

**Faculté de Pharmacie**

Année 2017

Thèse N°

**Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie**

présentée et soutenue publiquement

le 7 juillet 2017

par

**Marie-Pauline COUQUET**

née le 31 août 1991, à Limoges

**Identification de marqueurs biologiques dans l'urine et la  
salive de patients atteints de  
Trypanosomose Humaine Africaine**

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur Gilles DREYFUSS

M. Bertrand COURTIoux

M. Jean-Benjamin MURAT

Mme Aurélie PREMAUD

Président

Juge

Juge

Juge

## Liste des enseignants

---

### PROFESSEURS :

|                           |                                               |
|---------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>BATTU</b> Serge        | CHIMIE ANALYTIQUE                             |
| <b>CARDOT</b> Philippe    | CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE             |
| <b>DESMOULIERE</b> Alexis | PHYSIOLOGIE                                   |
| <b>DUROUX</b> Jean-Luc    | BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE |
| <b>FAGNERE</b> Catherine  | CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE       |
| <b>LIAGRE</b> Bertrand    | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE             |
| <b>MAMBU</b> Lengo        | PHARMACOGNOSIE                                |
| <b>ROUSSEAU</b> Annick    | BIOSTATISTIQUE                                |
| <b>TROUILLAS</b> Patrick  | CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE                    |
| <b>VIANA</b> Marylène     | PHARMACOTECHNIE                               |

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

|                             |                                  |
|-----------------------------|----------------------------------|
| <b>MOESCH</b> Christian     | HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT |
| <b>PICARD</b> Nicolas       | PHARMACOLOGIE                    |
| <b>ROGEZ</b> Sylvie         | BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE       |
| <b>SAINT-MARCOUX</b> Franck | TOXICOLOGIE                      |

### ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

|                         |             |
|-------------------------|-------------|
| <b>CHAUZEIX</b> Jasmine | HEMATOLOGIE |
|-------------------------|-------------|

### MAITRES DE CONFERENCES :

|                             |                                               |
|-----------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>BASLY</b> Jean-Philippe  | CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE             |
| <b>BEAUBRUN-GIRY</b> Karine | PHARMACOTECHNIE                               |
| <b>BILLET</b> Fabrice       | PHYSIOLOGIE                                   |
| <b>CALLISTE</b> Claude      | BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE |

|                                 |                                                  |
|---------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>CLEDAT</b> Dominique         | CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE                |
| <b>COMBY</b> Francis            | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE                |
| <b>COURTIOUX</b> Bertrand       | PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE                     |
| <b>DELEBASSEE</b> Sylvie        | MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-<br>IMMUNOLOGIE      |
| <b>DEMIOT</b> Claire-Elise      | PHARMACOLOGIE                                    |
| <b>FROISSARD</b> Didier         | BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE                       |
| <b>GRIMAUD</b> Gaëlle           | CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU<br>MEDICAMENT   |
| <b>JAMBUT</b> Anne-Catherine    | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE                |
| <b>LABROUSSE</b> Pascal         | BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE                       |
| <b>LEGER</b> David              | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE                |
| <b>MARION-THORE</b> Sandrine    | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE                |
| <b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE                |
| <b>MERCIER</b> Aurélien         | PARASITOLOGIE                                    |
| <b>MILLOT</b> Marion            | PHARMACOGNOSIE                                   |
| <b>MOREAU</b> Jeanne            | MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-<br>IMMUNOLOGIE      |
| <b>MUSUAMBA TSHINANU</b> Flora  | PHARMACOLOGIE                                    |
| <b>PASCAUD</b> Patricia         | PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX<br>CERAMIQUES |
| <b>POUGET</b> Christelle        | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE                |
| <b>VIGNOLES</b> Philippe        | BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET<br>INFORMATIQUE |

**ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :**

|                       |                                                          |
|-----------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>FABRE</b> Gabin    | (01.09.2016 au 31.08.2017)<br>CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE |
| <b>LAVERDET</b> Betty | (1.09.2016 au 31.08.2017)<br>PHARMACIE GALENIQUE         |

**PHAM** Thanh Nhat

(1.09.2016 au 31.08.2017)

CHIMIE ORGANIQUE - BIOCHIMIE

**PROFESSEURS EMERITES :**

**BUXERAUD** Jacques

**DREYFUSS** Gilles

**LOUDART** Nicole

## REMERCIEMENTS

A Monsieur le Pr Gilles DREYFUSS, merci de me faire l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Hommage respectueux.

A Monsieur le Dr Bertrand COURTIoux, directeur de cette thèse. Je vous remercie sincèrement pour votre disponibilité, les conseils et les connaissances que vous m'avez apportés tout au long de mes études.

A Monsieur le Dr Jean-Benjamin MURAT, je vous remercie de faire partie de mon jury de soutenance de thèse et de m'avoir apporté vos conseils.

A Madame Aurélie PREMAUD, je suis honorée que vous ayez accepté d'évaluer mon travail et de faire partie de mon jury de soutenance de thèse. Sincères remerciements.

Je remercie le Pr Pierre-Marie PREUX, Directeur de l'Institut de Neuroépidémiologie Tropicale, UMR INSERM 1094 et le Dr Daniel AJZENBERG pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie chaleureusement Julien BONNET doctorant en parasitologie pour sa perpétuelle disponibilité et sa précieuse aide tout au long de mon stage.

Je remercie également Jean-Michel CAMADRO, Thibaut LEGER, Camille GARCIA et Laetitia COLLOMB de m'avoir permis de réaliser une grande partie de mon étude au sein de la Plateforme Protéomique structurale et fonctionnelle/Spectrométrie de masse de l'Institut Jacques-Monod.

Je souhaite vivement remercier l'ensemble de l'UMR INSERM 1094 pour son accueil et sa bonne humeur. Je remercie plus spécialement Clotilde et Lokman avec qui j'ai partagé le bureau pour leur bienveillance au quotidien.

A mes parents, pour votre soutien pendant mes études et votre amour. Merci d'être toujours présents à mes côtés.

A ma sœur, pour ton soutien infailible, ta présence et ta bonne humeur que tu m'apportes chaque jour.

A ma grand-mère, merci d'être toujours autant dynamique, merci pour ce que tu as fait pour moi de ma petite enfance à aujourd'hui.

A mémé, tonton et grand-père partis trop tôt, merci pour votre affection.

A mes compagnons des bancs de la fac : Marine, Margaux, Corentin, Sébastien, Elodie, Cédric, Pierre, Frédéric, merci pour toutes ces années d'humour et d'amitié, faisons qu'elles perdurent.

A mes collègues du master, merci pour cette année qui ne ressemblait à aucune autre.

A tous ceux que je n'ai pu citer et qui ont contribué à ma réussite, 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 MATIERES

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| INTRODUCTION.....                       | 1  |
| Contexte bibliographique .....          | 2  |
| A. Trypanosomose Humaine Africaine..... | 2  |
| 1. Epidémiologie .....                  | 2  |
| 2. Parasite .....                       | 5  |
| 3. Vecteur de la maladie .....          | 6  |
| 4. Cycle parasitaire .....              | 7  |
| 5. Clinique de la THA .....             | 8  |
| 6. Physiopathologie de la THA .....     | 9  |
| 7. Diagnostic.....                      | 11 |
| 8. Traitements .....                    | 19 |
| B. Fluides biologiques.....             | 22 |
| 1. L'urine.....                         | 22 |
| 2. La salive .....                      | 23 |
| OBJECTIF.....                           | 25 |
| Etude expérimentale .....               | 26 |
| 1. Matériels et méthodes.....           | 26 |
| a. Cohorte .....                        | 26 |
| b. Technique de spectrométrie.....      | 27 |
| c. Préparation des échantillons .....   | 28 |
| d. Tests ELISA .....                    | 31 |
| e. Analyse statistique.....             | 31 |
| 2. Résultats .....                      | 32 |
| a. Screening des urines.....            | 32 |
| b. Dosage ELISA dans les urines .....   | 33 |
| c. Screening de la salive .....         | 37 |
| d. Dosage ELISA dans la salive .....    | 39 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....        | 47 |
| Serment de Galien .....                 | 59 |



## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**AUC** : *Area Under the Curve* pour aire sous la courbe

**BHE** : Barrière Hémato-Encéphalique

**CATT** : *Card Agglutination Test for Trypanosomiasis* pour Test d'Agglutination sur carte pour la Trypanosomose

**CTC** : Centrifugation en tubes capillaires

**DNDi** : *Drugs for Neglected Diseases initiative*

**ELISA** : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* pour dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

**ESI** : *Electrospray ionisation* pour Electro-spray d'ionisation

**FIND** : *Foundation for Innovative New Diagnosis*

**IFN- $\gamma$**  : Interféron- $\gamma$

**LCR** : Liquide Céphalo-Rachidien

**LED** : pour *light-emitting diodes* pour diodes électroluminescentes

**LAMP** : *loop mediated isothermal amplification* pour amplification isothermale en boucle

**mAECT** : *Mini Anion Exchange Centrifugation* Technique pour Technique de Concentration par minicolonne Echangeuse d'Anion

**NO** : Monoxyde d'Azote

**NASBA** : *nucleic acid sequence-based amplification* pour

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**ONG** : Organisation Non Gouvernementale

**PCR** : *Polymerase Chain Reaction* pour Réaction en Chaîne par Polymérase

**QBC** : *Quantitative Buffy Coat*

**RDT** : *rapid diagnostic test* pour Test de Diagnostic Rapide

**rpm** : rotation par minute

**SNC** : Système Nerveux Central

**THA** : Trypanosomose Humaine Africaine

**TLTF** : *Trypanosome Lymphocyte Triggering Factor* pour Facteur de déclenchement des lymphocytes du trypanosome

**TNF- $\alpha$**  : *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  pour Facteur de Nécrose Tumorale  $\alpha$

**VSG** : *Variable Surface Glycoprotein* pour Glycoprotéine Variable de Surface

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Nombre de nouveaux cas de THA déclarés en 2015
- Figure 2 :** Elimination puis résurgence de la maladie du sommeil
- Figure 3 :** Morphologie de *Trypanosoma sp*
- Figure 4 :** *Glossina palpalis*
- Figure 5 :** Cycle parasitaire de la THA
- Figure 6 :** Mécanismes immunopathologiques de la THA
- Figure 7 :** CATT
- Figure 8 :** Palpation ganglionnaire
- Figure 9 :** Centrifugation par tube capillaires
- Figure 10:** mAECT
- Figure 11 :** Exemple d'arbre décisionnel pour le diagnostic de la THA
- Figure 12:** Test HAT Sero-K-SeT®53
- Figure 13:** Test de Diagnostic Rapide
- Figure 14 :** Trypanosome à l'Immunofluorescence indirecte
- Figure 15 :** Technique LAMP
- Figure 16:** Appareil urinaire
- Figure 17 :** Anatomie des glandes salivaires
- Figure 18 :** Zone d'étude en Angola
- Figure 19 :** Principe du spectromètre de masse Q Exactive plus®
- Figure 20 :** Abondance relative de la Moésine en fonction des groupes contrôles, stade 1 et stade 2
- Figure 21 :** Abondance relative de la Kallistatine en fonction des groupes contrôles, stade1 et stade 2
- Figure 22 :** Représentation de la distribution de la concentration de Moésine entre les contrôles et les patients
- Figure 23 :** Représentation de la distribution de la concentration de Moésine entre les contrôles et les patients en stade 1 et 2
- Figure 24 :** Courbe ROC de la concentration en Moésine dans les urines (diagnostic de la maladie)
- Figure 25 :** Courbe ROC de la concentration en Moésine dans les urines (diagnostic contrôles/stade2)

**Figure 26 :** Abondance relative de l'Intelectine-2 en fonction des groupes contrôles, stade 1 et stade 2

**Figure 27 :** Abondance relative du Neutrophil cytosol factor 2 en fonction des groupes contrôles, stade 1 et stade 2

**Figure 28 :** Représentation de la distribution de l'Intelectine-2 entre les contrôles, les stades 1 et 2

**Figure 29 :** Courbe ROC de la concentration en Intelectine-2 dans la salive

## **LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1 :** Médicaments utilisés dans la THA

**Tableau 2 :** Protéines d'intérêt dans les urines

**Tableau 3 :** Données descriptives de la cohorte utilisée pour le dosage des protéines urinaires

**Tableau 4 :** Protéines d'intérêt dans la salive

**Tableau 5 :** Données descriptives de la cohorte utilisée pour le dosage des protéines salivaires

## **LISTE DES ANNEXES**

**Annexe 1 :** Utilisation d'une salivette® (Sarstedt)

# INTRODUCTION

La maladie du sommeil ou Trypanosomose Humaine Africaine (THA) est une parasitose vectorielle qui sévit dans 36 pays d'Afrique sub-saharienne. Cette maladie est due à un protozoaire flagellé extracellulaire appartenant au genre *Trypanosoma* et à l'espèce *brucei*. L'infection débute lors de la transmission du parasite *via* la piqûre d'une glossine. Les trypanosomes inoculés vont dans un premier temps se multiplier et se développer au niveau d'un chancre puis proliférer dans le système lymphatico-sanguin de l'Homme, ce qui correspond au stade 1 de la maladie. Ce stade hémolymphatique va être à l'origine de fièvres intermittentes, de céphalées, d'adénopathies et parfois de splénomégalie. Sans un diagnostic rapide et une prise en charge thérapeutique du patient, le parasite va poursuivre son cycle infectieux en franchissant la barrière hémato-encéphalique et ainsi se retrouver dans le système nerveux central. Le stade 2 ou stade nerveux correspond à l'apparition des signes neurologiques et neuropsychiatriques de la maladie tels que les paresthésies, les troubles du comportement et une perturbation du cycle nyctéméral. En l'absence de traitement, la maladie évolue vers un coma fébrile entraînant la mort du patient.

Les traitements actuellement disponibles sont stades et espèces dépendants et nécessitent donc un diagnostic rigoureux. En pratique le diagnostic de la maladie débute par un prélèvement sanguin afin de mettre en évidence des anticorps anti-trypanosome par la technique du CATT (Card Agglutination Trypanosomiasis Test). Cet examen doit être associé à une recherche du trypanosome dans le suc ganglionnaire (l'examen indirect doit être confirmé par un examen direct). Par la suite, seule une ponction lombaire permet de déterminer le stade de la maladie. Le traitement étant stade dépendant, il est donc primordial pour le clinicien de disposer d'outils diagnostiques fiables et utilisables sur le terrain permettant de discriminer le stade 1 du stade 2 de la maladie.

Dans cette optique, l'objectif de ce travail de thèse est d'identifier des marqueurs biologiques au cours de la THA dans l'urine et la salive de patients afin de faciliter le diagnostic de la pathologie et sa prise en charge.

# Contexte bibliographique

## A. Trypanosomose Humaine Africaine

### 1. Epidémiologie

La Trypanosomose Humaine Africaine fait partie des 20 maladies tropicales négligées listées par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Actuellement, on estime que près de 65 millions de personnes issues de 36 pays principalement des zones rurales africaines sont exposées au risque infectieux. Les populations touchées sont souvent pauvres, vivent dans des zones reculées, loin des centres de soin ce qui constitue un obstacle pour leurs surveillances et leurs dépistages. A ceci s'ajoutent les conflits et les déplacements de population dans de nombreuses régions comme actuellement en République centrafricaine<sup>1</sup> et en République Démocratique du Congo<sup>2</sup>.

On distingue deux types de trypanosomoses humaines suivant la répartition géographique du parasite. Plus de 97% des cas de maladie du sommeil sont dus à *Trypanosoma brucei gambiense* responsable d'une forme chronique. Ce parasite est retrouvé dans 24 pays et s'étend de l'Afrique de l'ouest à l'Afrique centrale. L'autre forme humaine est provoquée par *Trypanosoma brucei rhodesiense*, concentrée sur 13 pays d'Afrique orientale et d'Afrique australe (Figure 1). Cette forme est responsable d'une forme aiguë de la maladie et représente moins de 3% des cas. Toutefois, il est à noter que l'Ouganda est le seul pays où les deux formes coexistent<sup>3</sup>.

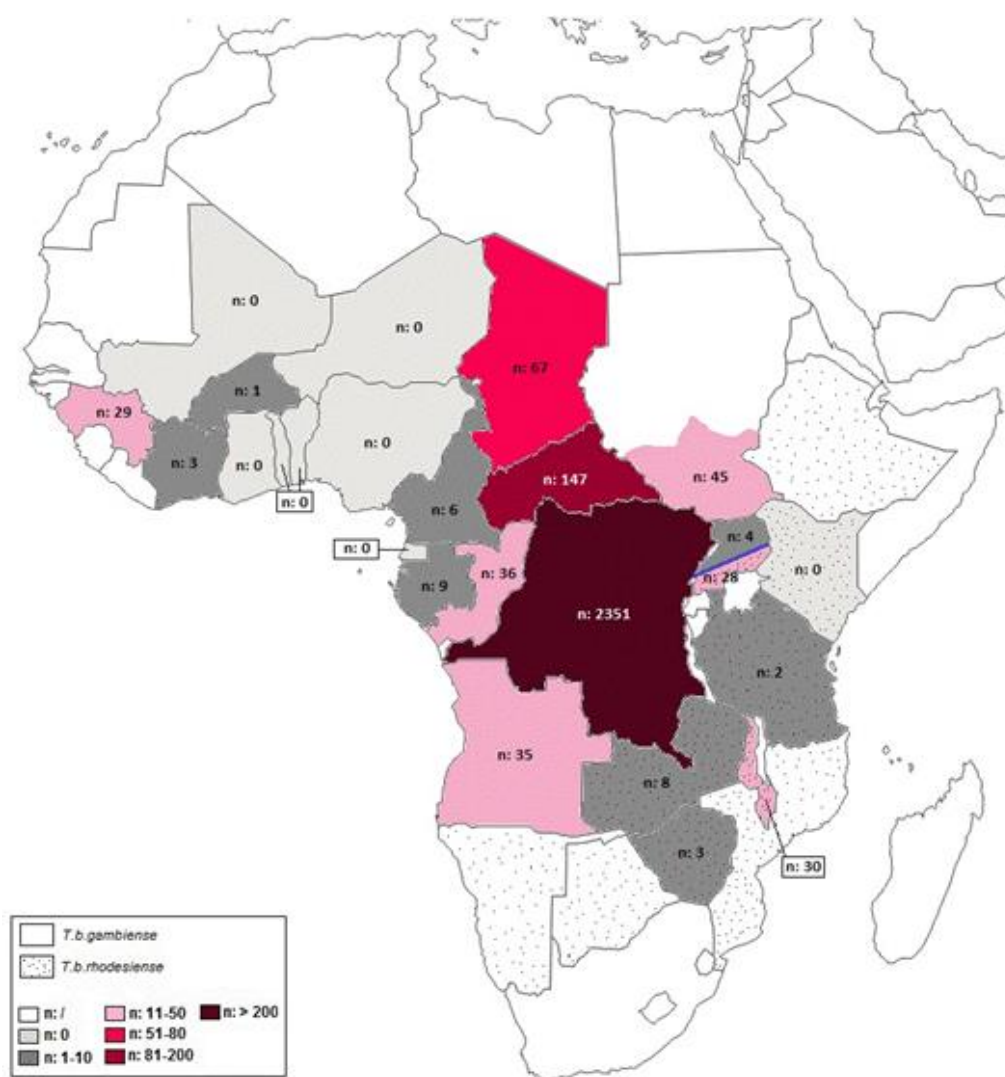


Figure 1: Nombre de nouveaux cas de THA déclarés en 2015<sup>21</sup>

Le continent africain a connu 3 grandes vagues épidémiques (Figure 2) au cours du siècle dernier. La première a eu lieu entre 1896 et 1906 de l’Ouganda jusqu’au Congo. Une deuxième épidémie s’est déclarée en 1920 où plusieurs pays africains ont été touchés, ce n’est qu’en 1960 que la maladie est de nouveau sous contrôle. La dernière épidémie est survenue en 1970 et a persisté jusqu’à la fin des années 1990. A cette période, la maladie du sommeil a été la première ou seconde cause de mortalité dans certaines zones (Angola et Soudan) dépassant même le VIH<sup>4</sup>. Depuis le début du XXIème siècle, on note une diminution du nombre de nouveaux cas grâce à des programmes de lutte et à la coopération de l’OMS avec des

organisations non gouvernementales (ONG). La fin de certains conflits, une meilleure prise en charge des populations et la lutte anti-vectorielle ont permis d'améliorer la situation et laissent espérer une éradication de la maladie dans les prochaines décennies<sup>5</sup>.

