



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>  
Eprints ID : 3134

**To cite this document :**

Pruvot, Mathieu, (2009) [Diagnostic de trypanosoma evansi : mise en place, standardisation et évaluation d'outils de PCR et d'Ac-ELISA : application à une étude préliminaire chez le bovin laitier en Thaïlande](#)  
Thesis

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr)

---

# DIAGNOSTIC DE *TRYPANOSOMA EVANSI* :

## Mise en place, standardisation et évaluation d'outils de PCR et d'Ac-ELISA

### Application à une étude préliminaire chez le bovin laitier en Thaïlande

---

#### THESE

pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2009  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Mathieu PRUVOT**

Né le 3 novembre 1983, à Poitiers

---

**Directeur de thèse : M. le Docteur Philippe JACQUIET**

---

#### JURY

PRESIDENT :

**M. VALENTIN Alexis**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

**M. JACQUIET Philippe**  
**M. FRANC Michel**

Maître de Conférence à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITES :

**M. DESQUESNES Marc**

Docteur en Parasitologie, Chercheur CIRAD







**A Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

*Zoologie-Parasitologie*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

**A Monsieur le Docteur Philippe JACQUIET**

Maître de Conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Parasitologie et Maladies Parasitaires*

Qui nous a fait l'honneur et le plaisir d'accepter la direction de cette thèse

Pour avoir supporté mes sit-in réguliers devant la porte de votre bureau ces dernières années, et pour m'avoir soutenu dans tous mes projets.

Trouvez ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon plus grand respect

**A Monsieur le Professeur Michel FRANCOIS**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Parasitologie et Maladies Parasitaires*

Qui nous a fait l'honneur et le plaisir d'accepter de prendre part notre jury de thèse.

Sincères remerciements

**A Monsieur le Docteur Marc Desquesnes**

Docteur vétérinaire, Docteur en parasitologie, Chercheur CIRAD

Qui nous a fait l'honneur de diriger et encadrer ce travail

Pour l'encadrement exemplaire dont vous m'avez fait bénéficier, votre confiance, et votre enrichissante présence tant professionnelle qu'amicale tout au long de ce stage.

Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de ma sincère amitié.

**To Ketsarin,**

Thank you so much for your help and your kindness : Khop Koun Khrap !

**To Professor Sathaporn,**

Thank you very much for welcoming me in your department, and for this fulfilling collaboration.

**A Jeremy,**

Pour m'avoir encouragé et soutenu dès le début dans mes intentions de m'orienter vers la recherche

Trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon amitié.

**A Hélène Cordoliani,**

Pour m'avoir enseigné la rigueur, le goût du détail, et m'avoir permis d'obtenir les clés pour accéder à ce que je voulais faire.

Trouvez ici l'expression de mon plus grand respect et de ma sincère sympathie.

**A Eric Meyer (et la clinique du 8 mai),**

Pour m'avoir permis de confirmer mon attirance pour le métier, et d'y réaliser mes tous premiers pas. Trouve ici l'expression de ma sincère amitié.

**A Papa,**

Pour ta douce intransigeance tout au long de ces années d'étude, pour ces inimitables omelettes aux chips de notre jeunesse, pour avoir toujours placé notre bonheur et notre épanouissement au premier plan, pour tout cet amour dont tu nous as toujours affectueusement entouré. Pour m'avoir transmis curiosité et soif de connaissance, pour m'avoir très tôt sensibilisé aux merveilles de la science, de la musique, et bien d'autres choses, pour ces longues et passionnantes discussions dans lesquelles j'ai commencé par écouter sagement jusqu'à apprendre à soutenir mes propres idées.

Trouve ici l'expression de ma plus sincère gratitude, et de mon profond amour.

**A Maman,**

Pour l'attention et le soutien apporté au cours de ces années, pour ta patience et la joie de voir grandir notre complicité.

Trouve ici l'expression de ma sincère affection et de ma profonde reconnaissance.

**A Marie,**

Pour avoir su entrer si délicatement et si profondément dans notre vie, pour m'avoir permis d'apprendre mon manuel d'histoire de 4<sup>ème</sup> par cœur, pour avoir su être la plus maternelle des belles-mères.

**A Joël,**

Pour avoir su apporter joie et bonheur à Maman.

Trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance

**A Claire...**

Pour les bons souvenirs de notre enfance partagée et avec l'espoir de continuer à vivre ensemble de bons moments et entretenir la complicité fraternelle.

**...et à Delphine,**

Puisqu'il n'est pas nécessaire d'être biologiquement frère et sœur pour pouvoir parler de complicité fraternelle

Trouvez ici l'expression de ma sincère affection.

**A Mamy,**

Pour ces moments de jeux, de rire et de tendresse gravés à jamais, pour ces gâteaux, crêpes et autres goûters copieux... pour avoir bercé notre enfance de l'inimitable douceur aimante d'une grand-mère attentionnée

**A Michelle et Alain et aux autres membres de ma famille, proche ou rattachée par différentes voies.****A Martine,**

Pour ton cœur si grand, pour ces inoubliables moments passés ensemble. Pour toutes ces choses que j'ai du mal à exprimer mais qui sont pourtant si fortes. Trouve ici l'expression de ma très sincère affection.

**A Thomas,**

Pour avoir été un ami et un frère, pour ces années où nous avons appris à nous construire l'un à côté de l'autre, et l'un grâce à l'autre, dans une complicité grandissante. Trouve ici l'expression de mon souvenir et de mon amour inaltérables



**A Guillaume** (bichon),

Pour me permettre de ne pas savoir comment faire le tri sur tout ce que j'ai envi de marquer dans ces quelques lignes. Pour tous ces moments inoubliables, pour être là et savoir me dire ce que je ne veux pas toujours entendre quand il faut. Pour ce magnifique tablier de barbecue pour lequel je ne te remercierai jamais assez parce que le barbecue, c'est comme la pêche, t'y vas pas avec une mouche de 12 pour taquiner la truite ! Pour m'avoir permis de dire « Je t'aime » à un ami sans en ressentir la moindre gêne.

Trouve ici l'expression de ma profonde et irrévocable amitié.

**A Olivier** (bichon),

Pour me permettre d'être fier d'avoir un ami comme toi, pour avoir toujours été présent dans les bons moments comme dans les plus durs, et ce malgré la distance. Pour m'avoir convaincu qu'on peut être à la fois loin des yeux et près du cœur. Pour les trips « sangsue » passés et les folles escapades à venir !

Trouve ici l'expression de ma profonde et sincère amitié.

**A Nath** (bichon),

Pour avoir aussi partagé l'amour du barbecue, de la classe et du bon goût... mais bien suuuuuur !...pour cette forte amitié qui s'est construite et renforcée au cours de ces années.

Trouve ici l'expression de ma profonde et sincère amitié.

**A Delphine,**

Pour cette amitié sans ombrage depuis le début dans les rangs serrés des poulots. Pour ta franchise, ton ouverture, pour tous ces chouettes moments passés ensemble (et ceux à venir), pour m'offrir cette amitié à la fois simple et d'une grande richesse. Merci.

**A Léni** (ma Kikoune),

Pour tout ce que nous partageons, et qui nous a fait passé d'extraordinaires moments ensemble, j'aime à penser que bien d'autres sont encore à venir.

Trouve ici l'expression de ma sincère et profonde amitié.

**A Natacha,**

Pour avoir su entretenir un lien si fort tout au long de ces années, et nous avoir laissé lui donner une intensité toute particulière ces derniers temps.

Trouve ici l'expression de ma sincère et profonde affection.

**A Anne,**

Pour m'avoir appris qu'on pouvait aimer la raclette sans aimer le fromage, pour tous ces bons moments partagés.

Trouve ici l'expression de ma sincère amitié.

**A Guillaume L.,**

Pour avoir été si soudés au cours de notre deuxième année de prépa, ce qui a sans nul doute contribué à me permettre d'en arriver là, pour toutes ces laborieuses Ronéo et pour tous les super moments passés ensemble et ceux à venir. Trouve ici l'expression de ma sincère amitié

**A Lucile,**

Pour m'accompagner dans mon adoration de la parasitologie et du panneau d'indication de cette vénérable chaire.

Trouve ici l'expression de ma sincère amitié

**A Stéphanie,**

Pour cette complicité et cette douce amitié qui nous lie, pour les bons moments passés et ceux à venir... trouve ici l'expression de ma sincère amitié (PS :« Olive ! »)

**A Mado, Majida, Alexandra, Anais et mes colloqs de CEAV : Marion, Marion, Elodie, Anne.**

Trouvez ici l'expression de ma sincère amitié

**A mes amis de Saint louis,**

Mikael, Pascal, Guillaume, Pauline, Yann, Gus (mon Cobi !), Delphine, Elodie (Didi ! merci pour le bon chocolat et ta douce amitié), Jeanne, Marion, Myriam....1000 merci pour m'avoir permis de passer deux intenses (à la fois horrible et merveilleuses) années de prépa, d'avoir fait perdurer ce lien particulier au cours des années qui ont suivi, et j'espère celles qui suivront...

Trouvez ici l'expression de ma profonde et sincère amitié.

**A Abaye,**

Pour cette plaisante amitié qui nous lie et que je souhaite de longue durée.

**A Mélanie,**

merci pour ces trois ans passées ensemble qui m'ont réellement permis de me construire et de m'ouvrir. Trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de ma sincère affection

**A l'ensemble du Jafoma system,**

Ben, Willy-Pet, Taquet, Karine, Marc, Anne ... et big up particulier à Chaton, Timothée, et bien qu'il faille regrouper les remerciements, ne doutez pas de l'importance que j'accorde à chacun de vous

**A Lalooze,**

Mikael, Léni, Farwest, Taquet, Bilitis, Lotfi...merci pour ces moments inoubliables de musicalité...euh... en tout cas, de rire et d'amitié !

**A Jean-Philippe,**

Pour avoir sauvé l'ambiance de cette année de master, et même mieux que ca...

Trouve ici l'expression de ma sincère amitié

**A Elise,** Pour être une si fidèle amie, pour tous ces bons moments et ces fous rires, pour m'avoir montré comment hypnotiser un prof avec un crayon.

**A Louis, Romain et Guillaume,** mes chers amis de Poitiers, j'espère pouvoir garder contact avec vous encore longtemps (on peut se donner rendez vous a Bangkok, apparemment, c'est le plus simple pour se retrouver !).

Trouvez ici l'expression de ma sincère amitié.

**Ce travail me donne la chance de pouvoir remercier les personnes qui me sont chères et qui ont rendu ce travail possible. Je ne peux toutes les citer : famille, collègues ou amis, si j'en suis arrivé là, c'est en partie grâce à vous. Même si les mots et la place manquent, puissent ces quelques lignes exprimer l'ampleur de ma reconnaissance.**

Table des matières :

Table des illustrations :	12
Introduction générale	14
Partie I : Etude bibliographique	16
1. Généralités : Trypanosomose à <i>T. evansi</i>	16
1.1. Le parasite	16
1.2 L'hôte et les effets sur hôte	19
1.2.1 Les principaux hôtes de <i>T. evansi</i>	19
1.2.2 L'immunodépression induite par <i>T. evansi</i>	22
1.2.3 Les traitements	23
1.3 Les vecteurs	25
1.4 Epidémiologie, facteurs de risques et contrôle du Surra	26
1.5 L'importance de <i>Trypanosoma evansi</i> en Asie	28
1.5.1 La présence du Surra en Asie	28
1.5.2 L'impact du Surra en Asie et dans le monde	29
1.5.3 Le projet initié sur <i>T. evansi</i> en Asie du Sud-Est	30
2. Description de l'élevage bovin laitier en Thaïlande	32
3. Les outils de diagnostics de l'infection à <i>T. evansi</i>	34
3.1 Les outils d'utilisation courante	34
3.2 La détection de <i>Trypanosoma evansi</i> par technique PCR	36
3.2.1 Principe	36
3.2.2 Historique	37
3.2.3 Les paramètres de la PCR	38
3.2.4 Précautions lors de la réalisation pratique au laboratoire	39
3.2.5 Les amorces candidates	40
3.3 La détection sérologique de <i>Trypanosoma evansi</i> par technique Ac-ELISA 43	
3.3.1 Rappel sur le principe de l'Ac-ELISA	43
3.3.2 Le développement de l'Ac-ELISA au cours des précédentes études	43
Partie II : Evaluation comparée de différents couples d'amorce pour la détection de <i>Trypanosoma evansi</i> par PCR	46
1. Introduction	46
2. Matériel et méthode	47
2.1 Dilutions d'ADN purifié	47
2.2 Dilutions de sang de rat parasitémique	48
2.3 Echantillons de bovins issus du terrain	48
2.4 Choix des couples d'amorces	49
2.5 Réalisation des PCR	49
3. Résultats	52
3.1 Dilutions d'ADN purifié	52
3.2 Dilution de sang de rat parasitémique	57
3.3 Echantillons de terrain	62
4. Discussion	66
5. Conclusion	71
Partie III : Etude sérologique chez les bovins laitiers en Thaïlande	72
1. Mise au point et standardisation d'un outil Ac-ELISA	72
1.1 Méthode de sélection des échantillons de référence	73
1.2 Méthodes de préparation et validation d'un antigène produit localement pour l'ELISA	73
1.3 Résultats de la mise en place de l'outil Ac-ELISA	74

1.3.1	Préparation d'antigènes de <i>T. evansi</i> .....	74
1.3.2	Sélection des échantillons de référence.....	74
1.3.3	Comparaison des résultats obtenus avec les deux types d'antigènes ..	75
1.3.4	Discussion/conclusion .....	75
2.	Matériel et méthode de l'enquête sur l'élevage bovin laitier .....	76
2.1	Echantillonnage et réalisation des prélèvements.....	76
2.2	Réalisation des ELISA <i>T.evansi</i> .....	76
2.3	Réalisation des analyses PCR.....	77
2.4	Analyses statistiques .....	77
3.	Résultats.....	78
3.1	Echantillonnage .....	78
3.2	Résultats généraux .....	78
3.3	Groupes d'âges.....	78
3.4	Distribution géographique .....	79
3.5	Résultats des PCR.....	84
4.	Discussion.....	85
4.1	Discussion générale des résultats .....	85
4.2	Discussion théorique de la méthodologique .....	89
4.3	Retour sur le contexte de l'étude : apports et les perspectives.....	90
	Conclusion.....	92
	Conclusion générale .....	94
	ANNEXE 1 : Préparation d'antigènes solubles de <i>T. evansi</i> pour l'Ac-ELISA.....	99
	ANNEXE 2 : Préparation des échantillons au phénol chloroforme pour la réalisation de PCR .....	100
	Bibliographie .....	101

## Table des illustrations :

### Figures :

<i>Fig. 1 : Positionnement de Trypanosoma evansi dans la classification taxonomique des Trypanosomatidés (D'après Vickermann, 1985).....</i>	<i>18</i>
<i>Fig. 2 : T. evansi sur frottis de sang de rat, suite à isolement en Aveyron (cliché M Desquesnes).....</i>	<i>18</i>
<i>Fig. 3: Rappel sur le principe de la PCR illustré par les premiers cycles (source : wikipedia).....</i>	<i>37</i>
<i>Fig. 4 : Schéma des principales étapes de l'ELISA.....</i>	<i>43</i>
<i>Fig. 5: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TBR sur des dilutions en série d'ADN purifié .....</i>	<i>54</i>
<i>Fig. 6: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces ESAG sur des dilutions en série d'ADN purifié .....</i>	<i>54</i>
<i>Fig. 7: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TEPAN sur des dilutions en série d'ADN purifié .....</i>	<i>55</i>
<i>Fig. 8: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces WUYTS sur des dilutions en série d'ADN purifié .....</i>	<i>55</i>
<i>Fig. 9: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TRYP4 sur des dilutions en série d'ADN purifié .....</i>	<i>56</i>
<i>Fig. 10: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TRYP1 sur des dilutions en série d'ADN purifié .....</i>	<i>56</i>
<i>Fig. 11: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TBR sur des dilutions en série de sang de rat parasitémique.....</i>	<i>59</i>
<i>Fig. 12: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces ESAG sur des dilutions en série de sang de rat parasitémique.....</i>	<i>59</i>
<i>Fig. 13: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TEPAN sur des dilutions en série de sang de rat parasitémique.....</i>	<i>60</i>
<i>Fig. 14: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces WUYTS sur des dilutions en série de sang de rat parasitémique.....</i>	<i>60</i>
<i>Fig. 15 : Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TRYP4 sur des dilutions en série de sang de rat parasitémique .....</i>	<i>61</i>
<i>Fig. 16: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TBR sur des échantillons de terrain de bovins.....</i>	<i>63</i>

Fig. 17: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces ESAG sur des échantillons de terrain de bovins.....	63
Fig. 18: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TEPAN sur des échantillons de terrain de bovins.....	64
Fig. 19: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TRYP4 sur des échantillons de terrain de bovins.....	64
Fig. 20: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces WUYTS sur des échantillons de terrain de bovins.....	65
Fig. 21: Répartition des zones étudiées en Thaïlande et bilan des résultats observés par province (encadrés) et par district (échelle de couleur). .....	82

**Graphiques :**

Graph. 1 : Evolution de la taille du cheptel laitier, et distribution par région.....	33
Graph. 2: Prévalence obtenue par technique PCR en fonction de la prévalence obtenue par technique ELISA. ....	87

**Tableaux :**

Tabl. 1: Dilutions successives d'ADN purifié de <i>T. evansi</i> utilisée dans l'évaluation des différentes amorces, et équivalences en poids d'ADN (en pg/ $\mu$ l) et en nombre de trypanosomes introduits dans chaque réaction.....	48
Tabl. 2: Récapitulatif des auteurs, séquences, conditions de réalisation des PCR et produits obtenus pour chaque couple d'amorces .....	51
Tabl. 3: Bilan des résultats de seuils de détection des amorces évaluées dans ce travail et dans les publications d'origine.....	65
Tabl. 4 : Bilan des résultats par région, province, district et ferme.....	81
Tabl. 5: Prévalence par ELISA et prévalence par PCR obtenus par ferme positives en ELISA (et testable par PCR) .....	84

## Introduction générale

La trypanosomose à *Trypanosoma evansi*, classiquement connue sous le nom de Surra, est une maladie parasitaire majeure affectant l'élevage. Elle est la trypanosomose la plus largement répartie dans le monde et touchant le plus grand nombre d'espèces hôtes domestiques et sauvages. Son impact est énorme, particulièrement dans les pays dont le secteur de l'élevage joue un rôle économique majeur. En Afrique du Nord et en Asie, elle représente un frein important au développement. Le Surra fut découvert en Inde en 1880 mais affecte l'élevage au moins depuis l'antiquité en Afrique et en Asie, et depuis son introduction par les Conquistadores (à partir du XV<sup>ème</sup> siècle) sur le continent américain. De nombreux pays d'Afrique, d'Amérique Latine et d'Asie souffrent d'avoir vu passer cette maladie dans leur paysage agricole, car l'aspect principalement chronique de la maladie entraîne le plus souvent un manque de conscience de son importance, et un désintérêt par les autorités. Ainsi, en Asie, très peu de mesures générales sont prises à l'encontre du Surra, et le contrôle se fait le plus souvent au niveau local, sans stratégie commune et intégrée. De plus, liée à cette absence de considération du Surra par les autorités politiques, la recherche peine parfois à approfondir les connaissances sur cette maladie. La trypanosomose à *Trypanosoma evansi* présente encore de nombreuses inconnues, handicapant la prise en charge raisonnée de ce fléau (Luckins 1988; Luckins 1998). Outre cet impact présent et bien réel, le Surra présente un risque important d'introduction et d'établissement dans certains pays occidentaux. Le récent épisode de Surra en France a confirmé ce potentiel, et le risque toujours croissant lié aux échanges commerciaux internationaux (Desquesnes, Bossard et al. 2008). De même, l'Australie craint l'introduction du Surra par ses proches voisins du pacifique (Philippines et Papouasie Nouvelle Guinée) (Reid 2002), mais à la différence de l'Europe elle a largement mis les moyens non seulement pour prévenir l'introduction du parasite sur son territoire mais également en anticipant une introduction accidentelle et en préparant un plan de réaction rapide pour le contrôle du parasite (AUSVETPLAN 2006). Tout ceci montre l'urgente nécessité de mettre en place ou soutenir les projets d'étude de *Trypanosoma evansi* à travers le Monde, afin d'en approfondir nos connaissances. Toutefois l'étude et la surveillance du Surra souffrent encore grandement du manque d'outils diagnostiques fiables et standardisés. Ceci impose une étape fondamentale d'étude de ces outils, leur évaluation, optimisation et standardisation. Ce travail s'inscrit dans cette démarche, dans le cadre de la mise en place d'un projet d'étude du Surra en Asie du Sud-Est, en abordant plus particulièrement l'étude de deux outils diagnostiques essentiels : la PCR classique et l'Ac-ELISA. Nous détaillerons ainsi le travail d'évaluation comparative de différents couples d'amorces PCR permettant la détection de *T. evansi*, réalisé en vue de la

mise en place de cet outil dans le laboratoire de parasitologie de la faculté vétérinaire à l'Université de Kasetsart (Bangkok, Thaïlande). Nous aborderons ensuite la mise en place et la standardisation d'un test sérologique Ac-ELISA de détection de l'infection à *T. evansi*, ainsi que son application à une enquête préliminaire portant sur l'élevage bovin laitier en Thaïlande.



