UTILISATION DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE DANS LE DIAGNOSTIC DE LA TRYPANOSOMOSE HUMAINE AFRICAINE

V. JAMONNEAU, P. SOLANO, G. CUNY

Med. Trop. 2001 ; **61** : 347-354

RESUME • La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil, reste un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne. Cette parasitose, transmise par les glossines, est causée en Afrique de l'Ouest et Centrale par *Trypanosoma brucei gambiense.* La maladie évolue classiquement en deux phases : la première, lymphatico-sanguine, et la seconde, méningo-encéphalitique. Le diagnostic de la maladie sur le terrain (à partir du sang), et le diagnostic de phase au laboratoire (à partir du liquide céphalo-rachidien, LCR) sont rendus très difficiles à cause de l'absence de signes cliniques spécifiques et de parasitémies fluctuantes. L'emploi de la PCR utilisant des amorces spécifiques de *Trypanosoma brucei* s.l dans l'optique d'obtenir une meilleure sensibilité et spécificité par rapport aux tests classiquement mis en oeuvre a été revue à partir d'études récentes publiées à ce sujet. Dans le cadre du dépistage actif, la PCR sur sang, utilisée en aval des tests sérologiques, pourra servir de décision pour établir si un suspect est infecté ou non. Pour un investissement matériel important au départ, mais unique, le coût en consommables reste inférieur aux techniques classiques (mAECt : minicolonne échangeuse d'anions), pour une sensibilité supérieure. Appliquée sur le LCR, la PCR qui offre un gain de sensibilité certain en comparaison aux critères classiques, apparaît d'un intérêt certain pour le suivi des traitements et le diagnostic précoce des cas de rechute. Des recherches restent à mener avant une application réelle, notamment sur la spécificité : tant que l'on ne pourra pas affirmer avec certitude qu'une PCR positive est le signe d'une infection active par un trypanosome pathogène pour l'homme, son utilisation restera limitée.

MOTS-CLES • Trypanosomiase humaine africaine - Diagnostic- PCR- Sang - LCR-

USEFULNESS OF MOLECULAR BIOLOGY FOR DIAGNOSIS OF HUMAN AFRICAN TRYPANOSOMIASIS

ABSTRACT • Human African trypanosomiasis (HAT), a.k.a. sleeping sickness, is still a major public health problem in sub-Saharan Africa. In West and Central Africa, this vector-borne parasitic disease in caused by Trypanosoma brucei gambiense transmitted by glossidinae. According to the classic model, HAT is characterized by two phases, i.e. the early circulating phase and the later neurological phase. Diagnosis from blood samples in the field and staging from cerebrospinal fluid samples in the laboratory are difficult due to the absence of specific clinical symptoms and fluctuating parasitemia levels. Several recent studies have described the use of the polymerase chain reaction (PCR) technique with primers specific for Trypanosoma brucei s.1 to improve the sensitivity and specificity of conventional test methods. Within the framework of active screening, PCR carried out on blood samples prior to serological tests could be helpful in identifying suspected infection. Although the one-time initial investment is high, expenditures on expendables is lower for PCR than conventional techniques (mAECt: miniature anion exchange column test) while achieving higher sensitivity. For application on cerebrospinal fluid samples, PCR also achieves better sensitivity than conventional techniques and thus can contribute to staging of the disease. Identification of the early or late phase is important for documenting successful therapy and early diagnosis of relapse. Further research will be needed before actual implementation. This is notably the case with regard to specificity since it is still not possible to assert that positive PCR is a sign of active infection by a pathogenic trypanosome in man.

KEY WORDS • Human African trypanosomiasis - Diagnosis - PCR - Blood - Cerebrospinal fluid.

La Trypanosomose humaine africaine (THA) ou maladie du sommeil, reste un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne. Le nombre réel de cas, très souvent sous-estimé à cause de la faible proportion de population à risque sous surveillance, oscillerait entre 300 000 et 500 000 (1). Cette parasitose, transmise par les glossines ou mouches tsé-tsé, est causée par des protozoaires du genre *Trypanosoma* : *Trypanosoma brucei gambiense*, classiquement reconnu comme responsable d'une forme « chronique » de la maladie en Afrique de l'Ouest et Centrale, et *Trypanosoma brucei rhodesiense,* considéré responsable d'une forme plus aiguë en Afrique de l'Est.

• *Travail de l'Unité UR 035 (V.J., Docteur en parasitologie ; P.S., Responsable de l'équipe THA et glossines de l'Institut Pierre Richet), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Institut Pierre Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire et du Laboratoire de Recherche et de Coordination sur les Trypanosomoses IRD/CIRAD UR 035 (G.C., Responsable de l'Unité) Institut de Recherche pour le Développement (IRD) UR 035, Campus de Baillarguet, France.*

• *Correspondance : P. SOLANO, Institut Pierre Richet, 01 BP 1500, Bouaké 01, Côte d'Ivoire • Fax : +225 31 63 27 38 • e-mail :solano@ird.ci •*

• *Article sollicité.*

EVOLUTION DE LA MALADIE DU SOMMEIL EN DEUX PHASES

On décrit deux phases dans la THA, la première, lymphatico-sanguine (première période) durant laquelle le parasite se multiplie dans le sang et dans la lymphe, et la deuxième, méningo-encéphalitique (deuxième période) qui correspond au passage du parasite dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Au cours de la phase lymphatico-sanguine, le malade présente des signes cliniques non spécifiques tels que des accès de fièvre fréquents, des céphalées ou des signes cutanés (2, 3). La phase méningo-encéphalitique se caractérise habituellement par l'apparition de troubles neurologiques (troubles du comportement, de la conscience, de la motricité) et, sans traitement, conduit à la mort du malade. Du fait d'une importante diversité clinique (4), il est difficile d'établir un diagnostic de THA à partir d'un examen clinique seul (2). On a alors recours à des méthodes de diagnostic direct ou indirect. Le diagnostic direct cherche à mettre en évidence la présence du parasite dans les liquides biologiques, alors que les méthodes indirectes recherchent des traces de passage du parasite lors d'une réaction sérologique. En pratique, le diagnostic indirect est utilisé préalablement pour déterminer les sujets sur lesquels porteront les examens du diagnostic direct.