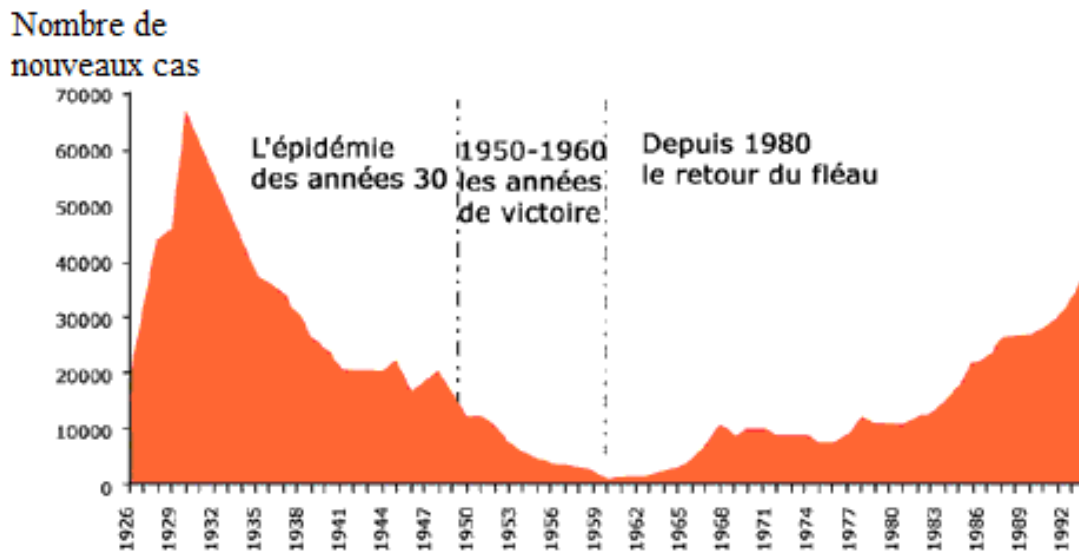


Figure 2 : Elimination puis résurgence de la maladie du sommeil<sup>6</sup>

L'OMS est très optimiste, en effet les statistiques prévoient l'élimination de la THA d'ici 2020 et l'interruption de la transmission de *T. b. gambiense* aux alentours de 2030. Cependant la réalité sur le terrain est différente, il reste encore du chemin à parcourir avant de résoudre les problèmes liés à la THA sur le continent africain<sup>7</sup>.

## 2. Parasite

Les trypanosomes appartiennent au genre *Trypanosoma*, à la famille des *Trypanosomastidae*, font partie de l'ordre des *Kinetoplastida*. Ce sont des protozoaires sanguicoles flagellés<sup>8</sup>. Le genre *Trypanosoma* se divise en deux sous-genres pouvant parasiter les mammifères :

Les **stercoraria** dont le vecteur transmet *Trypanosoma cruzi*<sup>9</sup> qui est responsable de la Trypanosomose Humaine Américaine aussi appelée maladie de Chagas. Le parasite est transmis par les déjections de la Réduve<sup>10</sup>.

Les **salivaria** transmis à la suite d'une piqûre par un insecte vecteur : la Glossine. D'un point de vue taxonomique, *Trypanosoma brucei* est divisé en trois sous espèces selon l'origine géographique, le vecteur, l'infectiosité pour l'homme ou encore la gravité de la maladie<sup>11</sup>.

- *T. b. brucei*, forme non pathogène pour l'Homme, car il existe dans le sang un complexe capable de lyser spécifiquement ce parasite<sup>12</sup>. Il est uniquement responsable d'une des formes de Trypanosomose Animale Africaine, aussi appelée Nagana (infection du bétail et des animaux domestiques)<sup>13</sup>.
- *T. b. gambiense* est retrouvé principalement dans le centre et l'ouest de l'Afrique. Il entraîne une forme chronique de la maladie et est responsable de plus de 90% des cas de THA répertoriés chaque année<sup>14</sup>. *T. b. rhodesiense* est responsable d'une anthrozoonose localisée à l'est et au sud de l'Afrique. Il est responsable de la forme aigüe de la maladie dont le bétail constitue le principal réservoir du parasite<sup>15</sup>.

Ces trois espèces présentent les mêmes caractéristiques morphologiques (Figure 2).

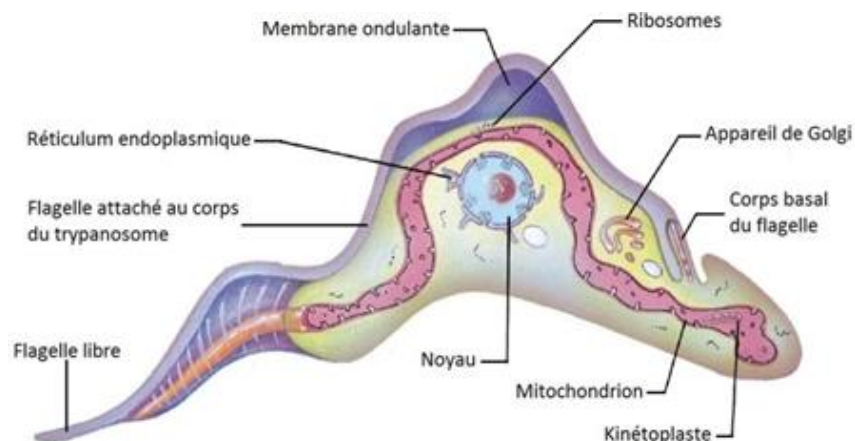


Figure 3 : Morphologie de *Trypanosoma sp*<sup>16</sup>



Ce parasite a une morphologie relativement simple. Cependant, il a la particularité de posséder des composés glycoprotéiques de surface ou VSG (Variant Surface Glycoprotein). Ceux-ci entraînent une variation continue de l'antigène de surface lui permettant d'échapper au système immunitaire de l'hôte<sup>17</sup>.

### 3. Vecteur de la maladie

La mouche Tsé-Tsé, appelée également glossine transmet la maladie du sommeil par l'intermédiaire de sa salive au cours d'un repas sanguin. Les glossines sont des Diptères Brachycères appartenant à la famille des Glossinidés et au genre *Glossina*. C'est un insecte piqueur avec une trompe saillante dont les deux sexes sont hématophages. Elles se nourrissent exclusivement de sang. Ces mouches ont un corps allongé, robuste, de coloration brun-noirâtre à brun testacé. Leur taille est comprise entre 6 et 16 mm<sup>18</sup>.



Figure 4 : *Glossina palpalis* (photo : Ray Wilson)

Ce sont des mouches exclusivement africaines et continentales. On dénombre 31 espèces et sous-espèces réparties en fonction des différents écosystèmes. Il existe trois principaux groupes, le groupe *Palpalis* confiné dans les forêts denses humides, riveraines de cours d'eau et transmettant *T. b. gambiense*<sup>19</sup>. Le groupe *Morsitans* rencontré dans les savanes boisées et les zones d'abondance de bétail ou de faune sauvage, il est le principal vecteur de *T. b. rhodesiense*. Le groupe *Fusca* vit principalement dans les zones forestières<sup>18</sup>.

La mouche est active au début de la matinée et en fin d'après-midi lorsque les températures sont moyennes, s'il fait très chaud l'activité cesse et l'insecte recherche les

endroits frais<sup>20</sup>. Lors de son premier repas sanguin la mouche s'infecte en piquant un individu contaminé. Les trypanosomes vont subir des maturations pour être infectant dans l'intestin avant d'être stockés dans les glandes salivaires. Une fois parasitée, la mouche sera infectante toute sa vie<sup>21</sup>. Un faible pourcentage de trypanosomes pourra effectuer une partie de son cycle chez la glossine afin d'être transmis. La mouche Tsé-Tsé est ainsi qualifiée de « mauvais vecteur »<sup>22</sup>.

#### 4. Cycle parasitaire

Ce cycle est complexe, il comporte différents stades morphologiques et physiologiques à la fois chez les mammifères et chez le vecteur (Figure 5).

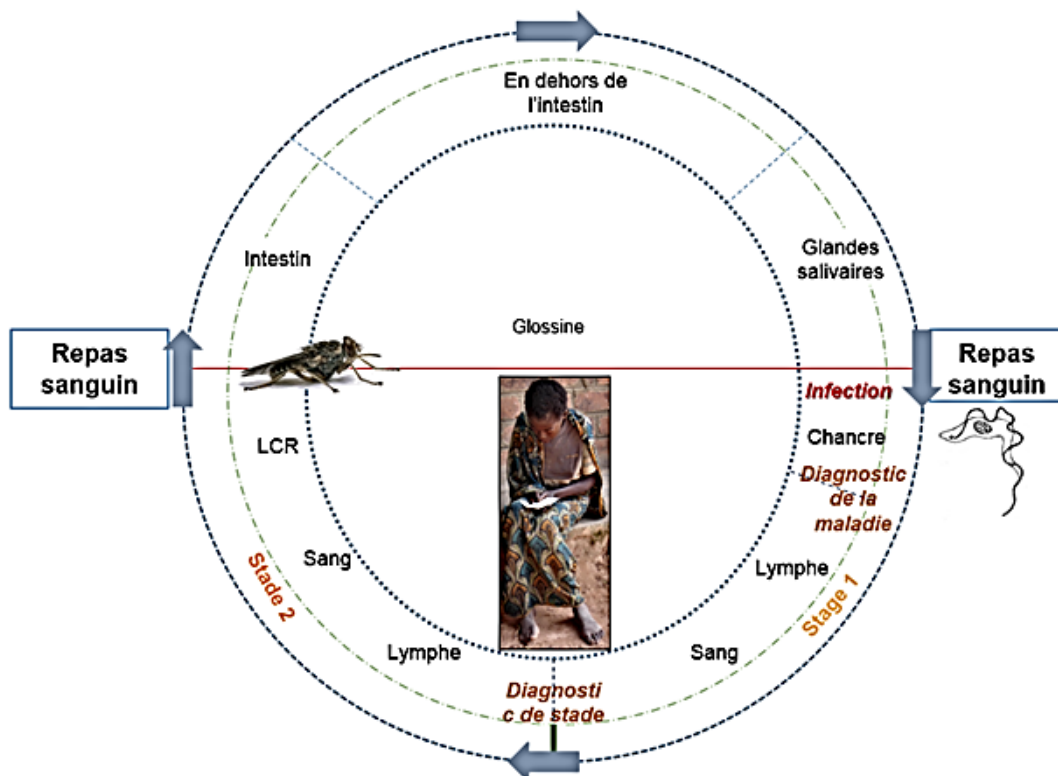


Figure 5 : Cycle parasitaire de la THA (adapté de Bonnet et al)<sup>21</sup>

Lors de son repas la mouche Tsé-Tsé infectée injecte sa salive afin d'empêcher la coagulation du sang, c'est ainsi qu'à cet instant elle transmet les parasites à l'hôte. Les trypanosomes sont au stade trypomastigote métacyclique. Depuis le site d'inoculation, ils vont se multiplier et se transformer en trypomastigote circulant pour rejoindre la circulation sanguine et lymphatique, ce qui correspond au stade 1 de la maladie. Après avoir séjourné et s'être multiplié dans ces fluides biologiques le parasite va franchir la BHE (Barrière Hémato

Encéphalique) et se développer dans le LCR (Liquide Céphalo-Rachidien). Cette étape marque l'entrée en stade 2 de la maladie ou également appelée stade nerveux<sup>22</sup>. L'hôte une fois infecté constitue un réservoir.

Si une glossine saine pique un individu infecté, celle-ci ingèrera des trypomastigotes qui se déplaceront vers le mésentéron de l'insecte où quelques-uns se différencieront en trypomastigotes procycliques. Ces derniers se transforment ensuite en épimastigotes et migrent vers les glandes salivaires. Enfin, ils subissent leur dernière transformation en trypomastigotes métacycliques, stade infectant qui sera transmis lors du prochain repas sanguin<sup>23</sup>.

## 5. Clinique de la THA

Les signes cliniques de cette maladie sont liés à la réaction du système immunitaire de l'organisme vis-à-vis du parasite. La progression de la maladie c'est-à-dire le passage du stade hémo-lymphatique au stade nerveux dépend de la sous-espèce du parasite. En effet, *T. b. rhodesiense* est responsable de la forme aiguë avec un développement rapide et une évolution fatale en 6 mois. Pour *T. b. gambiense* l'évolution peut aller jusqu'à 3 ans, il s'agit de la forme chronique. Cependant les symptômes sont souvent identiques pour les deux formes<sup>22</sup>.

### 5.1. Stade 1 ou stade hémo-lymphatique

La maladie débute par la formation d'un chancre au site de la piqûre faite par une glossine. Dans un premier temps les parasites vont se développer et se multiplier au niveau épidermique à l'endroit du chancre d'inoculation. Cette zone ulcéreuse va disparaître en 2 à 3 semaines et les trypanosomes vont ensuite diffuser dans le système lymphatico-sanguin. Des signes peu spécifiques et difficiles à diagnostiquer vont apparaître dans les semaines qui suivent. On retrouve une fièvre intermittente, des maux de tête, un prurit ainsi que des adénopathies, une hépatosplénomégalie. Des désordres cardiovasculaires sont également rencontrés, signe d'un pronostic plus réservé<sup>24</sup>. Puis les trypanosomes vont franchir la BHE et envahir le Système Nerveux Central (SNC) de l'hôte, c'est l'étape de polarisation nerveuse qui marque le début du stade 2 de la maladie.

### 5.2. Stade 2 ou Stade nerveux

Ce stade est insidieux il peut se déclarer quelques mois à plusieurs années après la transmission du parasite, lorsque celui-ci passe dans le LCR. Le trypanosome se trouve alors

dans le SNC entraînant des désordres neuropsychiatriques et endocriniens<sup>25</sup>. Parmi les signes neurologiques on note l'anxiété, l'irritabilité avec parfois des comportements violents. Des troubles moteurs et sensitifs tels que des akinésies ou des dyskinésies peuvent être associés. Les réflexes sont eux aussi perturbés. Une des principales caractéristiques de cette maladie est la perturbation du cycle veille-sommeil, d'où son nom « maladie du sommeil ». On observe des fragmentations du sommeil avec des somnolences le jour, des insomnies nocturnes ou encore des pulsions incontrôlables pour dormir.

En phase terminale de la maladie il y a une détérioration mentale importante, le patient est dans un état comateux avec altération de l'état général entraînant le décès du sujet<sup>26</sup>. L'étude de l'interaction hôte-parasite est indispensable afin de comprendre comment le parasite engendre une telle cascade d'évènements chez l'homme<sup>27</sup>.

## 6. Physiopathologie de la THA

### ➤ Mécanisme du développement de la maladie

A la suite de la piqûre, on observe une réaction cutanée locale de l'hôte par la formation d'un chancre. Cette réaction inflammatoire correspond à l'infiltration de polynucléaires neutrophiles ainsi que des lymphocytes T et B avec une prédominance de lymphocytes T CD8<sup>+</sup><sup>28</sup>. Les trypanosomes possèdent dans leur cytosquelette une protéine appelée trypanine ou Trypanosome Lymphocyte Triggering Factor (TLTF) ayant un rôle dans la mobilité cellulaire et l'immunomodulation<sup>29</sup>. Cette protéine active les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> qui ont la capacité de produire l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Or il a été démontré que celui-ci est un facteur de croissance pour le trypanosome<sup>30</sup>. Toutefois, L'IFN- $\gamma$  va entraîner l'activation des monocytes macrophages qui vont induire la production de monoxyde d'azote (NO) et de Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pouvant être toxiques pour les trypanosomes. Il existerait une corrélation entre des taux sériques élevés de TNF- $\alpha$  et la gravité de la THA<sup>31,32</sup> (Figure 6).

