J. Parasitol.* 36, 513–519. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.01.011

Nikolskaia, O.V., Thekiso, O.M.M., Dumler, J.S., Grab, D.J., 2017. Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of the 5.8S Ribosomal Ribonucleic Acid Internal Transcribed Spacer 2 Gene Found in *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96, 275–279. doi: 10.4269/ajtmh.15-0288

Njagu, Z., Mihok, S., Kokwaro, E., Verloo, D., 1999. Isolation of *Trypanosoma brucei* from the monitor lizard (*Varanus niloticus*) in an endemic focus of rhodesian sleeping sickness in Kenya. *Acta Trop.* 72, 137–148. doi: 10.1016/S0001-706X(98)00092-8

Njamnshi, A.K., Gettinby, G., Kennedy, P.G.E., 2017. The challenging problem of disease staging in human African trypanosomiasis (sleeping sickness): a new approach to a circular question. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1–5. doi:10.1093/trstmh/trx034

Njiru, Z.K., 2011. Rapid and sensitive detection of human African trypanosomiasis by loop-

mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 69, 205–209. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.026

Njiru, Z.K., Mikosza, A.S.J., Matovu, E., Enyaru, J.C.K., Ouma, J.O., Kibona, S.N., Thompson, R.C.A., Ndung'u, J.M., 2008. African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. *Int. J. Parasitol.* 38, 589–599. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.09.006

Njiru, Z.K., Traub, R., Ouma, J.O., Enyaru, J.C., Matovu, E., 2011. Detection of Group 1 *Trypanosoma brucei gambiense* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1530–1536. doi: 10.1128/JCM.01817-10

Noireau, F., Apembet, J.D., Frézil, J.-L., 1988. Revue clinique des troubles endocriniens observés chez l'adulte trypanosomé. *Bull. Société Pathol. Exot.* 81, 464–467

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63

Nunes, L.A.S., Mussavira, S., Bindhu, O.S., 2015. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem. Medica* 25, 177–192. doi: 10.11613/BM.2015.018

Okomo-Assoumou, M.C., Geffard, M., Daulouede, S., Chaugier, C., Lemesre, J.L., Vincendeau, P., 1995. Circulating antibodies directed against tryptophan-like epitopes in sera of patients with human African trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 461–467

Ollivier, G., Legros, D., 2001. Trypanosomiase humaine africaine: historique de la thérapeutique et de ses échecs. *Trop. Med. Int. Health* 6, 855–863. doi: 10.1046/j.1365-3156.2001.00753.x

Olsen, J.V., Macek, B., Lange, O., Makarov, A., Horning, S., Mann, M., 2007. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat. Methods* 4, 709–712. doi: 10.1038/nmeth1060

Olsen, J.V., Schwartz, J.C., Griep-Raming, J., Nielsen, M.L., Damoc, E., Denisov, E., Lange, O., Remes, P., Taylor, D., Splendore, M., Wouters, E.R., Senko, M., Makarov, A., Mann, M., Horning, S., 2009. A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 8, 2759–2769. doi: 10.1074/mcp.M900375-MCP200

Ormerod, W.E., Hussein, M.S.-A., 1986. The ventricular ependyma of mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 626–633. doi: 10.1016/0035-9203(86)90161-6

Osterwalder, T., Contartese, J., Stoeckli, E.T., Kuhn, T.B., Sonderegger, P., 1996. Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *EMBO J.* 15, 2944–2953

Overath, P., Ruoff, J., Stierhof, Y.D., Haag, J., Tichy, H., Dyková, I., Lom, J., 1998. Cultivation of bloodstream forms of *Trypanosoma carassii*, a common parasite of freshwater fish. *Parasitol. Res.* 84, 343–347

Owens, T., Babcock, A.A., Millward, J.M., Toft-Hansen, H., 2005. Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48, 178–184. doi:



10.1016/j.brainresrev.2004.12.007

Pandey, A., Galvani, A., 2017. Strategies for *Trypanosoma brucei gambiense* elimination. *Lancet Glob. Health* 5, e10–e11. doi: 10.1016/S2214-109X(16)30284-4

Panse, J., Friedrichs, K., Marx, A., Hildebrandt, Y., Luetkens, T., Barrels, K., Horn, C., Stahl, T., Cao, Y., Milde-Langosch, K., Niendorf, A., Kröger, N., Wenzel, S., Leuwer, R., Bokemeyer, C., Hegewisch-Becker, S., Atanackovic, D., 2008. Chemokine CXCL13 is overexpressed in the tumour tissue and in the peripheral blood of breast cancer patients. *Br. J. Cancer* 99, 930–938. doi: 10.1038/sj.bjc.6604621

Peacock, L., Ferris, V., Sharma, R., Sunter, J., Bailey, M., Carrington, M., Gibson, W., 2011. Identification of the meiotic life cycle stage of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 3671–3676. doi: 10.1073/pnas.1019423108

Peebles, R.S., 2010. The intelectins: a new link between the immune response to parasitic infections and allergic inflammation? *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 298, L288–L289. doi: 10.1152/ajplung.00441.2009

Pemberton, A.D., Knight, P.A., Gamble, J., Colledge, W.H., Lee, J.-K., Pierce, M., Miller, H.R.P., 2004. Innate BALB/c enteric epithelial responses to *Trichinella spiralis*: inducible expression of a novel goblet cell lectin, intelectin-2, and its natural deletion in C57BL/10 mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 1894–1901

Pentreath, V.W., 1994. Endotoxins and their significance for murine trypanosomiasis. *Parasitol. Today Pers. Ed* 10, 226–229

Pentreath, V.W., Rees, K., Owolabi, O.A., Philip, K.A., Doua, F., 1990. The somnogenic T lymphocyte suppressor prostaglandin D2 is selectively elevated in cerebrospinal fluid of advanced sleeping sickness patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 795–799

Pépin, J., Milord, F., 1994. The treatment of human African trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 33, 1–47

Picado, A., Ndung'u, J., 2017. Elimination of sleeping sickness in Uganda could be jeopardised by conflict in South Sudan. *Lancet Glob. Health* 5, e28–e29. doi: 10.1016/S2214-109X(16)30288-1

Pitt, J.J., 2009. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin. Biochem. Rev.* 30, 19–34

Ponte-Sucre, A., 2016. An Overview of *Trypanosoma brucei* Infections: An Intense Host–Parasite Interaction. *Front. Microbiol.* 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.02126

Prasad, S., Tyagi, A.K., Aggarwal, B.B., 2016. Detection of inflammatory biomarkers in saliva and urine: Potential in diagnosis, prevention, and treatment for chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* 241, 783–799. doi: 10.1177/1535370216638770