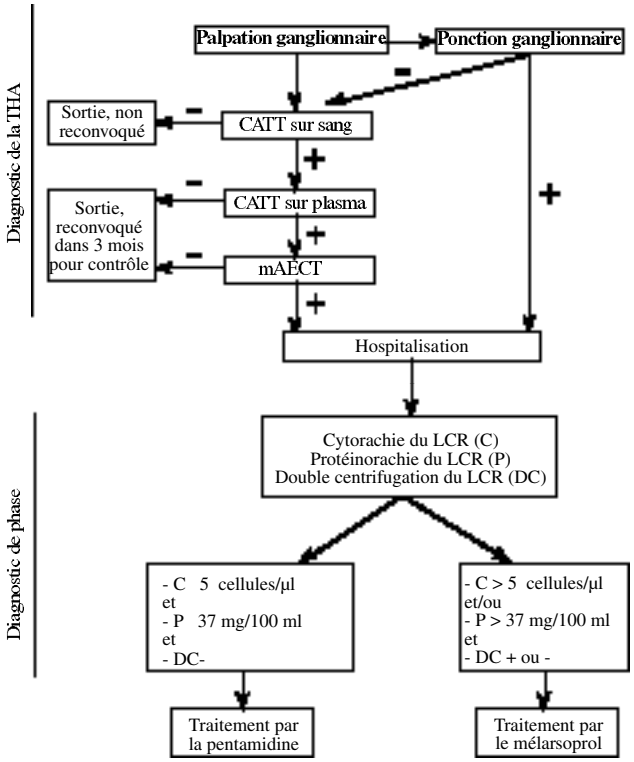


Figure 1 - Schéma classique du dépistage et du diagnostic de la phase de la trypanosomiase humaine africaine.

LE DIAGNOSTIC SUR LE TERRAIN

Les méthodes de diagnostic indirect, utilisées en dépistage de routine se basent sur la détection d'anticorps ou d'antigènes spécifiques (5-8). En cas de positivité de l'un de ces tests, le parasite devra être mis en évidence par une méthode directe pour décider du traitement (1). Le diagnostic direct pour la mise en évidence des trypanosomes consiste en l'observation microscopique de la lymphe et du sang. L'observation de la lymphe se fait simplement par examen direct du suc ganglionnaire entre lame et lamelle en cas de présence d'adénopathies cervicales. L'observation du sang, du fait des parasitémies souvent très faibles, nécessite l'utilisation de techniques de concentration comme par exemple, la centrifugation en tubes capillaires (9, 10), la colonne échangeuse d'anions (mAECt) (11, 12), ou le *quantitative buffy-coat* (13) (Fig. 1).

LE DIAGNOSTIC DE PHASE AU LABORATOIRE

L'examen du liquide céphalo-rachidien (LCR) permet de déterminer le stade de la maladie (diagnostic de phase), et conditionne la nature du traitement à administrer. Dans ce dernier cas, la recherche de trypanosomes se fait classiquement par simple ou double centrifugation du LCR (14, 15). Ces techniques étant peu sensibles, des critères indirects d'altération du LCR sont aussi utilisés, comme la protéinorachie (dosage des protéines) et la cytorachie (comptage des leucocytes). L'OMS préconise, pour un diagnostic de deuxième période, une cytorachie supérieure à 5 éléments/µl, et/ou une protéinorachie supérieure à 37 mg/100 ml, avec ou sans mise en évidence des trypanosomes dans le LCR (1). Il faut préciser que les médicaments utilisés pour les malades en première période (pentamidine, suramine) sont considérés peu toxiques, alors que le mélarsoprol utilisé pour la seconde période, est un dérivé arsenical avec de forts effets secondaires, responsable d'environ 10 % d'encéphalopathies réactives parmi les patients traités.

LA NECESSITE D'UN MEILLEUR TEST DIAGNOSTIQUE

Le diagnostic est donc d'une importance cruciale au niveau individuel, car il permet non seulement d'assigner un statut de « malade » pour la personne examinée, mais aussi de décider quel traitement sera donné en fonction de la phase de la maladie ; et au niveau de la population, car les stratégies de lutte contre cette maladie touchant des populations rurales dans des régions souvent difficiles d'accès reposent en partie sur la détection précoce et le traitement des malades. Chaque méthode de diagnostic est évaluée en fonction de sa sensibilité [vrais positifs/(vrais positifs + faux négatifs)], sa spécificité [vrais négatifs/(vrais négatifs + faux positifs)] (16), et sa faisabilité (facilité de mise en œuvre au laboratoire ou dans des conditions de terrain, temps d'exécution, coût, qualification du personnel nécessaire). Il est reproché aux tech-

niques actuellement utilisées de manquer souvent de sensibilité et/ou de spécificité :

- manque de sensibilité des examens parasitologiques du fait de parasitémies faibles (17), manque de sensibilité des méthodes indirectes dans le cas d'infections précoces (les anticorps ou antigènes recherchés ne circulent pas encore dans le sang) (18) ou d'infections ne générant pas les anticorps ou antigènes recherchés (19) ;

- manque de spécificité des méthodes sérologiques souvent attribué d'une part à des réactions croisées avec d'autres trypanosomes (suite à une infection transitoire par exemple à *Trypanosoma congolense*) (20) ou d'autres parasites humains (21) et d'autre part à des persistances d'anticorps ou d'antigènes plusieurs mois, voire plusieurs années après traitement.