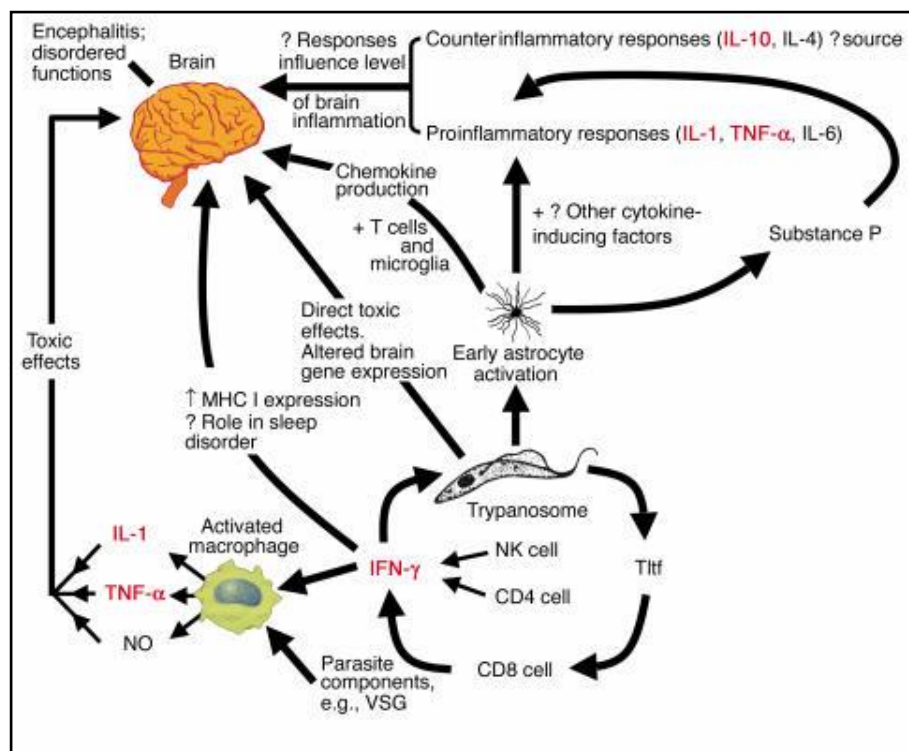


Figure 6 : Mécanismes immunopathologiques de la THA<sup>33</sup>

Après un délai variable, de quelques mois à plusieurs années, le parasite franchit la BHE et envahit le SNC à l'origine d'une méningo-encéphalite mésoenchymateuse. Le SNC est isolé du compartiment sanguin grâce à la BHE qui se situe au niveau des capillaires cérébraux qui possèdent une couche interne de cellules endothéliales connectées par des jonctions serrées, imperméables. Les prolongements des pieds astrocytaires forment une plate-forme de jonction avec le compartiment extracellulaire du SNC. Certaines zones cérébrales sont dépourvues de BHE ce qui permet le passage de molécules de grande taille. Il existe des connections entre le SNC et le système lymphatique par l'intermédiaire des ganglions cervicaux. Les lymphocytes T pénètrent dans le SNC réagir avec un antigène cérébral et initier une réaction inflammatoire. Les éléments constitutifs de la barrière sont impliqués dans la réaction inflammatoire, ils vont produire des cytokines, des molécules d'adhésion, des métalloprotéinases, des sérines protéases, des prostaglandines et du NO<sup>34</sup>. Normalement, en raison de sa taille (2µm) le parasite ne peut pas franchir la BHE. Cependant les trypanosomes traverseraient au niveau des jonctions intercellulaires. Ils passent au niveau de régions où la BHE est plus perméable c'est-à-dire au niveau des plexus choroïdes, des racines des ganglions et au niveau des organes péri-ventriculaires<sup>35</sup>. Selon plusieurs articles<sup>36</sup>, le passage du parasite serai facilité par l'état inflammatoire de la zone mais également grâce aux substances qu'il sécrète.

Une fois dans ce compartiment, le parasite se multipliera aux dépens de la réaction inflammatoire mise en œuvre par l'hôte<sup>37</sup>.

### ➤ Trypanotolérance

De rares cas où la Trypanosomose Humaine Africaine n'est pas fatale sans traitement ont été décrits, en effet on appelle ce phénomène la trypanotolérance. Cela concerne les malades présentant des adénopathies ou des signes cliniques avérés, discrets et ne passant pas au stade ménigo-encéphalique<sup>38</sup>. Cette tolérance est mise en évidence la première fois chez les bovins. Les bovins N'Dama en particulier ont évolué vers une tolérance relative à la maladie à la suite de la sélection naturelle sur plusieurs millénaires. Ils ont la capacité de limiter la parasitémie et l'anémie tout en conservant un poids corporel suffisant<sup>39</sup>. Les données parasitologiques et sérologiques soutiennent que l'hypothèse d'une auto-guérison peut se produire. De rares et vieux rapports ont précédemment exposés l'existence de la guérison spontanée de l'infection<sup>40</sup>. Les mécanismes immunologiques de cette trypanotolérance ne sont pas bien connus cependant les individus et le bétail trypanotolérants constituent un réservoir du parasite d'où la nécessité d'un dépistage<sup>41</sup>.

## 7. Diagnostic

### a) Diagnostic du stade 1

Le diagnostic de cette pathologie est relativement compliqué car les signes cliniques sont peu caractéristiques. Il existe un test de dépistage utilisable sur le terrain, il s'agit du CATT (Figure 7). En effet ce test est rapide, peu coûteux et d'utilisation simple. Il n'est disponible que pour *T.b. gambiense*. Malgré une bonne spécificité 97%, il doit être systématiquement confirmé par un examen de laboratoire. Après avoir dépisté la maladie, un diagnostic de stade doit être réalisé afin d'administrer le bon traitement<sup>42</sup>. La numération formule sanguine est modifiée, on note une anémie, une hyperleucose et une plasmocytose non spécifiques. Un protocole de dépistage est recommandé par l'OMS en tenant compte des différentes techniques diagnostiques disponibles et des conditions sur le terrain<sup>43</sup>.

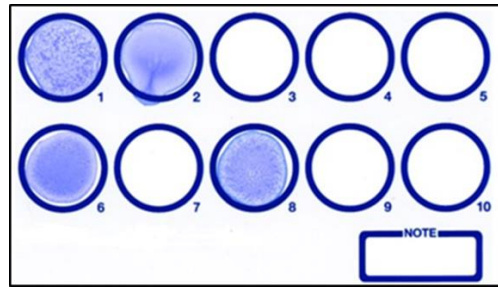


Figure 7 : CATT (J. Bonnet)

Dans les régions à risques, l’OMS donne un certain nombre de recommandation pour le diagnostic de la maladie. Ainsi lors de campagne de dépistage après l’anamnèse le CATT sur sang total est le premier outil diagnostique utilisé. Il s’agit d’un test sérologique d’agglutination utilisant des antigènes variables LiTat 1.3 de *T. b. gambiense*. Ce test est utilisable sur le terrain (sous réserve d’avoir accès à une source d’énergie), facile d’emploi et peu coûteux. Cependant on observe une agglutination qui peut être subjective avec une sensibilité qui varie de 87% à 98% probablement en lien avec les erreurs de lecture<sup>43,44</sup>.

Si le test est négatif, la personne ne possède pas d’anticorps elle est alors considérée saine. Si le test est positif, on procède à une palpation des ganglions situés à la base du cou (Figure 8). Dans le cas où les ganglions cervicaux sont présents le prélèvement et l’examen du suc ganglionnaire à l’état frais permet de détecter les trypanosomes mobiles. La simplicité et le faible coût de cette technique font qu’elle est largement utilisée malgré sa sensibilité de 59 %. Elle dépend de la charge parasitaire du patient parfois faible au cours de l’évolution de la maladie<sup>3</sup>. Si la présence du trypanosome est confirmée par examen direct le patient est considéré comme atteint de THA.



Figure 8: palpation ganglionnaire<sup>45</sup>

En cas d'absence de ganglions lymphatiques ou de trypanosomes dans le suc ganglionnaire, on réalise une centrifugation en tubes capillaires (CTC) (Figure 9). C'est une technique réalisée sur du sang recueilli dans des tubes capillaires qui nécessite une centrifugation à grande vitesse avec une centrifugeuse à microhématocrite. Il y a séparation des différents éléments, les hématies se concentrent à une extrémité. A l'autre extrémité du tube se trouve le plasma. A l'interface on note la présence des globules blancs, des plaquettes et des trypanosomes car ils ont la même densité. L'observation des trypanosomes mobiles se fait au microscope, on recherche les parasites mobiles à proximité de la couche de globules blancs. Aucune coloration n'est nécessaire cependant une centrifugeuse spéciale et un branchement électrique sont indispensables. C'est une méthode peu coûteuse, rapide avec un seuil de détection d'environ 500 trypanosomes par mL de sang<sup>46</sup>.



Figure 9 : Centrifugation par tube capillaires<sup>47</sup>

La mAECT a été mise au point à partir d'une grande colonne de cellulose destinée à extraire les trypanosomes du sang d'animaux inoculés au laboratoire. Par la suite, cette colonne a été réduite, d'où son nom de « minicolonne », et adaptée pour le diagnostic des suspects de la trypanosomiase humaine africaine. Cette technique permet de trouver les parasites à une concentration d'au moins 100 trypanosomes par ml de sang. La résine échangeuse d'anions (DEAE cellulose), utilisée en suspension dans un tampon phosphate (PSG), a la capacité de retenir les cellules ayant une charge électrique bien précise ; or les cellules sanguines ont une charge électrique différente de celle des trypanosomes. En adaptant le pH et la concentration du tampon, on peut retenir, grâce à la cellulose, les cellules du sang et laisser passer les trypanosomes. Selon les caractéristiques du tampon, on peut adapter la mAECT au sang humain et d'animaux. Pour l'homme, le pH est fixé à 8 et la concentration du tampon à 5,5.



Le liquide recueilli est ensuite centrifugé pour concentrer les trypanosomes dans le culot. Avec un objectif 10x, les trypanosomes apparaissent minuscules. Ils peuvent être confondus, malgré leur mobilité, avec d'autres éléments venus souiller le milieu. Ils peuvent aussi être masqués par de la cellulose entraînée lors de la filtration<sup>111, 112</sup>.

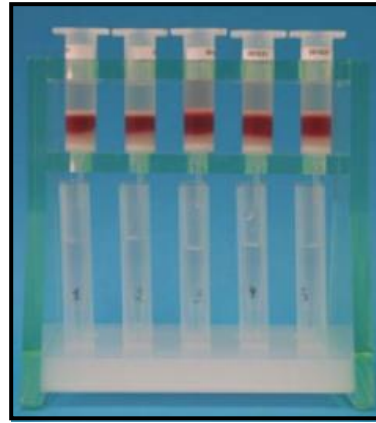


Figure 10 : mAECT<sup>50</sup>

Un arbre décisionnel résume cette procédure de diagnostic qui est variable d'un pays à l'autre, la figure 11 présente le protocole utilisé en Angola. Les méthodes de diagnostic sont très diversifiées et leur utilisation varie selon les pays.

D'autres techniques plus spécifiques et plus sensibles sont en cours de développement<sup>51</sup> et sont détaillées plus loin.

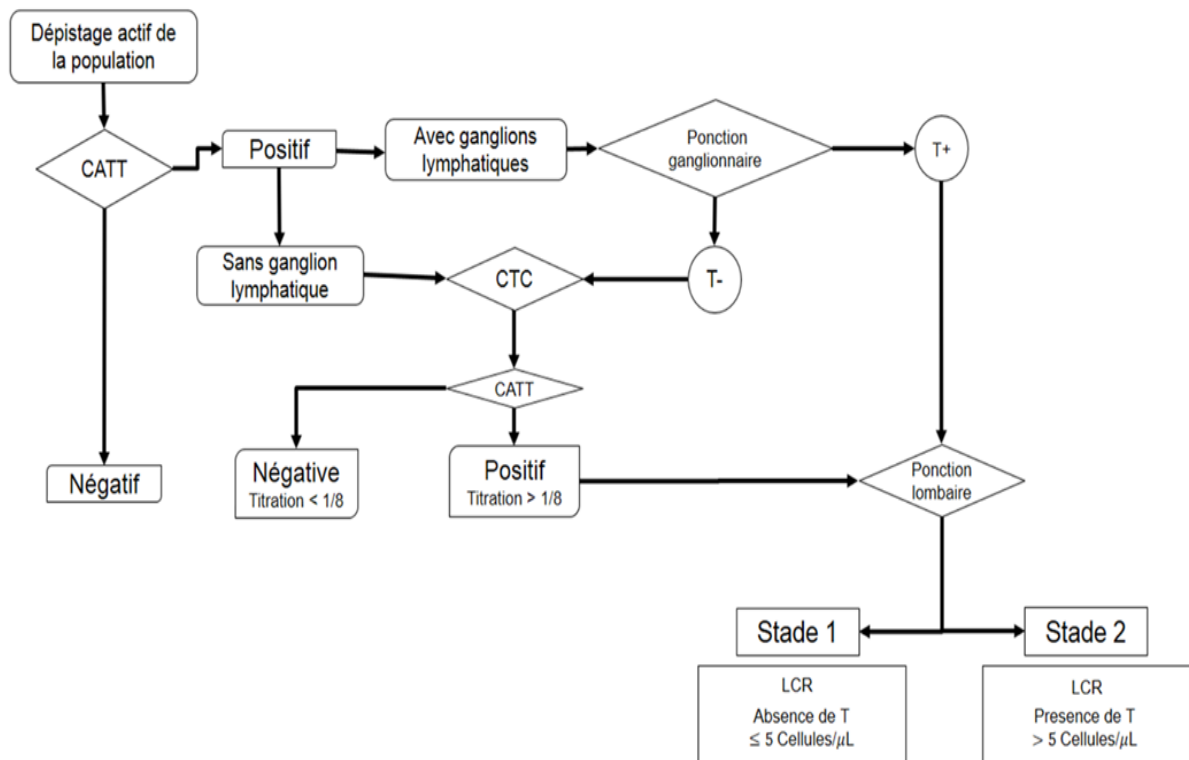


Figure 11: Exemple d'arbre décisionnel pour le diagnostic de la THA

➤ Détection des anticorps

Des tests de diagnostic rapide développés à l'initiative de FIND (Foundation for Innovative New Diagnosis) pour rechercher une infection par *T. b. gambiense* ont été expérimentés en Angola et en République Centrafricaine. Ce dispositif utilise l'immunochromatographie à écoulement latéral et détecte des anticorps anti-trypanosomes. Le test HAT Sero-K-SeT® (Figure 12) contient des antigènes variables de *T. b. gambiense*, LiTat 1.3 et LiTat 1.5<sup>52</sup>. Une seconde génération de rapid diagnostic test (RDT) utilise des antigènes natifs et recombinants moins coûteux à produire et de standardisation plus facile<sup>53</sup> (Figure 13). Comme pour le CATT, une confirmation parasitologique est nécessaire. Le prochain objectif de FIND est de développer un test pouvant détecter à la fois la malaria et la THA afin de surveiller l'apparition de nouveaux cas<sup>51</sup>.



Figure 12: Test HAT Sero-K-SeT®<sup>54</sup>



Figure 13: Test de Diagnostic Rapide

L'immunofluorescence indirecte est une technique diagnostique qui consiste à fixer des trypanosomes entiers sur des lames de microscopes puis déposer des IgG anti-humaine couplées à un marqueur fluorescent sur la lame (Figure 14). L'utilisation d'antigènes de type LiTat 1.3 ou LiTat 1.5 a amélioré la sensibilité et la spécificité. Cette technique est adaptée à la surveillance et au diagnostic en laboratoire<sup>3</sup>. Carl Zeiss GmbH en collaboration avec FIND développe une technique LED (light-emitting diodes) couplée à la microscopie pouvant être utilisable sur le terrain, cependant cette méthode reste pour l'instant anecdotique<sup>51</sup>.

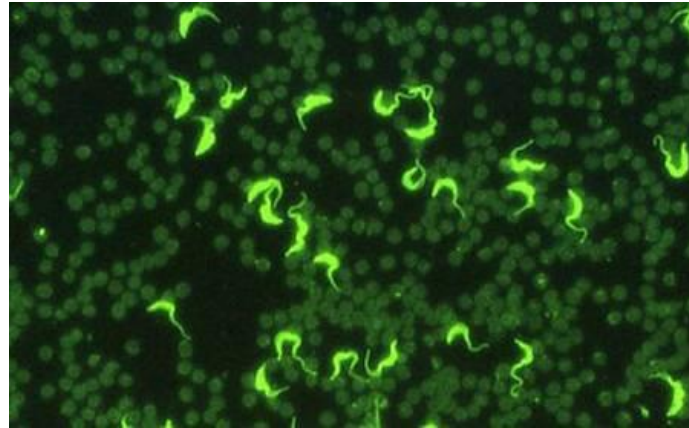


Figure 14 : Trypanosome à l'Immunofluorescence indirecte

Les techniques ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sont largement utilisées pour le sérodiagnostic. Elles sont pratiquées sur de nombreux fluides biologiques. Néanmoins, les tests ELISA nécessitent du matériel de pointe constituant un inconvénient pour le travail sur le terrain<sup>55</sup>.

L'immuno-trypanolyse est un test qui repose sur la reconnaissance des épitopes des VSG situées à la surface des trypanosomes vivants par les anticorps ce qui provoque une lyse. On considère qu'il est spécifique à 100%, en effet uniquement les anticorps spécifiques vont entraîner la lyse des trypanosomes car ces anticorps sont absents chez les personnes non infectées. Ce test peut être utilisé sur le terrain<sup>56</sup>. Le test d'immuno-trypanolyse est considéré comme le test de référence ou « gold-standard ». Ce test nécessite des trypanosomes vivants et n'est réalisé que dans les laboratoires de référence. Ce sont des antigènes variables de *T. b. gambiense* de type LiTat 1.3 et 1.5 qui sont utilisés<sup>3</sup>. Il s'agit de la reconnaissance des VSG présentes à la surface du parasite par les anticorps correspondants présents dans le prélèvement. C'est un test très spécifique dont le principe est la lyse du complément. Il est considéré positif lorsque 50% des trypanosomes sont lysés. C'est un test qui sert de référence afin de vérifier la

présence des anticorps dirigés contre *T. b. gambiense* lors de contrôles qualité de certains tests sérologiques utilisés sur le terrain<sup>56</sup>.

L'orientation du diagnostic est permise si on observe à l'hémogramme une anémie, une hyperleucose et des cellules de Mott. Le protidogramme présente une hyperprotidémie avec une hypoalbuminémie mais surtout une élévation considérable des IgM sériques<sup>57</sup> en cas d'infection.

➤ Détection du parasite

La sensibilité du diagnostic direct, reposant sur la visualisation des trypanosomes, peut être influencée par la quantité de trypanosomes circulants, par le volume examiné ainsi que par l'expérience de l'observateur.