Prezas, P., Arlt, M.J.E., Viktorov, P., Soosaipillai, A., Holzscheiter, L., Schmitt, M., Talieri, M., Diamandis, E.P., Krüger, A., Magdolen, V., 2006. Overexpression of the human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6, and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *Biol. Chem.* 387, 807–811. doi: 10.1515/BC.2006.102

Priotto, G., Chappuis, F., Bastard, M., Flevaud, L., Etard, J.-F., 2012. Early Prediction of Treatment Efficacy in Second-Stage Gambiense Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1662. doi: 10.1371/journal.pntd.0001662

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

Rainey-Barger, E.K., Rumble, J.M., Lalor, S.J., Esen, N., Segal, B.M., Irani, D.N., 2011. The lymphoid chemokine, CXCL13, is dispensable for the initial recruitment of B cells to the acutely inflamed central nervous system. *Brain. Behav. Immun.* 25, 922–931. doi: 10.1016/j.bbi.2010.10.002

Ramström, M., Hagman, C., Mitchell, J.K., Derrick, P.J., Håkansson, P., Bergguist, J., 2005. Depletion of high-abundant proteins in body fluids prior to liquid chromatography fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 4, 410–416

Ransohoff, R.M., Kivisäkk, P., Kidd, G., 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 569–581. doi: 10.1038/nri1130

Rapado-González, Ó., Majem, B., Muínelo-Romay, L., López-López, R., Suarez-Cunqueiro, M.M., 2016. Cancer Salivary Biomarkers for Tumours Distant to the Oral Cavity. *Int. J. Mol. Sci.* 17. doi: 10.3390/ijms17091531

Raynor, M.W., Dawson, G.D., Balcerzak, M., Pretorius, W.G., Ebdon, L., 1997. Electrospray Nebulisation Interface for Micro-High Performance Liquid Chromatography–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 12, 1057–1064. doi: 10.1039/A701593C

Reichel, C.A., Pühr-Westerheide, D., Zuchriegel, G., Uhl, B., Berberich, N., Zahler, S., Wymann, M.P., Luckow, B., Krombach, F., 2012. C-C motif chemokine CCL3 and canonical neutrophil attractants promote neutrophil extravasation through common and distinct mechanisms. *Blood* 120, 880–890. doi: 10.1182/blood-2012-01-402164

Reist, M., Marshall, K.A., Jenner, P., Halliwell, B., 1998. Toxic effects of sulphite in combination with peroxynitrite on neuronal cells. *J. Neurochem.* 71, 2431–2438

Renneberg, R., Chan, C.P., Nie, Y.M., Leung, M.F., Bergmann, A., Ip, M., Rainer, T., Schennach, H., 2013. Neopterin Screening to Improve Safety of Blood Transfusion. *Pteridines* 17, 103–104. doi: 10.1515/pteridines.2006.17.4.103

Rhind, S.G., Shek, P.N., 1999. Cytokines in the pathogenesis of human African trypanosomiasis: antagonistic roles of TNF- α and IL-10, in: *Progress in Human African Trypanosomiasis, Sleeping Sickness*. Springer, Paris, pp. 119–135. doi: 10.1007/978-2-8178-0857-4_7

Richardson, J.B., Evans, B., Pyana, P.P., Van Reet, N., Sstrom, M., Büscher, P., Aksoy, S., Caccone, A., 2016. Whole genome sequencing shows sleeping sickness relapse is due to parasite regrowth and not reinfection. *Evol. Appl.* 9, 381–393. doi: 10.1111/eva.12338

Rivest, S., Lacroix, S., Vallières, L., Nadeau, S., Zhang, J., Laflamme, N., 2000. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med.*



Robertson, M., 1913. Notes on the Life-History of *Trypanosoma gambiense*, with a Brief Reference to the Cycles of *Trypanosoma nanum* and *Trypanosoma pecorum* in *Glossina palpalis*. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 203, 161–184. doi: 10.1098/rstb.1913.0005

Robins, S.P., 1995. Collagen crosslinks in metabolic bone disease. Acta Orthop. Scand. Suppl. 266, 171–175

Roditi, I., Lehane, M.J., 2008. Interactions between trypanosomes and tsetse flies. Curr. Opin. Microbiol., Host–microbe interactions: fungi/parasites/viruses 11, 345–351. doi: 10.1016/j.mib.2008.06.006

Rogers, D., 1985. Trypanosomiasis “risk” or “challenge”: a review. Acta Trop. 42, 5–23

Rolin, S., Hanocq-Quertier, J., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D., Salmon, D., Webb, H., Carrington, M., Voorheis, P., Pays, E., 1996. Simultaneous but Independent Activation of Adenylate Cyclase and Glycosylphosphatidylinositol-Phospholipase C under Stress Conditions in *Trypanosoma brucei*. J. Biol. Chem. 271, 10844–10852. doi: 10.1074/jbc.271.18.10844

Rollins, B.J., 1997. Chemokines. Blood 90, 909–928

Rosenberg, G.A., 2009. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. Lancet Neurol. 8, 205–216. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70016-X

Rot, A., von Andrian, U.H., 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. Annu. Rev. Immunol. 22, 891–928. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104543

Rotureau, B., Van Den Abbeele, J., 2013. Through the dark continent: African trypanosome development in the tsetse fly. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3. doi: 10.3389/fcimb.2013.00053

Rouillon, J., Poupiot, J., Zocevic, A., Amor, F., Léger, T., Garcia, C., Camadro, J.-M., Wong, B., Pinilla, R., Cosette, J., Coenen-Stass, A.M.L., McClorey, G., Roberts, T.C., Wood, M.J.A., Servais, L., Udd, B., Voit, T., Richard, I., Svinartchouk, F., 2015. Serum proteomic profiling reveals fragments of MYOM3 as potential biomarkers for monitoring the outcome of therapeutic interventions in muscular dystrophies. Hum. Mol. Genet. 24, 4916–4932. doi: 10.1093/hmg/ddv214

Rouillon, J., Zocevic, A., Leger, T., Garcia, C., Camadro, J.-M., Udd, B., Wong, B., Servais, L., Voit, T., Svinartchouk, F., 2014. Proteomics profiling of urine reveals specific titin fragments as biomarkers of Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul. Disord. NMD 24, 563–573. doi: 10.1016/j.nmd.2014.03.012

Ruiz, J.A., Simarro, P.P., Josenando, T., 2002. Control of human African trypanosomiasis in the Quiçama focus, Angola. Bull. World Health Organ. 80, 738–745