Depuis ces dernières années, des techniques moléculaires, basées sur la détection d'ADN de trypanosomes par PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou amplification en chaîne par polymérase) sont évaluées dans le domaine de la recherche afin de pouvoir les utiliser pour améliorer le diagnostic de la THA. Un accent particulier est naturellement porté à l'adaptation de ces techniques dans les conditions proches de terrain. Idéalement, un bon candidat moléculaire pour le diagnostic devrait posséder les caractéristiques suivantes :

. être répété un très grand nombre de fois afin d'assurer une sensibilité optimale,

. être situé dans des régions suffisamment conservées pour éviter les problèmes liés à la variabilité intraspécifique,

. être spécifique de trypanosomes pathogènes de l'homme,

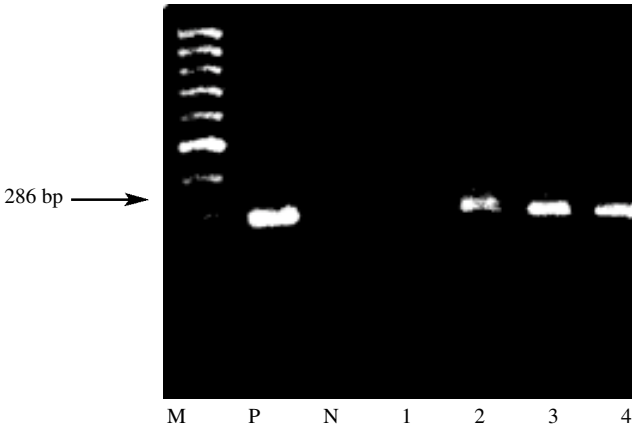
. être détectable facilement dans les liquides biologiques et chez le vecteur.

Cette revue a pour but de montrer les principales applications de la PCR au diagnostic de la THA. Nous nous limiterons donc à des études ayant employé des marqueurs déjà existants, qui ne possèdent malheureusement pas toutes ces caractéristiques idéales. Nous distinguerons le diagnostic classique (recherche des parasites dans le sang) et le diagnostic de phase. Nous comparerons les techniques moléculaires et les techniques directes et indirectes couramment utilisées, sur les critères classiques de sensibilité, de spécificité et de faisabilité. Enfin, nous discuterons l'apport de la PCR dans la lutte contre la THA.

LA PCR SUR SANG APPLIQUEE AU DIAGNOSTIC

Sensibilité.

Les premières études moléculaires dans le domaine des trypanosomoses se sont basées sur le développement de sondes ADN spécifiques d'espèces de trypanosomes. Puis, à partir de ces sondes, avec l'avènement de la PCR, des amorces *(primers)* ont été synthétisées, spécifiques de telle ou telle espèce, sous-espèce ou groupe de trypanosome. Chez *Trypanosoma brucei* s.l., deux marqueurs moléculaires ont ainsi été décrits, qui permettent l'amplification de séquences d'ADN satellites (22, 23). A partir de ces séquences, des



M : Marqueur de poids moléculaire (100 bp ladder, Promega, Mannheim, Germany) ; P : contrôle positif (ADN témoin) ; N : contrôle négatif (sans ADN) ; 1 : ADN contrôle : sang humain ; 2 : sang humain infecté avec *Trypanosoma brucei brucei* ; 3 et 4 : sang d'individus malades de THA à *Trypanosoma brucei gambiense.*

Figure 2 - Détection par PCR de Trypanosoma brucei *dans le sang humain à l'aide des amorces ESAG 6 et 7 (32). Ces amorces permettent l'amplification spécifique de* Trypanosoma brucei *s.l. avec une bande de taille 286 paires de bases (bp).*

amorces pour la PCR ont été synthétisées, dont le couple le plus classique, TBR1-2 (24). Le fait d'utiliser des séquences satellites, qui sont répétées des milliers de fois, permet d'obtenir la meilleure sensibilité possible.

Avec ces amorces, Kanmogne et Coll. (25) ont obtenu une sensibilité expérimentale de 25 parasites par ml de sang après une extraction organique classique utilisant le phénol. Penchenier et Coll. (26) ont appliqué la PCR sur sang au Cameroun, en utilisant les mêmes amorces associées à une méthode simplifiée d'extraction d'ADN par une résine chélatrice d'anions, le Chelex (27). Par comparaison avec la parasitologie, ils ont obtenu une sensibilité de 99,4 %. Ce type de protocole avait déjà été utilisé en trypanosomose animale en donnant de bons résultats de sensibilité (28, 29). En conditions expérimentales, ces amorces ont montré une sensibilité inégalée par les autres techniques (détection d'un trypanosome par ml de sang) (30). En Ouganda, Kyambadde et Coll. (31), en utilisant les mêmes amorces, associées à une extraction organique, ont également montré une sensibilité supérieure de la PCR par rapport à la détection parasitologique par mAECt, mais sur un échantillon réduit de patients.

Kabiri et Coll. (32), ont développé d'autres amorces spécifiques du sous-genre *Trypanozoon,* qui comprend l'espèce *Trypanosoma brucei* s.l. (Fig. 2). Ces amorces sont situées sur les gènes associés aux sites d'expression des glycoprotéines variantes de surface (ESAG 6-7). Il ne s'agit donc plus ici de séquences satellites, mais de gènes présents en multicopies (33). En conditions expérimentales, ils trouvent une sensibilité de 40 trypanosomes/ml de sang. Appliqué sur des malades d'Angola et Guinée équatoriale, ce protocole a montré 87 % de sensibilité. Lors de la même étude, au cours d'un suivi de suspects sérologiques non confirmés parasitologiquement, il a été montré que la PCR devenait positive 4 à 6 mois avant les

examens parasitologiques, confirmant la meilleure sensibilité de ce test. Sur des infections expérimentales d'animaux, Clausen et Coll., et Bengaly et Coll. ont montré que les infections étaient détectées plus vite avec la PCR qu'avec les examens parasitologiques ou sérologiques (34, 35).

De Almeida et Coll. (36) ont utilisé d'autres amorces (ORPHON 5j), qui permettent l'amplification d'une séquence d'ADN située à la jonction 5' du *spliced leader sequence orphon element.* Avec des infections expérimentales sur animaux, à partir de sang prélevé sur papier filtre, ils obtiennent une meilleure sensibilité que les examens parasitologiques.

