

Le diagnostic du stade dans la maladie du sommeil : vers une nouvelle approche.

V. Lejon & P. Büscher

Institut de médecine tropicale, Département de parasitologie, Nationalestraat 155,B-2000 Antwerpen,Belgique. Tél : +32-3-247.63.69. Fax : +32 3 247 63 73.E-mail : vlej@itg.be

Journée en hommage au MG LAPEYSSONNIE, Le Pharo, Marseille, 20 mars 2002

Summary: Diagnosis of the disease stage in sleeping sickness: towards a new approach.

Diagnosis of the neurological disease stage in *Trypanosoma brucei* (T.b.) gambiense infection is essential to select an optimal chemotherapy. The actual parameters for stage determination, the cerebrospinal fluid (CSF) cell count, total protein concentration and trypanosome detection, are insufficiently specific and sensitive. In order to identify new parameters for stage determination, we studied the neuro-inflammatory immune response in the central nervous system, notably the intrathecal humoral immune response in sleeping sickness patients.

The presence of intrathecal IgM synthesis was identified as an excellent marker of central nervous system involvement. However, intrathecal IgM detection cannot be performed under field conditions. As a consequence of the strong intrathecal IgM synthesis, extremely high concentrations of IgM are found in the CSF of sleeping sickness. We therefore developed a latex agglutination field test (LATEX/IgM) indicative for intrathecal IgM synthesis and CNS involvement in sleeping sickness. Based on our observations on the intrathecal immune response and with LATEX/IgM, we propose a new approach for stage determination in sleeping sickness.

Résumé :

Le diagnostic du stade neurologique dans l'infection par *Trypanosoma brucei* (T.b.) gambiense est essentiel pour la sélection d'une chimiothérapie optimale. Les marqueurs actuels de détermination du stade, la cytorachie, la protéinorachie et la détection de trypanosomes dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), sont insuffisamment spécifiques et sensibles. Dans le but d'identifier de nouveaux marqueurs de détermination du stade, nous avons étudié la réponse neuro-inflammatoire dans le système nerveux central (SNC), plus spécifiquement la réponse intrathécale humorale immunitaire chez des patients atteints de la maladie du sommeil.

La présence d'une synthèse intrathécale d'IgM a été identifiée comme un excellent marqueur d'atteinte du SNC. Cependant, sa détection n'est pas réalisable dans les conditions de terrain. La forte synthèse intrathécale d'IgM induit des concentrations d'IgM extrêmement élevées dans le LCR des patients trypanosomés. Nous avons donc développé un test d'agglutination au latex (LATEX/IgM), qui est indicatif de la synthèse intrathécale d'IgM et l'atteinte du SNC dans la maladie du sommeil.

Sur la base de nos observations quant à la réponse immunitaire intrathécale et le LATEX/IgM, nous proposons une nouvelle approche pour la détermination du stade dans la maladie du sommeil.

T. b. gambiense
human african trypanosomiasis
stage determination
cerebrospinal fluid
IgM

T. b. gambiense
trypanosomose humaine africaine
diagnostic de stade
liquide céphalo-rachidien
IgM

Problématique

L'infection par le parasite *Trypanosoma brucei* (T.b.) gambiense cause la maladie du sommeil ou trypanosomose humaine africaine. La maladie sévit en Afrique sub-saharienne, mais surtout en Afrique centrale où elle prend des formes épidémiques. Le parasite est transmis par les mouches tsé-tsé infectées. Après inoculation lors de la piqûre infectante par la mouche, les trypanosomes prolifèrent dans le sang et la lymphe (stade hémolympatique ou stade 1 de la maladie). Après quelque temps, voire des mois ou des années dans le cas de l'infection par *T. b. gambiense*, le système nerveux central (SNC) est également atteint et le patient entre en stade méningo-encéphalitique ou stade 2 de la maladie. Sans traitement, l'infection mènera inévitablement à la mort.

Le traitement dépend du stade de la maladie (19). Les patients au stade hémolympatique sont traités par la pentamidine ou

la suramine. Ces médicaments sont bien tolérés mais sont inefficaces lors d'une infection du SNC, puisqu'ils ne passent pas la barrière hémato-méningée. Les patients au stade méningo-encéphalitique sont traités presque exclusivement par le mélarsoprol, un médicament arsénical, donc toxique. Parmi les effets secondaires associés au mélarsoprol, le plus sévère est l'encéphalopathie, mortelle jusqu'à 5 % des cas traités. Le traitement par le mélarsoprol nécessite une hospitalisation d'environ 1 mois ou, selon un nouveau schéma continu, de 10 jours (3). La détermination correcte du stade est donc indispensable pour le choix du traitement approprié avec un risque minimal pour le patient.

