

Complications neuropsychiatriques survenant en période post-thérapeutique de la Trypanosomiase Humaine Africaine au stade 2.

Neuropsychiatric disorders following the treatment of the second phase of Human African Trypanosomiasis.

Itakala FB*, Mananga JL*, Situakibanza HN**, Mumba DN***, Nengi N*, Muyemba JT****

Correspondance

Itakala Bondo Félicien, MD.
Courriel : itakalafelicien@yahoo.fr
Phone : +243998116847

Summary

Context and objective: Neuropsychiatric signs are common in the Human African Trypanosomiasis (HAT). However, those occurring in the post therapeutic period are rarely documented. The objective of this study is to describe post therapeutic neuropsychiatric disorders of HAT in the context of sterile cerebrospinal fluid.

Methods: In descriptive retrospective approach, 73 patients having HAT followed from 2004 to 2008 at the Reference National Center of HAT of Kinshasa, were studied. The parameters of interest were clinical (neuropsychiatric signs) and biological (sterile cerebrospinal fluid) in the post therapeutic phase of a Stage 2 HAT.

Results: Average age of patients studied (53.4% males) was 30 ± 15.7 years. The main clinical signs observed were sleep disturbances (46.5%) and behavior changes (38.3%), occurred in average time of 36.8 ± 45.4 weeks. Frontal syndrome was more frequent (54.8%). Principal cerebrospinal fluid patterns were meningeal profile (47.9%) and standard albumin-cytological dissociation (32.9%).

Conclusion: Neuropsychiatric disorders observed in post-treatment period for HAT are relatively frequent and polymorphic, suggesting a variety of phenotypes. There is a need for a careful screening of these phenotypes through well designed prospective multicentric study to assess accurate diagnostic markers.

Keywords: HAT 2nd stage, post-treatment period, clinical and biological markers

* Centre neuropsychopathologique (CNPP), Département de Psychiatrie, UNIKIN

** Cliniques Universitaires de Kinshasa, Département de Médecine Interne, UNIKIN

*** Cliniques Universitaires de Kinshasa, Département de Médecine Tropicale, UNIKIN

**** Cliniques Universitaires de Kinshasa, Département de Biologie Médicale, UNIKIN

Résumé

Contexte et objectif : Les manifestations neuropsychiatriques sont couramment rencontrées dans la trypanosomiase humaine (THA). Cependant, celles qui surviennent en post thérapeutique sont peu documentées. L'objectif de la présente étude est de décrire les complications neuropsychiatriques à LCR stérile, post-thérapeutique.

Méthodes : Dans une approche rétrospective descriptive, 73 trypanosés suivis entre 2004 et 2008 au Centre National de Référence de la Trypanosomose Humaine Africaine, ont été examinés. Les paramètres d'intérêt étaient cliniques (neuropsychiatriques) et biologiques (LCR stérile) en phase post-thérapeutique d'une THA au stade 2.

Résultats : L'âge moyen des patients (53,4% de sexe masculin) était de $30 \pm 15,7$ ans. Les troubles du sommeil (46,5%) et les troubles du comportement (38,3%) étaient les principales manifestations cliniques, de délai moyen de survenue de $36,8 \pm 45,4$ semaines. Le syndrome frontal a été prépondérant (54,8%). L'analyse du LCR a montré préférentiellement un profil méningitique (47,9%) ou de type dissociation albumino-cytologique (32,9%).

Conclusion : Les manifestations neuropsychiatriques en période post-thérapeutique de la THA au stade 2 sont relativement fréquentes et polymorphes, suggérant des phénotypes et des étiologies diverses. Des études ultérieures prospectives et multicentriques incluant plusieurs sujets sont indispensables pour la détermination des marqueurs de discrimination mieux adaptés.

Mots-clés : THA stade 2, Période post-thérapeutique, Paramètres cliniques et biologiques.

Introduction

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) fait partie des maladies tropicales négligées (MTN), en recrudescence dans de nombreux foyers endémiques, notamment en Afrique subsaharienne (1-5). Peu de progrès ont été réalisés quant à son traitement, qui repose encore principalement sur des molécules très anciennes, souvent dotées d'effets secondaires multiples.