Ainsi, quelque soit le protocole utilisés et avec différents types d'amorces pour *Trypanosoma brucei* s.l., la PCR sur sang semble être généralement beaucoup plus sensible que les techniques parasitologiques. La mAECt, considérée actuellement comme l'examen parasitologique le plus sensible, donne une limite de détection de 100 trypanosomes par ml de sang (37).

La PCR permet aussi de détecter précocement les infections trypanosomiennes à la différence des techniques sérologiques, comme l'ont montré plusieurs études expérimentales (34, 35).

Cependant, plusieurs auteurs ont rapporté l'absence de concordance entre les résultats sérologiques et ceux obtenus par PCR. Le CATT, outil de dépistage de masse sensible, est connu pour produire un certain nombre de faux positifs : pour cette raison, un examen parasitologique est réalisé sur les sujets positifs au CATT afin de détecter les trypanosomes dans les liquides biologiques. A ce titre, on s'attendrait donc à trouver de fortes corrélations entre CATT positifs et PCR positifs. Mais Kyambadde et Coll., en Ouganda, rapportent une absence significative de corrélation entre le CATT sur sang et la PCR (31). D'autres auteurs mettent en évidence des problèmes de reproductibilité de la positivité de la PCR sur sang en Côte d'Ivoire : sur des sujets dont le statut est douteux (positif au CATT sur sang mais pas sur plasma, ou séropositif non confirmé parasitologiquement), deux PCR réalisées successivement ne donnent pas le même résultat (Solano et Coll. En cours de publication). Lors d'un suivi longitudinal effectué en Côte d'Ivoire sur de tels suspects, Garcia et Coll. observent que des résultats PCR positifs apparaissent moins souvent dans une population de séropositifs (définis dans cette étude comme positifs en sérologie à chacune des 6 visites du suivi) que dans une population de séronégatifs (définis comme négatifs en sérologie à au moins l'une des 6 visites) (38). Toujours sur des échantillons de sang prélevés sur des suspects séropositifs non confirmés parasitologiquement au Cameroun, Kanmogne et Coll., trouvent des discordances selon la méthode d'extraction, le sang traité au phénol/chloroforme ou par une méthode plus simple de lyse (25).

Spécificité.

Les amorces couramment utilisées (TBR1-2 par exemple) sont spécifiques de *Trypanosoma brucei* s.l., ce qui permet d'éviter les fausses positivités dues à d'autres parasitoses (filarioses, paludisme) ainsi que celles dues à une présence transitoire d'autres trypanosomes (*Trypanosoma congolense*). Ces avantages font de la PCR sur sang un test spécifique. Penchenier et Coll., au Cameroun, ont observé une spécificité de 98,6 % avec les amorces TBR1-2 (26). De plus, la PCR n'était positive que pour seulement 3,5 % des suspects sérologiques, ce qui permettait des économies drastiques pour le suivi des séropositifs non confirmés parasitologiquement. Les amorces ESAG 6-7 appliquées sur des malades d'Angola et Guinée équatoriale ont donné 97% de spécificité (32).

Au même titre que les techniques indirectes qui peuvent rester positives pendant plusieurs années après traitement (persistance des anticorps ou des antigènes dans le sang), une des inquiétudes majeures avec la PCR était de savoir si l'ADN détecté par PCR pouvait représenter une infection active. Plusieurs études expérimentales en trypanosomose animale ont montré que la persistance de l'ADN de trypanosomes morts dans le sang n'excédait pas 1 à 2 jours (34, 35). Le même type de résultats a été observé avec *Plasmodium falciparum* chez l'homme (39), avec une persistance de l'ADN dans le sang n'excédant pas 24 heures. Ces observations tendent à indiquer que l'observation d'une PCR positive représente réellement une infection active.

Toutefois, la spécificité de la technique a été remise en cause, notamment du fait que les amorces utilisées sont spécifiques de *Trypanosoma brucei* s.l.. En d'autres termes, des trypanosomes non pathogènes pour l'homme, comme *Trypanosoma brucei brucei,* donneront un signal positif avec ces amorces, générant ainsi des faux-positifs comme l'ont suspecté Garcia et Coll. (38). Précisons qu'il en est de même avec les techniques parasitologiques, puisque les trypanosomes observés au microscope, ne peuvent être différenciés morphologiquement au sein de l'espèce *Trypanosoma brucei* s.l.. De Almeida et Coll. remettent même en cause la spécificité de TBR1-2 à *Trypanosoma brucei* s.l. puisqu'ils ont observé des réactions croisées avec *Trypanosoma vivax* et *Trypanosoma congolense* (36).

Il semble intéressant de rapporter une observation pouvant expliquer en partie l'existence de faux-positifs par PCR avec *Trypanosoma brucei* : des PCR *in situ* (amorces ORPON5J) sur un rat mort qui avait été auparavant infecté par *Trypanosoma brucei brucei* puis traité à la pentamidine ont montré que des séquences de trypanosomes étaient insérées dans les tissus (macrophages) de ce rat pouvant expliquer des PCR positives plusieurs jours après traitement (40). Si elle est confirmée, cette observation pourrait avoir des implications très importantes en terme de diagnostic par PCR, et d'interactions hôte-parasite.

Faisabilité.

Une des difficultés majeures associées à la PCR réalisée directement sur sang a été la présence de facteurs inhibant la réaction (41). Il a donc été nécessaire de développer des méthodes d'extraction organique qui permettent de purifier l'ADN avant précipitation (42). Bien que l'ADN ainsi purifié soit de très bonne qualité, le nombre d'étapes nécessaires rend ce type d'extraction mal adapté à l'usage diagnostique et augmente aussi les risques de contamination. Dans l'objectif d'avoir un outil diagnostic pour les maladies

tropicales, les protocoles PCR se sont considérablement simplifiés (extraction par résine chélatrice d'anions) en gardant comme priorité de ne pas perdre de sensibilité ni de spécificité. Le temps d'exécution et le coût du test ont été réduits, permettant d'appliquer aisément les protocoles dans les conditions de laboratoire de recherche sur le terrain. Cependant, ces protocoles nécessitent du personnel qualifié, que ce soit pour le prélèvement des échantillons ou pour le test PCR. Dans le but de simplifier les prélèvements, des études ont été réalisées à partir de sang collecté sur papier filtre (28), prélèvement pouvant être effectué par du personnel non qualifié et dans des zones difficiles d'accès. Mais des problèmes de sensibilité et de reproductibilité ont été mis en évidence sur ce type de préparation (Solano et Dwinger, communication personnelle).