Pour la détermination du stade, l'OMS prescrit l'examen du liquide céphalo-rachidien (LCR) afin de rechercher le nombre de globules blancs (cytorachie), la concentration totale des protéines (protéinorachie) et la présence du trypanosome (13). Quand la cytorachie dépasse 5 cellules/ μ l, le patient est classé

en stade 2. Dans certains pays comme l'Angola et la Côte d'Ivoire, ce seuil a été augmenté jusqu'à 20 cellules/ μ l (5, 17). Des erreurs de comptage sont fréquentes et la précision est faible, surtout quand la cytorachie est basse (observations personnelles). Les seuils normaux de la protéinorachie dépendent de la méthodologie appliquée et sont plutôt arbitraires. En pratique, la protéinorachie est rarement mesurée à cause du prix élevé et de la stabilité limitée des réactifs, du besoin en matériel sophistiqué et de l'opinion selon laquelle l'augmentation de la protéinorachie n'apporte pas un supplément d'information au diagnostic du stade de la maladie. Un problème commun à la cytorachie et la protéinorachie est qu'une valeur élevée n'est pas spécifique de la trypanosomose au stade méningo-encéphalitique et peut être liée à d'autres infections neurologiques. La détection d'un trypanosome dans le LCR classe le patient au stade 2, mais les examens parasitologiques sont peu sensibles. L'examen direct du LCR permet de détecter des trypanosomes seulement lorsqu'ils sont très nombreux (> 1 trypanosome/ μ l). Les techniques de concentration comme la double centrifugation ou la simple centrifugation modifiée (4, 12) sont plus laborieuses, rarement exécutées et également peu sensibles.

Ces inconvénients des marqueurs classiques du stade soulignent la nécessité d'identifier de nouveaux paramètres de diagnostic du stade qui soient plus spécifiques et sensibles. Dans ce but, nous avons examiné l'hypothèse selon laquelle les événements neuro-inflammatoires reflètent l'atteinte du SNC. Cette neuro-inflammation dans le SNC des patients infectés par *T. b. gambiense* peut être étudiée par la détection de la réponse intrathécale humorale.

Étude de la réponse intrathécale humorale des patients infectés par *T. b. gambiense*

Nous avons étudié l'intégrité de la barrière hémato-méningée, la synthèse intrathécale d'immunoglobulines et la synthèse d'anticorps spécifiques du trypanosome comme paramètres de la réponse intrathécale humorale.

L'intégrité de la barrière hémato-méningée a été évaluée par le quotient d'albumine LCR/sérum (Q_{Alb}), qui reflète la diffusion des protéines sériques dans le LCR (1, 16).

La synthèse intrathécale d'immunoglobulines peut être quantifiée grâce aux formules de REIBER (14, 16). Le rapport hyperbolique entre (Q_{Alb}) et le quotient maximal d'immunoglobuline LCR/sérum (Q_{Ig}), en l'absence d'une synthèse intrathécale d'immunoglobulines, est calculé selon la formule $Q_{Lim} = (a/b) \times (Q_{Alb}^2 + b^2)^{1/2} - c$. Les constantes a, b, et c dans la formule sont différentes pour IgG, IgA et IgM. Par exemple, pour le calcul de Q_{Lim} (IgG), $a/b = 0,93$, $b^2 = 6 \times 10^6$, $c = 1,7 \times 10^3$. Pour un $Q_{Alb} = 2,88 \times 10^{-3}$, le Q_{Lim} (IgG) est $1,8 \times 10^3$. Un patient Y avec $Q_{Alb} = 2,88 \times 10^{-3}$ et un quotient d'IgG LCR/sérum, $Q_{IgG} = 25,1 \times 10^{-3} \text{ g/l} / 21,8 \text{ g/l} = 1,15 \times 10^{-3}$, n'a pas de synthèse intrathécale d'IgG, parce que $Q_{IgG} < Q_{Lim}$ (IgG). Un patient Z, avec le même Q_{Alb} et un $Q_{IgG} = 80,1 \times 10^{-3} \text{ g/l} / 21,8 \text{ g/l} = 3,67 \times 10^{-3}$, a une synthèse intrathécale d'IgG, parce que $Q_{IgG} > Q_{Lim}$. Dans le cas d'une synthèse locale, la synthèse peut être exprimée comme fraction intrathécale (IF) qui est le pourcentage d'immunoglobulines dans le LCR (IgG, IgA ou IgM) d'origine locale. Pour l'exemple du patient Z, $IF_{IgG} = 51\%$, donc 51 % de l'IgG dans le LCR est d'origine locale, soit $40,9 \times 10^{-3} \text{ g/l}$.

La synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques du trypanosome peut être calculée sur la base de l'index d'anticorps (AI) qui est le rapport entre le quotient d'anticorps spécifiques

LCR/sérum (Q_{Igsp}) et le quotient d'immunoglobulines totales LCR/sérum (Q_{Ig}). Donc $AI = Q_{Igsp} / Q_{Ig}$. Quand $Q_{IgG} > Q_{Lim}$, la formule est adaptée et devient $AI = Q_{Igsp} / Q_{Lim}$. Les anticorps spécifiques diffusent du sérum dans le LCR de la même façon, donc l'index d'anticorps reste $< 1,5$ en l'absence d'inflammation intrathécale. Quand l'index AI dépasse 1,5, il indique une synthèse additionnelle d'anticorps spécifiques dans le SNC (15, 16, 18). Dans l'exemple du patient Y, Q_{IgGsp} était $0,49 \times 10^{-3}$, donc le AI (IgG) = Q_{IgGsp} / Q_{Lim} (IgG) = $0,49 \times 10^{-3} / 1,15 \times 10^{-3} = 0,43$. Le patient Y n'a pas une synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques du trypanosome du type IgG. Dans l'exemple du patient Z, $Q_{IgG} > Q_{Lim}$ et Q_{IgGsp} était $11,25 \times 10^{-3}$, donc le AI (IgG) = Q_{IgGsp} / Q_{Lim} (IgG) = $11,25 \times 10^{-3} / 1,8 \times 10^{-3} = 6,25$. Le patient Z a une synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques du trypanosome du type IgG.

La positivité de la IF et de l'AI indique, respectivement, la synthèse d'immunoglobulines donc l'atteinte neurologique d'une infection, et la synthèse d'anticorps spécifiques dans le SNC, donc une atteinte neurologique spécifique de la trypanosomose.

Ces paramètres ont été étudiés chez 373 patients infectés par *T. b. gambiense* (8), dont les résultats sont résumés ci-après. Cent soixante trois patients avaient une cytorachie > 20 cellules/ μ l, indicative d'une neuro-inflammation. Parmi eux, 55 à 96 % étaient positifs pour les marqueurs étudiés (valeur pathologique de Q_{Alb} , IF_{IgG} , IF_{IgA} , IF_{IgM} ou AI (IgG)). En particulier, 96 % de ces patients avaient une $IF_{IgM} > 0\%$: la synthèse intrathécale d'IgM se montre donc le marqueur le plus sensible pour détecter une atteinte du SNC, ce qui confirme des résultats publiés antérieurement (2).

En outre, 6 à 14 % des 86 patients en stade 1 selon les critères classiques (soit 5 cellules/ μ l et absence de trypanosome dans le LCR) étaient positifs pour un des paramètres étudiés. De nouveau, la synthèse intrathécale d'IgM était observée le plus fréquemment, chez 14% des patients, qui présentaient donc une atteinte du SNC non diagnostiquée selon les critères classiques. Les données du suivi de ces patients n'étant pas disponibles, il est impossible d'évaluer si le traitement par la pentamidine administré à ces patients a été efficace ou s'ils auraient dû recevoir le mélasoprol. En général, la fréquence des rechutes chez ce type de patients traités par la pentamidine est de 7 à 16 %.

Enfin, deux groupes de patients au stade intermédiaire ont été analysés ; un groupe de 80 patients avec 6-20 cellules/ μ l sans trypanosome dans le LCR, et un groupe de 44 patients avec 0-20 cellules/ μ l mais avec présence de trypanosomes dans le LCR. Les proportions de positivité pour les nouveaux marqueurs étaient similaires dans les 2 groupes et, de nouveau, une proportion significative (37-52 %) de ces patients était positive pour IF_{IgM} . D'habitude, les patients au stade intermédiaire sont traités par le mélasoprol.