Historique de l'article :

Reçu le 17 février 2015 ; Accepté le 29 décembre 2015

La période post-thérapeutique exige un suivi dont le délai et les outils sont loin d'être consensuels, avant toute déclaration de guérison définitive (6-11). Des tableaux cliniques divers peuvent être observés, certains pouvant faire craindre une vraie rechute ; d'où la difficile décision de reprise de trypanocides, exposant parfois certains sujets à des effets indésirables inopportuns. La situation est plus préoccupante lorsque des manifestations neuropsychiatriques diverses sont observées chez des sujets ayant un LCR stérile, après un traitement bien conduit (12, 13). Dans les pays en voie de développement, qui sont aussi à très forte endémicité, le diagnostic usuel de la rechute de la THA repose principalement sur la mise en évidence du trypanosome dans le LCR. Toutefois, la faible sensibilité des techniques parasitologiques usuelles, justifie pour certains auteurs, le recours à d'autres critères d'orientation, tels que l'analyse cytochimique du LCR (7, 8, 10, 11). C'est ainsi qu'une cytorachie ≥ 50 éléments est généralement admise, comme stigmate d'une rechute, même si aucun seuil n'est consensuellement établi à l'heure actuelle dans la littérature médicale (8, 10). Cette situation justifie le développement d'outils diagnostiques alternatifs et facilement accessibles. La présente enquête décrit le profil clinique et biologique des patients THA ayant présenté des troubles neuropsychiatriques en phase post-thérapeutique d'une THA au stade 2.

Méthodes

Type et cadre d'étude

Etude descriptive des dossiers des patients suivis au Centre National de Référence de la Trypanosomose Humaine Africaine (CNRTHA) à Kinshasa (RD Congo) durant la période de janvier 2004 à décembre 2008.

Critères d'inclusion de patients

Les dossiers retenus ont été ceux des patients justifiant d'un traitement antérieur pour une THA à *T.b. gambiense* au stade méningo-encéphalitique (stade 2) et répondant aux critères ci-dessous :

- avoir dans ses antécédents la preuve de la présence de trypanosomes dans le LCR ;
- avoir bénéficié d'une cure trypanocide complète, active au stade nerveux, avec le melarsoprol ou le difluoro-méthyl-ornithine (DFMO) ;
- avoir obligatoirement fait l'objet d'un examen de contrôle à la fin de ladite cure, confirmant la stérilisation du LCR ;
- avoir présenté après traitement, une période de rémission ou de disparition complète des signes cliniques, suivie d'une réapparition des manifestations neuropsychiatriques, avec cependant un LCR stérile à l'examen parasitologique direct.
- disposer des résultats des analyses cytochimiques du LCR (principalement le taux de leucocytes et de protéines).

Définitions opérationnelles

• Profil cytochimique

Le profil cytochimique du LCR était déterminé par une analyse comparative des variations quantitatives de la leucorachie et de la protéinorachie. Quatre profils sont classiquement décrits : normal, méningitique, dissociation albumino-cytologique, et dissociation cyto-albuminique.

Le profil est dit normal pour une leucorachie ≤ 5 éléments/mm³ et une protéinorachie comprise entre 10-45 mg%, selon les normes du laboratoire du CNRTHA.

Il est de type méningitique, en cas d'augmentation simultanée de la leucorachie et de la protéinorachie.

La dissociation albumino-cytologique désigne un profil caractérisé par une hyperprotéinorachie associée à une cytorachie normale ; tandis que le profil de type dissociation cyto-albuminique est caractérisé par une hyperleucorachie associée à une protéinorachie dans les normes.

Conflits d'intérêts

Aucun conflit d'intérêt n'a été déclaré par les auteurs.

Résultats

Caractéristiques sociodémographiques des sujets

La population des enquêtés avait un âge moyen de 30±15,7 ans avec une médiane de 27 ans (extrêmes 3-75 ans). Le sexe masculin prédominait légèrement (53,4% avec sexe ratio 1,14/1) et la plupart avaient un niveau d'étude égal ou inférieur au secondaire. Les célibataires représentaient plus de la moitié du groupe (57,6%). Les chômeurs, les cultivateurs et les pêcheurs représentaient les ¾ des sujets.