Toujours d'un point de vue faisabilité, un autre problème lié à la PCR réside dans le fait que le résultat est différé par rapport au prélèvement, à cause du temps d'amplification et de révélation. On retrouve alors les mêmes problèmes que ceux rencontrés avec les tests d'immunofluorescence indirecte ou les techniques parasitologiques basées sur l'isolement *in vitro* ou *in vivo*. Il faut pouvoir retrouver les sujets positifs. La PCR, appliquée dans le cadre d'un dépistage de masse, obligerait donc l'équipe de prospection à faire deux passages dans la même zone. Le protocole occasionnerait une perte non négligeable de porteurs de trypanosomes entre les deux passages de l'équipe, ce qui diminue l'impact de la prospection dans le cadre de la lutte contre le réservoir humain.

Par ailleurs, on peut regretter que peu d'informations soient disponibles sur le coût représenté par l'application de la technique. Une des seules estimations publiées chiffre à 4 à 5 FF (0.5 à 0.6 US$) par échantillon le coût représenté par les consommables (29), sans tenir compte de l'investissement matériel et du personnel humain. Ce coût tient compte d'une extraction d'ADN simplifiée, grâce à une résine commerciale, le Chelex®. Si des kits commerciaux sont employés (Qiagen®, par exemple), le coût en est augmenté. A titre de comparaison, la technique parasitologique la plus utilisée, la mAECt, est estimée à 15-20 FF par échantillon (2-2.5 US$), mais l'investissement matériel est bien moindre.

Ainsi, à l'heure actuelle, la PCR sur sang n'est pas envisageable dans les conditions de dépistage de masse (dépistage actif). Néanmoins, il est possible de transférer la technique dans des bases de santé rurale pour améliorer le dépistage passif. Une application potentielle à moyen terme, serait de l'utiliser comme le sont actuellement les tests parasitologiques, en confirmation de tests sérologiques lors de prospections actives. Actuellement, des recherches sont menées pour pouvoir traiter plus d'échantillons à la fois, avec une révélation de la réaction simplifiée et plus rapide (PCR-ELISA).

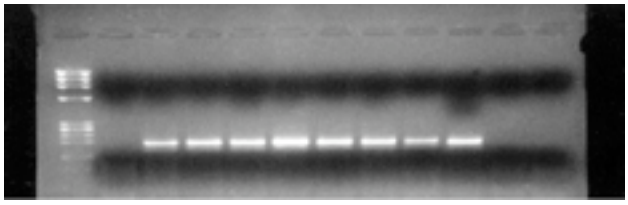
La diminution du temps nécessaire à l'application de la technique associée à la capacité de traiter plus d'échantillons à la fois, et l'existence d'amorces indiscutables au plan de la spécificité, sont autant d'étapes indispensables à l'utilisation de la PCR dans des conditions de terrain ou de laboratoire tropical, pour le diagnostic de la THA.

LA PCR SUR LCR APPLIQUEE AU DIAGNOSTIC DE PHASE

Nous avons vu ci-dessus que le diagnostic de phase, en conditionnant la nature du traitement à administrer, est d'une importance cruciale puisque les sujets diagnostiqués en seconde période sont classiquement traités au mélarsoprol, qui occasionne des effets secondaires graves et des cas de rechute possibles. Les critères retenus par l'OMS pour la décision de classer un malade en deuxième phase sont discutés, en particulier le nombre de cellules (43). Dans l'optique d'améliorer le diagnostic de phase, les protocoles de PCR sur sang, du fait de leur sensibilité apparente ont été appliqués à la recherche des trypanosomes dans le LCR.

Truc et Coll. ont comparé la détection des trypanosomes par PCR dans le LCR (amorces TBR1-2) à la double centrifugation, la protéinorachie, et la cytorachie sur 20 malades en Côte d'Ivoire, en utilisant la méthode simplifiée d'extraction d'ADN par une résine : tous les patients considérés en second stade par les critères de l'OMS étaient positifs en PCR, alors que certains étaient négatifs en double centrifugation. Les malades classés en premier stade étaient négatifs en PCR (44). Cette étude préliminaire indique donc une très bonne corrélation entre la PCR et les critères de l'OMS, tout en mettant en évidence une meilleure sensibilité que la double centrifugation. Kyambadde et Coll., en Ouganda, montrent aussi une sensibilité supérieure de la PCR/LCR par rapport à la double centrifugation (31). Les tests PCR sont tous positifs sur des malades classés en seconde période par la cytorachie. En revanche, quelques discordances avec des PCR positives pour des cas classés en première période sont relevées.

Sur un échantillonnage plus important de 92 malades, en Côte d'Ivoire, Jamonneau et Coll. confirment la bonne corrélation entre les cas classés en seconde période et les PCR positives (amorces TBR1-2 et extraction sur résine, Fig. 3) (communication personnelle). Cette corrélation est nettement moins bonne lorsque les cas sont douteux : entre 5 et 20 cellules, on trouve des PCR positives et négatives, un nombre important de PCR positives apparaissent sur des cas classés en première phase. La même question que celle concernant la PCR sur sang se pose alors : ces différences reflètent-elles une grande sensibilité de la PCR capable de détecter des parasi-



M : Marqueur de poids moléculaire (Marque 4, Eurogentec) ; N : contrôle négatif (sans ADN) ; 1-3 : malades C+/DC+ ; P : contrôle positif (ADN témoin *Trypanosoma brucei*) ; 4-5 : malades C+/DC- ; 6-7 : malades 5<C<20/DC- ; 8-9 : malades C-/DC-.