Selon l'OMS, l'examen du chancre est le moyen le plus précoce pour diagnostiquer l'infection par un trypanosome. Le parasite peut être détecté localement quelques jours avant sa présence dans le sang. L'exsudat est observé à l'état frais ou après fixation au May Grunwald Giemsa. C'est une technique rarement utilisée bien qu'elle soit simple et peu coûteuse car le chancre a souvent disparu au moment de l'examen<sup>43</sup>.

La recherche du parasite se fait rarement dans le sang (technique de la goutte épaisse ou du sang frais) en raison d'une trop faible parasitémie, l'observation nécessite une concentration<sup>58</sup>.

Le système QBC® (Quantitative Buffy Coat) utilise aussi le principe de centrifugation auquel est associée une fluorescence de l'ADN (Acide désoxyribonucléique). On utilise la capacité de l'acridine orange à rendre fluorescent les noyaux et les kinétoplastes afin de détecter les trypanosomes présents dans le sang. Le QBC® est assez sensible mais le matériel nécessaire est complexe le rendant difficile d'emploi sur le terrain<sup>59</sup>.

La lyse des hématies à partir du chlorure d'ammonium permettrait de visualiser les trypanosomes au microscope après coloration au Giemsa ou à l'orangé d'acridine<sup>60</sup>. Ce moyen diagnostique est pour l'instant anecdotique.

➤ Détection moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire sont une alternative avec une meilleure rapidité, sensibilité et spécificité pour la détection de l'ADN de *T.b. gambiense*.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet la détection de l'ADN du trypanosome dans différents fluides biologiques afin d'améliorer le diagnostic et la détermination du stade de la THA<sup>61 62</sup>. Les prélèvements sanguins peuvent être réalisés sur le terrain puis transférés au laboratoire cependant le coût est assez élevé.

FIND et Eiken Chemical Co. Ltd ont développé la technique LAMP (loop mediated isothermal amplification) initialement mise en place pour diagnostiquer la tuberculose. FIND est une fondation suisse qui participe au développement et à la mise sur le marché de nouveaux diagnostics pour les maladies tropicales négligées. La LAMP est une technique d'amplification de l'ADN à température constante d'environ 65°C ne nécessitant ni d'équipement coûteux de biologie moléculaire ni d'extraction<sup>63</sup>. Test très sensible, son seuil de détection est de 1 trypanosome/mL dans le sang<sup>64</sup>. Un LAMP kit a déjà été évalué en République Démocratique du Congo et en Ouganda (Figure 15).



Figure 15 : Technique LAMP<sup>64</sup>

La technique NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) soit en temps réel soit couplée à l'oligochromatographie permet de mettre en évidence l'ARN ribosomal du parasite. L'avantage majeur vient de sa capacité à être réalisée à température constante (41°C). Cependant l'instabilité de l'ARN nécessite une logistique conservation de l'échantillon par une chaîne du froid qui est difficile à mettre en œuvre sur le terrain. Le seuil de détection de 10 parasites/mL de sang cependant il n'existe aucun kit commercial<sup>65</sup>.

Détection de biomarqueurs : La recherche intrathécale d'IgM, marqueur sensible de neuro-inflammation et d'atteinte neurologique, a été pratiquée mais abandonnée par manque de spécificité<sup>66</sup>. D'autres biomarqueurs plus récents tels que la Neopterin, le CXCL10 et le CXCL13 ont été identifiés dans le LCR afin de déterminer le stade de la maladie et l'évolution après traitement<sup>67,68</sup>.

#### b) Diagnostic du stade 2

Pour le diagnostic de stade, la réalisation d'une ponction lombaire est indispensable. C'est une technique rapide et peu coûteuse mais qui manque de sensibilité. De plus c'est un

acte délicat, invasif réalisé dans des conditions d'asepsie sont souvent douteuses<sup>43</sup>. Le résultat est fondé sur deux éléments : la cytorachie (le comptage des éléments figurés dans le liquide céphalo-rachidien) et la recherche du parasite dans le LCR. L'OMS<sup>3</sup> considère que

- Les patients ayant une numération leucocytaire inférieure à 5 par  $\mu\text{L}$ , et sans trypanosome dans leur LCR sont en Stade 1 de la maladie.
- Si la numération leucocytaire est supérieure à 5 par  $\mu\text{L}$  ou que la présence du trypanosome est confirmée dans le LCR alors les patients sont en Stade 2.

Le liquide est clair est hypertendu, on note la présence de lymphocytes et parfois des cellules de Mott. Celles-ci sont très fortement évocatrices de THA. Une hyperprotéinorachie est également visible, elle serait la conséquence d'une synthèse intrathécale importante d'IgM<sup>43</sup>. La protéinorachie est rarement effectuée à cause des difficultés de standardisation, de l'absence de contrôles au moment de la réalisation et des difficultés d'interprétation<sup>69</sup>.

## 8. Traitements

Les traitements actuellement disponibles sont stades et espèces dépendants. De plus, les produits sont toxiques et délicats à administrer avec souvent de nombreux effets indésirables<sup>70</sup>. Seulement cinq médicaments peuvent être prescrits. Les médicaments sont donnés à l'OMS par les fabricants grâce à une convention et sont fournis gratuitement aux pays où la maladie est endémique.

Pour un patient en stade 1 atteint par *T. b. gambiense* on traite avec de la pentamidine alors que pour une infection à *T. b. rhodesiense* on utilise la suramine.

Pour le traitement du stade 2, le mélarsoprol est utilisé uniquement pour *T. b. rhodesiense*. Lors du stade 2 de la THA à *T. b. gambiense* on administre de l'éflornithine ou l'association nifurtimox/éflornithine<sup>3</sup> (Tableau 1).

De nouveaux traitements sont à l'étude, notamment le fexinidazole qui fait partie des Nitroimidazoles. Le pouvoir trypanocide de cette molécule a été découvert par le DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative) au début des années 1980 puis développée par Sanofi-Aventis dont l'objectif est de traiter les deux stades de la THA. Elle présente un fort intérêt puisque le traitement est par voie orale et de courte durée. De plus, la molécule agit sur les deux types de

parasite<sup>71</sup>. Le fexinidazole est actuellement en phase III des essais cliniques dont les centres d'étude sont localisés en République Démocratique du Congo et en République Centrafricaine<sup>72</sup>.

Les traitements actuels étant stades dépendants, il est nécessaire de donner aux praticiens un outil diagnostique fiable et non invasif, afin de réaliser un diagnostic de stade précis et fiable.

|                                | <i>Stade</i> | <i>Souche</i>                                 | <i>Dosage</i>                                                                                                                                   | <i>Effets indésirables</i>                                                                              |
|--------------------------------|--------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Pentamidine</i>             | stade 1      | <i>T. b. gambiense</i>                        | 4 mg/kg/j<br>IM<br>Pendant 7 jours                                                                                                              | hypertension,<br>nausées, douleurs<br>au site d'injection,<br>toxicité cardiaque,<br>éruptions cutanées |
| <i>Suramine</i>                | stade 1      | <i>T. b. rhodesiense</i>                      | 4-5 mg/kg (jour 1)<br>puis 20 mg /kg par<br>semaine<br>IV<br>maximum/injection :<br>1g<br>Pendant 5 semaines                                    | éruptions<br>cutanées,<br>toxicité<br>hématologique,<br>neuropathies                                    |
| <i>Mélarsozol</i>              | stade 2      | <i>T. b. gambiense/<br/>T. b. rhodesiense</i> | 2,2 mg/kg/j<br>IV<br>Pendant 10 jours                                                                                                           | encéphalopathie<br>arsenicale,<br>céphalées,<br>tremblements                                            |
| <i>Eflornithine</i>            | stade 2      | <i>T. b. gambiense</i>                        | 400 mg/kg/j<br>IV<br>4 perfusions/j<br>pendant 14 jours                                                                                         | anémie,<br>leucopénie,<br>convulsions                                                                   |
| <i>Eflornithine/Nifurtimox</i> | stade 2      | <i>T. b. gambiense</i>                        | Eflornithine : 400<br>mg/kg/j<br>IV<br>2 perfusions/j<br>pendant 7 jours<br>+ Nifurtimox :<br>15mg/kg/j<br>PO<br>3 prises/j pendant 10<br>jours | <i>Idem</i> eflornithine<br>+ anorexie,<br>nausées, douleurs<br>gastriques                              |

Tableau 1 : Médicaments utilisés dans la THA<sup>3</sup>



## B. Fluides biologiques

L'urine et la salive sont deux fluides biologiques ayant la particularité d'être recueillis de manière simple, non invasive, non traumatisante et peu coûteuse. Ces fluides contiennent des protéines qui ont une origine plasmatique et une origine propres à chaque système.

### 1. L'urine

#### a. Appareil urinaire

Les fonctions principales de l'arbre urinaire sont de collecter, transporter, stocker et expulser l'urine. La circulation se fait des papilles rénales, vers le bassinet, les uretères, la vessie jusqu'à l'urètre (Figure 7). Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein, il participe à l'homéostasie en remplissant les fonctions d'excrétion des déchets (créatinine, urée, ...) de maintien du volume hydrique, de maintien de l'équilibre hydrominéral et acido-basique.

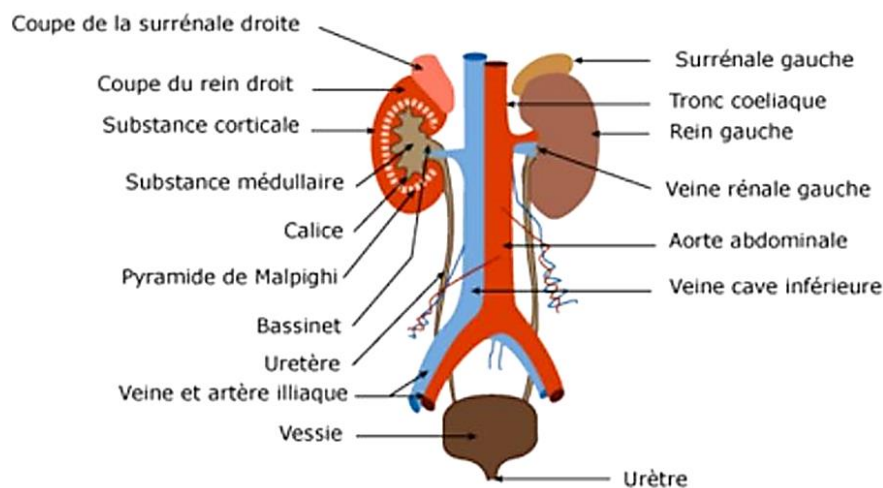


Figure 16: Appareil urinaire<sup>73</sup>

#### b. Composition de l'urine

En premier, le sang est filtré au niveau des glomérules, à ce niveau les cellules sanguines et les grosses molécules sont retenues contrairement à l'eau, aux électrolytes et aux petites molécules qui passent. Il s'agit de la formation de l'urine primitive. Par la suite, la composition de l'urine est modifiée suite à des échanges très étroits avec des capillaires sanguins entourant le tubule proximal, l'anse de Henlé et le tubule distal. La réabsorption et la sécrétion permettent aux néphrons de maintenir l'homéostasie. L'urine définitive est ainsi formée puis stockée dans la vessie jusqu'à la miction. L'organisme produit environ 1,5 L/24 h d'urine<sup>74</sup>. L'urine est un

liquide jaune pâle, limpide et légèrement acide. Il contient 95% d'eau et 5% de solutés dont l'urée, la créatinine, l'acide urique, des ions ammonium, des corps cétoniques et des électrolytes (sodium, potassium, calcium...). La composition et la concentration varient en fonction des besoins pour assurer l'homéostasie de l'organisme. L'urine physiologique présente moins de 50 mg/L de protéines. L'albumine et l'uromoduline constituent les protéines majoritaires. On retrouve d'autres protéines comme des chaînes légères des immunoglobulines, la transferrine et d'autres en quantité moindre<sup>75</sup>. Ce fluide présente des biomarqueurs permettant l'aide au diagnostic de nombreuses pathologies urologiques et néphrologiques mais aussi pour des pathologies systémiques : cancer de la prostate<sup>76</sup>, syndrome de Cushing<sup>77</sup>, parasitoses (bilharziose, filarioses, paludisme)<sup>78</sup>.

## 2. La salive

### a. Système salivaire

La salive est un liquide biologique qui participe au maintien de l'équilibre buccodentaire ainsi qu'au déroulement de nombreuses fonctions orales. La salive intervient lors de la gustation, la mastication et la déglutition du bol alimentaire. Elle facilite la digestion et la phonation grâce à ses propriétés lubrifiantes. Ce fluide agit comme une barrière contre les agents irritants mécaniques, thermiques et chimiques. Il maintient la cavité buccale humide, élimine les microorganismes, les débris alimentaires ainsi que les cellules épithéliales en desquamation. Les glandes salivaires situées dans la cavité buccale assurent la production d'environ 1 L de salive par jour. Le processus de sécrétion salivaire est permis par un ensemble de glandes. On distingue les glandes dites majeures constituées des glandes parotides, submandibulaires et sublinguales et les glandes dites mineures disséminées dans la muqueuse buccale<sup>79</sup> (Figure 17).

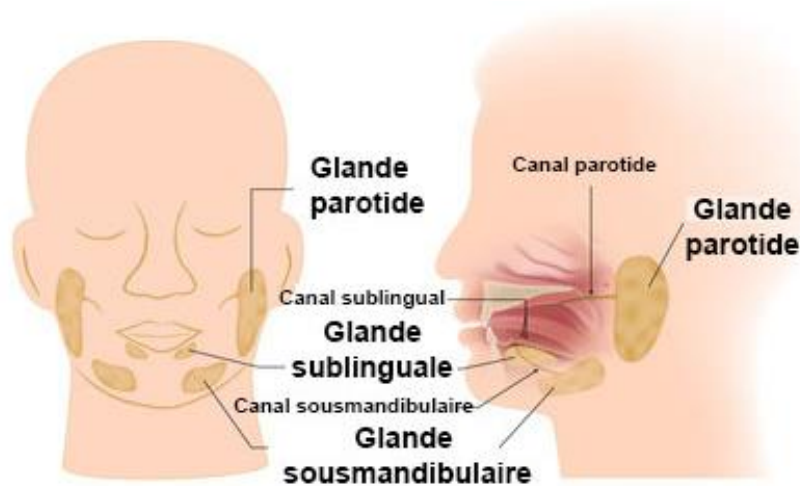


Figure 17 : Anatomie des glandes salivaires<sup>79</sup>

La sécrétion salivaire est stimulée par les branches parasymphatique et sympathique du système nerveux autonome. La vascularisation artérielle et veineuse est importante surtout au niveau des glandes salivaires principales contrairement au réseau lymphatique qui est peu développé<sup>80</sup>.

Le pH physiologique varie entre 6,5 et 7,4 cependant une stimulation de la sécrétion l'augmente. Le pouvoir tampon ainsi que l'action sur la reminéralisation dentaire de la salive sont également à souligner<sup>81</sup>.

#### b. Composition salivaire

La salive est un fluide visqueux, incolore, hypo-osmolaire. La salive est constituée de plus de 99 % d'eau, le reste correspondant à la phase minérale et organique. La composition ionique de la salive primaire est relativement proche de celle du plasma. On note la présence d'ions sodium, chlorure, fluorure et sulfate mais surtout des concentrations non négligeables d'ions calcium et phosphate. Ces derniers ont un rôle important dans la calcification de la plaque dentaire et la reminéralisations de l'émail.

On retrouve dans la salive des toxines et des médicaments qui peuvent être éliminés par l'organisme du fait des nombreux échanges sang/salive. Plusieurs types de protéines sont présents et constituent la phase organique de la salive. On trouve des protéines non spécifiques comme les immunoglobulines (Ig) provenant du sang dont la principale est l'IgA salivaire, des IgG et IgM existent en faible quantité. Des glycoprotéines comme le lysozyme et la lactoferrine

sont dans ce fluide et ont une activité antiseptique. De nombreuses enzymes telles que des protéases, hydrolases, catalases, phosphatases sont présentes dans la salive<sup>82</sup>. L'enzyme la plus importante quantitativement est l' $\alpha$ -amylase. En dehors des enzymes, d'autres éléments sont dans ce milieu : de l'ammoniaque, de l'urée, des acides aminés ou encore les vitamines C et B.

## **OBJECTIF**

L'objectif général de ma thèse est d'identifier des marqueurs biologiques utiles au diagnostic de la THA. Les objectifs spécifiques sont d'identifier ces marqueurs dans deux fluides biologiques l'urine et la salive par une technique de protéomique et de valider les résultats sur une partie de la cohorte FIND.

# Etude expérimentale

## 1. Matériels et méthodes

### a. Cohorte

Pour cette étude, nous avons à disposition une bio-banque d'échantillons humains constituée par le Docteur S. Bisser lors d'une enquête de prospection qui a eu lieu en Angola dans les provinces de Bengo, Uíge et Kwanza Norte (Figure 18) entre 2008 et 2011 sous l'égide de l'organisation suisse FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics). Ces patients ont été suivis depuis leur inclusion, à 6, 12, 18 et 24 mois post traitement. La cohorte est constituée de 228 individus dont, 67 patients en stade 1, 161 patients en stade 2 et 19 contrôles indemne de la THA. Pour chacun des patients et individus contrôles, nous avons à disposition des échantillons de sérum, de plasma, de LCR, de salive, d'urine et de larmes. Les prélèvements d'urine ont été effectués le matin, entre 7h et 13h en parallèle des tests de diagnostic pour la THA. Le recueil de la salive a été effectué grâce à une salivette® (Sarstedt) (Annexe 3). Un tampon en coton est placé dans la bouche puis mâché pendant 60 secondes pour stimuler la salivation. Le tampon imbibé de salive est retiré et placé dans un tube. Une centrifugation est réalisée permettant l'obtention d'une salive claire. L'ensemble de ces échantillons est stocké dans des conditions optimales de conservations à -80°C depuis leurs recueils.