Russo, R.C., Garcia, C.C., Teixeira, M.M., Amaral, F.A., 2014. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. Expert Rev. Clin. Immunol. 10, 593–619. doi: 10.1586/1744666X.2014.894886

Sadun, E.H., Duxbury, R.E., Williams, J.S., Anderson, R.I., 1963. Fluorescent Antibody Test

for the Serodiagnosis of African and American Trypanosomiasis in Man. *J. Parasitol.* 49, 385–388. doi: 10.2307/3275803

Sansonno, D., Tucci, F.A., Troiani, L., Lauletta, G., Montrone, M., Conteduca, V., Sansonno, L., Dammacco, F., 2008. Increased serum levels of the chemokine CXCL13 and up-regulation of its gene expression are distinctive features of HCV-related cryoglobulinemia and correlate with active cutaneous vasculitis. *Blood* 112, 1620–1627. doi: 10.1182/blood-2008-02-137455

Scheltema, R.A., Hauschild, J.-P., Lange, O., Hornburg, D., Denisov, E., Damoc, E., Kuehn, A., Makarov, A., Mann, M., 2014. The Q Exactive HF, a Benchtop Mass Spectrometer with a Pre-filter, High-performance Quadrupole and an Ultra-high-field Orbitrap Analyzer. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 3698–3708. doi: 10.1074/mcp.M114.043489

Schoknecht, K., Shalev, H., 2012. Blood-brain barrier dysfunction in brain diseases: clinical experience. *Epilepsia* 53 Suppl 6, 7–13. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03697.x

Sehgal, R.N., Jones, H.I., Smith, T.B., 2001. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Mol. Ecol.* 10, 2319–2327

Seibel, M.J., Robins, S.P., Bilezikian, J.P., 1992. Urinary pyridinium crosslinks of collagen: specific markers of bone resorption in metabolic bone disease. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 3, 263–270

Sekhar, G.N., Watson, C.P., Fidanboyly, M., Sanderson, L., Thomas, S.A., 2014. Delivery of antihuman African trypanosomiasis drugs across the blood-brain and blood-CSF barriers. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 71, 245–275. doi: 10.1016/bs.apha.2014.06.003

Shapiro, E.G., Nestrail, I., Delaney, K.A., Rudser, K., Kovac, V., Nair, N., Richard, C.W., Haslett, P., Whitley, C.B., 2016. A Prospective Natural History Study of Mucopolysaccharidosis Type IIIA. *J. Pediatr.* 170, 278–287.e4. doi: 10.1016/j.jpeds.2015.11.079

Sharkia, R., Mahajnah, M., Zalan, A., Sourlis, C., Bauer, P., Schöls, L., 2014. Sanfilippo type A: new clinical manifestations and neuro-imaging findings in patients from the same family in Israel: a case report. *J. Med. Case Reports* 8, 78. doi: 10.1186/1752-1947-8-78

Sheehan, D.V., Lecrubier, Y., Sheehan, K.H., Amorim, P., Janavs, J., Weiller, E., Hergueta, T., Baker, R., Dunbar, G.C., 1998. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J. Clin. Psychiatry* 59 Suppl 20, 22-33-57.

Shi, C., Zhu, Y., Su, Y., Chung, L.W.K., Cheng, T., 2009. Beta2-microglobulin: emerging as a promising cancer therapeutic target. *Drug Discov. Today* 14, 25–30. doi: 10.1016/j.drudis.2008.11.001

Shi, M., Sui, Y.-T., Peskind, E.R., Li, G., Hwang, H., Devic, I., Ginghina, C., Edgar, J.S., Pan, C., Goodlett, D.R., Furay, A.R., Gonzalez-Cuyar, L.F., Zhang, J., 2011. Salivary tau species are potential biomarkers of Alzheimer disease. *J. Alzheimers Dis.* 27, 299–305. doi: 10.3233/JAD-2011-110731

Siddiqui, N.Y., DuBois, L.G., St John-Williams, L., Will, T.J., Grenier, C., Burke, E., Fraser, M.O., Amundsen, C.L., Murphy, S.K., 2015. Optimizing Urine Processing Protocols for Protein and Metabolite Detection. *J. Proteomics Bioinform.* 2015.

- Simarro, P.P., Diarra, A., Ruiz Postigo, J.A., Franco, J.R., Jannin, J.G., 2011. The Human African Trypanosomiasis Control and Surveillance Programme of the World Health Organization 2000–2009: The Way Forward. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1007. doi: 10.1371/journal.pntd.0001007
- Smith, D.H., Pepin, J., Stich, A.H.R., 1998. Human African trypanosomiasis: an emerging public health crisis. *Br. Med. Bull.* 54, 341–355. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a011692
- Sodek, J., Ganss, B., McKee, M.D., 2000. Osteopontin. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* 11, 279–303
- Sørensen, T.L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V.A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R.M., Frederiksen, J.L., Ransohoff, R.M., 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* 103, 807–815. doi: 10.1172/JCI5150
- Stanghellini, A., Josenando, T., 2001. The situation of sleeping sickness in Angola: a calamity. *Trop. Med. Int. Health TM IH* 6, 330–334
- Stephens, N.A., Kieft, R., MacLeod, A., Hajduk, S.L., 2012. Trypanosome resistance to human innate immunity: targeting Achilles' heel. *Trends Parasitol.* 28, 539–545. doi: 10.1016/j.pt.2012.09.002
- Sternberg, J.M., Gierliński, M., Biéler, S., Ferguson, M.A.J., Ndung'u, J.M., 2014. Evaluation of the diagnostic accuracy of prototype rapid tests for human African trypanosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3373. doi: 10.1371/journal.pntd.0003373
- Steubl, D., Kumar, S.V., Tato, M., Mulay, S.R., Larsson, A., Lind, L., Risérus, U., Renders, L., Heemann, U., Carlsson, A.C., Årnlöv, J., Anders, H.-J., 2017. Circulating cathepsin-S levels correlate with GFR decline and sTNFR1 and sTNFR2 levels in mice and humans. *Sci. Rep.* 7. doi: 10.1038/srep43538
- Stijlemans, B., Vankrunkelsven, A., Brys, L., Magez, S., De Baetselier, P., 2008. Role of iron homeostasis in trypanosomiasis-associated anemia. *Immunobiology* 213, 823–835. doi: 10.1016/j.imbio.2008.07.023
- Stoppini, L., Buchs, P.-A., Brun, R., Muller, D., Duport, S., Parisi, L., Seebeck, T., 2000. Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with *Trypanosoma brucei brucei*. *Int. J. Med. Microbiol.* 290, 105–113. doi: 10.1016/S1438-4221(00)80113-7
- Streckfus, C., Bigler, L., Tucci, M., Thigpen, J.T., 2000. A preliminary study of CA15-3, c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, cathepsin-D, and p53 in saliva among women with breast carcinoma. *Cancer Invest.* 18, 101–109
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R.E., McKerrow, J., Reed, S., Tarleton, R., 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.* 118, 1301–1310. doi: 10.1172/JCI33945
- Sullivan, L., Fleming, J., Sastry, L., Mehlert, A., Wall, S.J., Ferguson, M.A.J., 2014. Identification of sVSG117 as an Immunodiagnostic Antigen and Evaluation of a Dual-Antigen Lateral Flow Test for the Diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2976. doi: 10.1371/journal.pntd.0002976