L'efficacité de la pentamidine au stade intermédiaire a été testée par plusieurs essais cliniques. En Côte d'Ivoire, le nombre de rechutes après traitement par la pentamidine était similaire (6-7 %) chez les patients au stade intermédiaire et chez les patients au stade 1 (5). Au contraire, MSF France a observé un taux de rechutes de 43 % après traitement par la pentamidine des patients au stade intermédiaire (LEGROS, résultats non publiés). Chez ces derniers, nous avons démontré que la synthèse intrathécale d'IgM était un facteur de risque de rechute (8). Le risque de rechute après traitement par la pentamidine était 20 fois plus élevé chez les patients au stade intermédiaire avec synthèse d'IgM intrathécale que chez les patients sans synthèse d'IgM intrathécale décelable.

La détection d'IgM sur le terrain

Nos observations soulignent l'importance de la détection d'une synthèse intrathécale d'IgM pour le diagnostic de l'atteinte du SNC, donc pour la détermination du stade et une décision thérapeutique correcte. Cependant, la détection de la synthèse intrathécale d'IgM n'est pas réalisable dans les conditions de terrain en Afrique rurale. La forte synthèse intrathécale d'IgM entraîne des taux extrêmement élevés d'IgM dans le LCR, caractéristiques de la trypanosomose au stade méningo-encéphalitique (6, 7, 11, 20). Bien que ce phénomène soit connu depuis plus de 30 ans, la détection d'IgM dans le LCR n'a jamais été appliquée en routine au diagnostic de stade, par manque de tests quantitatifs simples. Afin d'y remédier, nous avons développé un test d'agglutination sur carte, le LATEX/IgM (9, 10). Ce test est exécuté sur des dilutions sériées de LCR. Le titre final, défini comme la dernière dilution encore positive, est corrélé à la concentration d'IgM dans le LCR (en mg/l). Le test est stable à température élevée, sensible et simple à exécuter. Un titre final 8 est sensible à 89 % et spécifique à 93 % pour la synthèse intrathécale d'IgM. Le test LATEX/IgM semble donc capable de détecter de façon fiable la synthèse intrathécale d'IgM et l'atteinte du SNC (10). Le test LATEX/IgM a aussi été évalué chez les patients au stade intermédiaire traités par la pentamidine (8). Le risque de rechute était 12 fois plus élevé pour les patients avec un titre LATEX/IgM 8 que pour les patients avec un titre final <8. Un LCR avec un titre final élevé en LATEX/IgM est donc à considérer comme facteur de risque de rechute après traitement par la pentamidine.

Conclusions

La réponse humorale intrathécale chez les patients infectés par *T. b. gambiense* est dominée par les IgM. La détection de la synthèse intrathécale d'IgM est un marqueur sensible de neuro-inflammation et d'atteinte neurologique. Jusqu'à présent, cette détection n'était pas réalisable en routine sur le terrain. Le titrage d'IgM dans le LCR à l'aide du test LATEX/IgM peut répondre à ce besoin. Un titre d'IgM 8 dans le LCR signale un facteur de risque élevé de rechute après traitement par la pentamidine.

Sur la base de ces observations, nous proposons une nouvelle approche pour la détermination du stade dans la maladie du sommeil. Les patients présentant une cytorachie supérieure à 20 cellules/ μ l ou une synthèse intrathécale d'IgM ont une atteinte du SNC et devraient être traités par le mélasoprol. Les patients ayant une cytorachie inférieure à 20 cellules/ μ l et sans synthèse détectable d'IgM sont encore au stade 1 et devraient être traités par la pentamidine.

Plusieurs questions restent sans réponse: la présence de trypanosomes dans le LCR chez des patients avec une cytorachie inférieure à 20 cellules/ μ l sans synthèse intrathécale d'IgM, la signification d'une synthèse d'IgM intrathécale au stade 1 défini par les critères classiques, et savoir si ces patients seraient guéris par la pentamidine ou devraient recevoir le mélasoprol.

Remerciements

Nous remercions le Neurochemisches Labor (Université Göttingen, Allemagne), l'Institut de neurologie et d'épidémiologie tropicale (Limoges), l'Institut Pierre Richet (Bouaké, Côte d'Ivoire), le Projet de recherches cliniques sur la trypanosomose (Daloa, Côte d'Ivoire), le laboratoire de neurochimie (Université catholique de Louvain, Bruxelles), Médecins sans frontières (Paris, France), ÉPICENTRE (Paris, France), le laboratoire de biologie clinique (IMT, Anvers) pour leur collaboration ainsi que le Directeur général de la coopération internationale belge pour son soutien financier.