Figure 3 - Détection de Trypanosoma brucei *s.l. dans le liquide céphalo-rachidien à l'aide des amorces TBR 1-2.*

témies très faibles dans le LCR, ou sont-elles dues à l'existence de faux-positifs ? Contrairement à la PCR sur sang, le fait de détecter l'ADN de *Trypanosoma brucei* dans le LCR doit faire immédiatement penser à des trypanosomes pathogènes pour l'homme et il ne se pose pas le problème d'éventuelles réactions croisées avec des trypanosomes non pathogènes, leur passage transitoire dans le sang ne pouvant probablement pas les conduire à traverser la barrière hémato-méningée.

Truc et Coll. ont montré que la PCR sur LCR pourrait permettre un diagnostic de rechute très précoce (44). Deux patients de leur étude sont en effet restés positifs en PCR, immédiatement après le traitement et 1 mois après, alors que la détection de parasites par les techniques habituelles est restée négative. L'interprétation de ce phénomène n'est pas encore établie (les deux sujets n'ont pas fait de rechute) et son étude doit être poursuivie. La cytorachie et la protéinorachie se normalisant lentement après traitement, leur dosage ne peut suffire à affirmer un échec thérapeutique. De plus, la double centrifugation manque de sensibilité pour détecter les cas de rechute (Miezan et Coll., communication personnelle). A une époque où les échecs thérapeutiques par résistance au traitement se multiplient (1), la mise au point d'un outil permettant le diagnostic de rechute précoce est indispensable. Par ailleurs, dans le domaine des trypanosomoses animales, la PCR sur sang a été utilisée comme outil de suivi de l'efficacité du traitement, en donnant des résultats très prometteurs du fait de sa bonne sensibilité (35). Cependant, en THA, les cas de rechute se caractérisent par une absence de parasite dans le sang : seul un suivi de la parasitologie du LCR peut détecter ce type de cas. Ainsi, même si d'un point de vue faisabilité, les remarques faites sur la PCR sur sang sont valables pour la PCR sur LCR, il semble important d'équiper les centres de traitement avec cette technique.

CONCLUSION

Après avoir vu quelques-unes unes des applications principales de la PCR dans le diagnostic/dépistage et le diagnostic de phase de la THA, nous pouvons retenir quelques domaines dans lesquels cet outil peut apporter des progrès importants :

- Dans le cadre du dépistage actif, la PCR utilisée en aval des tests sérologiques pourra servir de décision pour établir si un suspect est infecté ou non. Pour un investissement matériel important au départ, mais unique, le coût en consommables reste inférieur aux techniques classiques (mAECt), pour une sensibilité supérieure. Des recherches restent à mener avant une application réelle, notamment sur la spécificité : tant que l'on ne pourra pas affirmer avec certitude qu'une PCR positive est le signe d'une infection active, son utilisation dans le cadre de dépistages actifs restera marginale. L'adaptation d'un format PCR-ELISA sera d'un apport appréciable pour traiter un plus grand nombre d'échantillons en moins de temps.

- En dépistage passif, on peut assez facilement imaginer d'équiper des laboratoires de base de santé ou les centres de traitement, avec cet outil. Une formation des agents de santé, accompagnée d'un suivi minimal et régulier par des instituts universitaires ou de recherche ou des ONG, accroîtrait l'efficacité de ce type de dépistage.

- En dehors de la spécificité, nous avons vu que des problèmes de reproductibilité de la technique ont été rapportés par certains. Si la PCR offre une sensibilité apparemment inégalée et une spécificité correcte, les résultats obtenus sur des sujets ayant présenté une réponse positive au CATT, mais non confirmés parasitologiquement, sont controversés. Mais le problème du diagnostic sur ce type d'individus, n'est pas réservé à la PCR, et concerne toutes les techniques de diagnostic. En admettant qu'un test arrive réellement à déterminer quelle proportion de ces sujets est réellement infectée, la question de savoir s'il faut traiter ou non de tels sujets reste un champ de recherche prioritaire aux yeux de l'OMS (1). Cette question rejoint le phénomène de trypanotolérance humaine, déjà décrit et dont l'importance reste à être évaluée.

En terme d'application sur le LCR, nous avons vu que la PCR pouvait contribuer à la décision de classer un malade en première ou seconde phase, ce qui conditionnera son traitement. Ceci est aussi un argument pour équiper les centres de traitement par cet outil. Là encore, il faut se poser la question de l'objectif à atteindre lorsqu'on pose ce type de diagnostic : a-t-on réellement intérêt à utiliser le test le plus sensible pour le diagnostic de phase, alors que plusieurs travaux rapportent que l'on peut traiter avec succès des malades dits de seconde phase à la pentamidine (45) ? En revanche, il apparaît d'un intérêt certain pour le suivi des traitements et le diagnostic précoce des cas de rechute : alors que ces cas de rechute ne pourront être établis que tardivement par les paramètres classiques, la réapparition d'ADN trypanosomien dans le LCR pourra être considérée comme la signature d'une réapparition de la maladie.

Dans toutes ces applications, un pas décisif aura été franchi lorsque seront disponibles des amorces spécifiques de l'ADN de trypanosomes pathogènes de l'homme. C'est, nous l'avons vu, un des obstacles principaux au fait qu'une PCR positive soit considérée comme une infection active. Des candidats potentiels sont actuellement à l'étude pour le diagnostic moléculaire de la THA : SRA (*serum resistant associated gene* pour *Trypanosoma brucei rhodesiense*), TgsGP (*Trypanosoma gambiense specific glycoprotein,* pour *Trypanosoma brucei gambiense*) (46). Une observation intéressante est l'existence de séquences d'ADN microsatellites spécifiques de *Trypanosoma brucei gambiense*, qui différencient apparemment les trypanosomes pathogènes de l'homme, des autres *Trypanosoma brucei* (47-49). Ce type de marqueurs pourrait résoudre les questions de spécificité, le défi étant alors d'arriver à obtenir une sensibilité équivalente à celle observée grâce aux séquences répétées ■

REFERENCES

1 - OMS - Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series, 1998, n° 881.