Données cliniques

Elles ont été recueillies en rapport avec les antécédents morbides personnels, les symptômes dominants avec leur délai et modalités d'apparition, les syndromes neuropsychiatriques retenus en hospitalisation, le diagnostic à l'admission et celui retenu à la sortie, et l'évolution post-thérapeutique.

Le tableau 1 ci-dessous illustre les symptômes dominants enregistrés.

Tableau 1. Symptômes dominants

Symptômes dominants	n	%
Troubles du sommeil (somnolence diurne)	34	46,5
Troubles de comportement	28	38,3
Mouvements involontaires	18	24,6
Difficultés de la marche	12	16,4
Céphalées	11	15,1
Crises convulsives	10	13,7
Amaigrissement	10	13,7
Asthénie	9	12,3
Prurit	8	10,9
Fièvres	7	9,5
Troubles des fonctions supérieures	2	2,7
Aucun*	2	2,7

* cas asymptomatiques présentant uniquement une hyperleucocytose > 50 éléments/mm³

Les troubles du sommeil et du comportement constituaient avec les mouvements involontaires, la triade la plus fréquente parmi les plaintes. Leur délai moyen de survenue était de 36,8 ± 45,4 semaines (extrêmes : 1-216 semaines).

Ils étaient d'installation brutale chez 33/73 sujets (45,2%) et progressive chez les 31 autres (42,5%).

Les principaux syndromes neuropsychiatriques évoqués ont été : le frontal (54,8%), le parkinsonien (37%), le cérébelleux (28,8%), le pyramidal (24,7%), et le méningé (21,9%).

Les diagnostics présomptifs à l'admission au centre sont listés dans le tableau 2.

Tableau 2. Principaux diagnostics présomptifs

Diagnostic présomptif	n	%
Sans diagnostic précis	58	79,4
Résistance à l'Arsobal	4	5,5
Méningoencéphalite à THA	3	4
Trouble psychiatrique non spécifié	2	2,7
Accident Vasculaire Cérébral (AVC)	1	1,4
Effets secondaires des trypanocides	1	1,4
Encéphalopathie	1	1,4
Méningite lymphocytaire	1	1,4
Séquelles de THA	1	1,4
Syndrome dissociatif	1	1,4
Total	73	100

Ce tableau 2 illustre la difficulté du diagnostic présomptif. Il est imprécis chez la majorité des cas (79,4%).

Le diagnostic à la décharge des patients a été celui de rechute pour 20 d'entre eux (27,4%) et de non rechute pour les 53 restants (72,6%).

En rapport avec l'approche thérapeutique, 41 patients (56,2%) ont bénéficié d'un traitement symptomatique, 28 (38,4%) à nouveau des trypanocides, et 4 (5,5%) ont été simplement sous surveillance. Le tableau 3 ci-dessous retrace l'évolution post-thérapeutique du groupe.

Tableau 3. Evolution post-thérapeutique

Evolution clinique	N	%
Bonne	47	64,4
Stationnaire ou aggravation des signes cliniques	14	19,2
Décès	10	13,7
Pas de renseignements	2	2,7
Total	73	100

L'évolution a été bonne pour 47 cas (64,4%) et mauvaise 24 cas d'entre eux (32,9%).

Données biologiques

Elles sont renseignées dans les tableaux 4 et 5 ; elles concernent les paramètres hématologiques et les profils cyto-biochimiques du LCR.

Tableau 4. Données hématologiques

	Médiane	Mode	Min	Max
Hb (g %)	9,9	8,6	5,6	13
GB (éléments/mm ³)	7950	6700	2300	14000
VS (mm/1h)	55	35	2	130
Neutrophiles (%)	44	36	20	85
Lymphocytes (%)	35	60	10	71
Eosinophiles (%)	4	2	0	30
Basophiles (%)	0	0	0	1
Monocytes (%)	0	0	0	4

L'anémie légère (Hb 9,9 g%) et une VS accélérée ont été les principales anomalies observées.

Tableau 5. Profil cytobiochimique du LCR

Types	N	%
Méningitique	35	47,9
Dissociation albumino-cytologique	24	32,9
Normal	13	17,8
Dissociation cyto-albuminique	1	1,4
Total	73	100

Quatre profils sont rapportés, avec prédominance néanmoins du type méningitique et de dissociation albumino-cytologique chez 59 patients (80,8%).