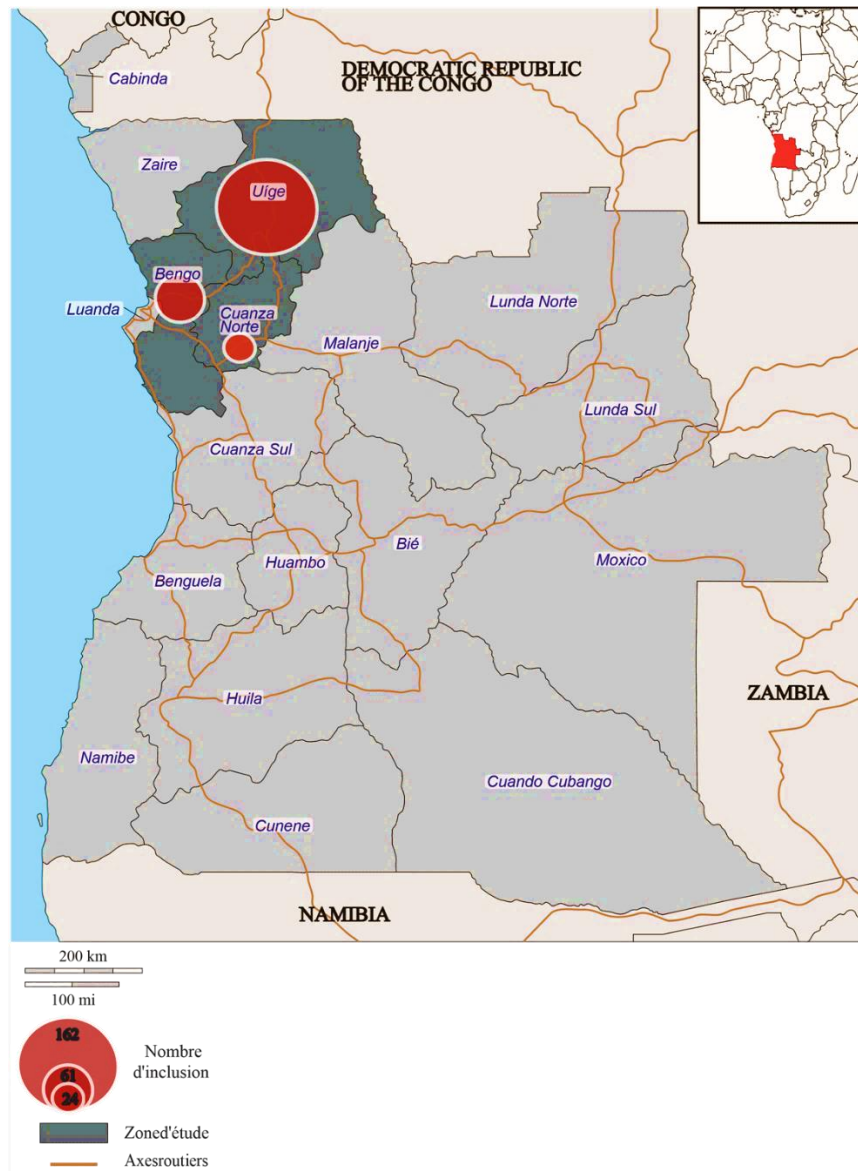


Figure 18 : Zone d'étude en Angola (J. Bonnet)

#### b. Technique de spectrométrie

Afin de caractériser des marqueurs d'intérêts putatifs dans la salive et dans les urines de la pathologie nous avons opté pour une analyse protéomique par spectrométrie de masse couplée à de la chromatographie liquide (LC-MS/MS). La séparation on-line des peptides est immédiatement suivie de leur analyse par spectrométrie de masse. Ce travail a été réalisé au sein de la plateforme Protéomique/Spectrométrie de masse de l'Institut Jacques-Monod (UMR CNRS 7592 de l'Université Paris Diderot), sous la responsabilité de Thibaut Léger (Ingénieur) et de Camille Garcia (Ingénieur). Le principe est le suivant :

La chromatographie en phase "reverse" permet une séparation des peptides en fonction de leurs propriétés d'hydrophobicité. L'ionisation des peptides au niveau de la source ESI (Electrospray ionisation) se poursuit par une analyse MS et la sélection des 20 précurseurs les plus intenses qui sont ensuite fragmentés au niveau de la HCD cell. L'analyse des précurseurs et des fragments se fait au niveau de l'orbitrap, analyseur de masse à haute résolution. Ce dernier est composé d'une électrode externe concave à l'intérieur de laquelle est placée une électrode en forme de fuseau et permet de mesurer la fréquence d'oscillation des ions. Cette dernière est directement corrélée à leur rapport charge sur masse. L'utilisation d'une transformée de fourrier (opération permettant de représenter en fréquence des signaux qui ne sont pas périodiques) permet de traiter le signal obtenu.

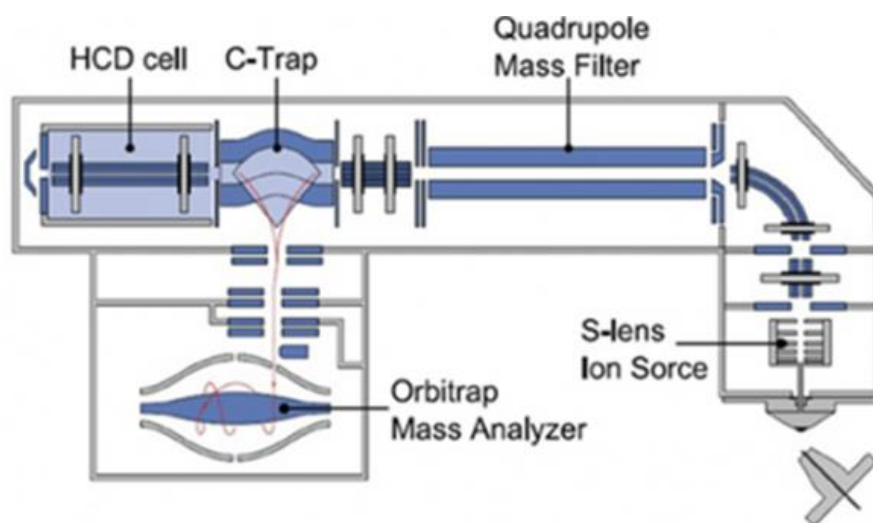


Figure 19 : Principe du spectromètre de masse Q Exactive plus® (Thermo Fisher)

### c. Préparation des échantillons

Dans un premier temps, avant la préparation des échantillons, un dosage Bradford est réalisé, celui-ci permet d'estimer les concentrations de protéines présentes dans les fluides. Le protocole initialement prévu nécessite 20 mL par échantillons, nous n'avions que 2 mL à disposition.

- ✓ Pour la salive, les protéines sont précipitées dans l'acétone. Cette précipitation permet de concentrer les protéines et d'éliminer les impuretés de la salive. Un volume d'acétone à -20°C, 5 fois supérieur à celui de l'échantillon est ajouté pendant 3h pour qu'il y ait une précipitation totale. Une centrifugation à 11 000 rpm (rotation par minute), 4°C pendant 15 min permet d'obtenir un culot. Après la centrifugation l'acétone est éliminé.

- ✓ Pour l'urine cette première étape de concentration n'est pas effectuée en raison du faible volume que nous avons à disposition.

Pour la salive et l'urine la suite du protocole est identique :

- **Concentration**

Chaque échantillon est déposé dans une colonne Ultra 15 Centrifugal Filter Unit® (Merck millipore). L'échantillon d'urine est concentré par centrifugation pendant 3h à 15°C à 4 000 rpm. Pour la salive, la concentration des protéines est réalisée grâce à l'étape de précipitation décrite précédemment.

- **Dosage des protéines (quantification avec le DC Protein Assay®)**

Cette étape de dosage de protéines utilise le même principe qu'un dosage Bradford®. Une gamme étalon est réalisée afin de servir de référence pour les échantillons testés selon la procédure indiquée par le fabricant du kit (DC Protein Assay®, laboratoire Bio-rad). La réaction se développe à l'obscurité pendant 10 min avant lecture de l'absorbance à 750 nm. L'objectif de ce dosage est de vérifier la qualité de notre étape de concentration.

- **Digestion en solution**

A la suite du dosage protéique, l'équivalent de 10 µg de protéines urinaires et salivaires concentrées sont ajoutés à de l'eau MS-Grade® (Thermo Fisher) pour avoir un volume final de 41 µL. A ce volume est ajouté 41 µL de tampon urée à 6 M (Sigma) / thiourée 2M (Fluka). Ensuite, 2,5 µL de DTT (DiThioTréitol 2M), (Biorad) sont ajoutés et une agitation est réalisée pendant 20 minutes à température ambiante. A chaque échantillon, il est ajouté 14 µL d'IAA (iodoacétamide, Biorad) puis le tout est laissé à température ambiante à l'obscurité pendant 20 min. Enfin 2,5 µL d'endopeptidase lys-C (Wako) sont ajoutés, c'est l'étape de pré-digestion qui dure 2h à 37°C. L'étape de digestion est catalysée par de la trypsine (Promega). Afin d'éviter la dégradation de la trypsine par l'urée une dilution est réalisée par l'ajout de 235 µL d'eau MS-Grade® et 5 µL de trypsine. L'étape de digestion a lieu pendant 16h à température ambiante. La digestion est arrêtée par l'ajout de 11 µL d'acide formique(Sigma) à 100%. En effet, la diminution du pH entraîne l'arrêt de l'activité de la trypsine. Le tampon carbonaté est évaporé pendant 20 min afin d'éviter toute interaction avec la colonne Zip Tip® (U-C18, Merck millipore).

- **Purification sur colonne Zip Tip C18®**

Avant de commencer la purification il est nécessaire de préparer 4 solutions pour le lavage de la colonne : une solution de 1 mL d'acétonitrile 100%, une solution de 1 mL



d'acétonitrile/acide formique 0,1% (80/20), une solution de 1 mL d'acétonitrile/acide formique 0,1% (50/50) et une solution de 1 mL d'acide formique 0,1%. La première étape est le lavage de la colonne Zip Tip C18 par 3 aspirations/refoulements avec de l'acétonitrile à 100% puis 3 aspirations/refoulements avec l'acétonitrile/acide formique à 0,1% (50/50) et enfin 5 aspirations/refoulements avec l'acide formique à 0,1% afin d'équilibrer la colonne. Une série de 25 aspirations/refoulements est effectuée pour chaque échantillon. La colonne est ensuite lavée en réalisant 5 aspirations/refoulements avec l'acide formique à 0,1% dans le but de purifier les peptides. Enfin 3,5 µL d'acétonitrile/acide formique à 0,1% (80/20) sont prélevés afin de récupérer les peptides sur la membrane filtrante puis déposés au fond d'un tube d'analyse. L'acétonitrile est évaporé puis l'échantillon est remis en suspensions dans 12 µL d'acide formique à 0,1%.

#### - Spectrométrie de masse, analyse LC-MS/MS

C'est une séparation en phase «reverse». L'analyse est ensuite assurée par un spectromètre de masse (LC-MS/MS) de type Q-exactive plus® (Thermo Fisher). L'équivalent de 2,5 µg d'échantillon est utilisé. Cinq µg maximum peuvent être injectés sur l'instrument.

Lors d'une analyse près de 66 000 spectres différents peuvent être détectés. Une interrogation de la base de données réalisée en semi-trypsine permet de détecter une éventuelle altération des échantillons par le temps ou la congélation/décongélation. Pour notre étude aucune dégradation des échantillons n'est observable.

A la fin de la procédure, les peptides sont reconstitués. Une double interrogation en base de données humaines et celle de *T. b. gambiense* est mise en œuvre. Les données recueillies sont ensuite analysées par le logiciel Proteome Discoverer® 2.1, qui permet d'obtenir des résultats qualitatifs puis le logiciel Progenesis QI® nous permet d'estimer une abondance relative de chaque protéine.

**Echantillons testés** : L'étape de screening a été réalisée pour les échantillons d'urine provenant de 10 individus de la cohorte FIND dont 3 contrôles, 3 patients en stade 1 et 4 patients en stade 2. Concernant la salive, le screening a été réalisé sur les mêmes individus mais avec uniquement 2 contrôles (l'échantillon du troisième contrôle ayant eu un mauvais étiquetage n'a pu être exploité).

#### d. Tests ELISA

Notre étude se déroule en deux étapes, la première est un screening de nos fluides biologiques sur 10 individus. La seconde étape est un dosage ELISA des protéines mises en évidence précédemment. Compte tenu de nos résultats et de l'analyse statistique, nous avons fait le choix de doser uniquement 1 protéine par fluide biologique :

- Pour l'urine : le dosage ELISA réalisé est celui de la Moésine (MSN). Cette protéine est un constituant du cytosquelette<sup>83</sup> et un biomarqueur de lésion rénale<sup>84</sup>.
- Pour la salive : le dosage ELISA réalisé est celui de l'Intelectine-2 (ITLN). Cette protéine est exprimée dans l'intestin grêle et serait un peptide avec une activité anti microbienne<sup>85</sup>.

Cette étape permet la validation des résultats de screening par dosage de la Moésine dans les urines avec le Human Moesin ELISA kit (Abxexa Ltd®) et pour la salive par le dosage de l'Intelectine-2 avec le kit Human ITLN2 ELISA kit, (Elabscience®). Ces deux kits ELISA sont de type ELISA-sandwich. Le principe général en est le suivant : un anticorps de capture capable de lier spécifiquement l'antigène recherché est fixé au support de plaque. L'échantillon à tester est ensuite déposé dans les puits et si l'antigène recherché est présent il va se lier spécifiquement à l'anticorps de capture. Un deuxième anticorps, qui est l'anticorps traceur est capable de se lier à l'antigène capturé. Les anticorps traceurs qui ne sont pas fixés sont éliminés lors du rinçage. L'anticorps traceur est couplé à une enzyme, l'avidine, entraînant la formation d'une réaction colorée. Cette réaction est quantifiée par mesure de l'absorbance (750 nm sur le lecteur Multiscan Go®) à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues.

#### e. Analyse statistique

L'analyse statistique est effectuée grâce à l'utilisation de paramètres présents dans le logiciel Progenesis QI ® comme Fold change. Il permet de montrer une différence entre les groupes (contrôles, stade 1, stade 2) lorsqu'il est supérieur à 2. Le test Anova est utilisé afin de vérifier s'il existe des variations au sein de nos groupes d'études. L'Anova est significative quand le taux pour un risque  $\alpha$  est inférieur à 0,05. Afin d'analyser les résultats de nos dosages, le test de Bartlett (test d'homogénéité des variances), le test de Shapiro (test permettant de voir si les variables suivent une loi normale) ou encore le test de Kruskal Wallis (test non paramétrique, détermine si les échantillons proviennent d'une même population ou si un

échantillon provient d'une population différente) ont été réalisés grâce au logiciel R<sup>52</sup> à l'aide des packages ROC-R et pgrimess<sup>86</sup>. Pour finaliser l'analyse de nos résultats nous avons fait une régression linéaire pour savoir si la concentration des protéines dosées est influencée par divers paramètres comme l'âge, le sexe des patients et des contrôles. Nous avons aussi déterminé un seuil pour chaque protéine analysée permettant de discriminer les stades de la maladie avec la meilleure sensibilité et spécificité grâce aux courbes ROC. Pour l'ensemble des outils statistiques utilisé, les conditions d'application des tests ont été validées.

## 2. Résultats

### a. Screening des urines

Grâce à l'analyse réalisée avec le logiciel Proteome Discoverer 2.1®, 1212 protéines ont été identifiées dans les urines des 7 patients et des 3 contrôles utilisés pour le screening. Les résultats sont exprimés en données qualitatives par ce logiciel. Ensuite grâce à l'analyse par le logiciel Progenesis QI®, nous avons mis en évidence l'abondance relative de chacune de ces protéines et finalement 8 protéines semblent présenter un intérêt (Tableau 2). Ces 8 protéines urinaires ont été étudiées en tenant compte du Fold change, de l'Anova et suivant leur présence ou non chez les contrôles, les patients stade 1 et stade 2. Le rôle biologique de chacune de ces protéines a également été pris en compte afin de sélectionner celles ayant un intérêt potentiel en lien avec une infection parasitaire ou plus largement une infection.

| Accession | Description                         | Score      | ANOVA     | Fold change | Abondances relatives normalisées |           |           |
|-----------|-------------------------------------|------------|-----------|-------------|----------------------------------|-----------|-----------|
|           |                                     |            |           |             | Contrôles                        | 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                         | 151,8<br>5 | 5,80e-003 | 371,97      | 37,12                            | 1,38e+004 | 621,63    |
| P26038    | Moésine                             | 319,4<br>3 | 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                         | 120.7<br>2 | 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 |

Tableau 2 : Protéines d'intérêt dans les urines

Deux protéines nous ont semblé intéressantes à doser dans les échantillons d'urines : la Moésine (Figure 20) et de la Kallistatine (Figure 21).