# Partie I : Etude bibliographique

## 1. Généralités : Trypanosomose à *T evansi*

### 1.1. Le parasite

*Trypanosoma evansi* est un protozoaire sanguicole et tissulaire, parasite obligatoire, transmis principalement par les pièces buccales d'insectes hématophages (trypanosome du groupe Salivaria). *T. evansi* appartient au sous-genre Trypanozoon, qui rassemble également *Trypanosoma equiperdum* et *Trypanosoma brucei* (cf. Figure 1). *T. evansi* est monomorphe et ressemble aux formes longues et minces, ou intermédiaires de trypomastigotes (24  $\mu$  de long) de *T. brucei*, trypanosome pléomorphe transmis par les glossines. Les formes minces ont un long flagelle libre, et une extrémité postérieure renflée ou tronquée présentant un kinétoplaste petit et subterminal. Les formes intermédiaires ont un flagelle libre plus court, et une extrémité postérieure courte et pointue. *T. evansi* possède une membrane ondulante bien développée et sa taille est de 15 et 34  $\mu$ m avec une moyenne de 24 $\mu$ m. Son kinétoplaste est petit (0,6  $\mu$ m) et subterminal (cf. Figure 2). Dans cette espèce, on observe une tendance marquée à présenter des formes dyskinétoplastiques ou akinétoplastiques, en proportion variable selon les souches. (Hoare 1972)

Hoare postula que *T. evansi* avait évolué à partir de *T. brucei* par adaptation à une transmission mécanique par des vecteurs chez lesquels il ne réalise pas de cycle biologique, perdant ainsi son pléomorphisme. Il suggéra que cette adaptation ait pu avoir lieu suite à l'infection de dromadaires, à la limite nord de l'aire de répartition des mouches Tsé-Tsé. L'infection aurait ensuite persisté au dessus de cette zone par transmission mécanique. Différentes études taxonomiques, génétiques et biochimiques (isoenzymes), ont confirmé cette proximité avec *T. brucei* : *T. evansi* en aurait évolué en perdant la capacité de réaliser un cycle biologique chez la glossine, par perte des maxi-cercles kinétoplastiques (Borst, Fase-Fowler et al. 1987). Plus récemment, certaines études tendent à considérer *T. evansi* comme des souches dyskynétoplastiques (dK) ou akynétoplastiques (aK) de *T. brucei*, relayant *T. evansi* (ainsi que *T. equiperdum*) au rang d'une sous-espèce *T. brucei evansi* (et *T. brucei equiperdum*), suggérant la possibilité d'émergence d'autres souches dK ou aK à partir de *T. brucei*. (Lai, Hashimi et al. 2008). De même, Songa et al. (1990) soulignent la proximité génétique des minicercles de *T. evansi* avec ceux de *T.b. gambiense* plus qu'avec tout autre trypanosome africain. Ces deux derniers apparaissent proches des souches de *T.b. brucei* d'Afrique de l'Ouest, suggérant un cheminement évolutif commun (Songa, Paindavoine et al. 1990).

Par ailleurs, il a été remarqué à de nombreuses reprises, la particulière homogénéité génétique des souches de *Trypanosoma evansi* à travers le monde. La large distribution géographique, le grand spectre d'hôtes, et l'importante variabilité clinique induite par l'infection pourrait suggérer une variabilité génétique élevée, mais la comparaison d'isolats provenant d'Amérique du Sud, du Nigeria et du Soudan (Gibson and Gashumba 1983) a montré l'appartenance au même zymodème. Cette grande homogénéité a été confirmée par séquençage de gènes des minicercles sur différentes souches de différentes provenances (Borst, Fase-Fowler et al. 1987) ; (Songa, Paindavoine et al. 1990). Cette homogénéité pourrait être en particulier reliée au mode de transmission mécanique : l'absence de stade de développement dans le vecteur, empêchant notamment la réalisation d'échanges génétiques (Luckins 1988), et la sélection d'organismes hautement prolifériques (nécessité de fortes parasitémies pour la transmission mécanique).

La grande homologie observée avec *T. equiperdum* pose également de nombreux problèmes en ce qui concerne le diagnostic différentiel des deux parasites. Plus généralement, les communautés antigéniques qui se retrouvent entre les différents groupes de *Trypanosoma* rendent parfois les distinctions délicates à cause d'un grand nombre de réactions croisées. Par exemple, la plupart des souches de *T. equiperdum* expriment une isoVAT (Variable antigen type) de RoTat 1.2, qui est exprimé chez quasiment toutes les souches de *T. evansi* (Verloo, Magnus et al. 2001). Ceci explique en partie qu'un test basé sur la reconnaissance de ces antigènes (tel que le CATT/*T.evansi*) n'est pas en mesure de faire correctement la différence entre une infection à *T. evansi* et *T. equiperdum* (Claes, Verloo et al. 2003). Le CATT croise également avec *Trypanosoma vivax* (Desquesnes 2004) et certains antigènes ont pu être identifiés comme responsables d'une réactivité croisée entre *T. evansi* et *T. vivax* (Camargo, Uzcanga et al. 2004). En dehors des zones de présence de glossines, *Trypanosoma evansi*, *vivax* et *equiperdum* sont les seuls trypanosomes pathogènes à être en mesure de circuler, ce sont donc les deux principales réactions croisées à redouter dans l'identification de *T. evansi*. Toutefois, comme nous le verrons, l'homogénéité antigénique de *Trypanosoma evansi* présente également des avantages dans la diffusion internationale d'un test.

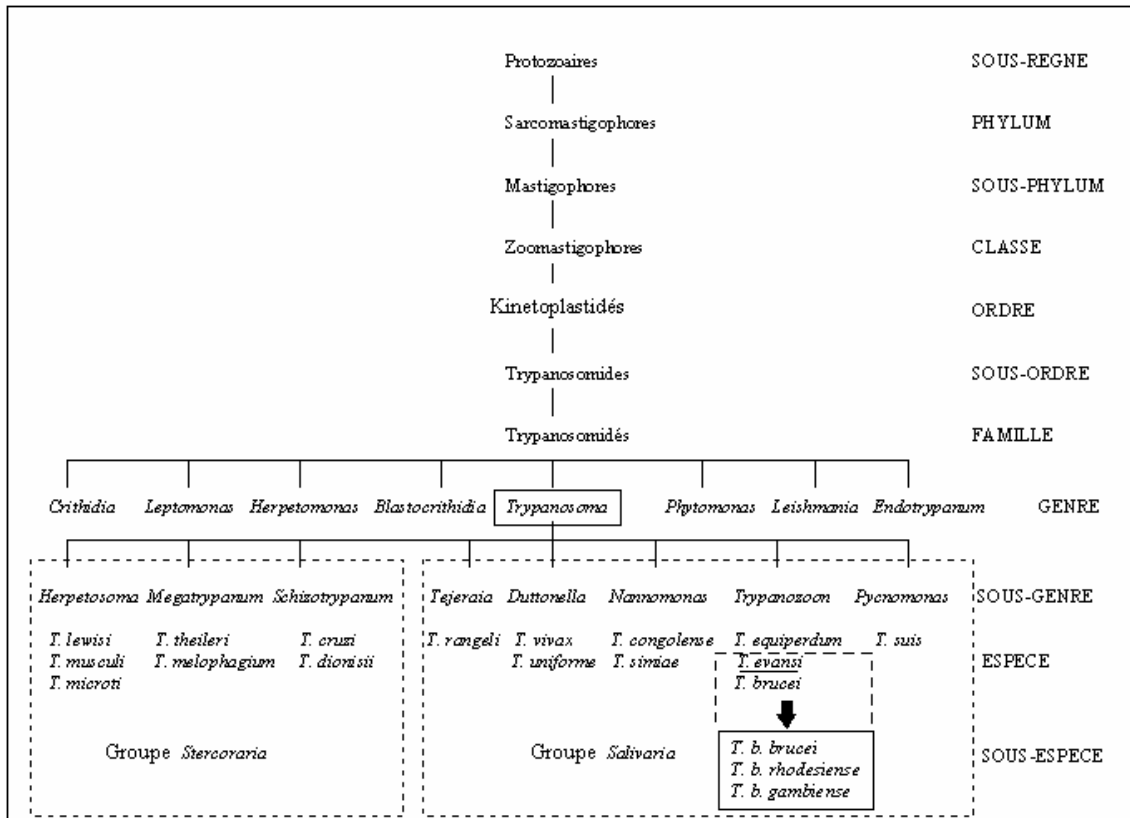


Fig. 1 : Positionnement de *Trypanosoma evansi* dans la classification taxonomique des Trypanosomatidés (D'après Vickermann, 1985)

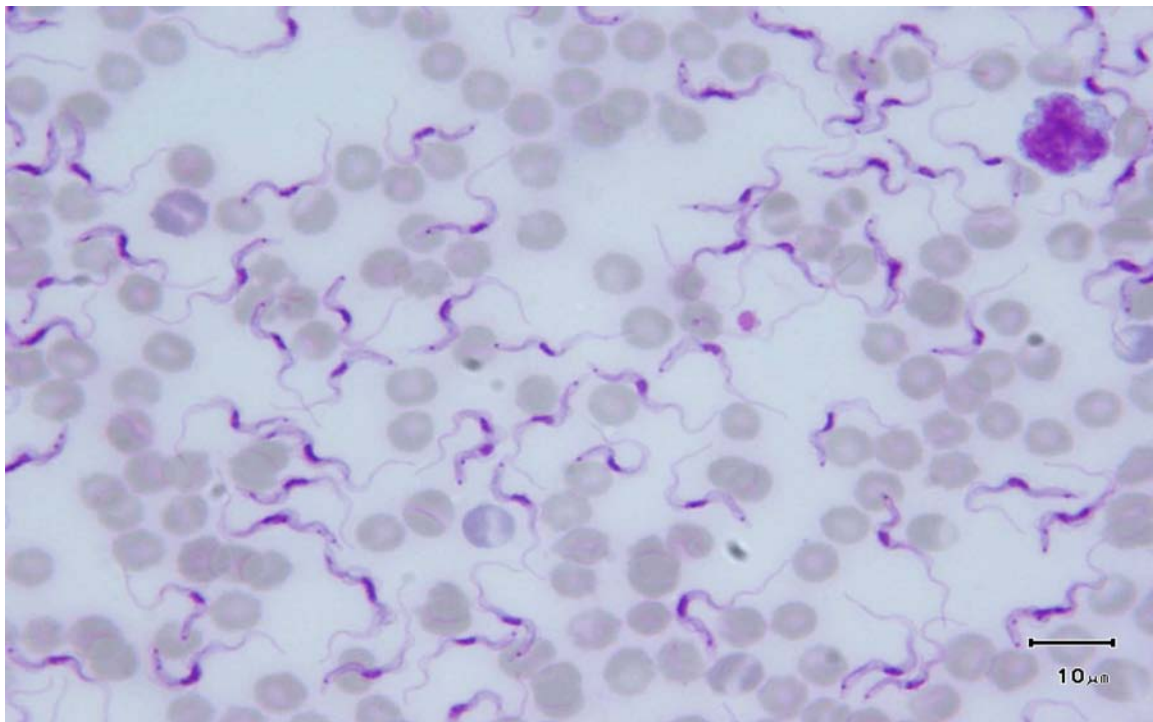


Fig. 2 : *Trypanosoma evansi* sur frottis de sang de rat, suite à isolement en Aveyron (cliché M Desquesnes)

## 1.2 L'hôte et les effets sur hôte

### 1.2.1 Les principaux hôtes de *T. evansi*

Comme nous l'avons déjà évoqué, *Trypanosoma evansi* était probablement initialement un parasite des dromadaires et des équidés. Il est aujourd'hui l'un des parasites possédant la plus grande diversité d'hôtes domestiques et sauvages. Il est en effet capable d'infecter tous les mammifères à l'exception de l'homme (sauf rares cas évoqués ci-dessous). Toutefois, des tendances s'observent quant aux hôtes principaux, et varient selon les localisations géographiques.

- Camélidés

En Afrique, ce sont les Camélidés qui sont les principaux hôtes. La forme aiguë est caractérisée par de la fièvre continue ou par pics coïncidant avec les pics de parasitémie. On observe également engourdissement, léthargie, écoulements oculaires et le poil est terne. Pourront également être fréquemment observés : anémie, oedèmes sous cutanés, pétéchies sur les muqueuses. Enfin, l'infection s'accompagne souvent d'une chute de la production laitière ou d'avortements. Parfois, ces formes aiguës conduisent l'animal au décubitus et à la mort. Dans la forme chronique, on observe une fièvre intermittente, une accentuation de l'émaciation (effacement de la bosse) et de la faiblesse, ainsi que l'apparition d'oedèmes en partie déclive et d'abcès cutanés. L'examen hématologique montre une anémie microcytaire et normochrome, une lymphocytose et une neutrophilie, ainsi qu'une hyperglobulinémie et une hypoalbuminémie. Des corps cétoniques sont détectables dans l'urine (Hussein et Gasmir, 1993). Enfin, l'infection à *Trypanosoma evansi* induit une baisse de la production laitière et un rôle important a été démontré dans la baisse de fertilité d'un troupeau (Baumann et al., 1992).

- Equidés

Les équidés sont parmi les hôtes les plus sensibles : les symptômes déjà cités s'y retrouvent avec souvent plus de sévérité (mortalité 50%), et peuvent s'étendre de 2 semaines à environ 4 mois : amaigrissement rapide, fièvre (accompagnée parfois de perte d'appétit), faiblesse générale, muqueuses pâles en raison de l'anémie (HT < 20%, Hb < 6g/dl et monocytose), parfois ictère, et adénomégalie. Des kératites ou des hémorragies de la chambre antérieure de l'œil sont parfois observées. S'y ajoutent des éruptions urticariennes sur la peau et des oedèmes des parties déclives, du ventre et des membres. L'incoordination

motrice et les convulsions sont des stades terminaux révélant l'invasion des tissus nerveux par le parasite. Dans les cas sur-aigus la mort peut survenir en l'absence de symptômes, et dans les cas chroniques les oedèmes déclives dominent le tableau clinique (Boonyawong *et al* 1975). L'issue est souvent fatale. En Amérique du Sud, on observe fréquemment une parésie importante avec croisement des membres, démarche ébrieuse, chutes fréquentes, caractéristiques du Mal de Caderas.

Les mules et ânes présentent souvent des formes plus chroniques que les chevaux, ainsi que des formes asymptomatiques. Curasson (1943) cite de nombreux cas de rémissions spontanées (Curasson 1943). Ils pourraient ainsi jouer un rôle de réservoir dans certaines régions.

- Bovins

Chez les Bovins, l'infection est souvent chronique et asymptomatique, bien qu'il y ait une possibilité de formes aiguës avec des signes cliniques similaires à ceux décrits précédemment. La présence de *Trypanosoma evansi* en Asie est caractérisée par l'importance particulière de ces formes cliniques chez les bovins et les buffles.

Chez les bovins laitiers, le signe principal est la chute de production laitière pouvant être totale chez 25% des animaux infectés, et chuter de 20 à 35% chez les autres (Sarataphan *et al* 1989) (Pholpark, Pholpark *et al.* 1999). Les avortements et de la mortinatalité sont aussi observés (Kashiwazaki, Pholpark *et al.* 1998). Chez les bovins à viande on observe davantage des signes nerveux : tremblement, salivation, mouvement en cercle, bonds, pertes de l'équilibre et convulsions dans les phases terminales.

Lors des formes chroniques, le caractère invasif de *Trypanosoma evansi* pour les tissus de l'hôte lui permet d'atteindre des localisations profondes peu soumises à la pression immunitaire et aux molécules thérapeutiques, dont il peut ressortir à l'occasion d'une dégradation de l'état de l'animal liée à une autre maladie, un stress métabolique ou alimentaire, etc...

- Buffles

Chez les buffles la maladie peut souvent passer inaperçue ; dans les autres cas les signes cliniques sont : raideur, conjonctivite, amaigrissement, oedème des membres, fièvre, inappétence, dyspnée, anémie, faiblesse (Löhr, Pholpark *et al.* 1985). Il a également été rapporté une diminution des capacités reproductrices, comprenant des augmentations de l'intervalle inter-oestrus, des avortements tardifs et de la mortinatalité (Löhr, Pholpark *et al.* 1986). Enfin, l'infection à *T. evansi* peut également engendrer une diminution des capacités

de travail, particulièrement importante dans le cas des buffles souvent élevés à cet usage en Asie (Pearson 1999).

- Porcs

Chez le porc, on observe souvent des rashes cutanés sur les oreilles ainsi que les faces latérales et inférieures du corps, de la mamelle ou du scrotum. Les avortements peuvent apparaître à tous les stades de gestation, mais le plus souvent à 1-2 mois. Des signes nerveux de convulsion et de « tourner en rond » sont observés, précédant parfois la mort. Toutefois, les manifestations cliniques sont le plus souvent légères, et l'effet sur les porcs à l'engrais est faible (Tuntasuvan and Luckins 1998).

- Autres espèces touchées

De nombreuses autres espèces domestiques (ovins, caprins, chien, chat, éléphant,...), ou sauvages (singe, cervidés, rongeurs, ours, carnivores sauvages etc...) présentent des réceptivités et des sensibilités variables (Luckins 1998).

Les chiens sont particulièrement sensibles et présentent souvent des hémorragies oculaires et des décompensations cardiaques fatales liées à des parasitémies extrêmement élevées ; ils exercent en outre un rôle de sentinelle autour des abattoirs et auprès de la faune sauvage (chiens de chasse).

Les infections dans la faune sauvage arrivent probablement après introduction du parasite dans la faune domestique, expliquant l'importante sensibilité de certains animaux sauvages lorsqu'ils sont pour la première fois en contact avec cet agent pathogène (Luckins 1998).

Par ailleurs, de rares cas humains ont récemment été documentés en Inde (Joshi, Shegokar et al. 2005). Bien que l'un des malades souffrait d'une déficience génétique ayant pu causer une réceptivité accrue au parasite, le potentiel zoonotique de *Trypanosoma evansi* reste à étudier et à surveiller.

- Les réservoirs potentiels

Une étude sur les rongeurs menée en Thaïlande a pu démontrer l'infection par *T. evansi*, particulièrement dans les zones agricoles et forestières (Jittapalapong, Inpankaew et al. 2007). Toutefois, le rôle potentiel de réservoir reste à explorer, d'autant que le caractère crépusculaire ou nocturne de ces animaux n'est pas sans soulever certaines questions. En effet, leurs phases d'activité ne correspondant pas à celle des vecteurs classiquement

identifiés, les questions de leur mode d'infection et des vecteurs mis en cause restent à élucider.