Discussion

La présente enquête visant à déterminer les caractéristiques cliniques et le profil cytobiochimique du LCR dans la population d'étude a montré essentiellement : que la population est jeune (âge moyen : 30±15,7 ans ; médiane : 27 ans) et l'exposition aux piqûres des glossines est fortement suggérée par la profession (cultivateurs, pêcheurs). La prédominance masculine observée dans notre série (*sexe ratio* 1,14/1) est en désaccord avec certains rapports antérieurs, notamment celui de Garcia *et al* (10), de même que celui de Lutumba et son

équipe (11). Ces auteurs justifient la suprématie féminine par le type d'activités dévolues à la femme en milieu rural, l'exposant plus que l'homme aux piqûres de glossines en zones champêtres. Quelques études génétiques récentes en RD Congo et ailleurs suggèrent néanmoins la susceptibilité différente des sujets à la THA (12-14), qui pourrait expliquer les disparités entre différents rapports.

Les hommes étaient d'avantage célibataires et d'âge jeune. Cette catégorie est aussi celle des sujets soumis à des activités diverses imposant une plus grande mobilité et majorant de ce fait, le risque d'exposition aux piqûres de glossines. L'enquête de Robays *et al* en 2004 à Kinshasa, révélait déjà une prépondérance des cas de THA corrélée au type d'activité exercée (15).

Le faible niveau d'études observé parmi les patients est un facteur additionnel de vulnérabilité. En effet, comme pour d'autres maladies tropicales négligées, la THA frappe surtout les régions chaudes du globe, également les plus démunies et dépourvues de moyens efficaces d'assainissement de l'environnement (16, 17). Le manque d'informations ou de connaissances influe sur le comportement des individus et empêche l'appropriation des mesures usuelles de prévention.

Le tableau clinique dominé par la somnolence diurne (46,5%), les troubles de comportement (38,3%) et les mouvements involontaires (24,6%), est en concordance avec les données de la littérature sur les manifestations cliniques de la THA au stade méningoencéphalitique (18, 19, 20). La somnolence résulterait de l'atteinte des noyaux supra-optiques (21). Ce tableau clinique manque néanmoins de spécificité et illustre à suffisance la difficulté du diagnostic de rechute vraie en phase post-thérapeutique de la THA, nécessitant le recours à des outils souvent peu accessibles dans les pays les plus concernés (22, 23).

Le mode d'installation des symptômes dans la présente étude a été progressif ou brutal. La période de latence a été très variable, allant de 1 à 216 semaines. Cette grande dispersion suggère

la probabilité de phénotypes différents ou de susceptibilité différente de l'hôte dans la THA à T.b. gambiense. Dans cette affection, le tableau clinique est de type chronique et d'installation progressive (19, 20, 24) et, la rechute n'interviendrait qu'après une période de latence clinique d'au-moins 12 semaines selon une étude expérimentale par Mulumba *et al* (25).

Au regard des différents syndromes neuropsychiatriques répertoriés, les structures anatomiques intéressées par les lésions sont le lobe frontal, les noyaux gris centraux et de la base, les régions péri-ventriculaires, le thalamus, les méninges et le cervelet. Ces corrélations anatomo-cliniques concordent avec les notions classiques d'anatomo-pathologie établies dans la THA au stade 2 et expliquent la prédominance du syndrome frontal observé dans plus de la moitié de cas (54,8%). En effet, selon les auteurs (26, 27), les lobes frontaux sont les plus atteints et suivant un axe vertical, l'intensité des lésions va en décroissant, de haut en bas.

S'agissant de paramètres biologiques, l'enquête a retenu l'anémie et une VS accélérée comme principaux éléments observés dans cette population d'étude. Ces anomalies de l'héogramme sont fréquentes dans la THA comme décrit dans la littérature (23, 28, 29).

L'analyse cyto-biochimique du LCR a permis d'individualiser 4 profils distincts. Cette diversité conforte l'idée de phénotypes différents et justifie la recherche du caractère discriminant de ces derniers dans la gestion de la période post-thérapeutique dans la THA.