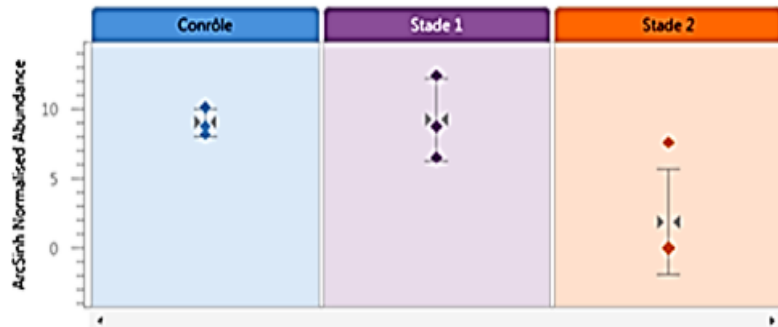


Figure 20 : Abondance relative de la Moésine en fonction des groupes contrôles, stade 1, stade 2 (Anova  $p = 9,38e-003$  ; Fold change: 47,11)



Figure 21 : Abondance relative de la Kallistatine en fonction des groupes contrôles, stade1, stade 2 (Anova  $p = 0,02$  ; Fold change : 170,86)

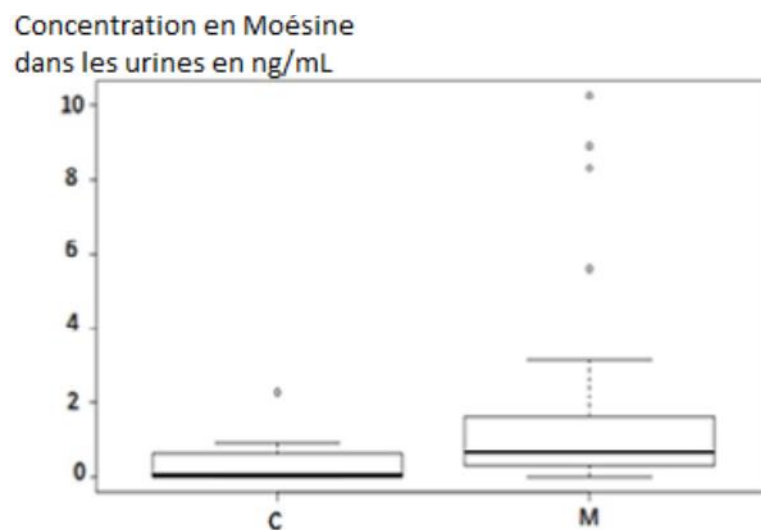
#### b. Dosage ELISA dans les urines

A la suite du travail de screening nous avons fait le choix de ne doser qu'une seule protéine pour ce travail de master. Ce dosage a été réalisé selon une méthode ELISA sur 59 patients et 13 contrôles issus de la cohorte FIND (Tableau 3)

|                          |         | Contrôles    | S1           | S2            |
|--------------------------|---------|--------------|--------------|---------------|
| N                        |         | 13           | 21           | 38            |
| Sexe ratio               |         | 0,62         | 0,91         | 0,52          |
| Age                      | Moyenne | 40,00        | 38,09        | 33,88         |
|                          | Min     | 18           | 15           | 14            |
|                          | Max     | 70           | 58           | 58            |
| Troubles neurologiques   |         | 7 oui/6 non  | 17 oui/4 non | 33 oui/5 non  |
| Troubles du sommeil      |         | 2 oui/11 non | 5 oui/16 non | 27 oui/11 non |
| Cytorachie               | Moyenne | 2,57         | 1,29         | 144,42        |
|                          | Min     | 0            | 0            | 6             |
|                          | Max     | 8            | 4            | 597           |
| Trypanosome dans le sang |         | Négatif      | Positif      | Positif       |
| Trypanosome dans le LCR  |         | Négatif      | Négatif      | Positif       |

*Tableau 3 : Données descriptives de la cohorte utilisée pour le dosage des protéines urinaires*

Nous avons comparé les individus contrôles aux malades (Figure 22). Le test de Kruskal Wallis nous permet de voir que la distribution des données en fonction des groupes est différente, la  $p$ -value obtenue est inférieure à 0,05. Cela signifie qu'il y a une différence significative entre les individus contrôles et les patients (tous stades confondus). De plus, le test post hoc de Kruskal Wallis, qui compare chaque population permet de discriminer ces groupes ( $p < 0,05$ ).



*Figure 22 : Représentation de la distribution de la concentration de Moésine entre les contrôles (n = 13) et les patients (n = 59)*

A la suite de ces résultats nous avons cherché à voir si nous pouvions discriminer les deux stades de la maladie grâce au taux de Moésine dans les différents groupes de patients (stade 1 versus stade 2) (Figure 23). Pour rappel et selon les critères de l’OMS, un patient stade 1 est un patient qui n’a pas de trypanosome dans son LCR et qui présente une cytorachie inférieure à 5 cellules/ $\mu$ L de LCR. De même, un patient en stade 2 correspond à un individu ayant une cytorachie supérieure à 5 cellules ou ayant des trypanosomes dans le LCR.

Le test de Kruskal Wallis nous permet de comparer la population des contrôles versus les populations de stades 1 et de stades 2 avec un risque d’erreur inférieur à 5%. Le résultat de ce test montre qu’il existe une différence significative entre les groupes. Pour affiner ce résultat nous utilisons le test post hoc de Kruskal Wallis qui permet de comparer les groupes deux à deux. Lorsque l’on compare les contrôles aux patients stade 1 nous n’observons pas de différence significative entre ces deux groupes. De même aucune différence significative n’est visible entre les stades 1 versus les stades 2 ( $p < 0,05$ ). Cependant, lorsque l’on compare les individus contrôles aux patients en stade 2, il existe une différence significative ( $p < 0,05$ ).

Pour enrichir notre analyse nous avons cherché à vérifier si les taux de Moésine étaient influencés par le sexe, l’âge, la présence du trypanosome, les troubles du sommeil et les troubles neurologiques. Grâce à l’analyse par régression linéaire, nous avons déterminé qu’aucun de ces paramètres n’influence la concentration de Moésine dans les différents groupes testés.

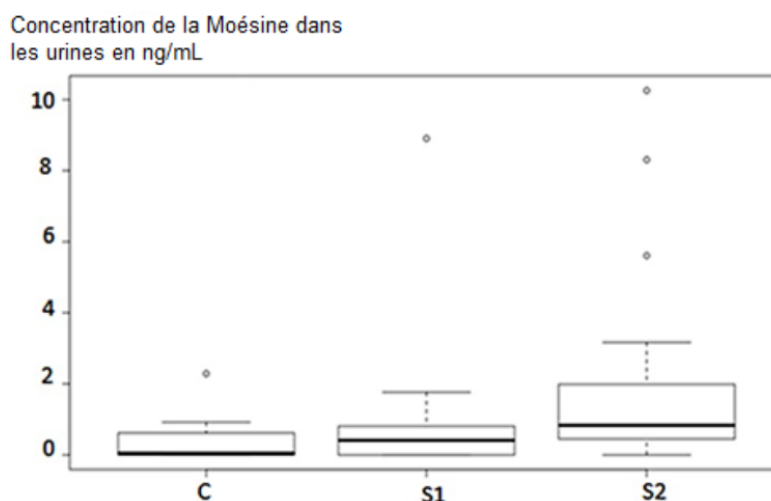
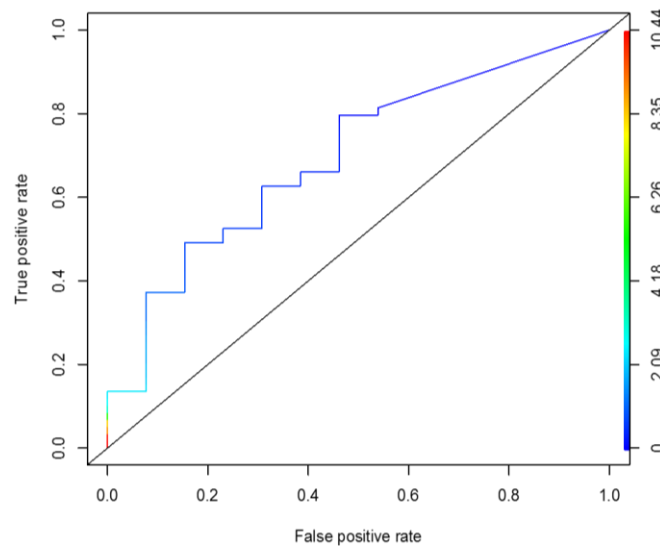


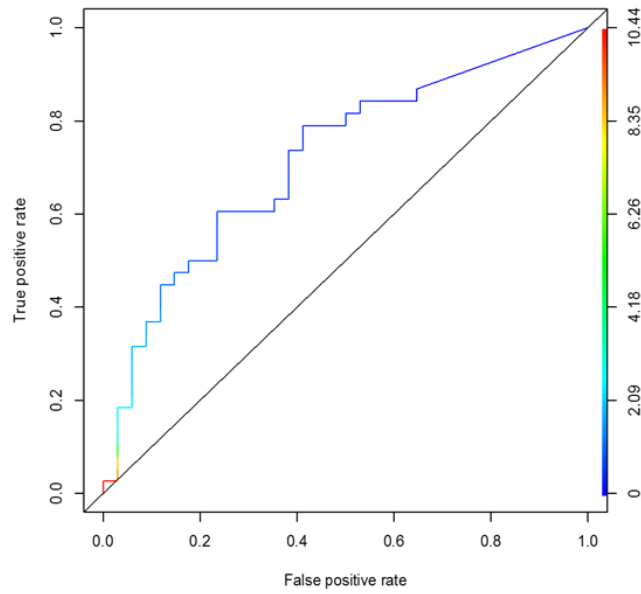
Figure 23 : Représentation de la distribution de la concentration de Moésine entre les contrôles ( $n = 13$ ) et les patients en stade 1 ( $n = 21$ ) et 2 ( $n = 38$ )

Enfin, une courbe ROC nous permet le calcul du seuil, discriminant les individus contrôles des malades. Celle-ci présente une AUC (Area Under the Curve) égale à 0,70 donc proche de 1 ce qui peut se traduire par une bonne interprétabilité de la courbe (Figure 24). Ce seuil correspond au meilleur rapport entre la sensibilité et la spécificité. Nous obtenons le meilleur ratio sensibilité (Se = 0,64) et spécificité (Sp = 0,61) pour 0,448 ng/mL. En théorie, c'est à partir de cette valeur que l'on pourrait distinguer un sujet sain d'un malade.



*Figure 24 : Courbe ROC de la concentration en Moésine dans les urines (diagnostic de la maladie)*

De la même manière, nous avons réalisé une courbe ROC afin d'établir un seuil discriminant les individus contrôles des patients en stade 2 (Figure 25). Celle-ci présente une AUC de 0,72 ce qui nous permet de l'exploiter. Un seuil à 0,60 ng/mL d'urine (Se = 0,63) (Sp = 0,65) est déterminé. Théoriquement, c'est à partir de cette valeur que l'on pourrait discriminer un individu contrôle d'un patient en stade 2.



*Figure 25 : Courbe ROC de la concentration en Moésine dans les urines (diagnostic contrôles/stade2)*

c. Screening de la salive

Au départ 1407 protéines salivaires ont été identifiées en données qualitatives par Proteome Discoverer 2.1®.



| Accession | Description                                                                       | Score   | ANOV<br>A | Fold<br>change | Abondances relatives normalisées |           |           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------|----------------|----------------------------------|-----------|-----------|
|           |                                                                                   |         |           |                | Contrôles                        | S1        | S2        |
| P19878    | Neutrophil cytosol factor 2                                                       | 26,41   | 1,21e-005 | Infinity       | 0.00                             | 1207,94   | 8375,66   |
| Q8WWU7    | Intelectine-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 |
| Q9BQI0    | 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 |

Tableau 4 : Protéines d'intérêt dans la salive

De même que pour les urines, Progenesis QI® a mis en évidence 137 protéines en abondance relative. Vingt-quatre semblent présenter un intérêt (Tableau 4), deux d'entre elles ont été sélectionnées en fonction de leur Fold change et de leur Anova : L'Intelectine-2 (Figure 26) et le Neutrophil cytosol factor 2 (Figure 27).



Figure 26 : Abondance relative de l'Intelectine-2 en fonction des groupes contrôles (n =13), stade 1 (n =22), stade 2 (n =38) (Anova p = 1, 23e-004 ; Fold change : 120,23)

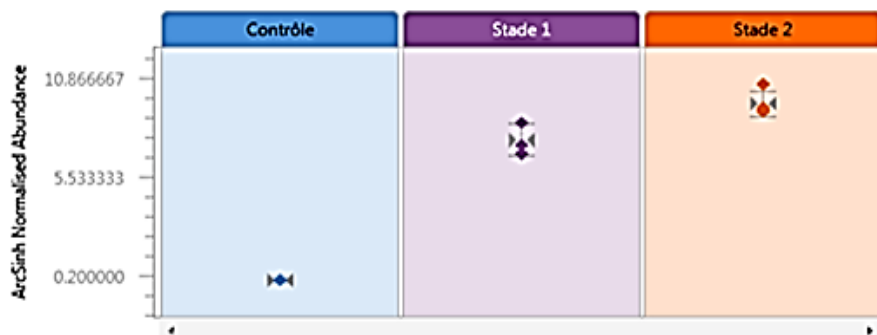


Figure 27 : Abondance relative du Neutrophil cytosol factor 2 en fonction des groupes contrôles (n = 13), stade 1 (n = 22) et stade 2 (n =38) (Anova p = 1, 21e-005 ; Fold change: infini)

#### d. Dosage ELISA dans la salive

A la suite du travail de screening nous avons fait le choix de doser l'Intelectine-2 en raison de l'intérêt biologique de cette protéine et du temps imparti à ce travail. Ce dosage a été réalisé selon une méthode ELISA à partir de 60 patients et 13 contrôles issus de la cohorte FIND (Tableau 5).

|                          | Contrôles    | S1           | S2            |
|--------------------------|--------------|--------------|---------------|
| N                        | 13           | 22           | 52            |
| Sexe ratio               | 0,44         | 1            | 0,52          |
| Moyenne                  | 41,29        | 37,50        | 33,47         |
| Min                      | 12           | 15           | 14            |
| Max                      | 68           | 58           | 58            |
| Troubles neurologiques   | 5 oui/8 non  | 17 oui/5 non | 31 oui/7 non  |
| Troubles du sommeil      | 2 oui/11 non | 6 oui/16 non | 27 oui/11 non |
| Moyenne                  | 2,71         | 1,36         | 132,16        |
| Cytorachie               | Min          | 0            | 0             |
|                          | Max          | 8            | 4             |
| Trypanosome dans le sang | Négatif      | Positif      | Positif       |
| Trypanosome dans le LCR  | Négatif      | Négatif      | Positif       |

Tableau 5 : Données descriptives de la cohorte utilisée pour le dosage des protéines salivaires

Nous avons comparé les concentrations d'Intelectine-2 des contrôles à celles des malades avec le test de Kruskal Wallis qui nous permet de comparer la distribution des données en fonction des groupes, la  $p$ -value obtenue est de 0,40. Cette valeur ne nous permet pas d'aller plus loin puisqu'elle est supérieure à 0,05, seuil de significativité que nous nous sommes fixés. Il n'y a donc aucune différence significative entre nos deux populations.

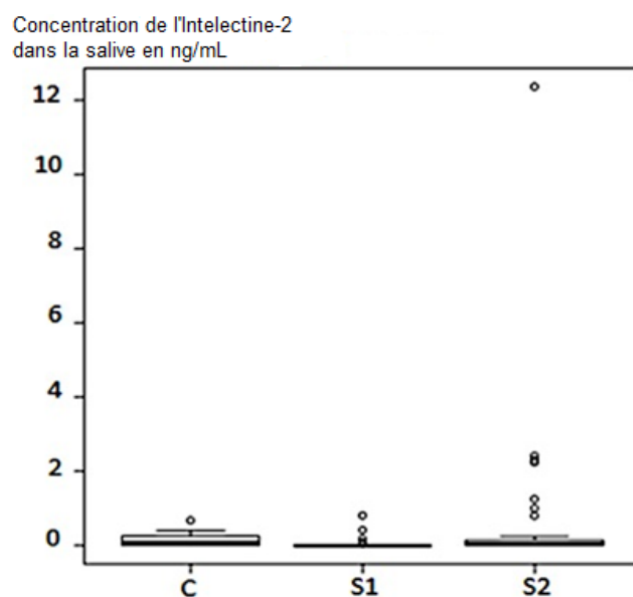


Figure 28: Représentation de la distribution de l'Intelectine-2 entre les contrôles ( $n = 13$ ), les stade 1 ( $n = 22$ ) et 2 ( $n = 38$ )

Malgré tout, nous avons comparé les concentrations chez les patients en stade 1 et les patients en stade 2 et les individus contrôles (Figure 28), selon les critères de OMS (cf paragraphe sur les résultats dans les urines). Avec le test de Kruskal Wallis on obtient une  $p$ -value de 0,06. Une différence obtenue grâce au test de Kruskal Wallis est considérée comme significative pour une  $p$ -value inférieure à 5%, toute fois considérant le faible nombre d'échantillons testé et la nature biologique de ceux-ci, une  $p$ -value à 0,06 doit être explorée. Ainsi *a priori*, la concentration de cette protéine ne nous permet pas de discriminer les groupes. Toutefois, nous avons cherché à vérifier si les taux d'Intelectine-2 étaient influencés par le sexe, l'âge, la présence du trypanosome, les troubles du sommeil et les troubles neurologiques. Une association existe entre la concentration d'Intelectine-2 et la présence de troubles neurologiques ( $p < 0,001$ ). De même un lien peut être fait entre la présence de trypanosomes dans le LCR et la concentration d'Intelectine-2 ( $p < 0,001$ ). Pour affiner l'étude en suivant la même méthodologie que pour les urines, nous avons analysé la courbe ROC de l'Intelectine-2 afin de déterminer un seuil de positivité (Figure 29).

Mais cela n'a pas été concluant et donc la concentration d'Intelectine-2 ne permet pas de distinguer des individus malades des individus sains.

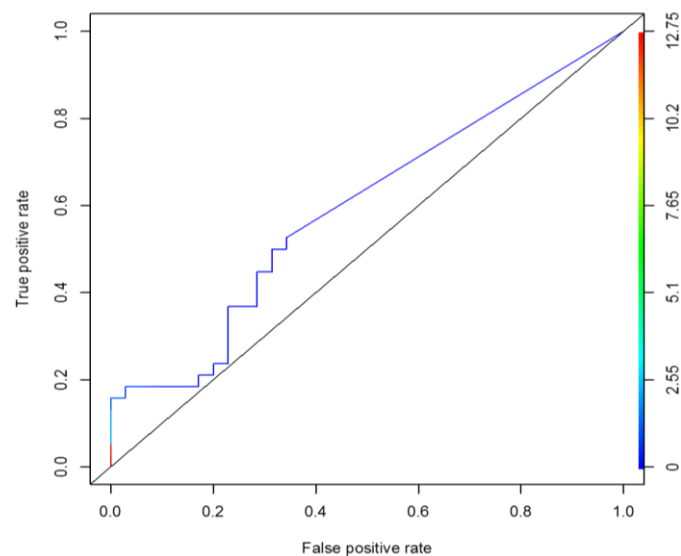


Figure 29: Courbe ROC de la concentration en Intelectine-2 dans la salive

Au cours de ce stage nous n'avons pu doser qu'une seule protéine par fluide biologique mais le travail va se poursuivre par le dosage des autres protéines mises en évidence.

## Discussion

Le but de notre travail était d'identifier des marqueurs utiles au diagnostic de la THA. L'analyse, par une technique de protéomique, a été effectuée sur deux fluides biologiques, l'urine et la salive de patients issus d'une cohorte. Ce travail préliminaire est le premier à notre connaissance sur ces fluides pour des patients atteints de THA.