Sullivan, L., Wall, S.J., Carrington, M., Ferguson, M.A.J., 2013. Proteomic selection of immunodiagnostic antigens for human African trypanosomiasis and generation of a prototype lateral flow immunodiagnostic device. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2087. doi: 10.1371/journal.pntd.0002087

Sutherland, C.S., Stone, C.M., Steinmann, P., Tanner, M., Tediosi, F., 2017. Seeing beyond 2020: an economic evaluation of contemporary and emerging strategies for elimination of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Lancet Glob. Health* 5, e69–e79. doi: 10.1016/S2214-109X(16)30237-6

Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T., 2014. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6. doi: 10.1101/cshperspect.a016295

Tarral, A., Blesson, S., Mordt, O.V., Torreele, E., Sassella, D., Bray, M.A., Hovsepian, L., Evène, E., Gualano, V., Felices, M., Strub-Wourgaft, N., 2014. Determination of an optimal dosing regimen for fexinidazole, a novel oral drug for the treatment of human African trypanosomiasis: first-in-human studies. *Clin. Pharmacokinet.* 53, 565–580. doi: 10.1007/s40262-014-0136-3

Taylor, G., 1964. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proc. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* 280, 383–397. doi: 10.1098/rspa.1964.0151

Teixeira, S.C., Lopes, D.S., Gimenes, S.N.C., Teixeira, T.L., da Silva, M.S., Brígido, R.T. e S., da Luz, F.A.C., da Silva, A.A., Silva, M.A., Florentino, P.V., Tavares, P.C.B., dos Santos, M.A., Ávila, V. de M.R., Silva, M.J.B., Elias, M.C., Mortara, R.A., da Silva, C.V., 2017. Mechanistic Insights into the Anti-angiogenic Activity of *Trypanosoma cruzi* Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy. *Sci. Rep.* 7. doi: 10.1038/srep44978

Tetley, L., Turner, C.M., Barry, J.D., Crowe, J.S., Vickerman, K., 1987. Onset of expression of the variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly studied using immunoelectron microscopy. *J. Cell Sci.* 87 (Pt 2), 363–372

Thomson, R., Samanovic, M., Raper, J., 2009. Activity of trypanosome lytic factor: a novel component of innate immunity. *Future Microbiol.* 4, 789–796. doi: 10.2217/fmb.09.57

Tiberti, N., Hainard, A., Lejon, V., Courtioux, B., Matovu, E., Enyaru, J.C., Robin, X., Turck, N., Kristensson, K., Ngoyi, D.M., Vatunga, G.M.L., Krishna, S., Büscher, P., Bisser, S., Ndung'u, J.M., Sanchez, J.-C., 2012. Cerebrospinal fluid neopterin as marker of the meningo-encephalitic stage of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *PloS One* 7, e40909. doi: 10.1371/journal.pone.0040909

Tiberti, N., Hainard, A., Lejon, V., Robin, X., Ngoyi, D.M., Turck, N., Matovu, E., Enyaru, J., Ndung'u, J.M., Scherl, A., Dayon, L., Sanchez, J.-C., 2010. Discovery and verification of osteopontin and Beta-2-microglobulin as promising markers for staging human African trypanosomiasis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 9, 2783–2795. doi: 10.1074/mcp.M110.001008

Tiberti, N., Lejon, V., Hainard, A., Courtioux, B., Robin, X., Turck, N., Kristensson, K., Matovu, E., Enyaru, J.C., Ngoyi, D.M., Krishna, S., Bisser, S., Ndung'u, J.M., Büscher, P., Sanchez, J.-C., 2013. Neopterin Is a Cerebrospinal Fluid Marker for Treatment Outcome Evaluation in Patients Affected by *Trypanosoma brucei gambiense* Sleeping Sickness. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2088. doi: 10.1371/journal.pntd.0002088

Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., Notomi, T., 2008. Loop-mediated isothermal amplification

(LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* 3, 877–882. doi: 10.1038/nprot.2008.57

Torreele, E., Bourdin Trunz, B., Tweats, D., Kaiser, M., Brun, R., Mazué, G., Bray, M.A., Pécoul, B., 2010. Fexinidazole--a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e923. doi: 10.1371/journal.pntd.0000923

Traka, M., Dupree, J.L., Popko, B., Karagogeos, D., 2002. The neuronal adhesion protein TAG-1 is expressed by Schwann cells and oligodendrocytes and is localized to the juxtaparanodal region of myelinated fibers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 3016–3024. doi: 20026306

Trindade, S., Rijo-Ferreira, F., Carvalho, T., Pinto-Neves, D., Guegan, F., Aresta-Branco, F., Bento, F., Young, S.A., Pinto, A., Van Den Abbeele, J., Ribeiro, R.M., Dias, S., Smith, T.K., Figueiredo, L.M., 2016. *Trypanosoma brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. *Cell Host Microbe* 19, 837–848. doi: 10.1016/j.chom.2016.05.002

Truc, P., Jamonneau, V., Cuny, G., Frézil, J.L., 1999. Use of polymerase chain reaction in human African trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bull. World Health Organ.* 77, 745–748

Truc, P., Jamonneau, V., N'Guessan, P., Diallo, P.B., Garcia, A., 1998. Parasitological diagnosis of human African trypanosomiasis: a comparison of the QBC® and miniature anion-exchange centrifugation techniques. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 288–289. doi: 10.1016/S0035-9203(98)91014-8

Truc, P., Lando, A., Penchenier, L., Vatinga, G., Josenando, T., 2012. Human African trypanosomiasis in Angola: clinical observations, treatment, and use of PCR for stage determination of early stage of the disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 10–14. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.10.002