2 - JANNIN J., MOULIA-PELAT J.P., CHANFREAU B. et Coll. - Trypanosomiase Humaine Africaine: étude d'un score de présomption de diagnostic au Congo. *Bull. World Health Organ.* 1993 ; **71** : 215-222.

3 - DUMAS M., BOUTEILLE B. - Human African trypanosomiasis. *Compte-Rendu de la Société de Biologie* 1996 ; **190** : 395-408.

4 - JAMONNEAU V., GARCIA A., FREZIL J.L. et Coll. - Clinical and biological evolution of human trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2000 ; **94** : 831-835.

5 - MAGNUS E., VERVOORT T., VAN MEIRVENNE N. - A card-agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of T. b. gambiense trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 1978 ; **59** : 169-176.

6 - BUSCHER P., DRAELANTS E., MAGNUS E. et Coll. -An experimental latex agglutination test for antibody detection in human African trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 1991 ; **71** : 267-273.

7 - SADUN E.H., DUXBURY R.E., WILLIAMS J.S., ANDERSON R.I. - Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of African and American Trypanosomiasis in man. *Parasitology* 1963 ; **49** : 385-388.

8 - FREZIL J.L., CARRIE J., RIO F. - Application et valeur de la technique d'immunofluorescence indirecte au dépistage et à la surveillance épidémiologique de la trypanosomiase à *Trypanosoma gambiense. Cah. ORSTOM, Ser. Ent. med. et Parasitol.* 1974 ; **12** : 111-126.

9 - WOO P.T. - The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. *Acta Trop.* 1970 ; **27** : 384-386.

10 - MURRAY M., MURRAY P.K., McINTYRE W.I. - An improved parasitological technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1977 ; **71** : 325-326.

11 - LANHAM S.M., GODFREY D.G. - Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* 1970 ; 28 : 521-534.

12 - LUMSDEN W.H., KIMBER C.D., STRANGE M. - *Trypanosoma brucei* : detection of low parasitaemias in mice by a miniature anion-exchenger/centrifugation technique. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1977 ; **71** : 421-424.

13 - BAILEY J.W., SMITH D.H. - The use of the acridine orange QBC technique in the diagnosis of African Trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992 ; **86** : 630.

14 - CATTAND P., MIEZAN T.W., DE RAADT P. - Human African trypanosomiasis: use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *Bull. World Health Organ.* 1988 ; **66** : 83-86.

15 - MIEZAN T.W., MEDA H.A., DOUA F. et Coll. - Single centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2000 ; **94** : 293.

16 - DUKES P., RICKMAN L.R., KILLICK-KENDRICK R. et Coll. - A field comparison of seven diagnostic techniques for human trypanosomiasis in the Luangwa Valley, Zambia. *Trop. Med. Parasitol.* 1984 ; **35** : 141-147.

17 - TRUC P., JAMONNEAU V., N'GUESSAN P. et Coll. -Parasitological diagnosis of human African trypanosomiasis : a comparison of the QBC® and miniature anion-exchange centrifugation techniques. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1998 ; **92** : 288-289.

18 - NOIREAU F., GOUTEUX J.P., DUTEURTRE J.P. - Valeur diagnostique du test d'agglutination sur carte (Testryp CATT) dans le dépistage de masse de la trypanosomiase humaine au Congo. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1987 ; **80** : 797-803.

19 - DUKES P., GIBSON W.C., GASHUMBA J.K. et Coll. -Absence of the LiTat 1.3 (CATT antigen) gene in *Trypanosoma brucei gambiense* stocks from Cameroon. *Acta Trop.* 1992 ; **51** : 123-124.

20 - NOIREAU F., GOUTEUX J.P., FREZIL J.L. - Sensibilité du test d'agglutination sur carte (Testryp CATT) dans les infections porcines à *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* en République du Congo. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 1986 ; **66** : 63-68.

21 - DIALLO P.B., TRUC P., MEDA H.A., KAMENAN A. - Diagnostic sérologique de la Trypanosomiase Humaine Africaine à *Trypanosoma brucei gambiense* : 1- Obtention et utilisation d'antigènes bruts dans les tests ELISA et d'agglutination au latex. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1996 ; **89** : 262-268.

22 - SLOOF P., BOS J.L., KONINGS A.F. et Coll. - Characterization of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi. J. Mol. Biol.* 1983 ; 167 : 1-21.

23 - KIMMEL B.E., ONESMO K., OLE-MOIYOI O.K., YOUNG J.R. Ingi, a 5.2 Kb dispersed sequence element from *Trypanosoma brucei* that carries half of a smaller mobile element at either end and has homology with mammalian « LINES ». *Mol. Cell Biol.* 1987 ; **7** : 1465-1475.

24 - MOSER D.R., COOK G.A., OCHS D.E. et Coll. -Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology* 1989 ; **99** : 57-66.

25 - KANMOGNE G.D., STEVENS J.R., ASONGANYI T., GIBSON W.C. - Genetic heterogeneity in the *Trypanosoma brucei gambiense* genome analysed by random amplification of polymorphic DNA. *Parasitol. Res.* 1996 ; **82** : 535-541.

26 - PENCHENIER L., SIMO G., GREBAUT P. et Coll. -Diagnosis of human trypanosomiasis, due to *Trypanosoma brucei gambiense* in central Africa, by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2000 ; **94** : 392-394.

27 - WALSH P.S., METZGER D.A., HIGUCHI R. - Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 1991 ; **10** : 506-513.

28 - KATAKURA K., LUBINGA C., CHITAMBO H., TADA Y. - Detection of Trypanosoma congolense and *Trypanosoma brucei* subspecies in cattle in Zambia by polymerase chain reaction from blood collected on a filter paper. *Parasitol. Res.* 1997 ; **83** : 241-245.