Pour l'urine nous avons mis en évidence 8 protéines dont les rôles sont variables et pas toujours clairement décrits dans la littérature. Celle potentiellement la plus intéressante était la **Kallistatine** (SERPINA4). Cette protéine est décrite comme un inhibiteur de la serine-protéase exprimée par le foie et sécrétée dans le plasma. C'est également un inhibiteur de l'angiogenèse et de la croissance tumorale d'où son implication dans plusieurs pathologies (fibrose pulmonaire)<sup>87</sup>. Elle est également utilisée depuis peu comme biomarqueur fiable pour le diagnostic de la cirrhose hépatique<sup>88</sup>. La **N-sulphoglucosamine sulphohydrolase** (SGSH) catalyse une étape de la dégradation lysosomale du sulfate d'héparane. Elle est impliquée dans les processus métaboliques<sup>89</sup>. La **Carboxypeptidase E** (CPE) a une activité catalytique et participe au transport des vésicules et à la régulation de voies de signalisation. Elle est impliquée dans la production d'insuline et d'hormones sexuelles<sup>90</sup>. Et enfin, la **Cathepsine S** (CTSS) qui est une protéase clé dans la réponse immune adaptative, permet également l'élimination de la chaîne invariante des molécules du CMH de classe II. Les Cathepsines L et T sont plus étudiées cependant la Cathepsine S peut être utilisée comme marqueur de l'évolution de certains cancers<sup>91</sup>. Pour la **Multimérine-2** et la **Transthyréline** les rôles physiologiques ne sont pas ou peu documentés et donc nous avons pris le parti de ne pas nous focaliser dessus, de plus l'analyse statistique montre qu'elles ont un pouvoir discriminant entre les stades le moins pertinent par rapport aux autres protéines identifiées.

Les critères que nous avons établis étaient de trouver une protéine en lien avec une pathologie infectieuse et ayant un fort pouvoir discriminant entre le stade 1 et le stade 2 de la THA. Il ressort qu'en fonction de notre screening une seule protéine présentait un fort intérêt : la Moésine. Cette protéine appartient à la famille des protéines ezrine-radixine-moésine (ERM) et est impliquée dans l'angiogenèse. La phosphorylation de la Moésine permet la médiation de l'angiogenèse endothéliale<sup>92</sup>. Cette protéine participe également à la connexion entre le cytosquelette et la membrane plasmique des cellules humaines. Grâce à cette propriété elle limiterait l'infection par virus de l'herpès simplex de type 1<sup>83</sup>. Son action sur le cytosquelette a permis de montrer qu'elle interviendrait aussi dans l'invasion cellulaire des amastigotes de

*Trypanosoma cruzi* dans des cellules humaines<sup>93</sup>. La Moésine jouerait également un rôle dans la régulation, la prolifération et l'adhésion des cellules lymphoïdes humaines. Une mutation de la protéine entraînerait une immunodéficiência primaire<sup>94</sup>. L'implication dans les lésions rénales de la Moésine est constatée dans de nombreuses publications cependant son rôle n'est pas complètement établi<sup>84</sup>. Le complexe ezrine-radixine-moésine intervient dans la dynamique cellulaire en participant notamment à la mobilité des cellules cancéreuses décrite lors de cancers oraux et de carcinomes<sup>95,96</sup>. Bien que cette protéine ait de multiples rôles au sein de l'organisme, nous n'avons pas trouvé d'articles détaillant par quel mécanisme elle se retrouve dans les urines ni pourquoi son expression urinaire est modifiée.

L'analyse statistique du dosage de la Moésine chez les patients atteints de THA, montre qu'il existe une différence significative entre les contrôles et les malades. La concentration en Moésine des urines pourrait permettre de discriminer un individu sain d'un individu malade. De même, une différence de concentration de cette protéine est observée entre les individus contrôles et les patients en stade 2 ce qui pourrait permettre une discrimination. Cependant, les résultats du screening montrent une diminution de la concentration en Moésine chez les patients en stade 2 de la maladie ce qui contraste avec le dosage ELISA où l'on note au contraire une augmentation de la concentration au cours de l'évolution de la maladie. Ce résultat peut être expliqué par la différence de technique utilisée. En effet, d'une part un screening avec mise en évidence d'une abondance relative est effectué et d'autre part c'est un dosage quantitatif ELISA qui est réalisé. De plus le faible nombre de nos échantillons peut expliquer certains résultats. Le dosage ELISA effectué sur 72 individus rendent le résultat plus fiable par rapport aux 10 individus testés lors du screening.

Malgré des résultats encourageants, notre analyse sur les urines présente quelques biais notamment en ce qui concerne les prélèvements. En effet, l'heure de ceux-ci n'est pas très précise (entre 7h et 13h) ce qui peut entraîner une variation de la composition et de la concentration des urines. De plus ce fluide est influencé par le mode de vie, par les pathologies et les traitements médicamenteux des sujets. Le sexe et l'ethnie ont également un impact sur sa composition<sup>97</sup>. Pour tous ces critères nous n'avons que très peu d'informations, ils sont impossibles à corrélés à nos résultats.

Pour l'analyse de la salive, 24 protéines semblent intéressantes sur les 1407 identifiées. Parmi celles-ci, le **Neutrophil cytosol factor 2** (NCF2) entre en jeu dans la voie de l'activation

de la NADPH oxydase. Il participe à la réponse immune innée, une mutation entre autres de cette protéine rend les neutrophiles et les phagocytes incapables d'éliminer les microorganismes pathogènes<sup>98</sup>. Cette protéine n'a pas été sélectionnée pour le dosage car elle n'est pas spécifique à une infection. Le **Cathelicidin antimicrobial** (CAMP) est une protéine ayant la capacité de se lier aux lipopolysaccharides bactériens ce qui lui procure une activité antibactérienne. Cette protéine est présente de manière physiologique dans la moelle osseuse, les épithéliums et le système salivaire. On note son implication dans la réponse immunitaire humorale bactérienne et fongique ainsi que dans la réponse inflammatoire chronique<sup>99</sup>. Le groupe des Cathélicidines entraînent une perturbation de l'intégrité de la membrane plasmique de *T. brucei* le rendant vulnérable. Chez des souris, l'administration de peptides de ce groupe entraîne la diminution de la parasitémie et une survie prolongée de celle-ci<sup>100</sup>. Malheureusement, l'abondance relative de cette protéine ne permet pas de différencier clairement les deux stades de la THA. La **Mucine-5B** (MUC5B) forme un gel contribuant à la lubrification et à la viscosité de salive et du mucus cervical. Il est donc normal de la retrouver dans notre étude. Cette protéine participe au système de défense bactérien et à la régulation de l'activation des macrophages<sup>101</sup>. De par son rôle dans la salive elle ne présente pas une spécificité suffisante pour être mise en lien avec la THA.

Au terme de l'étude bibliographique, nous nous sommes focalisés sur le dosage de l'**Intelectine-2**. Cependant après l'analyse des résultats du dosage ELISA, cette protéine ne nous permet pas de discriminer des individus sains des individus malades. Bien qu'il n'existe aucune différence de concentration significative entre nos trois groupes, une corrélation est mise en évidence entre la concentration d'Intelectine-2 et la présence de troubles neurologiques. De même un lien peut être établi entre la présence de trypanosomes dans le LCR et la concentration d'Intelectine-2. Pour l'instant ces interactions avec l'Intelectine-2 restent inexplicables sur le plan physiopathologique. L'Intelectine-2 est une protéine exprimée uniquement au niveau de l'intestin grêle. Elle est impliquée dans le système de défense contre les pathogènes et la sécrétion de mucus<sup>85</sup>. Le groupe des Intelectines est impliqué dans les relations hôte-pathogène et les pathologies métaboliques<sup>102</sup>. Des études sont en cours afin d'approfondir son rôle en tant que peptide antimicrobien et antiparasitaire<sup>103</sup>. Cependant la présence de l'Intelectine-2 ainsi que son rôle dans la salive restent encore inexplicables.

Il est important d'avoir à l'esprit que la composition salivaire peut varier d'un individu à l'autre mais également chez un même individu en fonction de nombreux paramètres. Ainsi le

flux salivaire, le sexe, l'âge, l'état émotionnel du sujet, la saison, le rythme nyctéméral et la prise de médicaments sont des facteurs pouvant influencer la composition de l'urine. De même des éléments extérieurs au système salivaire peuvent modifier sa composition : les sécrétions nasales et bronchiques, le fluide gingival, les cellules épithéliales, la flore microbienne et les débris alimentaires<sup>104</sup>. Le laboratoire Sardstedt préconise de réaliser le prélèvement avant le brossage des dents et au moins 30 min après toute ingestion d'aliments. Dans notre étude ces variations n'ont pu être prises en compte et peuvent constituer un biais.

Plus globalement, ce travail présente quelques limites. Concernant le recueil de nos échantillons peu d'informations nous ont été transmises et un certain nombre de paramètres peuvent influencer la composition de l'urine et de la salive. Il en est de même pour les individus inclus dans la cohorte (247 individus) pour lesquels nous disposons de peu de renseignements sur leur état de santé. Les patients atteints du paludisme, du VIH, de la syphilis et des filaires ont été exclus cependant aucune information concernant d'autre type de pathologie nous est parvenu. En effet, certaines pathologies rénales, cardiovasculaires pourraient impacter sur la composition des fluides<sup>105</sup>.

Il est indispensable de rappeler qu'actuellement de nouveaux traitements sont en cours d'étude. Sanofi en partenariat avec le DNDi a développé le fexinidazole qui pourrait être une solution médicale permettant de simplifier le traitement. Il éviterait ainsi une hospitalisation systématique et supprimerait le besoin de procéder à une ponction lombaire<sup>106</sup>. En effet ce médicament serait administré par voie orale et agirait sur les deux stades de la maladie engendrée par *T. b. gambiense*. La finalité de ce médicament est d'être utilisable sur un grand nombre de patients et même sur les enfants dès 6 ans. La durée de traitement prévue sera de 10 jours ce qui est plus acceptable par rapport aux traitements actuels<sup>107</sup>. Il est actuellement en phase III des essais cliniques ce qui laisse imaginer une suite prometteuse<sup>107</sup>.

Une autre molécule est aussi en cours d'étude depuis plusieurs années, il s'agit de l'oxaborole SCYX-7158<sup>108</sup>. Cette molécule vient de conclure avec succès les essais cliniques de phase I qui sont menés chez des volontaires sains ayant reçu une dose unique de trois comprimés de 320 mg<sup>107</sup>. Il s'agit également d'un traitement *per os* dont les modalités de prises sont assez faciles. Cette molécule est développée entre autres par les laboratoires Anacor et SCYNEXIS. Cependant cette molécule doit encore subir de nombreuses investigations avant



de se trouver sur le marché<sup>109</sup>. Des essais cliniques de phase II/III ont débuté fin 2016 en République Démocratique du Congo<sup>110</sup>.

Bien qu'un traitement actif sur les deux stades soit sur le point d'être commercialisé, la recherche de marqueurs biologiques de la maladie reste nécessaire. En effet, ces marqueurs pourraient permettre le suivi de la maladie. Après le traitement le patient est suivi à 6, 12, 18 et 24 mois afin de diagnostiquer une éventuelle rechute. Actuellement, la réalisation d'une ponction lombaire est nécessaire. L'utilisation de biomarqueur de suivi éviterait le recours à cette technique invasive, d'où l'intérêt de multiplier les études sur les marqueurs de cette maladie.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

La prise en charge de la maladie du sommeil est impactée par un diagnostic complexe réalisé loin de toutes structures sanitaires et éloignées de tous laboratoires modernes. Le développement d'outils diagnostiques utilisables sur le terrain est donc un enjeu crucial dans le cadre de la lutte contre cette parasitose. Le screening des fluides biologiques d'un grand nombre de malades pourrait permettre de mettre en avant de nouveaux biomarqueurs permettant le diagnostic mais aussi le suivi des patients. La recherche de ces biomarqueurs doit tenir compte des contraintes du terrain et pour cela doit être simplifiée au maximum.

Des fluides comme la salive et les urines permettent une facilité de manipulation comparativement à une ponction lombaire. Mais il reste encore à trouver le bon biomarqueur ou la combinaison de biomarqueurs permettant la discrimination entre les stades.

Notre travail a permis d'identifier un certain nombre de protéines qui devront toutes être dosées afin d'identifier le meilleur candidat. En l'état actuel il s'agit du premier screening réalisé sur une cohorte de patients et de contrôles à la fois sur la salive et les urines.

Les perspectives pour ce travail seront de développer des tests rapides de type cassette ou bandelette sur ces fluides.

## Bibliographie

1. Médecins Sans Frontières. *République centrafricaine : une crise silencieuse*. (2011).
2. Simarro, P. P. *et al.* Mapping the capacities of fixed health facilities to cover people at risk of gambiense human African trypanosomiasis. *Int. J. Health Geogr.* **13**, 4 (2014).
3. OMS | Trypanosomiase humaine africaine (maladie du sommeil).  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/fr/>. (consulté le 2 mai 2017)
4. WHO | The history of sleeping sickness. *WHO*  
[http://www.who.int/trypanosomiasis\\_african/country/history/en/](http://www.who.int/trypanosomiasis_african/country/history/en/). (consulté le: 22 mai 2017)
5. Steverding, D. The history of African trypanosomiasis. *Parasit. Vectors* **1**, 3 (2008).
6. ASNOM - Association Amicale Santé Navale et d'Outre Mer. Available at:  
[https://www.asnom.org/oh/fr/0541\\_trypanosomiase](https://www.asnom.org/oh/fr/0541_trypanosomiase) (consulté le 6 juin 2017)
7. Picado, A. & Ndung'u, J. Elimination of sleeping sickness in Uganda could be jeopardised by conflict in South Sudan. *Lancet Glob. Health* **5**, e28–e29 (2017).
8. Chappuis, F., Loutan, L., Simarro, P., Lejon, V. & Büscher, P. Options for Field Diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 133–146 (2005).
9. Lukeš, J., Skalický, T., Týč, J., Votýpka, J. & Yurchenko, V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Mol. Biochem. Parasitol.* **195**, 115–122 (2014).
10. Teixeira, A. R. L., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O. & Nitz, N. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 592–630 (2011).
11. Balmer, O., Beadell, J. S., Gibson, W. & Caccone, A. Phylogeography and Taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, (2011).
12. del Pilar Molina-Portela, M., Lugli, E. B., Recio-Pinto, E. & Raper, J. Trypanosome lytic factor, a subclass of high-density lipoprotein, forms cation-selective pores in membranes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **144**, 218–226 (2005).
13. Rapport OMS 2016. (consulté le 18 juin 2017)
14. Simarro, P. P., Jannin, J. & Cattand, P. Eliminating Human African Trypanosomiasis: Where Do We Stand and What Comes Next?. *PLoS Med.* **5**, (2008).
15. Simarro, P. P. *et al.* The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *Int. J. Health Geogr.* **9**, 57 (2010).
16. Laveissière, C. & Penchenier, L. Manuel de lutte contre la maladie du sommeil. (2005).

17. Barry, J. D. The relative significance of mechanisms of antigenic variation in African trypanosomes. *Parasitol. Today Pers. Ed* **13**, 212–218 (1997).
18. De la Rocque, S. & Cuisance, D. La Tsé-tsé / Insectes n° 136 - i136la\_roque-cuisance.pdf. A [https://www7.inra.fr/opie-insectes/pdf/i136la\\_roque-cuisance](https://www7.inra.fr/opie-insectes/pdf/i136la_roque-cuisance). (consulté le 23 février 2017)
19. Nekpeni, E. ., Eouzan, J. . & Dagnno. Infection de *Glossina palpalis palpalis* (Diptera, Glossinidae) par les trypanosomes en zone forestière de Gagnoa en Côte d’Ivoire - 35458.pdf. *Tropical Medecine and parasitology* **42**, 319–468 (1992).
20. Ecologie et comportement des tsé-tsé.  
<http://www.fao.org/docrep/009/p5444f/P5444F01.htm>. (consulté le 24 février 2017)
21. Bonnet, J., Boudot, C. & Courtioux, B. Overview of the Diagnostic Methods Used in the Field for Human African Trypanosomiasis: What Could Change in the Next Years? *BioMed Res. Int.* **2015**, (2015).
22. Franco, J. R., Simarro, P. P., Diarra, A. & Jannin, J. G. Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clin. Epidemiol.* **6**, 257–275 (2014).
23. Oberle, M., Balmer, O., Brun, R. & Roditi, I. Bottlenecks and the Maintenance of Minor Genotypes during the Life Cycle of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.* **6**, (2010).
24. Malvy, D. & Chappuis, F. Sleeping sickness. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 986–995 (2011).
25. Bédard-Millet, A. L., Charpentier, S., Monge-Strauss, M. F. & Woimant, F. [Psychiatric presentation of human African trypanosomiasis: overview of diagnostic pitfalls, interest of difluoromethylornithine treatment and contribution of magnetic resonance imaging]. *Rev. Neurol. (Paris)* **156**, 505–509 (2000).
26. Kennedy, P. G. E. Human African trypanosomiasis-neurological aspects. *J. Neurol.* **253**, 411–416 (2006).
27. Ponte-Sucre, A. An Overview of *Trypanosoma brucei* Infections: An Intense Host–Parasite Interaction. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
28. Mwangi, D. M., Hopkins, J. & Luckins, A. G. *Trypanosoma congolense* infection in sheep: cellular phenotypes in lymph and lymph nodes associated with skin reactions. *J. Comp. Pathol.* **114**, 51–61 (1996).
29. Hutchings, N. R., Donelson, J. E. & Hill, K. L. Trypanin is a cytoskeletal linker protein and is required for cell motility in African trypanosomes. *J. Cell Biol.* **156**, 867–877 (2002).

30. Olsson, T. *et al.* Bidirectional activating signals between *Trypanosoma brucei* and CD8+ T cells: a trypanosome-released factor triggers interferon-gamma production that stimulates parasite growth. *Eur. J. Immunol.* **21**, 2447–2454 (1991).
31. Buguet, A., Cespuglio, R. & Bouteille, B. Chapitre 33 - Trypanosomose humaine africaine. in *Les troubles du sommeil (2e édition entièrement revue et actualisée)* (eds. Billiard, M. & Dauvilliers, Y.) 399–406 (Elsevier Masson, 2012). doi:10.1016/B978-2-294-71025-4.00033-6
32. Okomo-Assoumou, M. C., Daulouede, S., Lemesre, J. L., N’Zila-Mouanda, A. & Vincendeau, P. Correlation of high serum levels of tumor necrosis factor-alpha with disease severity in human African trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**, 539–543 (1995).
33. Kennedy, P. G. E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *J. Clin. Invest.* **113**, 496–504 (2004).
34. Webb, A. A. & Muir, G. D. The blood-brain barrier and its role in inflammation. *J. Vet. Intern. Med.* **14**, 399–411 (2000).
35. Philip, K. A., Dascombe, M. J., Fraser, P. A. & Pentreath, V. W. Blood-brain barrier damage in experimental African trypanosomiasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **88**, 607–616 (1994).
36. Lonsdale-Eccles, J. D. & Grab, D. J. Trypanosome hydrolases and the blood-brain barrier. *Trends Parasitol.* **18**, 17–19 (2002).
37. Vincendeau, P., Okomo-Assoumou, M. C., Semballa, S., Fouquet, C. & Daulouede, S. [Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis]. *Med. Trop. Rev. Corps Sante Colon.* **56**, 73–78 (1996).
38. Ginoux, P. & Frézil, J. Recherches sur la latence clinique et la trypanotolérance humaine dans le foyer du couloir du fleuve Congo - 00507.pdf. **XIX**, 33–40 (1981).
39. Hill, E. W. *et al.* Understanding bovine trypanosomiasis and trypanotolerance: the promise of functional genomics. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **105**, 247–258 (2005).
40. Harding, R. D. & Hutchinson, M. P. Sleeping sickness of an unusual type in Sierra Leone and its attempted control. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **41**, 481–512 (1948).
41. Jamonneau, V. *et al.* Untreated Human Infections by *Trypanosoma brucei gambiense* Are Not 100% Fatal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).
42. Bouteille, B., Oukem, O., Bisser, S. & Dumas, M. Treatment perspectives for human African trypanosomiasis. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **17**, 171–181 (2003).