Toutefois, les animaux domestiques jouent aussi fréquemment le rôle de réservoir. La chronicité des infections chez les camélidés, bovins et buffles fait de ces espèces de bons réservoirs permettant de pérenniser l'infection dans une région. En revanche, les manifestations cliniques plus aiguës chez le chien et le cheval pourraient en faire de mauvais réservoirs à long terme, mais de bons amplificateurs de foyers épizootiques. Enfin, la chèvre présente souvent des parasitémies basses et il est communément admis que son rôle de réservoir est probablement faible. Toutefois, il reste encore beaucoup à découvrir sur le rôle respectif de chaque espèce hôte.

Concernant la faune sauvage, à titre d'exemple, nous pouvons citer le capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) en Amérique du Sud, l'un des plus gros rongeurs qui présente la capacité d'héberger *T. evansi*, et de supporter de fortes parasitémies sans développer les signes cliniques classiques d'une infection. De plus, l'abondance de cet animal, notamment dans la région du Pantanal au Brésil, et la forte prévalence de l'infection, en font un réservoir particulièrement efficace, et pourrait en faire un acteur important du cycle incluant chevaux, bovins et chiens dans cette région. (Herrera, Davila et al. 2004). Ce rôle de réservoir de la faune sauvage est, en Amérique du Sud, partagé avec l'ocelot, le coati, la chauve-souris vampire (cf. vecteurs), le pécarì à lèvres blanches, le pécarì à collier, le cochon sauvage, etc... Nous pouvons également citer l'antilope en Afrique, le cerf rusa (*Cervus timorensis rusa*) et le cochon sauvage en Indonésie, le cerf axis (*Axis axis*) et sambar (*Cervus unicolor*) au Rajasthan. (Reid, Husein et al. 2001; Herrera, Davila et al. 2004).

Par ailleurs, un travail récent fait état d'infections expérimentales de jeunes pigeons, soulevant des questionnements sur le rôle potentiel des oiseaux dans l'épidémiologie de *T. evansi* (Mandal, Laha et al. 2008).

### **1.2.2 L'immunodépression induite par *T. evansi***

Une manifestation clinique de l'infection à *T. evansi* semble partagée par la plupart des hôtes : l'induction d'une immunodépression. Elle semblerait en partie liée à une activation polyclonale des lymphocytes B produisant une grande quantité d'IgM aspécifiques voire auto-réactifs. La diminution des lymphocytes T interviendrait également dans ce mécanisme (Onah, Hopkins et al. 1998) ainsi que la baisse du taux sanguin de facteurs du complément. Chez le mouton, il a été démontré une diminution significative de la réponse immunitaire au vaccin contre *Pasteurella haemolytica* (Onah, Hopkins et al. 1998). Chez le buffle, une diminution de la capacité à produire une réponse à médiation cellulaire et

humorale contre un antigène hétérologue est induite par l'infection à *T. evansi*, ceci pouvant compromettre le développement d'une réponse immunitaire protectrice lors de vaccination. Ceci concorde avec les observations d'échecs vaccinaux contre *Pasteurella multocida* (septicémie hémorragique) chez le buffle, dans des zones du Vietnam où *T. evansi* est enzootique (Holland, My et al. 2001). Chez les porcs, malgré une clinique peu marquée et un effet non significatif sur les performances de croissance, l'infection à *Trypanosoma evansi* diminue la réponse vaccinale contre la peste porcine classique (Holland, Do et al. 2003).

Cette immunodépression induite par l'infection à *T. evansi* a également une autre conséquence : la diminution de résistance face à d'autres infections naturelles. Ainsi, il a été démontré une interaction avec *Haemonchus contortus* dont la période prépatente est diminuée et la pathogénicité augmentée lors d'infection concomitante avec *T. evansi* chez la chèvre (Sharma, Chauhan et al. 2000).

L'immunodépression est donc à la fois responsable de pathologies intercurrentes, mais également d'échecs vaccinaux risquant de compromettre la réussite de campagnes de lutte contre d'autres agents pathogènes.

### 1.2.3 Les traitements

Il existe principalement 4 molécules : l'acéturate de diminazène (Bérénil ND) très présent en Thaïlande, le chlorure d'isométymidium (Trypamidium ND, Samorin ND), le sulfate et chlorure de quinapyramine (Antrycide Pro-Salt ND) et enfin, plus récemment développé suite à la toxicité importante des autres molécules chez le dromadaire, la mélarsamine (Cymelarsan ND) encore non disponible pour le bétail en Thaïlande (bien qu'il en existe une forme contre les filaires du chien : Immiticide ND). Ces différentes molécules ont des efficacités et des toxicités variables selon l'animal traité.

Les résultats d'une étude du Bérénil ND et du Samorin ND menée en Thaïlande ont montré une dose de Bérénil efficace pour les bovins de 3,5 mg/kg, ou de 1 mg/kg de Samorin, mais avec des réapparitions de cas dans les trois mois (sans être en mesure de déterminer s'il s'agit d'une résurgence ou d'une réinfection). Pour les bovins, la dose de 7 mg/Kg recommandée par le fabricant pour le traitement de *T. brucei* est probablement plus adaptée à *T. evansi* que la dose de 3,5 mg/Kg recommandée pour *T. vivax* et *T. congolense*. Les buffles nécessitent des doses plus élevées : le Bérénil est inefficace à 5 mg/kg, et on doit atteindre 8 mg/kg, avec encore 5% d'inefficacité après deux semaines (Kashemsant 1989). En revanche, le Samorin est efficace chez le buffle à 0,5 mg/kg. Pour les porcs, le Bérénil à 3,5 mg/kg semble être efficace. L'introduction du Cymelarsan pourrait apporter une



solution intéressante aux échecs de traitements observés fréquemment avec l'acéturate de diminazène.

Quoiqu'il en soit, il est toujours difficile de savoir si ces traitements permettent de blanchir totalement l'animal ou entraînent seulement une amélioration clinique par destruction des parasites circulants, sans toucher les parasites en localisation profonde. En effet, des parasites présents dans des compartiments biologiques extra-vasculaires (liquide céphalo-rachidien, humeur aqueuse de l'œil) ne recevraient que des doses sub-létales et donc inefficaces, de trypanocides, et pourraient ré-envahir le sang plusieurs mois ou années plus tard. Il est toutefois souvent difficile de différencier ce phénomène, des phénomènes de résistance fréquemment observés et dont l'importance semble être croissante. C'est le cas en Afrique sub-saharienne où les résistances aux trypanocides employés dans le contrôle des trypanosomoses africaines engendrent des contraintes croissantes sur la production de bétail (Eisler, Brandt et al. 2001). Ceci a également pu être observé en Chine où certaines souches présentent des résistances totales aux doses curatives de Suramin ou d'Antrycide ND (Zhou, Shen et al. 2004), tout comme au Soudan (El Rayah, Kaminsky et al. 1999). Des résistances à l'acéturate de diminazène ou au chlorure d'isometamidium ont également été identifiées en Amérique du Sud (Desquesnes and Tresse 1999).

Un certain nombre de gènes ont été identifiés comme intervenant dans les mécanismes de résistance. Pour la mélarsamine la pénétration dans le trypanosome se fait grâce à l'intervention de transporteurs de bases puriques de type P2 mais également par le transporteur de pentamidine à haute affinité (HAPT) (Ross and Barns 1996). L'intervention du transporteur adénosine TevAT1 a été démontré dans l'effet trypanocide de l'acéturate de diminazène, ainsi que son intervention dans les mécanismes de résistance de certaines souches de *T. evansi* (Witola, Inoue et al. 2004). Le gène TeDR40 a également été identifié comme associé à la résistance au Bérénil de *T. evansi* (Witola, Tsuda et al. 2005). De plus, des observations sur souris ont montré qu'un déficit du système immunitaire pouvait favoriser l'émergence de souches résistantes à la mélarsamine, l'acéturate de diminazène et le chlorure d'isoméamidium.

Un enjeu important des années à venir est la mise au point de méthodes diagnostiques simples des résistances afin d'en évaluer plus justement l'importance.

### 1.3 Les vecteurs

*Trypanosoma evansi* est un trypanosome transmis principalement de manière mécanique par des insectes hématophages. En raison de la taille de leurs pièces buccales les insectes les plus impliqués dans cette transmission sont les Tabanidés, notamment ceux du genre *Tabanus*. En effet, leur morsure est douloureuse et provoque des réactions de défense de l'hôte, ce qui entraîne un fractionnement du repas de l'insecte. Ceci augmente le risque de transmission car l'insecte délogé de son hôte (potentiellement infecté) doit compléter son repas sur un animal (potentiellement sain). Chez les Tabanidés, la quantité de sang portée par les pièces buccales a été estimée à 0,01µl (Foil, Adams et al. 1987), ce qui souligne la nécessité de fortes parasitémies ( $> 10^6/ml$ ) chez les animaux infectés pour jouer le rôle de source d'infection. En Thaïlande, une étude entomologique a permis d'identifier 5 espèces majoritaires : *Tabanus megalops*, *T. rubidus*, *T. rufiscutellatus*, *T. striatus* et *T. oxybeles* (Tuntasuvan and Luckins 1998), les genres *Haematopota*, *Chrysops* et *Stomoxys* étant plus rarement impliqués. Les stomoxes semblent également pouvoir réaliser la transmission, mais leur repas est souvent moins interrompu que les tabanidés et le volume sanguin transporté est plus faible, ce qui limite la capacité de transmission mécanique (Luckins 1988). Cependant une observation de terrain a pu mettre en évidence la présence de petites mouches suceuses (non identifiées) profitant de l'effraction cutanée pour se nourrir, et délogeant ainsi les stomoxes de leur site de piqûre, ce qui pourrait conduire à un fractionnement du repas et une augmentation des risques de transmission mécanique à la fois par les stomoxes et par les mouches suceuses.

Il existe un autre cas plus atypique de transmission de *Trypanosoma evansi* en Amérique du Sud par les chauves souris vampires (*Desmodus rotundus*) qui agissent comme de véritables vecteurs biologiques, en s'infectant le plus souvent sur des chevaux, multipliant le parasite qui se localise en particulier dans la salive, et en recontaminant un autre animal lors du repas suivant. Les vampires pouvant se contaminer entre eux, leurs colonies constituent des réservoirs vrais du parasite (capables de maintenir longtemps le parasite en l'absence de l'hôte principal).

Il existe d'autres possibilités de transmissions à étudier de manière plus approfondie :

- la possibilité d'une transmission trans-placentaire a été à plusieurs reprises démontrée
- la transmission iatrogène (aiguille contaminée) doit également être considérée mais son impact reste à évaluer
- la transmission par les muqueuses buccales a déjà été démontré chez le vampire, la souris et les carnivores domestiques (Moloo, Losos et al. 1973;

Raina, Rakesh-Kumar et al. 1985) et est probablement présente également chez les carnivores sauvages. L'importance épidémiologique de cette voie de transmission doit également être investiguée

- des questions se posent toujours quant à la possibilité d'une transmission sexuelle ou par voie lactéale

- enfin, la présence de *Trypanosoma evansi* chez les rongeurs soulève d'importantes questions étant donné leur mode de vie principalement crépusculaire ou nocturne, incompatible avec une transmission par les Tabanidés. Ces derniers se contamineraient par voie orale, mais il a également été suggéré l'intervention de tiques dans la transmission ; en effet plusieurs études ont montré la possibilité d'infections expérimentales et naturelles de tiques par des trypanosomes (Shastri and Deshpande 1981; Thekiso, Honda et al. 2007). En revanche, le retour de l'infection depuis les rongeurs vers les ruminants par ingestion accidentelle de rongeurs semble peu probable. La réalisation du cycle épidémiologique est donc encore mal expliquée.

#### **1.4 Epidémiologie, facteurs de risques et contrôle du Surra**

Etant une maladie vectorielle, la trypanosomose à *Trypanosoma evansi* présente une certaine saisonnalité. Le schéma le plus classique est l'augmentation des populations de Tabanidés à la saison des pluies, et donc de la capacité vectorielle et de l'incidence de l'infection. C'est le cas dans de nombreuses régions : en Inde, au Tchad (Mahmoud, Gray et al. 1980), en Thaïlande et probablement une part importante du reste de l'Asie (Löhr, Pohlpark et al. 1985). Toutefois ce n'est pas le cas partout, puisque certaines régions comme le Soudan présentent une corrélation inverse (Elamin, el Bashir et al. 1998), ou encore le Kenya où aucun lien n'a pu être mis en évidence avec la saison (Ngaira, Bett et al. 2002) mais plutôt avec les conditions d'élevage. Ces observations donnent un premier aperçu de la diversité des situations épidémiologiques de par le monde.

Le stress semble avoir un rôle important. Il y en a plusieurs types :

- stress lié au travail : plusieurs études montrent une corrélation entre le stress physique subi par un animal au cours de son activité journalière et ses risques d'héberger le parasite, comme c'est le cas des chevaux de ranch et des chevaux de tourisme dans la région du Pantanal au Brésil (Herrera, Davila et al. 2004). Toutefois, le lien entre la charge accrue de travail et le risque d'infection n'a pu être prouvé en conditions contrôlées (Payne, Djauhari et al. 1991).

- stress métabolique lors de période de gestation ou de pics de lactation pourraient également être un facteur impliqué dans la résurgence d'infections silencieuses chez les bovins ou les buffles

- stress alimentaire en période sèche lorsque la nourriture se fait plus rare : il a en effet été montré que les périodes de restriction alimentaire étaient favorables à l'augmentation d'incidence de l'infection. De plus il est expérimentalement possible de provoquer une résurgence de la maladie chez des brebis présentant une forme cryptique de l'infection (indétectable) par restriction alimentaire (Desquesnes 2004).

- stress lié à d'autres infections concomitantes : d'autres infections parasitaires ont montré leur capacité à diminuer les défenses contre *Trypanosoma evansi*. Cela a été particulièrement observé lors de fasciolose (Löhr, Pohlpark et al. 1985).

La conduite d'élevage est un facteur important influant sur le risque d'infection. En Afrique, il a été montré des variations de prévalence selon le mode d'élevage nomade ou sédentaire (Elamin, el Bashir et al. 1998; Ngaira, Bett et al. 2002). Toutefois là encore, les résultats sont contradictoires et montrent la diversité des schémas épidémiologiques et la complexité d'interactions de nombreux facteurs.

En lien avec cette conduite d'élevage, les mouvements d'animaux semblent être déterminants dans la répartition et la diffusion du Surra. En effet, la transmission mécanique par les vecteurs n'autorise qu'une transmission à brève distance. Les animaux doivent donc être mis en contact ou à proximité pour que la transmission puisse avoir lieu. Ceci est le cas lors de regroupements d'animaux (points d'eau, pâtures communes, etc...), mais cela explique également que le principal mode de dissémination géographique de l'infection soit l'introduction d'animaux infectés, notamment, lors d'échanges commerciaux. Ainsi, il est probable que les transports d'animaux, en particulier les transports transfrontaliers contrôlés ou non, soient un facteur important intervenant dans la répartition de la maladie dans un pays. En Thaïlande, l'introduction d'animaux depuis le Myanmar et le Laos, sont probablement des sources importantes d'introduction de *T. evansi* sur le territoire. Notons de plus que les conditions de transports entraînent certainement un stress à même de réactiver des infections latentes (passées inaperçues), aboutissant à l'introduction d'animaux en plein pic de parasitémie. Les échanges transfrontaliers sont donc très importants à étudier dans une stratégie de contrôle de la maladie.

Les stratégies de contrôle sont souvent basées sur la limitation de la capacité vectorielle des insectes piqueurs par l'utilisation d'insecticides, pièges ou écrans. Des stratégies de traitements préventifs ou curatifs, saisonnière ou sur toute l'année sont parfois mis en place selon l'épidémiologie et l'importance locale de la maladie.

## 1.5 L'importance de *Trypanosoma evansi* en Asie

### 1.5.1 La présence du Surra en Asie

L'Asie se caractérise par la présence quasi exclusive de *Trypanosoma evansi* comme trypanosome pathogène (à l'exception de *T. equiperdum* dont la distribution géographique est très mal connue). Ceci est un atout en termes de diagnostic puisque les réactions croisées de nombreux tests avec d'autres espèces de trypanosomes sont ainsi rendues moins problématiques. Reste cependant *Trypanosoma equiperdum* dont la distinction avec *T. evansi* est encore peu claire et *Trypanosoma theileri*, trypanosome non pathogène des ruminants mais qui peut toutefois entraîner un défaut de spécificité des tests diagnostiques. *Trypanosoma evansi* est largement répandu dans toute l'Asie. Il fut identifié pour la première fois en 1907 en Thaïlande. Plusieurs études à travers l'Asie du Sud-Est permettent de se rendre compte de l'ampleur de la présence du parasite dans cette région.

Des données collectées dans le nord du Vietnam entre 1988 et 1995 dans 4 provinces font état chez le buffle de prévalence s'échelonnant de 13,1% à 30,1% par SAT (Slide agglutination test) et CATT (Thu, My et al. 1998). Dans certaines régions d'Indonésie où la densité d'élevage est très forte, 61% des bovins de races locales et 40% des bovins de races croisées importées étaient séropositives pour *T. evansi* (Ac-ELISA) (Payne, R.C., 1988, rapporté par (Reid 2002)). Dans une enquête menée en Malaisie sur l'élevage bovin laitier, la présence d'antigène de *T. evansi* a été détectée avec une prévalence de 24 à 55% selon les âges (prévalence croissante avec l'âge) et les stades physiologiques (gestation, lactation, ...) des animaux (Cheah, SANI et al. 1999).

En Thaïlande, la première investigation sur le Surra a été menée en 1980 sur 1396 buffles d'eau dans la région Nord du pays, et ont montré une prévalence de 20% (fixation du complément) avec un pic observé en saison des pluies (Lohr et al 1985). Kashemsant et al. ont conduit une enquête épidémiologique entre 1984 et 1989 dans le Nord de la Thaïlande et ont déterminé des taux d'infection chez les bovins et les buffles de 13% et 20% respectivement (Kashemsant 1989). En 1990, une enquête menée à travers le pays par Nishikawa sur 5331 buffles et 428 bovins (Immuno fluorescence indirecte) a montré des prévalences de 38,6% chez les buffles et 50% chez les bovins avec d'importantes variations selon les régions. Une enquête sur les porcs a été réalisée en 2005 (Holland, Thanh et al. 2005) et a montré que 23% des porcs testés (77) étaient positifs en ELISA. Toutefois, peu de données sont disponibles sur le statut des élevages porcins en Thaïlande.

De manière générale, la connaissance des prévalences de *Trypanosoma evansi* dans l'élevage en Thaïlande est encore très parcellaire mais ces observations confirment le

besoin de développement d'enquêtes afin de mieux connaître les zones les plus affectées et de mieux comprendre la répartition de la maladie et les facteurs influençant cette répartition.

### **1.5.2 L'impact du Surra en Asie et dans le monde**

L'impact découle des répercussions cliniques et subcliniques de l'infection à *T. evansi* décrites précédemment. A l'échelle de l'éleveur, les coûts sont liés à la dépréciation des animaux lors de la vente, aux pertes en viande, graisse, lait, aux pertes dues aux avortements, à l'infertilité ou aux effets indirects sur la croissance des jeunes, à la diminution des capacités de transport et de travail, et à la mortalité, auxquels il faut rajouter le coût des traitements et le coût engendré par l'apparition de maladies intercurrentes. A une échelle plus générale, nous avons vu l'impact que pouvait avoir *Trypanosoma evansi* sur les campagnes de santé animale.

Il est souvent difficile d'avoir une évaluation précise de l'impact économique d'une telle maladie car l'effet sur la production est encore mal estimé, et combine l'effet d'un portage chronique asymptomatique et de pics épidémiologiques. Toutefois, certains travaux, dont nous citerons quelques exemples, donnent une idée intéressante de l'ampleur de l'impact que peut avoir cette infection.