Truc, P., Lejon, V., Magnus, E., Jamonneau, V., Nangouma, A., Verloo, D., Penchenier, L., Büscher, P., 2002. Evaluation of the micro-CATT, CATT/*Trypanosoma brucei gambiense*, and LATEX/*T. b. gambiense* methods for serodiagnosis and surveillance of human African trypanosomiasis in West and Central Africa. *Bull. World Health Organ.* 80, 882–886

Tsai, H.C., Chung, L.Y., Chen, E.R., Liu, Y.C., Lee, S.S.J., Chen, Y.S., Sy, C.L., Wann, S.R., Yen, C.M., 2008. Association of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinase-4 in cerebrospinal fluid with blood-brain barrier dysfunction in patients with eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 20–27

Tshimungu, K., Okenge, L.N., Mukeba, J.N., de Mol, P., 2010. Réémergence de la trypanosomiase humaine africaine dans la province ville de Kinshasa, République démocratique du Congo (RDC). *Médecine Mal. Infect.* 40, 462–467. doi: 10.1016/j.medmal.2009.12.007

Turner, C.M.R., Barry, J.D., Vickerman, K., 1988. Loss of variable antigen during transformation of *Trypanosoma brucei rhodesiense* from bloodstream to procyclic forms in the tsetse fly. *Parasitol. Res.* 74, 507–511. doi: 10.1007/BF00531626

Urade, Y., Hayaishi, O., 2011. Prostaglandin D2 and sleep/wake regulation. *Sleep Med. Rev.* 15, 411–418. doi: 10.1016/j.smrv.2011.08.003

Van Den Abbeele, J., Claes, Y., van Bockstaele, D., Le Ray, D., Coosemans, M., 1999. *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology* 118 (Pt 5), 469–478

Van den Steen, P.E., Van Aelst, I., Starckx, S., Maskos, K., Opdenakker, G., Pagenstecher, A., 2006. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of MMPs and TACE in experimental cerebral malaria. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 86, 873–888. doi: 10.1038/labinvest.3700454

Van Nieuwenhove, L., Büscher, P., Balharbi, F., Humbert, M., Dieltjens, T., Guisez, Y., Lejon, V., 2012. Identification of mimotopes with diagnostic potential for *Trypanosoma brucei gambiense* variant surface glycoproteins using human antibody fractions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1682. doi: 10.1371/journal.pntd.0001682

Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Poelvoorde, P., Nolan, D.P., Lins, L., Van Den Abbeele, J., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H., Jacquet, A., Moguilevsky, N., Dieu, M., Kane, J.P., De Baetselier, P., Brasseur, R., Pays, E., 2003. Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* 422, 83–87. doi: 10.1038/nature01461

Vanhamme, L., Pays, E., 2004. The trypanosome lytic factor of human serum and the molecular basis of sleeping sickness. *Int. J. Parasitol.* 34, 887–898. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.04.008

Vanhollebeke, B., De Muylder, G., Nielsen, M.J., Pays, A., Tebabi, P., Dieu, M., Raes, M., Moestrup, S.K., Pays, E., 2008. A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. *Science* 320, 677–681. doi: 10.1126/science.1156296

Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvart, D., Léger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C., Luppi, P.-H., 2003. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci.* 4, 19. doi: 10.1186/1471-2202-4-19

Viaccoz, A., Ducray, F., Tholance, Y., Barcelos, G.K., Thomas-Maisonneuve, L., Ghesquières, H., Meyronet, D., Quadrio, I., Cartalat-Carel, S., Louis-Tisserand, G., Jouanneau, E., Guyotat, J., Honnorat, J., Perret-Liaudet, A., 2015. CSF neopterin level as a diagnostic marker in primary central nervous system lymphoma. *Neuro-Oncol.* 17, 1497–1503. doi: 10.1093/neuonc/nov092

Vickerman, K., 1969. On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. *J. Cell Sci.* 5, 163–193

Vincendeau, P., Bouteille, B., 2006. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 78, 645–665. doi: 10.1590/S0001-37652006000400004

Vincendeau, P., Gobert, A.P., Daulouède, S., Moynet, D., Mossalayi, M.D., 2003. Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol.* 19, 9–12

Vincent, I.M., Daly, R., Courtioux, B., Cattanach, A.M., Biéler, S., Ndung'u, J.M., Bisser, S., Barrett, M.P., 2016. Metabolomics Identifies Multiple Candidate Biomarkers to Diagnose and

Stage Human African Trypanosomiasis. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, e0005140. doi: 10.1371/journal.pntd.0005140

Walshe, D.P., Ooi, C.P., Lehane, M.J., Haines, L.R., 2009. Chapter 3 The Enemy Within: Interactions Between Tsetse, Trypanosomes and Symbionts, in: Advances in Insect Physiology, Advances in Insect Physiology. Academic Press, pp. 119–175. doi: 10.1016/S0065-2806(09)37003-4

Wamwiri, F.N., Changasi, R.E., 2016. Tsetse Flies (*Glossina*) as Vectors of Human African Trypanosomiasis: A Review. BioMed Res. Int. 2016. doi: 10.1155/2016/6201350

Wang, X., Li, X., Xu, L., Zhan, Y., Yaish-Ohad, S., Erhardt, J.A., Barone, F.C., Feuerstein, G.Z., 2003. Up-regulation of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in the brain after ischemic stroke: adenoviral expression of SLPI protects brain from ischemic injury. Mol. Pharmacol. 64, 833–840. doi: 10.1124/mol.64.4.833

Wastling, S.L., Picozzi, K., Kakembo, A.S.L., Welburn, S.C., 2010. LAMP for human African trypanosomiasis: a comparative study of detection formats. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e865. doi: 10.1371/journal.pntd.0000865

Weber, C., 2003. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. J. Mol. Med. Berl. Ger. 81, 4–19. doi: 10.1007/s00109-002-0391-x

Welburn, S.C., Arnold, K., Maudlin, I., Gooday, G.W., 1993. Rickettsia-like organisms and chitinase production in relation to transmission of trypanosomes by tsetse flies. Parasitology 107, 141–145. doi: 10.1017/S003118200006724X

Weng, Y., Siciliano, S.J., Waldburger, K.E., Sirotna-Meisher, A., Staruch, M.J., Daugherty, B.L., Gould, S.L., Springer, M.S., DeMartino, J.A., 1998. Binding and functional properties of recombinant and endogenous CXCR3 chemokine receptors. J. Biol. Chem. 273, 18288–18291