Références bibliographiques

- ANDERSSON M, ALVAREZ-CERMENO J, BERNARDI G, COGATO I, FREDMAN P *et al.* - Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1994, **57**, 897-902.
- BISSER S, LEJON V, PREUX PM, BOUTEILLE B, STANGHELLINI A *et al.* - Blood-cerebrospinal fluid barrier and intrathecal immunoglobulins compared to field diagnosis of central nervous system involvement in sleeping sickness. *J Neurol Sci*, 2002, **193**, 127-135.
- BURRI C, NKUNKU S, MEROLLE A, SMITH T, BLUM J & BRUN R - Efficacy of new, concise schedule for melarsoprol in treatment of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a randomised trial. *Lancet*, 2000, **355**, 1419-1425.
- CATTAND P, MIEZAN BT & DE RAADT P - Human African trypanosomiasis: use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *Bull Org mond santé*, 1988, **66**, 83-86.
- DOUA F, MIEZAN TW, SANON SR, BOA YF & BALTZ T - The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, **55**, 586-588.
- KNOBLOCH J, TISCHENDORF F, KÖNIG J & MEHLITZ D - Evaluation of immunoassays for diagnosis and management of sleeping sickness in Liberia. *Tropenmed Parasitol*, 1984, **35**, 137-140.
- LAMBERT PH, BERNEY M & KAZYUMBA G - Immune complexes in serum and in cerebrospinal fluid in African trypanosomiasis. Correlation with polyclonal B cell activation and with intracerebral immunoglobulin synthesis. *J Clin Invest*, 1981, **67**, 77-85.
- LEJON V - *Neuro-inflammation in human West-African trypanosomiasis: a basis for improved stage determination*. These doctoral, Université d'Anvers, Belgique, 2002, pp 3-201.
- LEJON V, BÜSCHER P, SEMA NH, MAGNUS E & VAN MEIRVENNE N - Human African Trypanosomiasis: a latex agglutination field test for quantifying IgM in cerebrospinal fluid. *Bull Org mond santé*, 1998, **76**, 553-558.
- LEJON V, LEGROS D, RICHER M, RUIZ JA, JAMONNEAU V *et al.* - IgM quantification in the cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients by a latex card agglutination test. *Trop Med Int Health*, 2002, **7**, 685-692.
- MATTERN P - Etat actuel et résultats des techniques immunologiques utilisées à l'Institut Pasteur de Dakar pour le diagnostic et l'étude de la trypanosomiase humaine africaine. *Bull Org mond santé*, 1968, **38**, 1-8.
- MIEZAN TW, MEDA AH, DOUA F, DJÉ NN, LEJON V & BÜSCHER P - Single centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2000, **94**, 293.
- OMS - Control and surveillance of African trypanosomiasis. *Sér rapp techn OMS*, 1998, **881**, 1-113.
- REIBER H - Cerebrospinal fluid-physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult Scler*, 1998, **4**, 99-107.
- REIBER H & LANGE P - Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin Chem*, 1991, **37**, 1153-1160.
- REIBER H & PETER JB - Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci*, 2001, **184**, 101-122.
- STANGHELLINI A & JOSENANDO T - The situation of sleeping sickness in Angola: a calamity. *Trop Med Int Health*, 2001, **6**, 330-334.
- TUMANI H, NÖLKER G & REIBER H - Relevance of cerebrospinal fluid variables for early diagnosis of neuroborreliosis. *Neurology*, 1995, **45**, 1663-1670.
- VAN NIEUWENHOVE S - Present strategies in the treatment of human African trypanosomiasis. In: DUMAS M, BOUTEILLE B, BUGUET A, editors. *Progress in human African trypanosomiasis, sleeping sickness*. Paris: Springer, 1999, 253-281.
- WHITTLE HC, GREENWOOD BM, BIDWELL DE, BARTLETT A & VOLLER A - IgM and antibody measurement in the diagnosis and management of Gambian trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg*, 1977, **26**, 1129-1135.

Intervention en séance d'E. PICHARD :

Y a-t-il une corrélation entre les tests biologiques pratiqués sur le LCR au cours de la trypanosomose et les lésions encéphaliques visualisées par l'imagerie par résonance magnétique, utile à l'identification du stade de la maladie ?

Réponse de V. LEJON : L'imagerie par résonance magnétique n'est pas appliquée en Afrique rurale où la maladie sévit. Dans la trypanosomose humaine africaine, les données de l'imagerie par résonance magnétique sont donc limitées aux cas diagnostiqués dans des pays non endémiques, et sont jusqu'à maintenant trop rares pour étudier une corrélation avec les tests biologiques dans le LCR.