Dans de nombreux pays d'Afrique, le dromadaire joue un rôle important dans le pastoralisme. *Trypanosoma evansi* engendre de nombreuses pertes : dépréciation des animaux lors de la vente, pertes en viande, lait, pertes dues aux avortements, à l'infertilité ou aux effets indirects sur la croissance des chamelons, diminution des capacités de transport, coût des traitements et mortalité. Une approche participative parmi la communauté pastorale au Kenya a pu montrer que le Surra est l'une des maladies ayant le plus lourd impact socio-économique sur les éleveurs de dromadaires dans cette région. (Mochabo, Kitala et al. 2006) En Amérique du Sud, dans la région du Pantanal au Brésil, le Surra touche principalement l'élevage bovin qui est la principale activité économique de la région, ainsi que les chevaux qui jouent un rôle très important dans l'élevage. Une étude économique a permis de montrer un coût global de 2,4 millions US\$ par an (soit une moyenne de 2143US\$/élevage/année) et une mortalité de 6462 chevaux (d'une valeur moyenne de 375US\$/animal) par an dans cette région. Ces coûts sont peu supportables à l'échelle de l'élevage comme de la région, et justifient la prise en charge de cette maladie à travers des plans de contrôle adaptés (Seidl, Dávila et al. 1999).

En ce qui concerne l'Asie, l'impact est souvent sous-estimé, d'une part en raison d'une faible identification et d'une sous-déclaration des cas, et d'autre part, par l'estimation des coûts directs sans prendre en compte les coûts indirects, moins bien définis et évalués.

Ainsi, aux Philippines, il a été estimé que *T. evansi* pouvait engendrer une perte de plus de 1,1 millions US\$ rien que par la mortalité induite en 9 ans, mais une seconde estimation suggère de multiplier au moins par 5 à 7 cette première estimation (Manuel 1998). En Indonésie, Peternakan estime les pertes annuelles par mortalité ou morbidité à 28 millions US\$ (Reid 2002). Il reste encore un travail important pour estimer plus précisément les pertes indirectes liées aux diminutions de production, bien que certains travaux aient pu identifier des pertes liées à la diminution de croissance des bovins à l'engraissement d'environ 7,6 kg en trois mois (soit 12,34US\$ par animal infecté en 1994) (Payne 1994), des pertes liées à la diminution de la production laitières de 25 à 30% et totale chez 25% des animaux infectés (Pholpark, Pholpark et al. 1999), une réduction de la capacité de traction jusqu'à 30% chez les buffles en Indonésie (Pearson 1999). Finalement, un autre effet économique noté en Indonésie et aux Philippines est la vente des animaux malades au lieu de les soigner, ce qui engendre une baisse de la valeur à la vente d'environ 40% (R. Mercado rapporté par Reid (Reid 2002)). Plus récemment, un modèle d'évaluation de l'impact de foyers de *T. evansi* a été mis au point par Robert Dobson (Université de Murdoch, Australie) à partir de données issues d'études menées au Philippines mais nécessite d'être adapté et validé pour être utilisé dans d'autres régions d'Asie du Sud-Est (Dobson 2008).

Il existe également des estimations ponctuelles réalisées lors de foyers. C'est le cas d'une estimation réalisée par Siriwan *et al.* en 1987 lors d'un foyer dans un élevage intensif de porcs. Les pertes totales ont ainsi été estimées à 8500 US\$ (Indrakamhang 1998). Une évaluation des coups de traitements pour des prévalences de 12,5%, 20% et 4,6% chez les bovins, buffles et porcs respectivement, atteindrait les 7,76 millions US\$ (Tuntasuvan and Luckins 1998). Toutefois, très peu de travaux ont été réalisés sur l'estimation de l'impact économique global en Thaïlande. Ce constat justifie l'intérêt porté à ce pays dans l'étude de la trypanosomose à *T. evansi* en Asie.

De manière générale, il faut noter un manque de données sur les effets économiques des infections subcliniques, et donc sur l'impact réel de *Trypanosoma evansi* à l'échelle de l'élevage et du pays. Ce manque de données est un grand handicap à la prise de conscience de l'importance de cette infection par les autorités, et donc à la mise en place de programmes de contrôle adaptés, organisés et efficaces.

### **1.5.3 Le projet initié sur *T. evansi* en Asie du Sud-Est**

C'est de ce besoin d'informations qu'est né le projet de collaboration entre le CIRAD (Montpellier, France) représenté par le Docteur Marc Desquesnes, et l'unité de parasitologie de la faculté vétérinaire de l'Université de Kasetsart (Bangkok, Thaïlande). L'objectif global du projet est d'accroître les connaissances et la compréhension de l'épidémiologie de la

trypanosomose à *Trypanosoma evansi* en Thaïlande puis dans l'ensemble de l'Asie du Sud-Est, pour élaborer des mesures de contrôle efficaces et adaptées. Le projet se découpe selon 4 grands axes de recherche concernant :

- 1) Diagnostic et épidémiologie : améliorer et appliquer des outils de diagnostic standardisés permettant de générer les connaissances sur la prévalence, la distribution et la circulation du parasite chez ses hôtes et réservoirs, mais également identifier ses vecteurs, déterminer et modéliser les conditions de sa transmission ;
- 2) Impacts : approfondir les connaissances de la pathogénie et évaluer et modéliser les impacts directs (médicaux et économiques) et indirects de l'infection (y compris la problématique de l'immunodépression);
- 3) Traitement : approfondir les connaissances sur le portage extra-vasculaire, optimiser les traitements et développer une surveillance des chimiorésistances ;
- 4) Zoonose ? : évaluer la possibilité d'émergence et les modalités de transmission d'une nouvelle forme de trypanosomose humaine due à *Trypanosoma evansi*.

Finalement, le projet a pour but ultime de créer un réseau d'information et élaborer sur ces bases des moyens de contrôle de *Trypanosoma evansi* en Asie du Sud-Est.

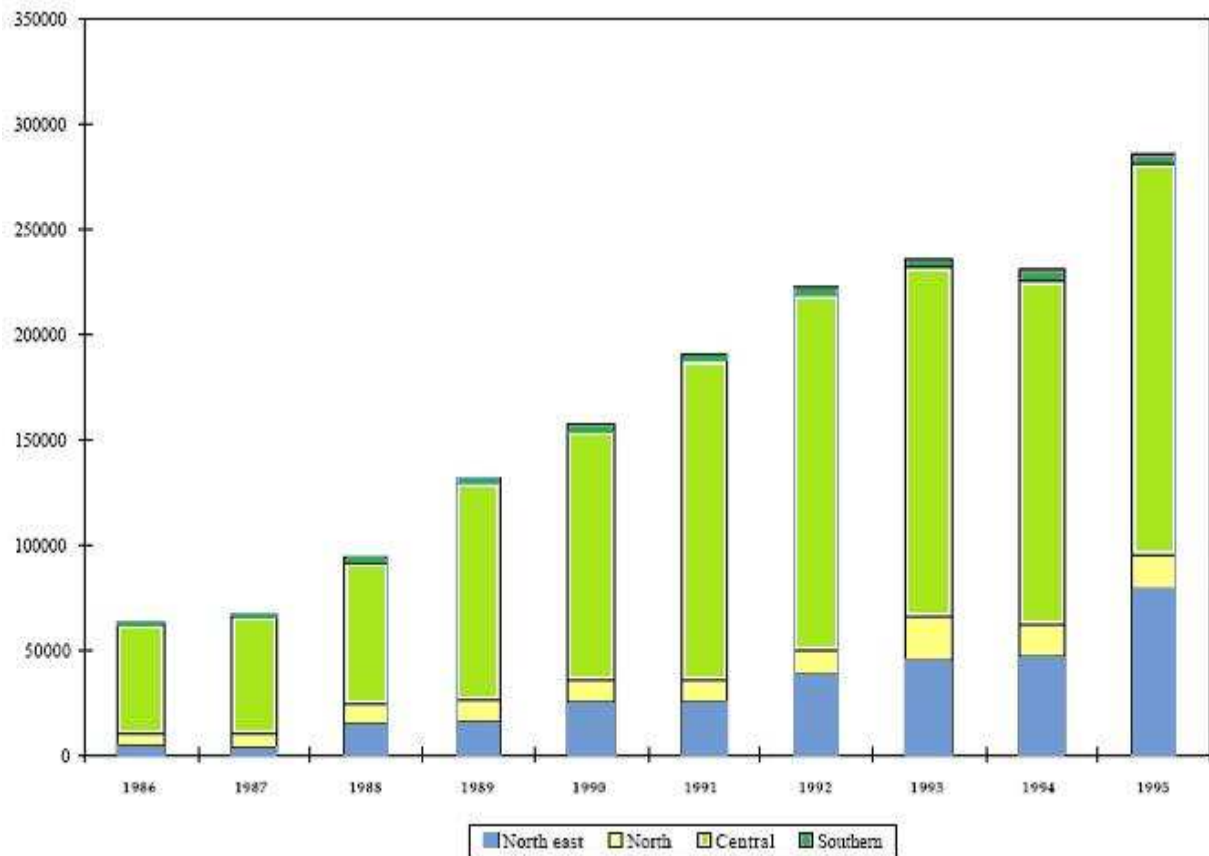
La première étape de ce projet se base ainsi sur les enquêtes épidémiologiques menées en Thaïlande, permettant d'estimer les prévalences en terme de maladie, de portage du parasite ou enfin de séropositivité. Un passage obligé dans cette quête d'informations est donc la mise en place d'outils diagnostics fiables, applicables à des enquêtes de grande envergure et standardisés afin de pouvoir diffuser cet outil à travers le réseau présent en Thaïlande et dans les pays voisins et récolter des données cohérentes.



## **2. Description de l'élevage bovin laitier en Thaïlande**

Dans les années 40-50, l'élevage laitier était restreint à un petit nombre d'éleveurs Indiens ou Pakistanais en périphérie de Bangkok, à des élevages expérimentaux au sein du Department of Livestock Development (DLD), ou à l'Université de Kasetsart sous l'impulsion du Ministère de l'agriculture. A partir de 1950, le gouvernement est beaucoup intervenu et a même orchestré le développement de tous les niveaux de cette industrie : importation du cheptel, soutien et protection de la production, et rôle de coordination entre les coopératives de producteurs et les compagnies laitières, permettant aux fermiers de vendre la totalité de leur lait cru à des firmes privées bien placées sur le marché national. Durant les années 1993-1995, le taux de croissance de l'industrie de l'élevage laitier a été stimulé par un programme gouvernemental visant à fournir 260 jours par an aux écoles et garderies d'enfants du lait provenant des systèmes de production thaïlandais exclusivement, et principalement du lait cru. Ceci a considérablement élargi le marché du lait et par conséquence, l'industrie laitière. D'autre part, une campagne pour promouvoir la consommation de lait, ainsi que l'augmentation du pouvoir d'achat de la classe moyenne a engendré une croissance continue de l'industrie laitière pendant 20 ans. L' « Organisation pour la Promotion de l'Elevage Laitier » a joué un rôle important dans l'introduction des nouvelles technologies et dans l'organisation de la filière, surtout dans la région centrale. Privatisé en 1990, c'est toujours une des plus grandes organisations de producteurs. De plus, jusqu'à 2003, des mesures de protection du marché ont pu être maintenues, obligeant tout acquéreur de lait écrémé en poudre, à acquérir également du lait cru domestique dans un rapport de 1 à 20. Ces mesures ne sont désormais plus compatibles avec les exigences du commerce international édictées par l'OMC.

Malgré une croissance très forte sur les 20 premières années, la limitation des capacités de production atténue cette croissance qui stagne à 5-6 % contre une moyenne de 15,4% les premières années. Le DLD a identifié quelques problèmes qu'il considère faire encore obstacle à cette industrie : les coûts de production élevés lié au prix élevé de la nourriture, la faible efficacité de production liée à une gestion et une qualité des animaux de niveau moyen, l'utilisation de lait écrémé en poudre pour la consommation, plutôt que du lait cru, en raison de son moindre coût, et finalement la mauvaise qualité de ce lait cru. De plus, Chantalakhana (1995) considère que l'augmentation des prix des terrains a conduit à une insuffisance en fourrage, et l'attraction produite par les opportunités d'emplois des zones non rurales a conduit à une insuffisance en main d'œuvre.



Graph. 1 : Evolution de la taille du cheptel laitier, et distribution par région

La région centrale est la région où se trouve le plus grand nombre d'élevages laitiers, mais la zone où la croissance est la plus forte est la région Nord-est. Les trois premières provinces pour l'élevage laitier sont Radchaburi, Saraburi et la province de Korat au Nord-Est. De nouvelles fermes s'installent également de plus en plus dans les provinces de Sakaew et Cholburi à l'Est, ainsi qu'au centre à Lopburi. D'autres zones importantes d'élevages sont les zones de Chiang Mai au Nord et Khon Kaen au Nord-est (cf graphique 1).

### **3. Les outils de diagnostics de l'infection à *T. evansi***

#### **3.1 Les outils d'utilisation courante**

Comme nous l'avons déjà évoqué, les tests diagnostiques sont déterminants dans la connaissance de l'importance d'une maladie, tant au niveau du troupeau où ils permettent de connaître la prévalence de l'infection, qu'à l'échelle individuelle où ils permettent de cibler les animaux à traiter et vérifier l'efficacité du traitement. Malgré le développement considérable des techniques diagnostiques permettant la détection de *Trypanosoma evansi*, leur évaluation, standardisation, diffusion en vue de leur application est toujours insuffisante. Ainsi, il est fréquent que le diagnostic du surra repose toujours sur les méthodes parasitologiques ou cliniques, de faible sensibilité, impliquant probablement une sous-évaluation de la fréquence de l'infection. D'autre part, la connaissance de ces tests et la prise en compte des conditions dans lesquelles ils sont employés sont déterminants dans l'interprétation qui devra être faite des résultats, et dans les mesures à prendre en conséquence (Luckins, 1998).

Les manifestations cliniques de la maladie, peu spécifiques, ne permettent qu'une suspicion, et offrent une grande carence dans le cas des formes sub-cliniques. De nombreux tests parasitologiques existent et présentent des sensibilités variables. Les techniques d'observation directe de sang entre lame et lamelle ou de frottis colorés sont encore fréquemment utilisées comme tests de routine, mais ne permettent pas la détection de *T. evansi* pour des concentrations inférieures à 10 000 trypanosomes par ml de sang. En revanche, des techniques permettant un enrichissement en parasite atteignent des seuils de détections bien inférieurs. Nous pouvons citer les méthodes utilisant la centrifugation en tube hématocrite, permettant une concentration des parasites au niveau du buffy coat, lui-même observé au microscope à travers la paroi du tube (méthode de Woo) ou après dépôt entre lame et lamelle (méthode de Murray). Ces méthodes ont un seuil de détection d'environ 50 à 100 trypanosomes par ml. Cette technique de concentration peut être utilisée pour augmenter la sensibilité de nombreuses techniques : lors d'utilisation avec la technique d'inoculation sur souris, ou de MAECT (Miniature anion-exchange centrifugation technique), il est possible de détecter un trypanosome dans 4ml et 2ml de sang respectivement, soit environ 10 fois moins qu'avec le sang total (Reid, Husein et al. 2001). Toutefois, notons que les techniques d'inoculation sont peu compatibles avec une utilisation comme examen de terrain à grande échelle.

Bien sûr, le diagnostic définitif d'une trypanosomose repose sur la démonstration de la présence de ce parasite dans le sang ou les tissus de l'animal. Malheureusement, les

techniques de détection des parasites citées précédemment ne peuvent pas toujours détecter les infections du fait des parasitémies parfois basses et fluctuantes, particulièrement lors d'infection chronique (Nantulya 1990), d'où l'importance des techniques sérologiques et moléculaires.

Les techniques moléculaires ont permis de bons progrès en termes de sensibilité et de spécificité. La PCR a été appliquée pour la première fois à l'identification de *T. congolense* et *T. brucei* dans le sang de souris infectées en 1989 (Moser, Cook et al. 1989a). Depuis, de nombreuses amorces permettant la détection de *T. evansi* ont été publiées, présentant des performances diverses. Le gold standard permettant d'évaluer les autres et présentant les meilleures limites de détection demeure toutefois les amorces TBR mises au point par Masiga, Smyth et al. (1992). Parmi les autres couples d'amorce, il existe des variations importantes de sensibilité, ainsi que de reproductibilité de résultats, c'est pourquoi elles nécessitent également une standardisation et des évaluations rigoureuses avant leur diffusion en vue de leur application.

Les deux principaux tests sérologiques couramment utilisés sont l'Ac-ELISA et le CATT (Card Agglutination Test). Toutefois, il est important de préciser que ces deux tests ne sont pas du tout équivalents puisque le premier permet la détection des IgG, dont l'apparition est différée par rapport à l'infection et qui persistent longtemps, alors que le deuxième détecte les IgM principalement dirigées contre une glycoprotéine variable de surface RoTat 1.2. Ces IgM, d'apparition précoce sont fugaces, présentent en outre d'importantes fluctuations en fonction des pics parasitémiques. Dans une évaluation, l'Ac-ELISA utilisant des antigènes purifiés s'est avérée être le test le plus adapté pour la détection de bovins séropositifs en Indonésie (Reid and Copeman 2002). L'étude des valeurs prédictives a montré une meilleure valeur prédictive positive pour le CATT, ce qui en fait un test performant pour constituer un groupe d'infectés (la probabilité d'être infecté dans le groupe de positifs sera forte). Le CATT est alors préconisé dans une situation où l'infection est présente, et où l'on souhaite déterminer tous les animaux sur lesquels il est nécessaire d'effectuer un traitement par exemple. L'Ac-ELISA dispose quant à elle d'une bonne valeur prédictive négative, utile dans une démarche d'exclusion de l'infection. Ainsi, l'Ac-ELISA est préconisée lors de qualification d'un cheptel, par exemple lors d'import-export (Davison, Thrusfield et al. 1999; OIE 2005). A noter cependant que les valeurs prédictives seront influencées, à un endroit donné, par le nombre d'espèces de trypanosome circulant, en raison des réactions croisées qui peuvent avoir lieu (notamment avec la détection de l'antigène RoTat 1.2), mais également par la situation épidémiologique (épizootique / enzootique) qui prévaut au moment des prélèvements. Nous donnerons par la suite plus de détails sur l'Ac-ELISA.

D'autres techniques telles que l'Ag-ELISA ont été mises au point mais n'ont pas toujours été validées : leur sensibilité et surtout spécificité ne sont pas toujours compatibles

avec une utilisation comme outil diagnostic. D'autre part, la nécessité de production d'anticorps monoclonaux ou d'anticorps polyclonaux en sérum hyper-immun en complique l'utilisation en routine. Un autre exemple de technique est la PCR-ELISA qui semble présenter une bonne sensibilité avec une limite de détection à 1 trypanosome/ml de sang (Chansiri 2002), mais qui implique un protocole assez lourd (et coûteux) puisqu'il combine les deux techniques PCR et ELISA et conviendrait mieux à des suivis longitudinaux de troupeaux plutôt qu'à des enquêtes transversales.

L'objet du travail réalisé au laboratoire de parasitologie de la faculté vétérinaire de l'université de Kasetsart, est de réaliser, dans le cadre du projet *T. evansi* en Thaïlande, la standardisation et la validation de deux techniques : la PCR classique et l'Ac-ELISA, en vue de leur prochaine diffusion à travers la Thaïlande en direction des partenaires du réseau ainsi que dans les pays voisins de l'Asie du Sud-Est. Il s'agit de deux outils assez classiquement utilisés et qui présentent une bonne complémentarité, en donnant respectivement des informations sur la présence effective du parasite ou sur un contact de l'animal avec celui-ci au cours de sa vie. Ces deux méthodes nécessitent du matériel spécifique et présentent également des coûts et une technicité importante, il est donc fondamental de les éprouver afin d'en vérifier les performances, la reproductibilité des résultats et la possibilité de standardisation avant diffusion. Ces outils ont ensuite été appliqués à une enquête préliminaire menée sur l'élevage bovin laitier.