Wery, M., Wery-Paskoff, S., Van Wettere, N., 1970. The diagnosis of human African trypanosomiasis (*T. b. gambiense*) by the use of fluorescent antibody test. I. Standardization of an easy technique to be used in mass surveys. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. Parasitol. Mycol. 50, 613–634

Wilson, N.H., Key, B., 2007. Neogenin: one receptor, many functions. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 874–878. doi: 10.1016/j.biocel.2006.10.023

Wirleitner, B., Reider, D., Ebner, S., Böck, G., Widner, B., Jaeger, M., Schennach, H., Romani, N., Fuchs, D., 2002. Monocyte-derived dendritic cells release neopterin. J. Leukoc. Biol. 72, 1148–1153

Wirleitner, B., Schroecksnadel, K., Winkler, C., Fuchs, D., 2005. Neopterin in HIV-1 infection. Mol. Immunol. 42, 183–194. doi: 10.1016/j.molimm.2004.06.017

Witte, E.C., Lambers Heerspink, H.J., de Zeeuw, D., Bakker, S.J.L., de Jong, P.E., Gansevoort, R., 2009. First Morning Voids Are More Reliable Than Spot Urine Samples to Assess Microalbuminuria. J. Am. Soc. Nephrol. JASN 20, 436–443. doi: 10.1681/ASN.2008030292

Wong, C.K., Wong, P.T.Y., Tam, L.S., Li, E.K., Chen, D.P., Lam, C.W.K., 2010. Elevated

production of B cell chemokine CXCL13 is correlated with systemic *lupus erythematosus* disease activity. *J. Clin. Immunol.* 30, 45–52. doi: 10.1007/s10875-009-9325-5

Woo, P.T., 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Can. J. Zool.* 47, 921–923

Wormwood, K.L., Aslebagh, R., Channaveerappa, D., Dupree, E.J., Borland, M.M., Ryan, J.P., Darie, C.C., Woods, A.G., 2015. Salivary proteomics and biomarkers in neurology and psychiatry. *Proteomics Clin. Appl.* 9, 899–906. doi: 10.1002/prca.201400153

Wu, C.C., Chu, H.W., Hsu, C.W., Chang, K.P., Liu, H.P., 2015. Saliva proteome profiling reveals potential salivary biomarkers for detection of oral cavity squamous cell carcinoma. *Proteomics* 15, 3394–3404. doi: 10.1002/pmic.201500157

Yamashita, M., Fenn, J.B., 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 88, 4451–4459. doi: 10.1021/j150664a002

Yan, J., Xu, L., Zhang, Y., Zhang, C., Zhang, C., Zhao, F., Feng, L., 2013. Comparative genomic and phylogenetic analyses of the intelectin gene family: implications for their origin and evolution. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 189–199. doi: 10.1016/j.dci.2013.04.016

Yoon, A.J., Cheng, B., Philipone, E., Turner, R., Lamster, I.B., 2012. Inflammatory biomarkers in saliva: assessing the strength of association of diabetes mellitus and periodontal status with the oral inflammatory burden. *J. Clin. Periodontol.* 39, 434–440. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01866.x

Yun, O., Priotto, G., Tong, J., Flevaud, L., Chappuis, F., 2010. NECT Is Next: Implementing the New Drug Combination Therapy for *Trypanosoma brucei gambiense* Sleeping Sickness. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4. doi: 10.1371/journal.pntd.0000720

Zalewska-Szajda, B., Dariusz Szajda, S., Waszkiewicz, N., Chojnowska, S., Gościak, E., Łebkowska, U., Kępka, A., Bossowski, A., Zalewska, A., Janica, J., Zwierz, K., Ładny, J.R., Waszkiel, D., 2013. Activity of N-acetyl-β-D-hexosaminidase in the saliva of children with type 1 diabetes. *Postepy Hig. Med. Doswiadczalnej Online* 67, 996–999. doi: 10.5604/17322693.1067686

Zhang, J., Keene, C.D., Pan, C., Montine, K.S., Montine, T.J., 2008. Proteomics of human neurodegenerative diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 923–932. doi: 10.1097/NEN.0b013e318187a832

Zhang, J., Shi, S., 2013. A literature review of AD7c-ntp as a biomarker for Alzheimer's disease. *Ann. Indian Acad. Neurol.* 16, 307–309. doi: 10.4103/0972-2327.116902

Zhang, Y., DeWitt, D.L., McNeely, T.B., Wahl, S.M., Wahl, L.M., 1997. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *J. Clin. Invest.* 99, 894–900.

Zhao, Z., Nelson, A.R., Betsholtz, C., Zlokovic, B.V., 2015. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* 163, 1064–1078. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.067

Zhu, L., Chen, Y., Liu, C., Deng, H., Zhang, N., Wang, S., Zhang, Z., 2014. Transthyretin as a novel candidate biomarker for preeclampsia. *Exp. Ther. Med.* 7, 1332–1336. doi: 10.3892/etm.2014.1558

Ziegelbauer, K., Multhaupt, G., Overath, P., 1992. Molecular characterization of two invariant surface glycoproteins specific for the bloodstream stage of *Trypanosoma brucei*. J. Biol. Chem. 267, 10797–10803

Zillmann, U., Albiez, E.J., 1986. The Testryp CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis): a field study on gambiense sleeping sickness in Liberia. Trop. Med. Parasitol. Off. Organ Dtsch. Tropenmedizinische Ges. Dtsch. Ges. Tech. Zusammenarbeit GTZ 37, 390–392

Zimmermann-Ivol, C.G., Burkhard, P.R., Le Floch-Rohr, J., Allard, L., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.-C., 2004. Fatty acid binding protein as a serum marker for the early diagnosis of stroke: a pilot study. Mol. Cell. Proteomics MCP 3, 66–72. doi: 10.1074/mcp.M300066-MCP200

Zonta, B., Desmazieres, A., Rinaldi, A., Tait, S., Sherman, D.L., Nolan, M.F., Brophy, P.J., 2011. A Critical Role for Neurofascin in Regulating Action Potential Initiation through Maintenance of the Axon Initial Segment. Neuron 69, 945–956. doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.021

Zubarev, R.A., 2013. The challenge of the proteome dynamic range and its implications for in-depth proteomics. Proteomics 13, 723–726. doi: 10.1002/pmic.201200451

Zumpt, F., 1935. The Systematics of the *Glossina palpalis* Group. Arch. Schiffs-Tropenhygiene 39

Ouvrages spéciaux

Sites internet :

dndi.org, 2007. Bioequivalence Study - Reference Clinical Fexinidazole Tablet Versus Proposed Market Formulation-ClinicalTrials.gov. (29/09/17).
URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02571062>

dndi.org, 2007. Human African Trypanosomiasis: First in Man Clinical Trial of a New Medicinal Product, the SCYX-7158 - ClinicalTrials.gov (29/09/17).
URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01533961>

Infectcheck NeoPT Flyer, 2017. Concile (10/07/17).
URL <https://fr.scribd.com/document/348117162/Infectcheck-NeoPT-Flyer-en-2>

Johnson, K., Sexton, D., 2017. Lumbar puncture: Technique, indications, contraindications, and complications in adults. <https://www.uptodate.com/contents/lumbar-puncture-technique-indications-contraindications-and-complications-in-adults>

Rapports scientifiques :

Aubry, P., Gaüzère, B.-A., 2015. Médecine Tropicale, in: Maladies Tropicales Négligées-Actualités 2015.