Limites

L'interprétation de nos résultats devrait tenir compte de quelques limites notamment : le caractère rétrospectif et monocentrique de notre enquête, associé à une population très réduite des patients inclus dans l'étude. L'absence d'un protocole antérieur validé peut avoir occasionné la perte de nombreuses données utiles, ces dernières étant recueillies par des prestataires différents. Les données récoltées en milieu

hospitalier urbain sont loin de refléter le vrai profil de la pathologie en milieu endémique communautaire. Ces limites n'enlèvent pas toutefois l'intérêt des observations.

Force

La principale force de cette enquête, c'est son caractère princeps dans notre contexte. Elle a abordé la difficile période hétérogène post-thérapeutique de la THA et a montré quelques caractéristiques différentes parmi les sujets ayant un LCR stérile. L'analyse approfondie de ces données pourrait déboucher sur une appréciation plus opérationnelle des patients, et mieux aider à la décision thérapeutique de reprise ou non de trypanocides.

Conclusion

Les manifestations neuropsychiatriques en période post-thérapeutique de la THA de stade 2 étaient polymorphes et suggèrent des phénotypes et des étiologies diverses. Des études longitudinales et incluant un plus grand nombre de centres et de sujets pourraient mieux contribuer à déterminer des marqueurs clinico-biologiques simples et accessibles de discrimination entre sujets en rechute vraie ou non de la THA au stade 2.

Références

1. Simarro PP, Cecchi G, Franco JR, Paone M, Fevre EM. *et al.* Risk for human African trypanosomiasis, Central Africa, 2000-2009. *Emerging Infectious Diseases.* 2007; **17**(12): 2322-2324.
2. Aksoy, S. Sleeping sickness elimination in sight: time to celebrate and reflect but not relax. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2011; **5**(2): e 1008.
3. OMS. Maladie du sommeil. *Aide-mémoire* N°259, Mai 2015.
4. Alirol E, Schrupf D, Amici Heradi J, Riedel A, de Patoul C. *et al.* Nifurtimox-éflornithine combination therapy for second-stage gambiense human African trypanosomiasis: Médecins Sans Frontières experience in the Democratic