## **3.2 La détection de *Trypanosoma evansi* par technique PCR**

### **3.2.1 Principe**

La PCR, ou *Polymerase Chain Reaction* est un procédé d'amplification en chaîne permettant la multiplication exponentielle *in vitro* d'une séquence d'acide nucléique spécifique d'un organisme afin de la rendre détectable et d'en disposer en quantité suffisante à son étude. Au cours de ces réactions, la séquence cible d'ADN sert de matrice à la réplication, et à chaque cycle, les produits de réplication peuvent à leur tour servir de matrice (cf. Figure 3). Un cycle se compose ainsi de trois étapes où il faut :

- (1) Dénaturer l'ADN double brin afin de le rendre utilisable comme matrice simple brin ;
- (2) Borner et amorcer la réplication de la séquence cible à l'aide d'oligonucléotides adaptés à cette séquence, les amorces, dont on va entraîner l'hybridation avec la matrice;
- (3) Réaliser la synthèse du brin complémentaire à la matrice à partir de l'amorce afin de reconstituer l'ADN double brin.

### 3.2.2 Historique

La PCR a été mise au point par différentes équipes dans les années 1985-1987 (Saiki, Scharf et al. 1985; Mullis, Faloona et al. 1986; Mullis, Faloona et al. 1986), mais en grande partie par Mullis qui a reçu pour ses travaux le prix Nobel de chimie en 1993. Ces publications initiales regroupent déjà une grande part des variantes et applications de la PCR. La PCR a été appliquée pour la première fois à l'identification de *T. congolense* et *T. brucei* dans le sang de souris infectées en 1989 (Moser, Cook et al. 1989a).

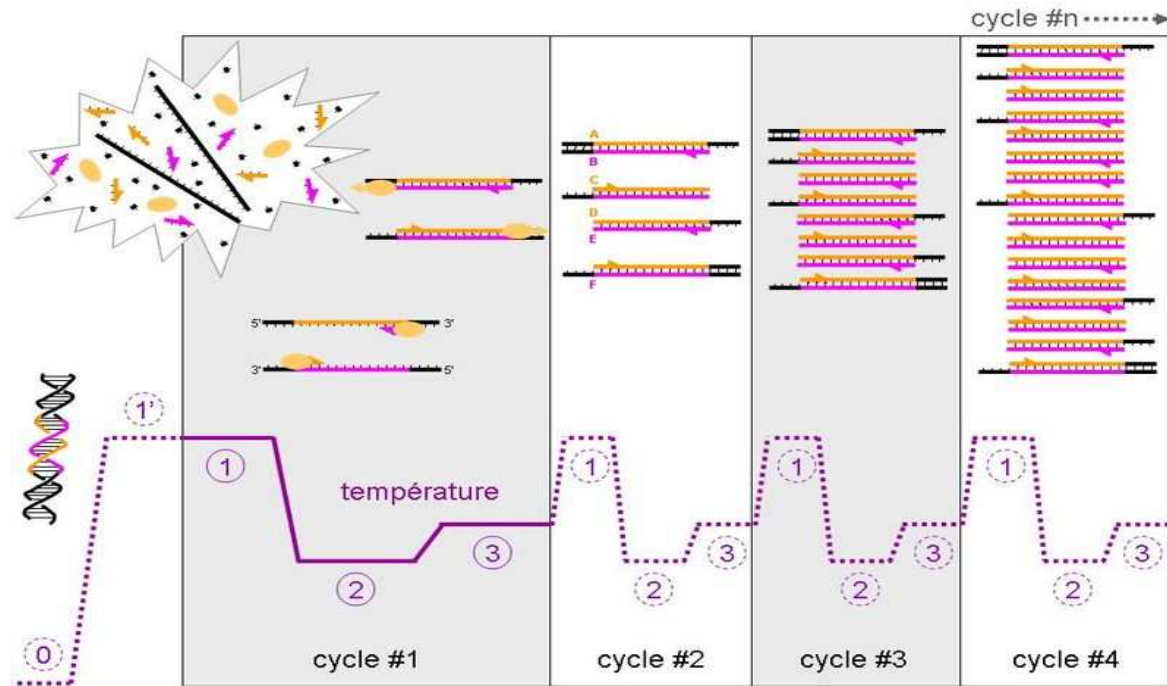


Fig. 3: Rappel sur le principe de la PCR illustré par les premiers cycles (source : wikipedia)

- (1) Dénaturation de l'ADN double brin afin de le rendre utilisable comme matrice simple brin ;
- (2) Hybridation des amorces avec la séquence cible d'ADN;
- (3) Synthèse du brin complémentaire par élongation à partir de l'amorce

### 3.2.3 Les paramètres de la PCR

*Le choix de l'amorce :*

Le « design » des amorces est fondamental dans la réussite de la réaction de PCR. Elles doivent en effet s'hybrider correctement avec la bonne séquence cible, et initier la synthèse par la polymérase grâce à leur extrémité 3'. Afin d'avoir le plus de chance de remplir correctement ces fonctions, il convient de vérifier un certain nombre de critères dans le choix des amorces (Rybicki 2001; Borde 2006) :

- La taille de l'amorce doit être suffisamment grande pour limiter le risque de liaison non spécifique. En effet, si on considère une séquence de 4 nucléotides, il y a une chance sur  $4^4$  soit 256 de retrouver la même séquence. Il est donc conseillé de construire des amorces de plus de 17 nucléotides, car le risque d'avoir une séquence semblable ailleurs dans le génome devient infime, ce qui limite les risques d'erreur lors de l'hybridation.
- Toujours en vue d'optimiser la spécificité des amorces, il est indispensable d'effectuer une comparaison des séquences candidates avec les bases de données existantes de génomes séquencés, afin de détecter les possibles interactions avec des séquences d'autres régions du génome et d'autres pathogènes ou hôtes. Ce types de bases de données sont en libre consultation et permettent rapidement de faire un « screening » des possibles homologues avec d'autres séquences (ex : NCBI database).
- Des  $T_m$  (melting température ou température de fusion) comparables. La  $T_m$  est la température à laquelle la moitié des molécules d'ADN sont sous forme double-brin et l'autre moitié mono-brin. Cette température dépend de la longueur de la séquence et des quantités relatives de C et G (qui établissent trois liaisons hydrogènes) et de A et T (qui en établissent deux). Pour calculer le  $T_m$  d'un oligonucléotide inférieur à 30 nucléotides, on utilise la relation suivante :

$$T_m = 2 (A + T) + 4 (G + C)$$

Ainsi, les amorces plus longues et avec une importante quantité de C et G auront une  $T_m$  plus élevée. Les oligonucléotides amorces doivent s'hybrider à l'ADN matrice dans des conditions de température très voisines.

- Les séquences ne doivent pas être complémentaires entre elles (en particulier dans la région 3'), pour éviter la formation de dimères d'amorces qui limitent la disponibilité en amorces
- Les séquences ne doivent pas contenir de séquences répétées inversées et donc pas de possibilité de repliement intramoléculaire. De manière générale, il faut vérifier l'absence de structure secondaire stable altérant la linéarité des amorces.
- L'amorce ne doit pas comporter, si possible, plus de quatre bases consécutives identiques, particulièrement G ou C, et surtout en fin d'amorce, ce qui a tendance à les fragiliser et à engendrer des adhésions non spécifiques sur l'ADN matriciel.

*Choix des conditions de réactions :*

- température de dénaturation : elle est environ de 92 à 95°C. Ce choix n'est pas extrêmement critique, il faut toutefois être prudent car, bien que la Taq polymérase soit thermorésistante, son activité diminue en fonction du couple temps-température. Il est possible d'effectuer une diminution progressive de la température au fur et à mesure de la réaction, car les réplicats plus petits, sont dénaturés plus facilement. Ceci permet de préserver la polymérase plus longtemps.
- Température d'hybridation : le choix de cette température est le plus critique, et le plus spécifique des amorces. On choisit classiquement une température de 5°C en dessous de  $T_m$ , il a toutefois été montré que des températures d'hybridation trop basses augmentent le nombre d'hybridations non spécifiques.
- Température de polymérisation : elle est classiquement de 72°C

### **3.2.4 Précautions lors de la réalisation pratique au laboratoire :**

La PCR classique est une manipulation sensible et nécessite certaines précautions. Les deux sources classiques d'échec sont la contamination des réactifs par l'ADN cible, et la présence de DNase engendrant la digestion des produits de PCR. Toutes les précautions doivent être prises au cours des différentes étapes afin de limiter ces risques. L'utilisation de consommables DNase et RNase free, ainsi que des précautions lors de la manipulation des différents réactifs et échantillons sont indispensables. D'autre part, la rigueur lors des manipulations des échantillons et la séparation des étapes de manipulation des réactifs avec toutes les autres étapes manipulant les produits de PCR sont importantes pour limiter les risques de contamination. Enfin des précautions sont importantes pour la préservation des réactifs sensibles à la chaleur. Il convient donc de manipuler le plus rapidement possible et de préférence sur glace.



### 3.2.5 Les amorces candidates

Initialement, le travail a commencé avec 9 amorces, mais pour trois d'entre elles, nous n'avons pas pu obtenir de produits de PCR malgré le respect des conditions décrites dans les publications initiales. Ces trois couples d'amorces étaient celles publiées par Artama de séquences 5'-CAACGACAAAGAGTCAGT-3' et 5'-ACGTGTTTTGTGTATGGT-3' (Artama et al. 1992), les amorces de Diall de séquences 5'-GAATCAGTGTCTTTTGAGGG-3' et 5'-AACCGTGTGTGTATTACA-3' (Diall, Bajyana-Songa et al. 1992) et enfin celles de Masiga, de séquences 5'-ACATATCAACAACGACAAG-3' et 5'-CCCTAAGTATCTCCAATGAAT-3' (Thèse Masiga 1994). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces échecs : un problème de synthèse de l'amorce, des conditions de manipulation ayant entraîné sa destruction, une variation de la séquence cible du parasite... Nous ne mentionnerons ici que les amorces sur lesquelles porte effectivement le travail qui suit. Notons également que nous traitons ici de PCR classique, mais que d'autres travaux ont été réalisés sur d'autres types de PCR. Récemment, une PCR temps réel a été développée (Taylor, Boyle et al. 2008) mais le contexte asiatique et le coût de ce type de technique semblent peu compatibles, particulièrement dans le cadre d'enquêtes de grande envergure. Une autre technique issues de la PCR, la LAMP (loop-mediated isothermal amplification) a également été appliquée à *Trypanosoma evansi*, (Thekiso, Inoue et al. 2005) et devra être évaluée et adaptée pour le diagnostic de routine.

- Les amorces TBR (Masiga, Smyth et al. 1992)

Les amorces TBR ont été développées en parallèle de 5 autres couples d'amorces, dans le but d'identifier les trypanosomes des glossines de manière univoque, afin d'évaluer précisément le risque pour l'homme et le bétail. La distinction par la morphologie est difficile dans la mouche tsé-tsé. En effet, l'identification, jusque là permise par la localisation dans le vecteur, ne s'avère pertinente que jusqu'au sous-genre. De plus, cette technique est mise à mal lors d'infections mixtes ou d'infections immatures. Ces travaux se sont appuyés sur ceux réalisés par Moser, qui travaillait alors pour la première fois à l'identification de *T. congolense* et *T. brucei* dans le sang de souris infectées en 1989 (Moser, Cook et al. 1989a).

Le couple d'amorce TBR permet l'amplification d'une séquence répétée d'ADN satellite, constituant la majeure partie des mini-chromosomes des trypanosomes *Salivaria* (Gibson, Dukes et al. 1988). Les amorces ont été synthétisées selon la séquence de Moser pour *T. congolense* savannah et *T. brucei*, et selon la séquence déterminée grâce à un programme informatique adapté.

L'identification par TBR porte sur les trypanosomes de l'espèce *brucei*, les autres amorces étant destinées à *T. congolense* savannah, *T.c. Kenya coast* et *T.c. forest*, *T. vivax*,

et *T. simiae*. Ce travail avait été effectué sur des mouches tsé-tsé expérimentalement infectées. Le but étant la possibilité de détection et d'identification des infections multiples, une attention particulière a été portée sur l'absence de réaction croisée entre les différentes amorces et les différentes espèces de trypanosomes étudiées. Les résultats ont confirmé cette spécificité. Il a également été noté une sensibilité d'environ 1 trypanosome par réaction, non accrue par utilisation de sondes marquées. En revanche l'utilisation d'enzymes de restriction Sau 3AI entraînant la séparation de la séquence répétée en fragments unitaires avait permis de détecter jusqu'à 0,01 trypanosome par réaction.

- Les amorces TEPAN (Panyim, Viseshakul et al. 1993)

Là aussi, le principe est l'amplification d'une séquence répétitive d'ADN, spécifique de *T. evansi*, avec pour objectif la détection d'un seul parasite par réaction.

Les auteurs ont effectué les réactions de PCR à partir d'ADN purifié ou avec du sang parasitémique, suivi d'une migration sur gel ou d'une technique de southern blot.

Le produit amplifié fait 122bp. Les gels montrent une bande à 122bp ainsi que des oligomères espacés de 122bp. Ce schéma est réduit en présence de l'enzyme de restriction Sau3AI qui comme précédemment permet la séparation de la séquence répétée en fragments unitaires. Le produit de PCR est clairement visible avec 1pg d'ADN, et légèrement visible à 0,1pg, équivalent du poids du génome d'un trypanosome. Suite à l'inoculation d'un seul parasite à des souris, l'évaluation de la sensibilité de la PCR a été estimée à 100 fois celle de la microscopie, par rapport au temps nécessaire à la première détection. Des PCR réalisées en isolant un seul trypanosome dans du sang, sont revenues positives pour une PCR sur trois. D'autre part, il n'a pas été observé de réaction croisée à 122bp avec *Babesia bovis*.

- Les amorces ESAG (Holland, Claes et al. 2001)

Les auteurs de cette publication ont réalisé une étude de la sensibilité et de la spécificité de la PCR avec le couple d'amorce ESAG, en comparaison avec diverses méthodes parasitologiques : Wet blood film clarification (SDS), méthode de Woo, méthode de Murray, technique de la mini colonne échangeuse d'ions, inoculation de souris.

Les amorces ESAG entraînent l'amplification d'un fragment de 237bp d'ADN génomique multi copies codant pour un complexe hétérodimérique de récepteur transferrine de *T. evansi*. Dans une étude non publiée, les limites de détection avaient été déterminées à 100 trypanosomes/ml avec le sang de souris, et 200 avec le sang de buffle.

Les estimations de la sensibilité montrent que la PCR domine l'ensemble des autres techniques parasitologiques dans les conditions de l'expérimentation. Pour les amorces

ESAG, la spécificité s'arrête au sous-genre trypanozoon, et il n'y a pas de réaction croisée avec *T. theileri*. Toutefois, la spécificité vis-à-vis d'*Anaplasma*, *Theileria* et *Babesia* n'a pas été vérifiée.

- Les amorces de WUYTS (Wuyts, Chokesajjawatee et al. 1994)

Ces amorces permettent l'amplification d'une séquence répétitive de 227bp. Les PCR sur l'ADN purifié ont pu mettre en évidence jusqu'à 0.5pg par réaction, équivalent au poids de 5 génomes de trypanosome selon les 0.1pg par génome décrit par Borst (Borst, Van der Ploeg et al. 1982). Puis les dilutions de parasites purifiés ont donné une détection possible à partir d'environ 100 trypanosomes. En revanche un effet inhibiteur du PSG a été observé sur la PCR (possible modification par le  $PO_4^{2-}$  de la stœchiométrie du  $Mg^{2+}$  avec les dNTP). La dilution de sang frais avec du sérum de rat, donne une détection possible à partir de 300 parasites, et très faible pour les dilutions de 3 et 30. Les manipulations ont été faites avec du sang non préparé (uniquement bouilli). Il a été observé également que la diminution de la concentration en amorce permettait de limiter le nombre de signaux non spécifiques. Toutefois, des signaux non spécifiques ont parfois été observés (mais n'interférant jamais avec la bande de 227bp) ainsi que de forts dimères d'amorces. Des sangs de bovins, porcs, moutons, chèvres et chevaux ont été testés sans montrer de réactions croisées. De même avec *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale*, *Plasmodium falciparum*. Les amorces ont montré leur capacité à détecter *T. brucei*, ce qui limite son utilisation en zone de recouvrement des deux parasites (Afrique) et *T. equiperdum*, ce qui peut rendre difficile la distinction dans de nombreuses régions.

- Les amorces TRYP1 (Desquesnes, McLaughlin et al. 2001; Desquesnes, Ravel et al. 2002)

Ces primers ont pour cible l'ITS1 (internal transcribed spacer 1 de l'ADNr kinetoplastique), séquence d'ADN non transcrite située entre l'ADNr 18S et 5.8S. La taille de ces séquences est variable d'une espèce à l'autre de trypanosome, et a ici été utilisée pour caractériser et identifier les trypanosomes présents dans un échantillon (Desquesnes, McLaughlin et al 2001). La manipulation a été réalisée avec différentes espèces : *T. vivax*, *T. simiae*, *T. evansi*, *T. brucei* spp, *T. equiperdum*, *T. theileri*, *T. congolense savannah*, *T. congolense forest*, *T. congolense Kenya Coast*. Les essais ont été menés sur les différents ADN extraits de ces souches, sur des mélanges de ces ADN afin de vérifier si les réactions se produisaient toujours, ainsi que sur 40 échantillons de terrain.

Ces amorces permettent donc également de détecter des infections multiples. Pour *T. evansi* le produit d'amplification est de 450bp (identique aux autres trypanozoon). En

revanche, la sensibilité semble être globalement inférieure à la sensibilité obtenue par d'autres amorces de référence de chaque espèce de trypanosome.

Les données à propos des amorces TRYP4 que nous étudierons aussi n'ont pas été publiées et ont été regroupées lors de communications personnelles ou à partir de rapports de stage ou mémoires de DEA. Le principe de fonctionnement est très proche de celui de TRYP1 mais la spécificité est supérieure (pas d'amplification des trypanosomes non pathogènes).

### 3.3 La détection sérologique de *Trypanosoma evansi* par technique Ac-ELISA

#### 3.3.1 Rappel sur le principe de l'Ac-ELISA

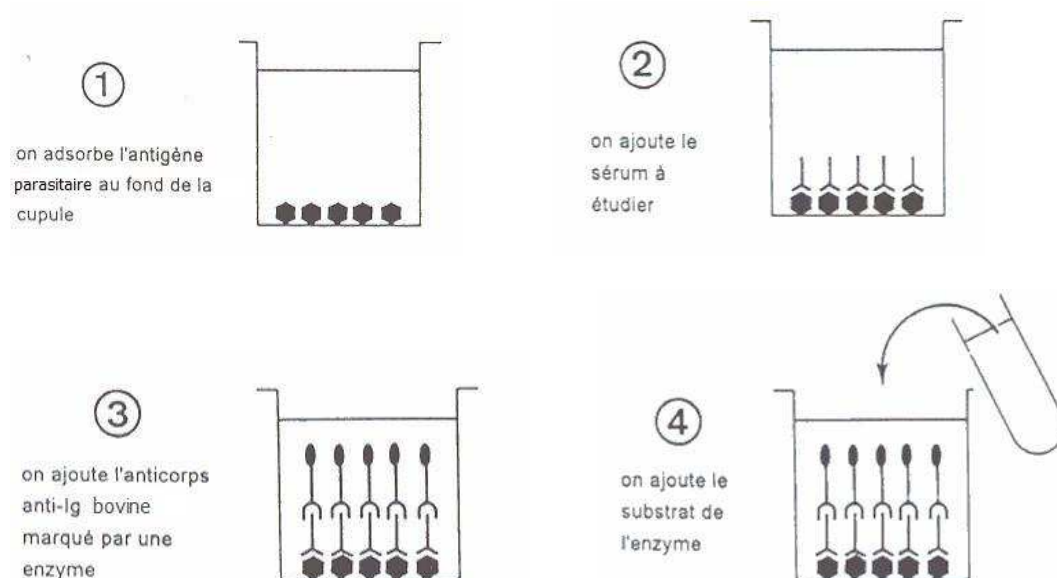


Fig. 4 : Schéma des principales étapes de l'ELISA.