Bertrand, E., Serie, F., Kone, I., Rive, J., Campaore, P., Sentilhes, L., Philippe, J., 1973. Symptomatologie générale de la trypanosomiase humaine africaine au moment du dépistage.

Strategic and Technical Advisory Group on NTDs (STAG), 2017. 10th meeting of the Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases. WHO, Geneva, Switzerland

WHO, 2013. Control and surveillance of human African trypanosomiasis: report of a WHO expert committee. World Health Organization, Switzerland. [Rapport du comité d'experts de l'Organisation Mondiale de la Santé : Trypanosomiase humaine africaine : lutte et surveillance ; OMS, série de rapports techniques] no. 984, Genève (Suisse). (Classification NLM: WC 705)

WHO, 2016. Report of the second WHO stakeholders meeting on gambiense human African trypanosomiasis elimination. [Continuer à agir pour réduire l'impact mondial des Maladies Tropicales Négligées : Deuxième rapport de l'OMS sur les maladies tropicales négligées] Genève (Suisse). (Classification NLM: WC 680)

Ouvrages :

Gentilini, M., Caumes, E., Danis, M., Bègué, P., 1993. Trypanosomiasis humaines africaines, Médecine tropicale. 5e ed Paris: Flammarion Médecine Sciences

Jurado, R., Walker, H.K., 1990. Cerebrospinal Fluid, in: Walker, H.K., Hall, W.D., Hurst, J.W. (Eds.), Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. Butterworths, Boston

Kjeldsberg, C.R., Knight, J.A., M.D., 1993. Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous & Synovial Fluids, 3 Sub edition. ed. Amer Society of Clinical, Chicago

Laveissière, C., Penchenier, L., 2000. Manuel de lutte contre la maladie du sommeil en Afrique centrale et occidentale : volume 2 Le diagnostic, OCEAC. ed. Yaounde, Cameroun

Laveissière, C., Penchenier, L., Chippaux, J.-P., 2005. Manuel de lutte contre la maladie du sommeil, Didactiques. IRD, Paris

Stevens, J.R., Brisse, S., 2004. Systematics of trypanosomes of medical and veterinary importance., in: Maudlin, I., Holmes, P.H., Miles, M.A., The Trypanosomiasis. CABI, Wallingford, pp. 1–23

Thèses :

Darsaud, A., 2003. Etude de la Bysrythmie circadienne de l'alternance veille-sommeil, suivi clinique et validation thérapeutique dans un modèle expérimentale de Trypanosomose Africaine. Université de Limoges

Lestrade-Carluer de Kyvon, M.-A., 2015. Actualités dans le diagnostic biologique des trypanosomoses Humaines Africaine (THA). A propos d'un cas récent de THA congénitale. Faculté de Médecine de Tours



Annexes

Annexe 1. Poster : « Nouveaux marqueurs biologiques de la THA à *T. b. gambiense* ».279

Annexe 1. Poster : « Nouveaux marqueurs biologiques de la THA à *T. b. gambiense* »

Nouveaux marqueurs biologiques de la Trypanosomose Humaine Africaine à *Trypanosoma brucei gambiense*.

Julien BONNET^{1*}, Thibault LEGER², Camille GARCIA², Marie-Pauline COUQUET¹, Philippe VIGNOLES¹, Clotilde BOUDOT¹, Sylvie BISSER³, Bertrand COURTILOUX¹

¹INSERM, Université de Limoges, UMR S 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Institut d'Epidémiologie Neurologique et de Neurologie Tropicale, Limoges, France; ²Plateforme Protéomique/Spectrométrie de masse de l'Institut Jacques-Monod, Paris, France; ³Institut Pasteur de la Guyane, Guyane, France; *julien.bonnet@unilim.fr

La THA est une infection parasitaire due à un protozoaire du genre *Trypanosoma*. La sous-espèce *T.b.gambiense* est présente en Afrique de l'Ouest et Centrale alors que *T.b.rhodesiense* est présent en Afrique de l'Est.

Elle évolue en deux stades. Le stade 1 (S1) ou hémolympatique correspond à la multiplication des parasites dans le sang et la lymphe. Il est diagnostiqué en recherchant les parasites présents dans ces fluides. A ce stade, la cytorachie reste normale. Le stade neurologique, qui correspond au passage du parasite dans le système nerveux central, est diagnostiqué via la mise en évidence d'une cytorachie supérieure à 5 éléments/μL ou la découverte d'un trypanosome dans le LCR. Le traitement étant stade dépendant, si le patient en stade 2 (S2) n'est pas correctement diagnostiqué, sa prise en charge ne sera pas adaptée et la mort sera inéluctable.

Nous avons mené cette étude sur une cohorte de patients et de contrôles angolais, recueillis entre 2009 et 2011, comprenant 19 contrôles : 61 patients S1 et 167 patients en S2. Cette cohorte comprend un stade intermédiaire (S INT) où l'invasion précoce du SNC est traitée avec des médicaments de S1. Ces patients présentent une cytorachie comprise entre 5 et 20 cellules/μL et/ou des trypanosomes dans le LCR sans augmentation cellulaire.

Le diagnostic de stade de la pathologie est primordial pour la prise en charge du patient. Les marqueurs de stade de la maladie définis par l'OMS sont peu sensibles (détection du parasite) peu spécifiques (la cytorachie) et pas toujours faciles à mettre en œuvre en situation isolée. Le suivi biologique après traitement est tout aussi complexe.