43. Talabani, H. & Ancelle, T. Le diagnostic de la trypanosomose humaine africaine. *Rev. Francoph. Lab.* (2011).
44. Chappuis, F. *et al.* 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**, 313–317 (2004).
45. Maladie du Sommeil / Dépistage. <http://www.sleeping-sickness.ird.fr/palpation.htm>. (consulté le 6 juin 2017)
46. Woo, P. T. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop.* **27**, 384–386 (1970).
47. Tube de prélèvement de sang capillaire / conique / en polypropylène / avec activateur de coagulation - Microvette® CB 300 Z - Sarstedt. <http://www.medicalexpo.fr/prod/sarstedt/product-69921-644753> (consulté le 6 juin 2017)
48. Lanham, S. M. & Godfrey, D. G. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* **28**, 521–534 (1970).
49. Lumsden, W. H., Kimber, C. D., Evans, D. A. & Doig, S. J. *Trypanosoma brucei*: Miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: Adaptation for field use. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **73**, 312–317 (1979).
50. Büscher, P. *et al.* 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**, (2009).
51. FIND. New diagnostic solution for human african trypanosomiasis. (2016).
52. Büscher, P., Gilman, Q. & Lejon, V. Rapid diagnostic test for sleeping sickness. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1069–1070 (2013).
53. Sullivan, L., Wall, S. J., Carrington, M. & Ferguson, M. A. J. Proteomic Selection of Immunodiagnostic Antigens for Human African Trypanosomiasis and Generation of a Prototype Lateral Flow Immunodiagnostic Device. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, (2013).
54. Human African Trypanosomiasis: rapid diagnostic test for in vitro detection of *T.b. gambiense* in blo. <http://www.corisbio.com/Products/Human-Field/Human-African-Trypanosomiasis>. (consulté le 6 juin 2017)
55. Lejon, V. *et al.* A semi-quantitative ELISA for detection of *Trypanosoma brucei gambiense* specific antibodies in serum and cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients. *Acta Trop.* **69**, 151–164 (1998).

56. Jamonneau, V. *et al.* Revisiting the Immune Trypanolysis Test to Optimise Epidemiological Surveillance and Control of Sleeping Sickness in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, (2010).
57. ANOFEL. *parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales.* (Elsevier Masson).
58. Louis, F., Buscher, P. & Lejon, V. Le diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine en 2001. *Med Trop* **7** (2001).
59. 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.* **86**, 630 (1992).
60. Biéler, S. *et al.* Improved detection of *Trypanosoma brucei* by lysis of red blood cells, concentration and LED fluorescence microscopy. *Acta Trop.* **121**, 135–140 (2012).
61. Moser, D. R. *et al.* Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology* **99 Pt 1**, 57–66 (1989).
62. Becker, S. *et al.* Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **50**, 193–199 (2004).
63. Notomi, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, e63 (2000).
64. Njiru, Z. K. *et al.* Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Rapid Detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**, (2008).
65. Mugasa, C. M. *et al.* Nucleic Acid Sequence-Based Amplification with Oligochromatography for Detection of *Trypanosoma brucei* in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 630–635 (2009).
66. Lejon, V. & Büscher, P. [Diagnosis of sleeping sickness stage: towards a new approach]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. 1990* **95**, 338–340 (2002).
67. Tiberti, N. *et al.* 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 (2013).
68. Tiberti, N. *et al.* Cerebrospinal fluid neopterin as marker of the meningo-encephalitic stage of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *PloS One* **7**, e40909 (2012).
69. Miezan, T. W., Meda, H. A., Doua, F., Yapo, F. B. & Baltz, T. Assessment of central nervous system involvement in gambiense trypanosomiasis: value of the cerebro-spinal white cell count. *Trop. Med. Int. Health TM IH* **3**, 571–575 (1998).

70. Bisser, S. *et al.* Equivalence trial of melarsoprol and nifurtimox monotherapy and combination therapy for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *J. Infect. Dis.* **195**, 322–329 (2007).
71. Torreele, E. *et al.* Fexinidazole – A New Oral Nitroimidazole Drug Candidate Entering Clinical Development for the Treatment of Sleeping Sickness. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, (2010).
72. Field, M. C. *et al.* Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 217–231 (2017).
73. université médicale virtuelle francophone. cours urologie, néphrologie. <http://campus.cerimes.fr/semiologie/enseignement/esemio10/site/html/1.html>. (consulté le 11 avril 2017)
74. Gueutin, V., Deray, G. & Isnard-Bagnis, C. Physiologie rénale. *Bull. Cancer (Paris)* **99**, 237–249 (2012).
75. Raidelet, L. & Bricon, T. L. Exploration de la protéinurie au laboratoire. *Rev. Francoph. Lab.* **2013**, 75–82 (2013).
76. Durand, X., Xylinas, E., Ploussard, G. & De la Taille, A. Biomarqueurs urinaires du cancer de prostate. *Prog. En Urol.* **20**, 1184–1191 (2010).
77. Ceccato, F. *et al.* Screening Tests for Cushing’s Syndrome: Urinary Free Cortisol Role Measured by LC-MS/MS. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 3856–3861 (2015).
78. Bourée, P. & Kanner, A. Diagnostic des parasitoses urinaires. *Rev. Francoph. Lab.* **2006**, 69–78 (2006).
79. Lac, G. Intérêt et champs d’application des dosages salivaires. *Sci. Sports* **13**, 55–63 (1998).
80. Holmberg, K. V. & Hoffman, M. P. Anatomy, biogenesis, and regeneration of salivary glands. *Monogr. Oral Sci.* **24**, 1–13 (2014).
81. Pedersen, A. M., Bardow, A., Jensen, S. B. & Nauntofte, B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis.* **8**, 117–129 (2002).
82. Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R. & De Palo, E. F. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **383**, 30–40 (2007).
83. Henning, M. S. *et al.* PDZD8 is a novel moesin-interacting cytoskeletal regulatory protein that suppresses infection by herpes simplex virus type 1. *Virology* **415**, 114–121 (2011).
84. Chen, Y.-X. *et al.* Role of moesin in renal fibrosis. *PLoS One* **9**, e112936 (2014).



85. Lee, J. K. *et al.* Human homologs of the *Xenopus* oocyte cortical granule lectin XL35. *Glycobiology* **11**, 65–73 (2001).
86. Sing, T., Sander, O., Beerenwinkel, N. & Lengauer, T. ROCR: visualizing classifier performance in R. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **21**, 3940–3941 (2005).
87. Huang, X. *et al.* Kallistatin protects against bleomycin-induced idiopathic pulmonary fibrosis by inhibiting angiogenesis and inflammation. *Am. J. Transl. Res.* **9**, 999–1011 (2017).
88. Cheng, Z. *et al.* Kallistatin, a new and reliable biomarker for the diagnosis of liver cirrhosis. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 194–200 (2015).
89. Meyer, A. *et al.* The mutation p.Ser298Pro in the sulphamidase gene (SGSH) is associated with a slowly progressive clinical phenotype in mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo A syndrome). *Hum. Mutat.* **29**, 770 (2008).
90. Ji, L., Wu, H.-T., Qin, X.-Y. & Lan, R. Dissecting carboxypeptidase E: properties, functions and pathophysiological roles in disease. *Endocr. Connect.* **6**, R18–R38 (2017).
91. Gormley, J. A. *et al.* The role of Cathepsin S as a marker of prognosis and predictor of chemotherapy benefit in adjuvant CRC: a pilot study. *Br. J. Cancer* **105**, 1487–1494 (2011).
92. Wang, Q. *et al.* Role of Moesin in Advanced Glycation End Products-Induced Angiogenesis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
93. Ferreira, É. R. de A. The role of Ezrin, radixin and moesin (ERM proteins) in cell invasion by extracellular amastigotes of *Trypanosoma Cruzi*. (2013).
94. Lagresle-Peyrou, C. *et al.* X-linked primary immunodeficiency associated with hemizygous mutations in the moesin (MSN) gene. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 1681–1689.e8 (2016).
95. Kinoshita, T. *et al.* Tumor suppressive microRNA-133a regulates novel targets: Moesin contributes to cancer cell proliferation and invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **418**, 378–383 (2012).
96. Li, Y., Zhou, C.-X. & Gao, Y. Moesin regulates the motility of oral cancer cells via MT1-MMP and E-cadherin/p120-catenin adhesion complex. *Oral Oncol.* **51**, 935–943 (2015).
97. Perucca, J., Bouby, N., Valeix, P., Jungers, P. & Bankir, L. Différence de concentration urinaire selon le sexe ou l'origine ethnique : implications possibles dans la susceptibilité variable à différentes pathologies rénales et cardiovasculaires. *Néphrologie Thérapeutique* **4**, 160–172 (2008).

98. Köker, M. Y. *et al.* Clinical, functional, and genetic characterization of chronic granulomatous disease in 89 Turkish patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 1156–1163.e5 (2013).
99. Wang, G. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J. Biol. Chem.* **283**, 32637–32643 (2008).
100. McGwire, B. S., Olson, C. L., Tack, B. F. & Engman, D. M. Killing of African trypanosomes by antimicrobial peptides. *J. Infect. Dis.* **188**, 146–152 (2003).
101. Chen, Y., Zhao, Y. H., Di, Y. P. & Wu, R. Characterization of human mucin 5B gene expression in airway epithelium and the genomic clone of the amino-terminal and 5'-flanking region. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**, 542–553 (2001).
102. Yan, J. *et al.* Comparative genomic and phylogenetic analyses of the intelectin gene family: implications for their origin and evolution. *Dev. Comp. Immunol.* **41**, 189–199 (2013).
103. Pemberton, A. D. *et al.* 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.* **173**, 1894–1901 (2004).
104. ROSSIER, M. F. hormones salivaires. [https://www.ar-l.ch/Docs/hormones\\_salivaires](https://www.ar-l.ch/Docs/hormones_salivaires) (consulté le 17 mai 2017)
105. Fesler, P. & Ribstein, J. Altération modérée de la fonction rénale et risque cardiovasculaire. *Rev. Médecine Interne* **30**, 585–591 (2009).
106. L'engagement de Sanofi contre la maladie du sommeil. *Le Hub* (2017).
107. Fexinidazole (HAT) – DNDi. <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/fexinidazole/>. (consulté le 8 juin 2017)
108. Mäser, P. *et al.* Antiparasitic agents: new drugs on the horizon. *Curr. Opin. Pharmacol.* **12**, 562–566 (2012).
109. Eperon, G. *et al.* Treatment options for second-stage gambiense human African trypanosomiasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **12**, 1407–1417 (2014).
110. SCYX-7158 Oxaborole – DNDi : <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/scyx-7158/>. (consulté le 8 juin 2017)
111. Lanham S, Godfrey DG. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAEcellulose. *Exp Parasitol* 1970 ; 28 : 521-534

112. - Lumsden WH, Kimber DD, Dukes P, Haller L, Stangellini A, Duvallet G. Field diagnosis of sleeping sickness in the Ivory Coast. I. Comparison of the miniature anion exchanger/centrifugation technique with other protozoological methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981;75: 242-249

## Webographie :

- Vague d'épidémie : <https://www.asnom.org> (consulté le 6 juin 2017)
- Composition salivaire : <http://microbiologiemedicale.fr/physiopathologie-et-diagnostic-des-infections/plan-urine/anatomie-appareil-urinaire> (consulté le 12 avril 2017)
- Photo glossine : [www.raywilsonbirdphotography.co](http://www.raywilsonbirdphotography.co), (consulté le 16 février 2017)
- Photo du trypanosome : <http://www.sleeping-sickness.ird.fr/parasite2.htm> (consulté le 2 mai 2017).
- Schéma du principe de masse Spectrométrie : <https://www.smbp.espci.fr/Qexactive.html> (consulté le 17 mars 2017).
- Schéma de l'appareil urinaire : <http://campus.cerimes.fr/semiologie/enseignement/esemio10/site/html/1.html> (consulté le 11 avril 2017).
- OMS : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/fr/> (consulté le 2 mai 2017).
- Photo système salivaire : <http://www.docteurcliv.com/maladie/lithiase-salivaire.aspx> (consulté le 4 mai 2017).
- Le système digestif (Cours 7) : URL <http://www.isto.ucl.ac.be/safe/dig7.htm> (consulté le 27 mars 2017).
- Composition salivaire : <http://www.docteur-guerre.com/pathologies/glandes-salivaires.html> (consulté le 23 mars 2017).
- Cours Médecine, Ostéopathie - Physiologie : La sécrétion salivaire <http://www.cours-medecine.info/physiologie/secretion-salivaire.html> (consulté le 27 mars 2017).
- Ecologie et comportement de la mouche tsé-tsé : <http://www.fao.org/docrep/009/p5444f/P5444F01.htm> (consulté le 24 février 2017).
- Salivette ® (Sarsted) : <https://www.sarstedt.com/fr/produits/diagnostic/salivecrachat/> (consulté le 9 mai 2017).
- Centrifugation en tube capillaires <http://www.medicalexpo.fr/prod/sarstedt/product-69921-644753.html>. (consulté le 6 juin 2017)
- Palpation ganglionnaire : <http://www.sleeping-sickness.ird.fr> (consulté le 6 juin 2017)
- ASNOM - Association Amicale Santé Navale et d'Outre-Mer : [https://www.asnom.org/oh/fr/0541\\_trypanosomiase](https://www.asnom.org/oh/fr/0541_trypanosomiase) (consulté le 6 juin 2017)
- DNDi. <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/fexinidazole> (consulté le 8 juin 2017)

**ANNEXE 1 : Utilisation d'une salivette® (Sarstedt)**



## Serment de Galien

---

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

## **Identification de marqueurs biologiques dans l'urine et la salive de patients atteints de Trypanosomose Humaine Africaine**

La maladie du sommeil ou Trypanosomose Humaine Africaine (THA) fait partie des 20 Maladies Tropicales Négligées listées par l'OMS. C'est une parasitose vectorielle qui sévit en Afrique subsaharienne. L'infection débute par la transmission du parasite *via* la pique d'une glossine ou mouche Tsé-Tsé lors de son repas sanguin. Les trypanosomes inoculés vont dans un premier temps proliférer dans le système lymphatico-sanguin de l'Homme, c'est le stade 1. Si à ce stade rien n'est fait, le parasite va poursuivre son cycle infectieux en franchissant la barrière hémato-encéphalique et ainsi se retrouver au niveau du système nerveux central, c'est l'entrée en stade 2 de la maladie. Les traitements disponibles sont stades et espèces dépendants d'où la nécessité d'un diagnostic rigoureux ou seule actuellement la ponction lombaire permet de déterminer le stade de la maladie.

Notre étude a pour objectif d'identifier des marqueurs biologiques au cours de la THA par une technique d'analyse par protéomique sur des fluides biologiques (Urines et Salives). La finalité étant d'améliorer le diagnostic en utilisant l'urine et la salive des patients pour mettre en évidence l'infection et le stade de la maladie.

Pour ce travail une bio banque d'échantillons biologiques de patients a été constituée en Angola entre 2008 et 2011. La cohorte est formée de 247 individus dont 67 patients en stade 1, 161 patients en stade 2 et 19 contrôles. L'identification des potentielles protéines d'intérêt est faite par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) puis par dosage ELISA sur les deux fluides.

Au total, 1212 protéines ont été identifiées qualitativement dans l'urine. Parmi elles Moésine a été choisi afin de réaliser un dosage. Pour la salive 1407 protéines ont été mises en évidence et nous avons sélectionné l'Intelectine-2 que nous avons dosé dans la salive.

Cette étude de protéomique est une première de ce genre sur la salive et l'urine car elle permet de mettre en lumière un potentiel biomarqueur.

Mots-clés : Trypanosomose Humaine Africaine, protéomique, salive, urine, moésine, intelectine-2

## **Identification of biomarker in urine and saliva of patients with Human African Trypanosomiasis**

Sleeping sickness or Human African Trypanosomiasis is considered as a tropical neglected disease by the WHO. This is a vector-borne parasitic disease of Sub-Saharan Africa. The infection is transmitted to humans by the bite of a tsetse fly during the blood meal. First, trypanosomes proliferate in the human lymphatic system also called stage 1. If at this step nothing is done, the parasite crosses the blood-brain barrier invading the central nervous system the disease develops into a second stage. Available treatment are stages and species depending hence the need to make a strict diagnosis but now only the lumbar puncture is performed to determine the stage.

Our purpose study is to identify biomarkers for diagnosis HAT by a proteomic analysis on biological fluid (urine and saliva). The goal is to improve the diagnostic using patients 'urine and saliva to highlight the infection and the stages of the disease.

For this survey, a biobank of biological sample was established in Angola between 2008 and 2011. The cohort is composed of 247 persons including 67 stage 1, 161 stage 2 and 19 controls. The identification of the potential proteins of interest is made by mass spectrometry (LC-MS/MS) and then by ELISA dosage on the 2 fluids.

In total, 1212 proteins were qualitatively identified in urine. Among them, Moesin was chosen to make a dosage. For the saliva, 1407 proteins were identified and we have selected and dosed Intelectin-2.

This is a first study of proteomic on urine and saliva because it points out a potential biomarker.

Keywords: Human African Trypanosomiasis, proteomic, saliva, urine, moesin, intelectin-2