#### 3.3.2 Le développement de l'Ac-ELISA au cours des précédentes études

Les méthodes ELISA ont déjà été utilisées depuis longtemps (Gray and Luckins 1977), L'ELISA pour la détection d'anticorps dirigés contre *T.evansi* a initialement été développée pour les dromadaires. Au cours d'un travail en 1979, Luckins *et al.* avaient proposé une comparaison de 5 types de diagnostic de *Trypanosoma evansi* sur des camélidés expérimentalement ou naturellement infectés au Soudan. Ils avaient alors déjà

relevé une bonne corrélation entre les résultats obtenus par IFAT et ELISA par rapport à des infections connues. Ces travaux avaient conduit à présenter l'ELISA comme un outil probablement important dans les futurs travaux de surveillance et de contrôle de l'infection à *T. evansi* chez les dromadaires (Luckins, Boid et al. 1979).

En 1986, Zweygarth *et al.* observèrent sur des sérums de dromadaires naturellement ou expérimentalement infectés, que l'ELISA pouvait être réalisé aussi bien avec des anticorps anti-dromadaire qu'avec un conjugué protéine A équine/peroxydase, et que les résultats étaient corrélés positivement, et que ceci pouvait constituer une alternative intéressante à l'utilisation d'Ig anti-dromadaire conjugués (Zweygarth et al. 1986). Toutefois Rae *et al.* en 1989 ont observé une diminution des performances des tests ELISA lors de l'utilisation de protéine A conjuguée par rapport à l'utilisation d'anti-sérum spécifique qui permet l'obtention de résultats satisfaisants en terme de sensibilité et de spécificité (Rae, Thrusfield et al. 1989). Des efforts importants ont été faits pour améliorer la standardisation et la reproductibilité, afin de valider ces tests à grande échelle (Bocquentin and Duvallet 1990; Dially et al. 1992; Wright et al. 1993; Desquesnes 1997; Dia and Desquesnes 2007). Ceci a progressivement permis de répondre aux exigences internationales de comparabilité des résultats et de permettre ainsi une meilleure coordination des différentes équipes à travers le monde (Wright, Nilsson et al. 1993; FAO/IEAE 1994).

Différentes adaptations ont été proposées pour les divers hôtes possibles du parasite. Ainsi, la technique ELISA a été adaptée aux chevaux (Reyna-Bello et al. 1998; Monzon et al. 2003). Reyna-Bello *et al.*, en établissant une valeur seuil par méthode bayésienne, ont obtenu des résultats comparables aux méthodes de référence d'IFA, avec une sensibilité relative de 98,39% et une spécificité relative de 95,12%. Une valeur prédictive de 96,83% a également été déterminée (Reyna-Bello, Garcia et al. 1998).

Un travail d'évaluation réalisé par Davison *et al.* sur des buffles en Indonésie a rapporté que la sensibilité de l'Ac-ELISA était la meilleure (89% avec détermination du seuil par courbe de Roc afin de maximiser sensibilité et spécificité) comparée à deux Ag-ELISA (75 et 78%) et le CATT, mais que ce dernier avait en revanche une meilleure spécificité (100%). Le calcul des valeurs prédictives pour différents niveaux de prévalence a permis de déduire que le CATT était un bon test d'inclusion (meilleure valeur prédictive positive) alors que l'Ac-ELISA était le meilleur en tant que test d'exclusion (meilleure VPN), intéressant lors de procédure de qualification de cheptel (Davison, Thrusfield et al. 1999).

Des résultats similaires ont été trouvés par un essai de ces différents tests sur un lot de buffles du Vietnam par Verloo, Holland et al. (2000) avec les mêmes tendances observées précédemment en ce qui concerne les valeurs prédictives et leurs conséquence sur l'utilisation (Verloo, Holland et al. 2000).

Chez le porc, les tests d'agglutination n'ont pas montré de résultats satisfaisants alors que l'Ac-ELISA présentait une bonne corrélation avec les résultats obtenus par trypanolyse, pris comme référence (Holland et al. 2005).

Plusieurs travaux réalisés par Reid *et al.* en Indonésie et Papouasie-Nouvelle Guinée ont montré que la technique était transposable chez les bovins (Reid and Copeman 2000; Reid and Copeman 2002; Reid and Copeman 2003). L'ELISA a été appliquée avec succès chez des bovins expérimentalement infectés (Dia et Desquesnes 2007). Ces différentes études s'accordent à définir l'Ac-ELISA et le CATT comme les deux tests les plus appropriés pour des études sérologiques de grande envergure.

## **Partie II : Evaluation comparée de différents couples d'amorce pour la détection de *Trypanosoma evansi* par PCR.**

### **1. Introduction**

Ces dernières années ont été marquées par la mise en place de nombreux outils PCR, et la publication de nombreuses amorces destinées à la détection des trypanosomes, en particulier celle de *Trypanosoma evansi*. En effet, le développement d'outils informatiques appliqués à la génétique a considérablement facilité la mise au point de couples d'amorces. A titre d'illustration, une rapide recherche internet a permis d'identifier une cinquantaine de sites permettant de dessiner en ligne ses amorces ou de contribuer à ce processus, ainsi qu'une vingtaine de logiciels libres ou payants. Ceci permet assez rapidement de dessiner les amorces correspondant à une séquence identifiée. Malheureusement, les évaluations correspondantes à ces amorces ne sont pas toujours réalisées de manière complète, et rarement comparées aux amorces pré-existantes. Il est donc difficile de connaître les avantages relatifs de chaque amorce, ainsi que leurs performances en termes de sensibilité et de spécificité. Dans ce contexte, il semble indispensable de procéder à une harmonisation en comparant les amorces les unes avec les autres, et en déterminant un référentiel pour ces comparaisons : un couple d'amorce montrant les meilleurs performances et utilisé comme « Gold standard ». Ainsi, toute nouvelle amorce de PCR classique, n'apportant pas d'innovation particulière, devra être comparée à ce gold standard afin d'évaluer de manière objective l'apport de ce nouvel outil. Le présent travail s'inscrit dans cette démarche et compare six couples d'amorces publiées récemment ou présentant un début d'évaluation prometteur. Par ailleurs, dans le cadre de la mise en place du projet sur *Trypanosoma evansi* en Thaïlande, ce travail permet d'initier l'étape indispensable de standardisation et d'évaluation des outils avant diffusion au sein d'un réseau de partenaires.

L'évaluation se fait à travers trois étapes utilisant de l'ADN purifié de *T. evansi*, du sang de rat infecté et enfin des échantillons de terrain de sang de bovin. Chaque étape permet d'obtenir des données quantitatives et qualitatives sur chaque amorce (limites de détection, force du signal, présence de bandes non spécifiques) qui seront utilisées dans leur évaluation. Des travaux ultérieurs chez d'autres espèces cibles telles le buffle, le cheval, le porc, le chien, etc... permettront de compléter ces éléments et de donner des recommandations spécifiques si nécessaire.

## 2. **Matériel et méthode**

L'évaluation comparative des couples d'amorces s'est déroulée en trois étapes : pour chaque couple d'amorce, les PCR ont été effectuées sur des dilutions successives d'ADN purifié de *Trypanosoma evansi*, puis des dilutions successives de sang de rats expérimentalement infectés et de parasitémie connue, et enfin sur 119 échantillons de vaches laitières prélevés sur le terrain au cours d'une enquête menée dans différentes parties de la Thaïlande et avérés positifs en ELISA.

### 2.1 **Dilutions d'ADN purifié**

L'ADN purifié a été obtenu après isolement des trypanosomes par la technique de migration sur colonne échangeuse d'ions DE52, à partir de sang de buffle infecté par *T. evansi* et aimablement fourni par Nachai Sarataphan (Department of Livestock Development, Bureau of Biotechnologies for Livestock Development, Bangkok, Thailand). Le dosage en ADN par spectrophotométrie de l'échantillon d'ADN purifié à la concentration initiale a été estimé à 1140 µg/ml.

Des dilutions en série dans l'eau distillée ont été réalisées à partir de l'échantillon de référence, en commençant au centième de la concentration initiale. 1/100 ; 1/500 ; 1/1 000 ; 1/5 000 ; 1/10 000 ; 1/50 000 ; 1/100 000 ; 1/150 000 ; 1/200 000 ; 1/400 000

Une autre série comprenant des dilutions supplémentaires a été effectuée afin de préciser les zones d'extinction de signal : 1/500 ; 1/1 000 ; 1/5 000 ; 1/10 000 ; 1/25 000 ; 1/50 000 ; 1/75 000 ; 1/100 000 ; 1/125 000 ; 1/150 000 ; 1/200 000.

Les dilutions au 1/100 et 1/500 comprenaient donc approximativement 11,4 pg/µl et 2,28 pg/µl d'ADN de *T. evansi*, et les trois dernières 1/150 000, 1/200 000 et 1/400 000, correspondent à 7,6 ; 5,7 et 2,9 fg/µl respectivement. En considérant que le génome de *Trypanosoma evansi* contient entre 0,05 à 0,1 pg d'ADN, et du fait que le volume de l'échantillon testé en PCR a été fixé à 1 µl, il est possible de réaliser des estimations du nombre de parasites équivalents à la quantité d'ADN testé dans chaque dilution. Ces estimations et correspondances sont compilées dans le Tableau 1.



Dilution de l'ADN de référence	1/100	1/500	1/1 000	1/5 000	1/10 000	1/25 000	1/50 000	1/75 000	1/100 000	1/125 000	1/150 000	1/200 000	1/400 000
quantité d'ADN (pg) de <i>T. evansi</i> estimé par $\mu$ l	11,4	2,28	1,14	0,228	0,114	0,04560	0,0228	0,0152	0,0114	0,0091	0,0076	0,0057	0,00285
Equivalence en nombre de génome de <i>T. evansi</i>	152,0	30,40	15,20	3,040	1,520	0,6080	0,3040	0,2027	0,1520	0,1216	0,1013	0,0760	0,0380

Tabl. 1: Dilutions successives d'ADN purifié de *T. evansi* utilisée dans l'évaluation des différentes amorces, et équivalences en poids d'ADN (en pg/ $\mu$ l) et en nombre de trypanosomes introduits dans chaque réaction.

## 2.2 Dilutions de sang de rat parasitémique

Un rat de souche Wistar WR120F a été inoculé avec une souche de *T. evansi* isolée sur un cervidé dans la province de Radchaburi et conservée sous forme de cryostabilisats stockés en azote liquide. La parasitémie et l'état clinique ont été régulièrement contrôlés, et le sacrifice fut effectué à 3 jours après l'infection. Deux autres rats non infectés ont également été sacrifiés afin de collecter le sang nécessaire à la réalisation des dilutions du sang infecté avec le sang sain. Une première dilution a été effectuée afin d'obtenir une parasitémie de  $10^6$  trypanosomes/ml, évaluée par comptage exhaustif des trypanosomes présents dans une goutte de sang de volume connu et observée entre lame et lamelle (méthode validée par Herbert and Lumsden (Herbert and Lumsden 1976)). Les comptages réalisés par trois manipulateurs différents ont montré des valeurs de parasitémie concordantes. Un plan de dilution en série, par ajout de sang infecté au sang non infecté, a été élaboré afin d'obtenir 13 niveaux de parasitémie connus (en trypanosomes par ml): 1 000 000 ; 100 000 ; 10 000 ; 5 000 ; 1 000 ; 500 ; 100 ; 50 ; 10 ; 5 ; 1 ; 0,1 ; 0,01.

Un protocole classique d'extraction au phénol-chloroforme avec précipitation à l'alcool absolu a été appliqué sur les échantillons.

## 2.3 Echantillons de bovins issus du terrain :

Dans le cadre d'une enquête sur la trypanosomose à *T. evansi* dans l'élevage bovin laitier en Thaïlande (cf. Partie III), 119 échantillons de sang, dont la sérologie ELISA était positive, ont pu être utilisés dans cette évaluation. Une extraction phénol/chloroforme a été faite. Les PCR ont été réalisées comme indiqué ci-après.

## 2.4 Choix des couples d'amorces

Neuf couples d'amorces ont été initialement introduits dans l'étude. Les séquences des amorces ont été conformes aux publications originales, et soumises au laboratoire spécialisé (Bioscience Resource Project, Bangkok, Thaïlande), pour leur production. Les volumes calculés par le laboratoire permettaient de reconstituer les amorces à une concentration de 100 mM, constituant la solution stock, rediluée à 20 mM et aliquotée pour la solution de travail. Comme ceci a été évoqué précédemment, trois jeux d'amorces n'ont donné aucun résultat satisfaisant au cours des premières étapes de l'évaluation, malgré le respect des protocoles publiés (cf. Partie I 3.2.5). Pour ne pas retarder la réalisation du protocole d'évaluation, et puisque ces 3 couples d'amorces ont jusqu'alors été très peu usités, ils ont été écartés de notre étude. Six jeux d'amorces, incluant les 4 jeux les plus classiquement utilisés par divers laboratoires ont donc été évalués comparativement.

## 2.5 Réalisation des PCR

Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 11 $\mu$ l, contenant 10 $\mu$ l de réactifs constitués du tampon (buffer 10x : 10mM Tris; 0 mM MgCl<sub>2</sub>; 50mM KCl), du MgCl<sub>2</sub>, de la Taq-Polymérase (Taq DNA Polymérase, Recombinant, Invitrogen), des dNTP (dNTP Set, Fermentas), des 2 amorces (Bioscience Resource Project), de l'eau distillée et éventuellement du DMSO, selon les quantités indiquées dans le Tableau 2. L'échantillon à tester était introduit dans ce milieu sous un volume de 1 $\mu$ l.

Les cycles d'amplification ont utilisé un thermocycleur (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation) programmé pour chaque amorce selon un protocole en accord avec les recommandations de leurs auteurs (cf. Tableau 2). A l'issue du thermocycle, il a été réalisé une migration des 11 $\mu$ l de produits de PCR, dans un gel d'agarose (Agarose D1 Low EEO, pronadisa, Condia) à 2%, dans une cuve à électrophorèse (Wealtec et Biorad) contenant du tampon TEB 1x (Tris base 0.89 mol/L, Acide borique 1.54 mol/L, EDTA sel dissodique 0.025 mol/L). L'introduction dans les puits se faisait après mélange du produit de PCR avec 2 $\mu$ l d'une solution aqueuse contenant 40% de glycérol et 0,25% de bleu de bromophénol. Une tension de 120V (500 mA) était appliquée pendant 1 heure. Le marquage de l'ADN a été réalisé après la migration par incubation du gel pendant 5 min dans une solution de bromure d'éthidium (environ 0,3 mg/l) puis lavage dans l'eau distillée pendant 15 minutes. La lecture des gels s'est faite après photographie sous éclairage UV ( $\lambda=302$ nm, DyNA Light, Labnet).

Lorsque les PCR étaient effectuées sur les dilutions successives d'ADN ou de sang parasité, l'introduction de l'échantillon dans le mélange réactionnel (master mix) se faisait

systématiquement dans le sens des dilutions décroissantes de manière à éviter les risques de contamination d'une dilution par une dilution inférieure. Toutefois, le contrôle négatif était toujours manipulé en dernier afin de détecter une éventuelle contamination avec un risque maximal.

Toutes les manipulations ont été répétées plusieurs fois et par plusieurs manipulateurs, afin d'obtenir les résultats les plus stables et concordants possibles.

Nom	Auteur	Séquence	Concentrations des réactifs dans le milieu réactionnel							Protocole thermocycle					Taille du produit (bp)
			Buffer	Eau distillée	MgCl2 (mM)	dNTP (µM)	Amorce (µM)	DMSO (%)	Taqpol (unit/11µl de milieu réactionnel)	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Extension	Terminaison	
TBR	Masiga, Smyth et al. 1992	TBR1: 5' GAATATTAACAATGCGCAG 3'	1x	qsp	1,5	200	1		0,5	94°C ; 60s	94°C ; 30s	60°C ; 60s	72°C ; 30s	7 2°C ; 120s	164
		TBR2: 5' CCATTTATTAGCTTTGTTGC 3'	1x	qsp			1				30				
TEPAN	Panyim, Viseshakul et al. 1993	TEPAN1: 5'AGTCACATGCATTGGTGGCA 3'	1x	qsp	1,5	200	1		0,5	94°C ; 60s	94°C ; 30s	60°C ; 60s	72°C ; 3 0s	72°C ; 120s	122
		TEPAN2: 5' GAGAAGGCGTTACCCAATCA 3'	1x	qsp			1				30				
WUYTS	Wuyts, Chokesajjawatee et al. 1994	WUYTS1: 5'TGCAGACGACCTGACGTACT3'	1x	qsp	1,5	200	1		0,5	94°C ; 60s	94°C ; 30s	60°C ; 60s	7 2°C ; 30s	72°C ; 120s	227
		WUYTS2: 5'CTCCTAGAAGCTTCGGTGTCTT	1x	qsp			1				30				
ESAG	Holland, Claes et al. 2001	ESAG1: 5'ACATTCCAGCAGGAGTTGGAG 3'	1x	qsp	3	200	0,5	0,5	0,5	94°C ; 240s	94°C ; 60s	55°C ; 60s	72°C ; 60s	72°C ; 300s	237
		ESAG2: 5' CACGTGAATCCTCAATTTTGT 3'	1x	qsp			0,5				35				
TRYP4	Desquesnes Non publié	TRYP4S: 5' AAGTTCACCGATATTG 3'	1x	qsp	1,5	200	1	0,5	0,5	94°C ; 30s	94°C ; 30s	55°C ; 30s	7 2°C ; 30s	72°C ; 30s	476
		TRYP4R: 5' GCTGCGTTCTTCAACGAA 3'	1x	qsp			1				30				
TRYP1	Desquesnes, Ravel et al. 2001	TRYP1S: 5'CGTCCCTGCCATTTGTACACAC 3'	1x	qsp	1,5	200	1	0,5	0,5	94°C ; 30s	94°C ; 30s	5 5°C ; 30s	72°C ; 30s	72°C ; 30s	545
		TRYP1R: 5'GGAAGCCAAGTCATCCATCG 3'	1x	qsp			1				30				

Tabl. 2: Récapitulatif des auteurs, séquences, conditions de réalisation des PCR et produits obtenus pour chaque couple d'amorces

### **3. Résultats**

#### **3.1 Dilutions d'ADN purifié**

Le poids des produits de PCR obtenus a été conforme aux indications publiées. Nous avons pu observer la présence d'un signal décroissant au fur à mesure des dilutions successives d'ADN purifié. Notre attention a ainsi porté sur la zone de dilution présentant une extinction du signal.

Les résultats permettent de répartir les couples d'amorce en trois groupes. Un premier groupe contient TBR et ESAG, qui présentent les meilleures performances sur ce test, avec la capacité de détection de l'ADN jusqu'au 100 000<sup>ème</sup> de la concentration de l'échantillon de référence (cf. Figure 5 et 6), ce qui correspond d'après nos estimations à une quantité d'ADN de 0,011pg (soit environ 15% du poids du génome d'un trypanosome) introduite dans la réaction PCR. Ces scores sont retrouvés plus fréquemment avec TBR qu'ESAG. Dans les deux cas, lorsque ces deux amorces n'atteignent pas ces scores particuliers, leurs performances rejoignent celles du deuxième ensemble défini ci-dessous. Les signaux donnés par les amorces TBR sont nets mais assez faibles. Des « smears » sont souvent présents sans toutefois gêner la lecture du gel. Un schéma en bandes multiples lié à la formation d'oligomères (dimères, trimères ou plus) de la séquence cible est observé systématiquement (cf. Figure 5). Pour ESAG, le signal est unique, net, mais d'intensité rapidement décroissante : fort sur les premières dilutions et assez rapidement affaibli à partir de la 4<sup>ème</sup> en général (équivalente à 0,228 pg d'ADN introduit dans le milieu) et parfois avant (cf. Figure 6). Aucune bande non spécifique n'a été observée.