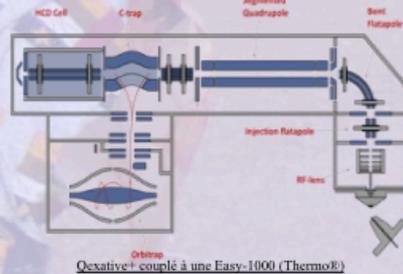
Objectif : Mise en évidence de marqueurs biologiques de stades par spectrométrie de masse et quantification et détermination de seuils pour ces biomarqueurs par ELISA

Screening

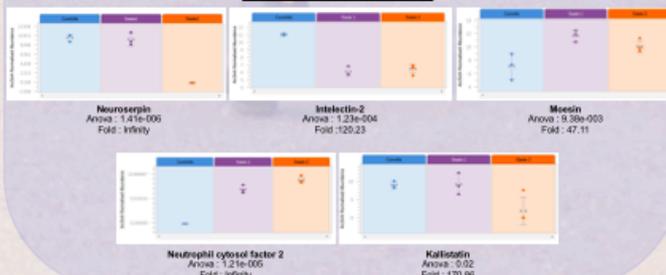
Identification du protéome de plusieurs fluides biologiques d'individus contrôles et de patients. Nous avons analysé via une technique de protéomique, la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), les échantillons de 10 individus (sérum, LCR, urines et salives) avant traitement.

	Trypanosomes dans le sang	Trypanosomes dans le LCR	cytorachie	Troubles neurologiques
3 patients Contrôles	-	-	-	-
3 patients S1	+	-	-	-
4 patients S2	+	+	+	+

Estimation de l'abondance relative de chaque protéine par quantification en Label-Free avec Progenesis Qi for proteomics Waters®.

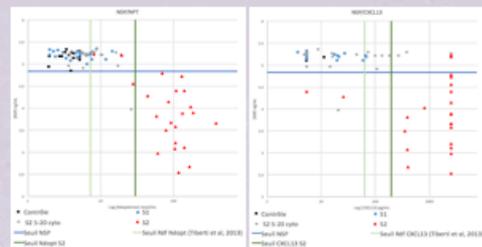


Biomarqueurs potentiels



Validation

Les données obtenues par dosage ELISA sur le LCR de 80 patients et contrôles nous ont permis, via une analyse statistique, de déterminer le ou les meilleurs candidats biomarqueurs pour une utilisation à visée diagnostic ou de suivi. Nos marqueurs ont été comparés à des marqueurs biologiques de stade précédemment décrits tels que la Néoptérine et CXCL-13.



14 Contrôles, 23 Stades 1, 20 Stades INT et 23 Stades 2

Nos données ont permis d'établir une valeur seuil pour discriminer les patients en S1 et S INT, pouvant être traités avec des traitements de stade 1, des patients en S2 nécessitant l'emploi du NECT.

La prochaine étape en ce qui concerne la Neuroserpine sera de la doser dans les échantillons de LCR à 6 et 12 mois post traitement. La finalité est de voir si le taux de Neuroserpine redevient normal et s'il est corrélé à l'évolution de la maladie. Ce biomarqueur pourrait être utilisé pour le suivi des patients.

Dans le cas des biomarqueurs potentiels présents dans la salive et l'urine, une étude similaire est en cours. Un biomarqueur urinaire ou salivaire permettrait le développement d'outils de diagnostic et de suivi à la fois facile à utiliser sur le terrain et peu invasif.



Congrès SFP/SFMM – Toulouse 2017

Exploitation d'une biobanque d'échantillons de patients atteints de Trypanosomose Humaine Africaine à *Trypanosoma brucei gambiense* : recherche et validation de biomarqueurs

La maladie du sommeil ou Trypanosomose Humaine Africaine (THA) est une parasitose vectorielle due à un protozoaire flagellé sanguicole du genre *Trypanosoma* et d'espèce *brucei*. Deux sous-espèces de ce parasite sont pathogènes pour l'Homme : *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* ; transmis par les mouches Tsé-Tsé présentes en Afrique subsaharienne. Cette maladie évolue classiquement en deux stades : le stade hémolyphatique qui est marqué par la présence du parasite dans le sang et la lymphe et le stade nerveux caractérisé par la présence du trypanosome dans le Système Nerveux Centrale. En l'absence de traitement cette maladie est mortelle. Actuellement les traitements accessibles à la population sont stades-dépendants. Pour contrôler un jour cette pathologie, la recherche et l'amélioration des outils de diagnostic de la maladie et le diagnostic de stade sont essentielles. C'est dans ce but que nous avons exploité une biobanque d'échantillons composée de patients infectés par *T. b. gambiense* et d'individus non-infectés pour :

- 1) Évaluer l'efficacité de biomarqueurs de stade déjà existants -Néoptérine et CXCL-13- et nous avons évalué leur potentiel sur les échantillons recueillis lors du suivi des patients post-traitements.
- 2) Rechercher de nouveaux biomarqueurs protéiques par spectrométrie de masse LC-MS/MS.

Notre étude a permis d'identifier, grâce à l'établissement d'un nouveau catalogue protéomique un grand nombre de biomarqueurs potentiels dans le liquide céphalo-rachidien, l'urine et la salive de patients. Certaines de ces protéines pourraient améliorer la prise en charge et le suivi des patients à l'avenir.

Mots-clés : Trypanosomose Humaine Africaine, Biomarqueurs, Protéomique, Diagnostic

Exploitation of biobank samples from HAT-patients infected by *Trypanosoma brucei gambiense*: exploration of biomarkers and their validation

Sleeping sickness, or Human African Trypanosomiasis (HAT), is a parasitic disease caused by a flagellar protozoan of the genus *Trypanosoma* and *brucei* species. Two subspecies of this parasite are pathogenic for humans: *T. b. gambiense* and *T. b. rhodesiense*; transmitted by Tsé-Tse flies present in sub-Saharan Africa. This disease classically evolves in two stages: the hemolymphatic stage which is define by the presence of the parasite in the blood and lymph and the nervous stage characterized by the presence of trypanosome in the central nervous system. Without treatment, this disease is lethal. Currently the available treatments for patients are stage-dependent. In order to control this pathology one day, research and improvement of tools for the diagnosis of the disease and the staging is fundamental. In this context, we have exploited a samples biobank composed of *T. b. gambiense*-infected patients and uninfected controles to:

- 1) evaluate the efficacy of existing stage biomarkers -Neopterin and CXCL-13- and we assessed their potential on the samples collected during post-treatment follow-up of patients.
- 2) determine new protein biomarkers using LC-MS/MS mass spectrometry.

Our study identified a large number of potential biomarkers in cerebrospinal fluid, urine and saliva through the establishment of a new proteomic catalogue. Taking into account some of these proteins may improve patient management and follow-up in the future.

Keywords : Human African Trypanosomiasis, Biomarkers, Proteomics, Diagnosis