- Republic of the Congo. *Clinical Infections Diseases*.2013; **56** (2): 195-203.
5. Schmid C., Nkunku S., Merolle A., Vounatsou P. et Burri C. Efficacy of 10-day melarsoprol schedule 2 years after treatment for late-stage gambiense sleeping sickness. *Lancet*. 2004; **364** (9436): 789-790.
 6. Miezán TW, Dje NN, Doua F. et Boa F. Trypanosomose Humaine Africaine en Côte d'Ivoire : caractéristiques biologiques après traitement. A propos de 812 cas traités dans le foyer de Daloa (Côte d'Ivoire). *Bulletin de la Société de Pathologies Exotiques*. 2003; **95**(5) :362-365.
 7. World Health Organization (WHO). Control and Surveillance of African trypanosomiasis. *Report of WHO expert committee*. WHO, Genève, 1998.
 8. Antoine, Ph. Etude neurologique et psychologique de malades trypanosomés et leur évolution. *Ann Soc Belg Med Trop*.1977 ; **57** (4-5) : 227-247.
 9. Itakala B, Mulumba PM, Kayembe PK, Lombe N, Tshala DK. et al. Problématique du diagnostic de rechute dans le traitement de la trypanosomiase humaine africaine à *Trypanosoma brucei gambiense* en pratique hospitalière. *Congo Médical*.1998 ; **2** (7) : 434-442.
 10. Garcia A, Jamonneau V, Magnus E. et al. Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitemic individuals in Côte d'Ivoire: evidence for complex and heterogenous population. *Tropical Medicine and International Health*.2000; **5**: 786-793.
 11. Lutumba P., Robays J., Miaka C, Kande V, MUMBA, D. et al. Validity, cost and feasibility of the mAECT and CTC confirmation tests after diagnosis of African sleeping sickness. *Tropical Medicine and International Health*.2006; **11** (4): 470-478.
 12. Courtin D., Milet J., Jamonneau V., Yeminanga CS., Kumeso V.K. et al. Association between human African trypanosomiasis and the IL 6 gene in a Congolese population. *In* : Bulletin d'information sur les glossines et les trypanosomoses (résumés), Programme de lutte contre la trypanosomose africaine, Rome, 2006; **29** (2) : 214.
 13. Morrison LJ, Mc Lelland S, Sweeney L, Chan CN, MacLeod A. et al. Role for parasite genetic diversity in differential host responses to *Trypanosoma brucei* infection. *Infection and Immunity*.2010; **78** (3): 1096-1108.
 14. Capewell P, Veitch NJ, Turner CM, Raper J, Berriman M. et al. Differences between *Trypanosoma brucei gambiense* groups 1 and 2 in their resistance to killing by trypanolytic factor 1. *PLoS Neglected Tropical Disease*.2011; **5** (9): e1287.
 15. Robays J, Kadima AE, Lutumba P, Bilenge CM, Mesu VK. et al. Human African trypanosomiasis amongst urban residents in Kinshasa: a case-control study. *Tropical Medicine and International Health*.2004; **9** (8): 869-875.
 16. Ilemobade AA. Tsetse and trypanosomosis in Africa: the challenges, the opportunities. *Onderstepport Journal of Veterinary Research*.2009; **76** (1):35-40.
 17. Boelaert M, Meheus F, Robays J. et Lutumba, P. Socio-economic aspects of neglected diseases: sleeping sickness and visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2010; **104** (7): 535-542.
 18. Dumas M. et Girard PL. Human African trypanosomiasis (Sleeping sickness). *In*: Handbook of Clinical Neurology, Vol 35: Infections of the Nervous System. Part III (Eds Vinken PJ & Bruyn GW), North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1978, pp: 7–83.
 19. Dumas M. et Bisser S. Clinical aspects of human African trypanosomiasis. *In*: Progress in Human African Trypanosomiasis, Sleeping Sickness (Ed. Dumas, M., Bouteille, B. & Buguet, A.) Springer, Paris, 1999: 215–233.
 20. Burri C. et Brun R. Human African trypanosomiasis. *In*: Manson's Tropical Diseases 21st Ed. (Eds Cook GC & Zumla AI) Elsevier, Edinburgh, 2003, pp. 1303–1323.
 21. Lundkvist GB, Kristensson K. et Bentivoglio M. Why trypanosomes cause sleeping sickness. *Physiology* 2004; **19** (4): 198-206.
 22. Mukendi D, Kalo JR, Bottieau E, Barbe B, Gillet Ph, Yansouni C. et al. Résultats préliminaires de l'étude clinique NIDIAG explorant l'étiologie des affections neurologiques et la place de la trypanosomiase humaine africaine à l'Hôpital Général de Référence de Mosango, Province de Bandundu, République Démocratique du Congo.

- In* : Targeting Elimination of HTA: The Role of Research and Development, (abstract presentation list), 3rd Joint HAT Platform-EANETT Scientific Meeting, Kinshasa, DRC, 17-19 September 2014; p 13
23. Gentilini M, Caumes E, Danis M, Mouchet J, Duflo B et al. *Médecine Tropicale*. 5^{ème} Edition, Flammarion, Paris, 1993: 123-139.
 24. Dumas M. et Girard PL. Human African trypanosomiasis (Sleeping sickness). *In*: Handbook of Clinical Neurology, Vol 35: Infections of the Nervous System. Part III (Eds Vinken PJ & Bruyn GW), North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1978: 7-83.
 25. Mulumba PM. Dynamique de développement de *Trypanosoma brucei gambiense* dans les tissus de l'hôte vertébré : Aspects parasitologiques, thérapeutiques et pronostiques. *Thèse doctorale*, Universitaire Instelling Antwerpen, Departement Geneskunde. 1984.
 26. Adams JH. et Hallier L. A neuropathological analysis of eight fatal cases of African trypanosomiasis (*T.b. gambiense*). *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 1984; **10**: 304-305.
 27. OMS. Trypanosomiase Humaine Africaine, Epidémiologie et Lutte. *Série de Rapports Techniques*. 1986 ; **739**, 154 p
 28. Lejon V, Bentivoglio M. et Franco JR. Human African trypanosomiasis. *Handbook of Clinical Neurology*. 2013; **114**: 169-81.
 29. Edan G. Signes cliniques et biologiques des trypanosomiasés à *T. gambiense* vues au stade d'atteinte méningoencéphalitique. *Méd Trop*. 1979; **39**: 499-507.