Un deuxième ensemble se détache, comprenant les amorces TEPAN, WUYTS et TRYP4. (cf. Figures 7, 8 et 9) Les performances de ce deuxième ensemble sont centrées sur les dilutions 1/5 000 et 1/10 000, parfois jusqu'à 1/25 000, correspondant à une estimation de 3,0 ; 1,5 et 0,6 équivalents génome de trypanosome respectivement. Dans certains cas, pour des raisons inconnues, il est arrivé que les amorces du premier ensemble n'aient pas réalisé les performances décrites ci-dessus, leurs résultats se trouvaient alors dans les mêmes zones de dilution que ce deuxième ensemble.

Les signaux de WUYTS et TRYP4 sont nets et forts dans les premières dilutions, et sont constitués d'une bande unique (cf. Figure 8 et 9).

Les signaux donnés par TEPAN sont de force modérée sur les premières dilutions, mais permettent toutefois une bonne lecture. Ils présentent un schéma identique aux amorces TBR, lié à la répétition de la séquence et la formation d'oligomères (cf. Figure 7).

Finalement, les PCR utilisant les amorces TRYP1 ne permettent pas de détecter l'ADN de *T. evansi* au delà du 1.000<sup>ème</sup> de l'échantillon de référence (soit un poids d'ADN équivalent à 15 génomes de *T. evansi* introduits dans le milieu réactionnel). Les signaux de TRYP1 sont assez faibles dès les premières dilutions (cf. Figure 10).

TEPAN et TRYP1 présentent des dimères d'amorces particulièrement visibles sur le gel (cf. Figure 7 et 10). Ils sont aussi présents constamment chez ESAG (cf. Figure 6) et de manière variable selon les puits avec TBR (cf. Figure 5). Ceci témoigne d'une dimérisation des amorces qui peut diminuer la disponibilité de celle-ci pour la réaction, et donc en diminuer globalement l'efficacité. Une optimisation des conditions pourrait permettre de limiter ce phénomène.

L'attention a également été portée sur la variabilité des résultats, et on observe en revanche que les amorces présentant les plus basses limites de détection (capacité de détecter l'ADN le plus dilué) présentent la plus grande variabilité, alors que les résultats du deuxième et troisième ensemble sont plus stables.

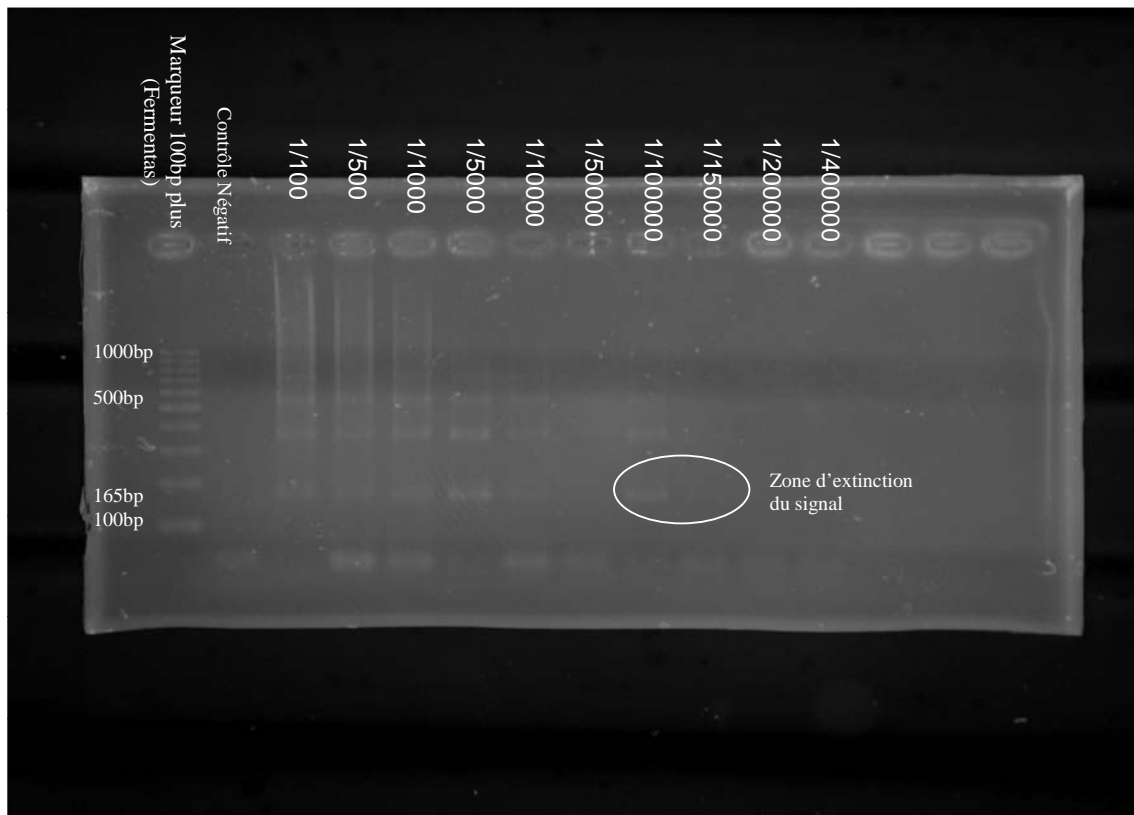


Fig. 5: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TBR sur des dilutions en série d'ADN purifié

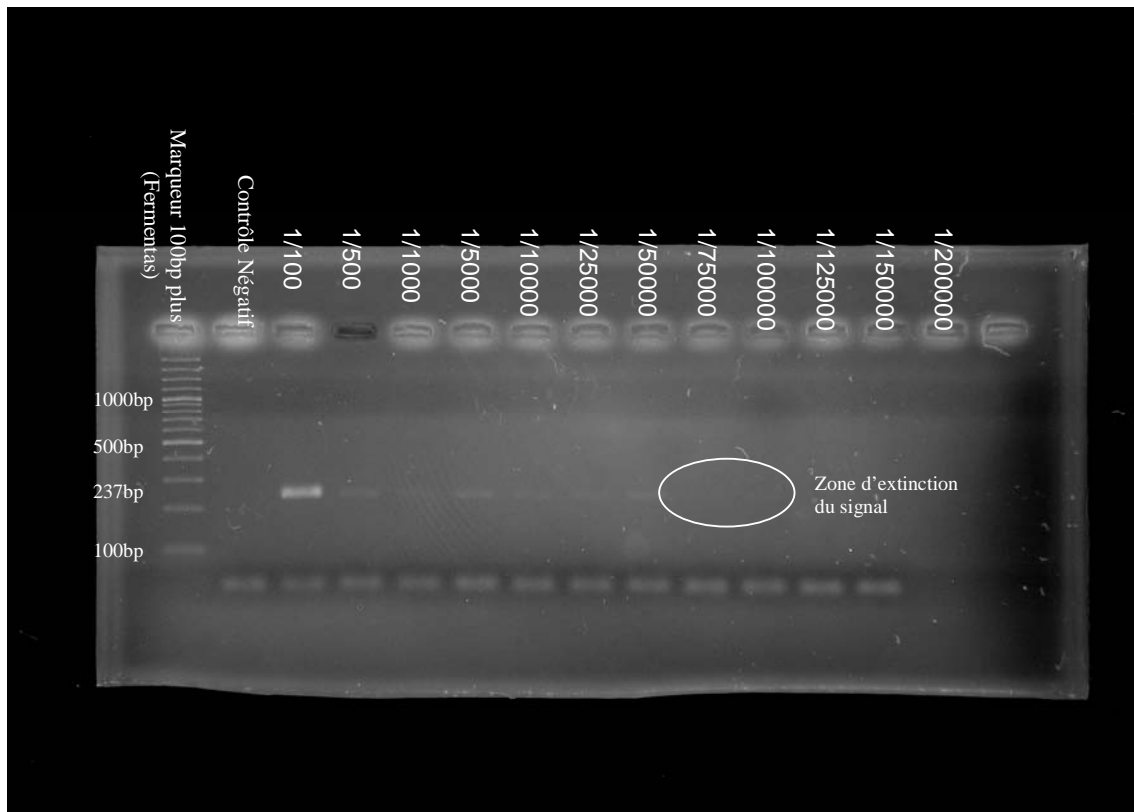


Fig. 6: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces ESAG sur des dilutions en série d'ADN purifié

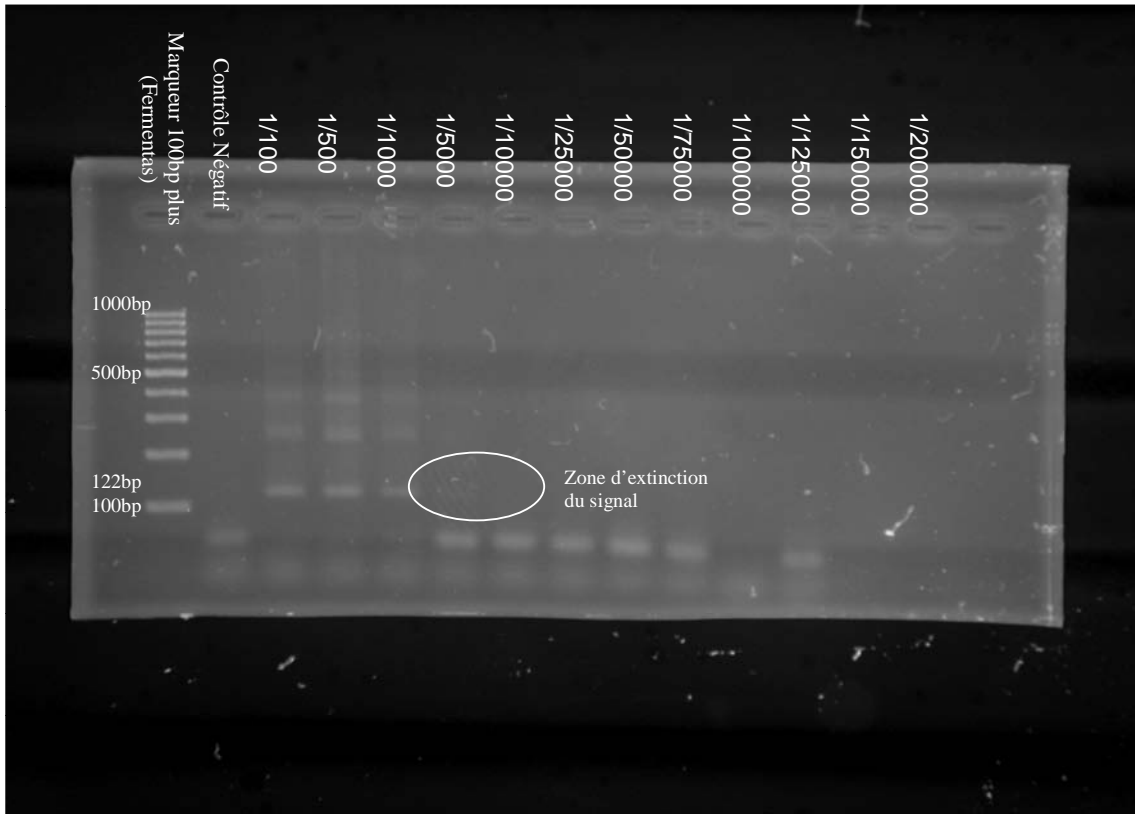


Fig. 7: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TEPAN sur des dilutions en série d'ADN purifié

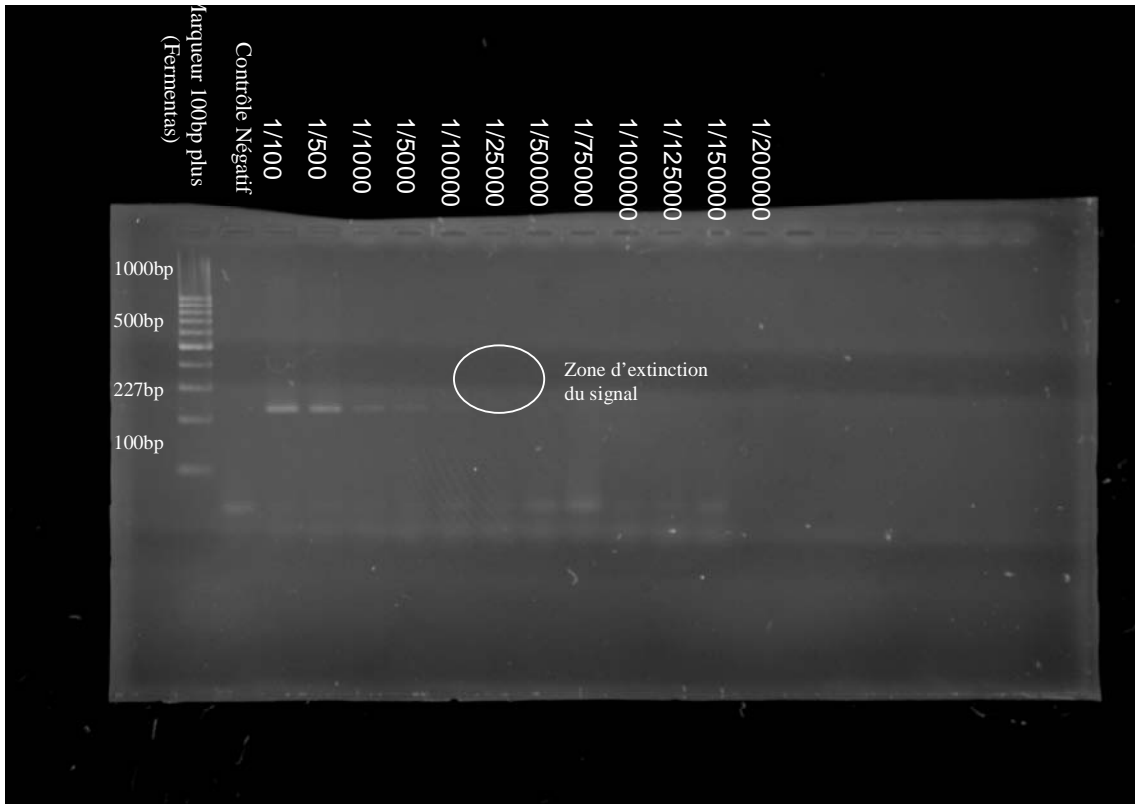


Fig. 8: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces WUYTS sur des dilutions en série d'ADN purifié



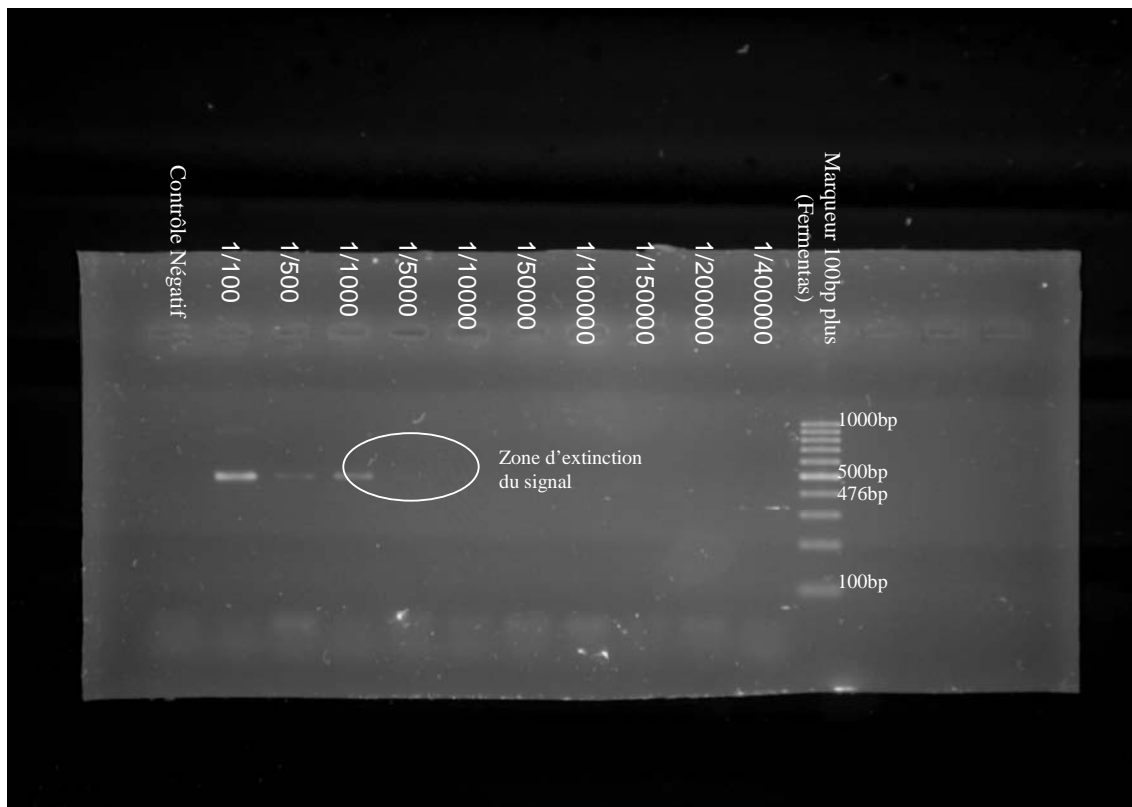


Fig. 9: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TRYP4 sur des dilutions en série d'ADN purifié

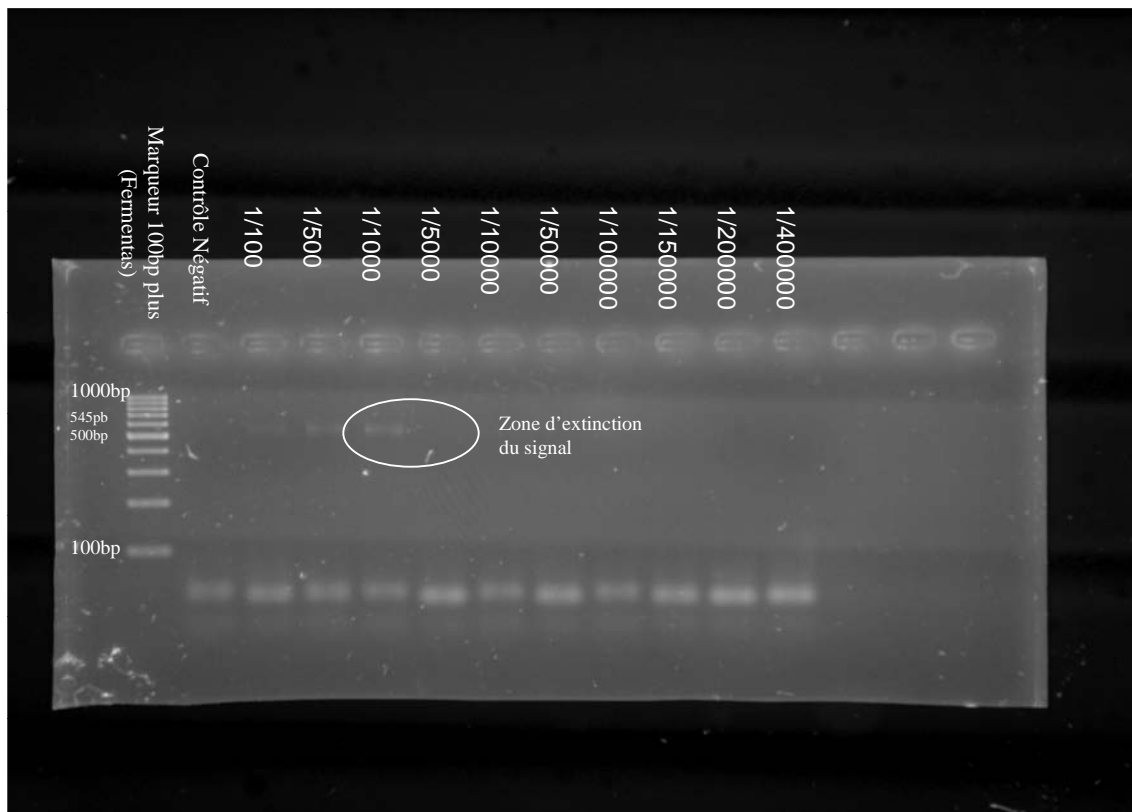


Fig. 10: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TRYP1 sur des dilutions en série d'ADN purifié

### 3.2 Dilution de sang de rat parasitémiq

Un schéma similaire peut être décrit avec les échantillons de sang de parasitémi

connues et décroissantes chez le rat, mais regroupe cette fois-ci les amorces TBR d'une part, puis un deuxième ensemble constitué d'ESAG et TEPAN, puis enfin WUYTS et TRYP4. TBR a régulièrement permis de mettre en évidence la présence de *T. evansi* dans des dilutions de sang allant jusqu'à une parasitémie évaluée de 10 à moins de 1 trypanosome par millilitre de sang (cf. Figure 11). Les dilutions de parasitémi

0.1 et 0.01 trypanosomes/ml ont été détectées faiblement positives, sans que cela puisse être attribué à une contamination (intensité du signal régulièrement décroissante). La force du signal est modérée, en particulier dans les premières dilutions où une grande quantité d'ADN produit des traînées (smears). Toutefois le signal est assez net et permet une bonne lecture. Aucune bande non spécifique n'est présente et la présence des dimères d'amorces est à peine perceptible (cf. Figure 11).