29 - SOLANO P., MICHEL J.F., LEFRANÇOIS T. et Coll. - Polymerase chain reaction as a diagnosis tool for detecting trypanosomes in naturally infected cattle in Burkina Faso. *Vet. Parasitol.* 1999 ; **86** : 95-103.

30 - PENCHENIER L., DUMAS V., GREBAUT P. et Coll. -Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomiasis. *Parasite* 1996 ; **4** : 387-389.

31 - KYAMBADDE J.W., ENYARU J.C., MATOVU E. et Coll. -Detection of trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using the polymerase chain reaction. *Bull. World Health Organ.* 2000 ; **78** : 119-124.

32 - KABIRI M., FRANCO J.R., SIMARRO P.P. et Coll. - Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7. *Trop. Med. Int. Health* 1999 ; **10** : 658-661.

33 - CULLY DF., IP H.S., CROSS G.A. - Coordinate transcription of variant surface glycoprotein genes and an expression site associated gene family in *Trypanosoma brucei. Cell.* 1985 ; **42** : 173-182.

34 - CLAUSEN P.H., WIEMANN A., PATZELT R. et Coll. - Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of *Trypanosoma* spp. in naturally infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. *Ann. NY Acad. Sci.* 1998 ; **849** : 21-31.

35 - BENGALY Z., KASBARI M., DESQUESNES M., SIDIBE I. - Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. *Vet. Parasitol.* 2001 ; **96** : 101-113.

36 - DE ALMEIDA P.P., NDAO M., VAN MEIRVENNE N., GEERTS S. - Diagnostic evaluation of PCR on dried blood samples from goats experimentally infected witw *Trypanosoma brucei brucei. Acta Trop.* 1998 ; **70** : 269-276.

37 - OMS - La trypanosomiase Africaine: épidémiologie et lutte. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series, 1986, 739.

38 - GARCIA A., JAMONNEAU V., MAGNUS E. et Coll. - Follow-up of card agglutination trypanosomiasis test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Cote d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population. *Trop. Med. Int. Health* 2000 ; **5** : 786-793.

39 - SNOUNOU G., BECK H.P. - The use of PCR genotyping in the assessment of recrudescence or re infection after antimalarial drug treatment. *Parasitol. Today* 1998 ; **14** : 462-467.

40 - DE ALMEIDA P.P. - Contributions to the diagnostic evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of salivarian trypanosomes. Thèse Université Libre de Bruxelles, 1998, 302 p.

41 - HIGUCHI R. - Simple and rapid preparation of samples for PCR. In « ERLICH H.A. - PCR technology ». Stockton Press. ed., Londres, 1989, pp 31-38.

42 - VAN DER PLOEG L.H., BERNARDS A., RIJSEWIJK F., BORST P. -Characterization of the DNA duplication-transposition that controls the expression of two genes for variant surface glycoproteins in *Trypanosoma brucei. Nucleic Acids Res.* 1982 ; **10** : 593-609.

43 - BISSER S., BOUTEILLE B., SARDA J. et Coll. -Apport des examens biochimiques dans le diagnostic de la phase nerveuse de la Trypanosomose humaine africaine. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1997 ; **90** : 321-326.

44 - TRUC P., JAMONNEAU V., CUNY G., FREZIL J.L. - Use of polymerase chain reaction in human African trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bull. World Health Organ.* 1999 ; **77** : 745-749.

45 - DOUA F., MIEZAN T.W., SANO-SINGAROJ.R. et Coll. - The efficacy of pentamidine un the treatment of early-late stage *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996 ; **55** : 586-588.

46 - RADWANSKA M. - Novel gene targets to diagnose Human African Trypanosomiasis. Use of PCR and PCR-ELISA. Report of the 1st Research Co-ordination Meeting on « developing, validating and standardising methodologies for the use of PCR and PCR-ELISA in the diagnosis and monitoring of control and eradication programmes for trypanosomosis », 26-30/03/01, Antwerp, Belgium, 2001.

47 - HERDER S., GREBAUT P., EOUZAN J.P. et Coll. - New molecular markers to study genetic variation of *Trypanosoma brucei* s.l. Proceedings de la 24e Réunion du Conseil Scientifique International pour la Recherche et la Lutte contre les Trypanosomiases (CSIRLT), Maputo (Mozambique), 1997.

48 - BITEAU N., BRINGAUD F., GIBSON W.C. et Coll. - Characterisation of Trypanozoon isolates using a repeated coding sequence and microsatellite markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000 ; **105** : 185-201.

49 - TRUC P., RAVEL S., JAMONNEAU V. et Coll. -Genetic variability within *Trypanosoma brucei gambiense* : evidence of the circulation of different genotypes in Human African Trypanosomiasis patients in Côte d'Ivoire. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2001 (in press).

IRD Editions
213 rue La Fayette
75480 Paris cedex 10

Diffusion
32 avenue Henri-Varagnat
93143 Bondy cedex
diffusion@bondy.ird.fr

Les serpents d'Afrique occidentale et centrale met à la disposition du naturaliste, professionnel comme amateur, l'information la plus complète, à partir des études les plus récentes, sur les serpents rencontrés de la Mauritanie jusqu'au Tchad et au Congo.
La première partie est consacrée aux généralités : caractéristiques, origines et évolution des ophidiens, composition des venins, épidémiologie des morsures, symptomatologie des envenimations et traitement. La seconde partie traite de la systématique des serpents de la région couverte : de nombreuses clés dichotomiques permettent l'identification du serpent, même par un non-spécialiste ; une carte de répartition, un dessin de la tête, et parfois du maxillaire ou de l'hémipénis, complètent la description de chaque taxon ; des notes de biologie et d'écologie sont rassemblées à la fin de chacune des notices d'identification. Une cinquantaine de photographies de morsures et des principales espèces rencontrées illustrent cet ouvrage. Un index comportant les noms anciens et actuels de toutes les espèces facilite l'accès aux descriptions. Enfin, la bibliographie est riche de près de 700 références ■

Mots-clés • Serpents - Afrique sub-saharienne - Systématique - Répartition - Envenimations.