ESAG et TEPAN atteignent également parfois des valeurs de dilutions détectées proches de celle de TBR (1 trypanosome/ml) mais ne permettent le plus souvent plus la détection de l'ADN trypanosomien en dessous de 100 à 50 trypanosomes par ml (cf. Figure 12 et 13).

Le signal induit par les amorces TEPAN est assez fort, bien que la netteté soit assez variable.

Certains gels ont présenté un nombre important de bandes non spécifiques de poids moléculaire élevé, ne gênant aucunement la lecture (gels non présentés ici), et il faut noter une présence marquée de dimères d'amorces (cf. Figure 13). Pour TBR et TEPAN, le schéma en bandes lié aux oligomères est toujours observé.

En revanche, le signal induit par ESAG a montré une forte détérioration par rapport à l'étape précédente : le signal est toujours fort mais présente un épaissement fréquent des bandes. De plus, un nombre important de bandes non spécifiques a fréquemment été noté, rendant parfois la lecture impossible (cf. Figure 12 : sur ce gel, la lecture est possible, toutefois les bandes sont déjà perceptibles). Les contrôles négatifs étaient toujours complètement négatifs, et les mêmes échantillons testés avec d'autres amorces ne présentaient pas ces bandes non spécifiques, on peut supposer que le couple d'amorce ESAG amplifie une autre séquence d'ADN du trypanosome, d'un autre pathogène ou de l'hôte, ce qui désavantage considérablement ESAG par rapport aux autres amorces.

Finalement, TRYP4 et WUYTS ont détecté le plus communément des parasitémi

de l'ordre de 1000 à 100 trypanosomes par ml, les amorces WUYTS permettant toutefois assez régulièrement d'atteindre les 100 trypanosomes/ml (cf. Figure 14 et 15). Dans les

deux cas, les signaux sont forts et nets, bien que pour WUYTS on puisse noter la forte présence de dimères d'amorces ainsi que des bandes non spécifique qui ne gênent pas la lecture.

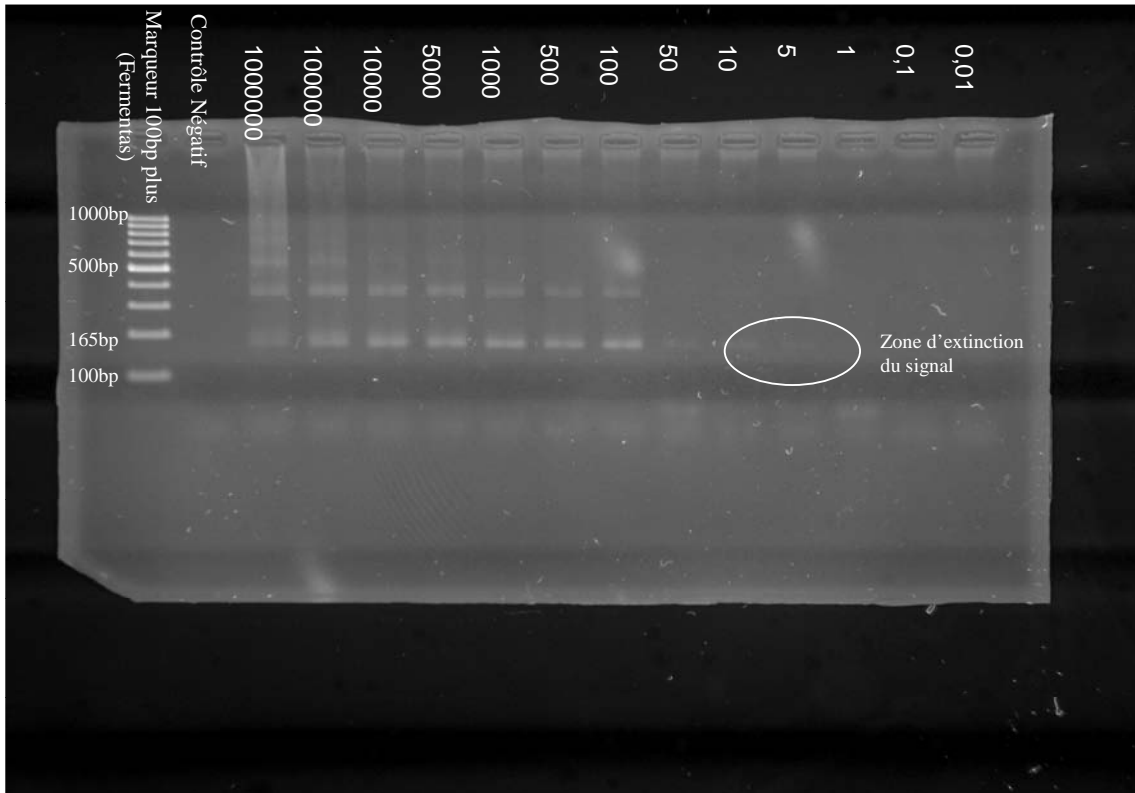


Fig. 11: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TBR sur des dilutions en série de sang de rat parasitémique

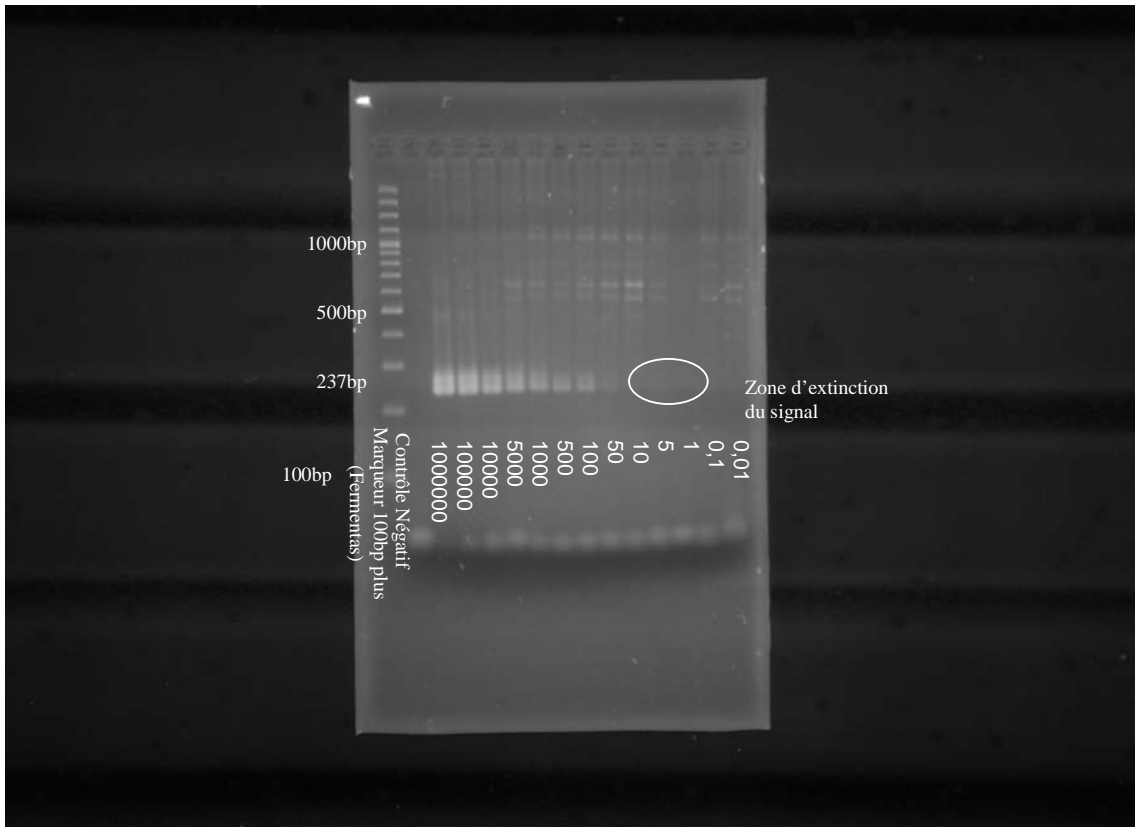


Fig. 12: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces ESAG sur des dilutions en série de sang de rat parasitémique

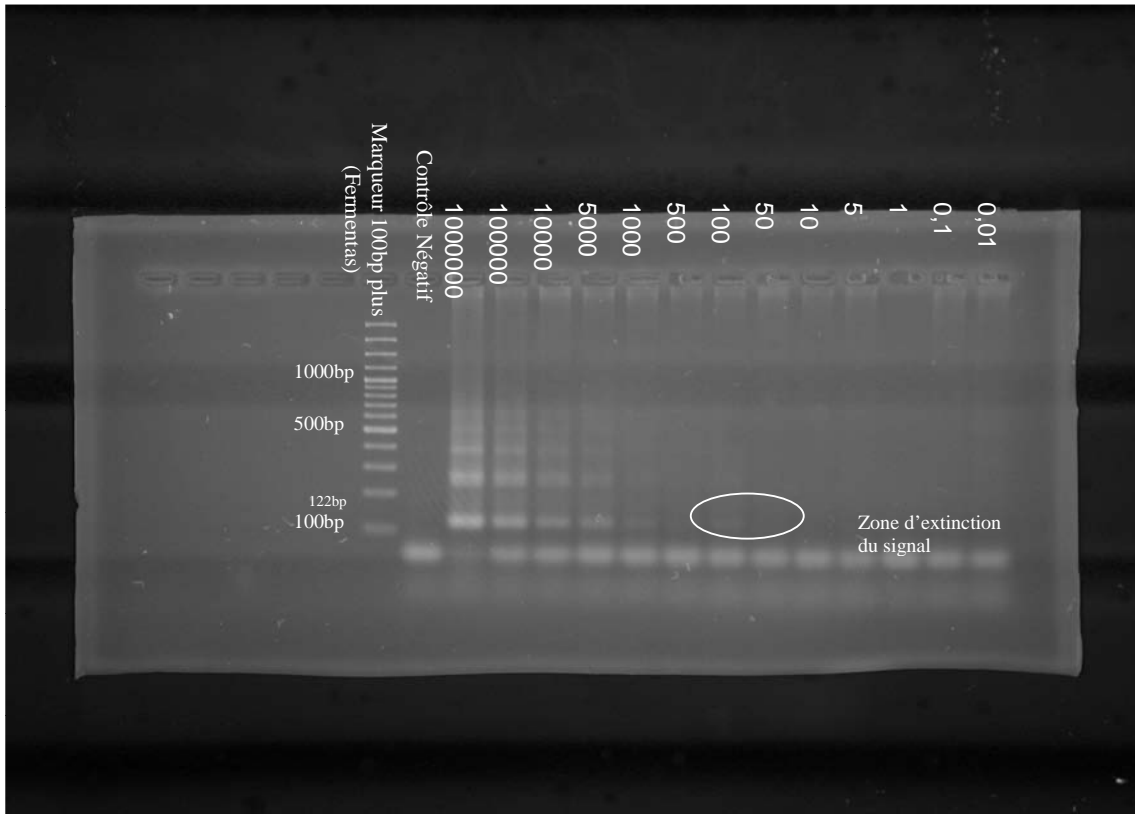


Fig. 13: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TEPAN sur des dilutions en série de sang de rat parasitémique

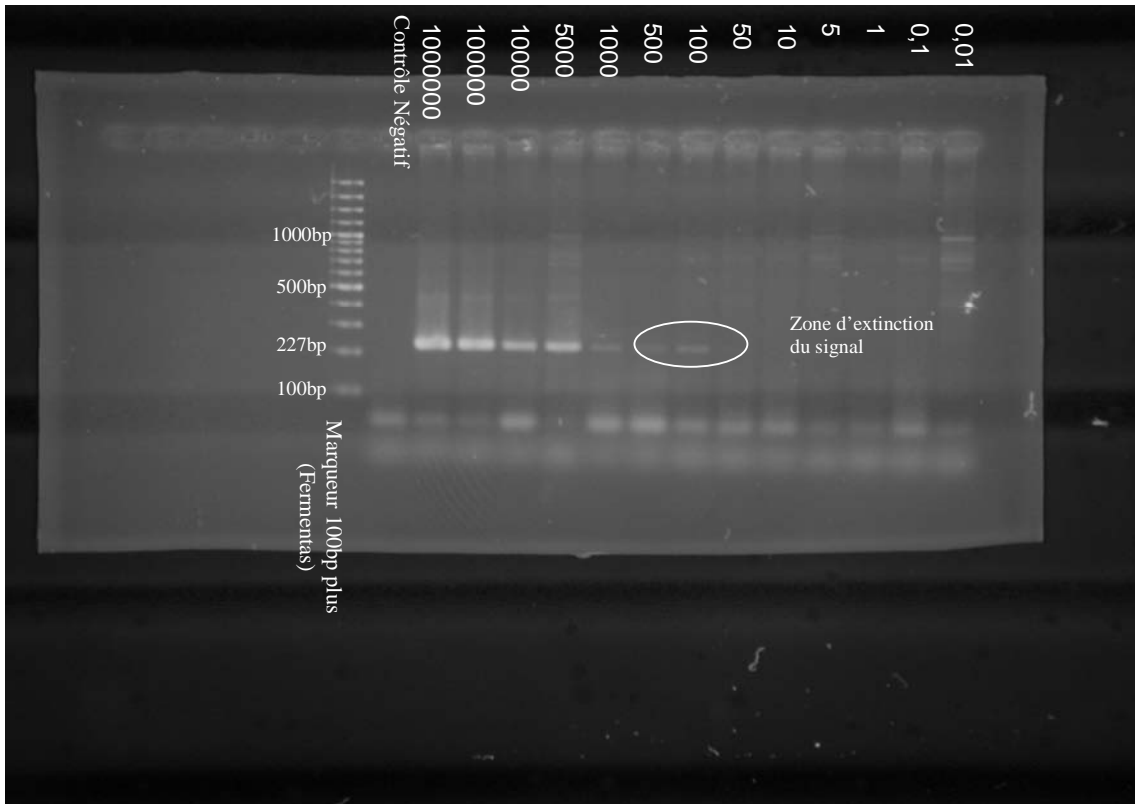


Fig. 14: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces WUYTS sur des dilutions en série de sang de rat parasitémique

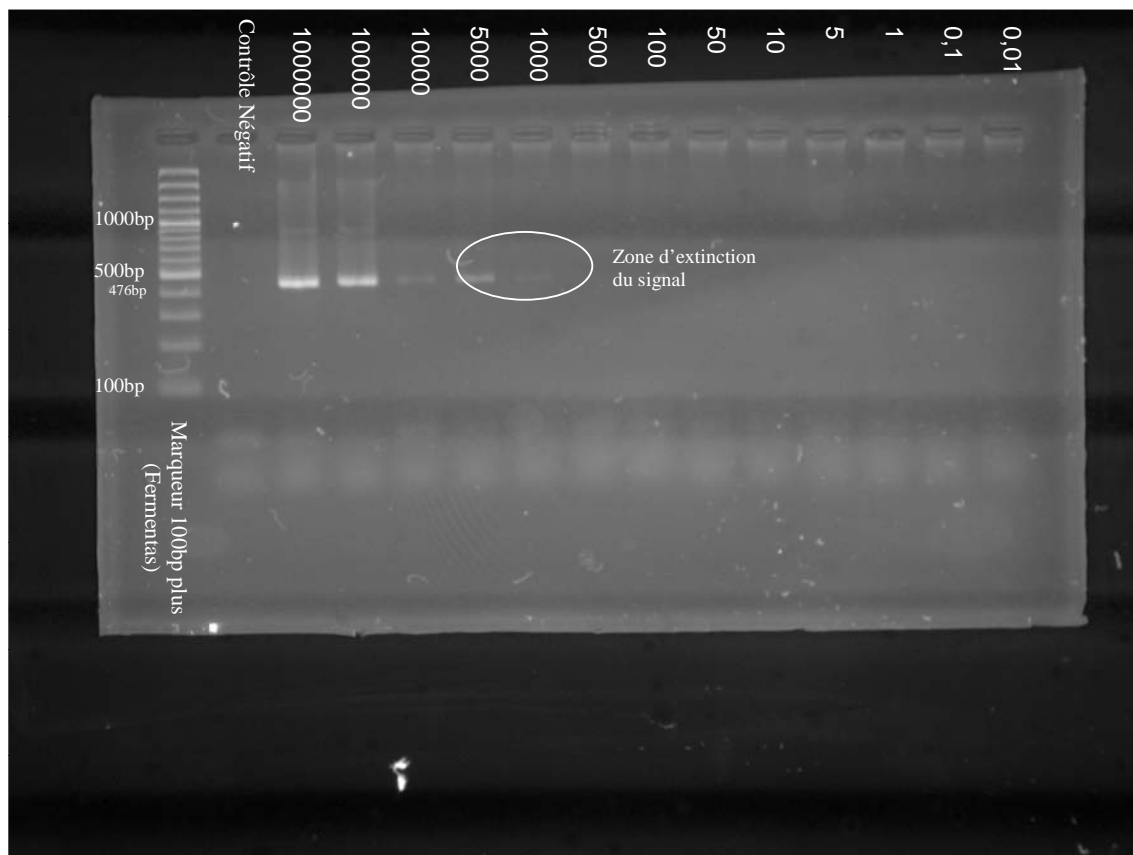


Fig. 15 : Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TRYP4 sur des dilutions en série de sang de rat parasitémique

### **3.3 Echantillons de terrain :**

L'utilisation de TBR a permis de détecter 55 infections parmi les 119 animaux testés positifs par ELISA (46%). Aucun produit nouveau n'est apparu avec ces amorces (cf Figure 16).

L'utilisation d'ESAG a présenté une accentuation du phénomène déjà observé avec le sang de rat : la présence de nombreuses bandes non spécifiques. Ceci a entraîné d'importantes difficultés pour la lecture de gels à l'issue de l'électrophorèse, et donc de l'interprétation des résultats, dans certains cas impossible tant les bandes non spécifiques sont plus visibles que le produit spécifique attendu (cf Figure 17).

La réalisation des PCR sur les mêmes échantillons avec le couple d'amorce TEPAN a montré 20 (17%) réactions positives, soit une sensibilité de 36% par rapport aux résultats obtenus avec TBR (gold standard).

Les amorces WUYTS ont permis de détecter 13 infections (11%) soit une sensibilité de 24% par rapport aux résultats de TBR.

TRYP4 en a décelé 4 (3%) soit 7% par rapport à TBR (cf Figure 19).

Les signaux TRYP4, TBR et TEPAN sont peu changés par rapport aux étapes précédentes. Toutefois, TEPAN a présenté dans un certains nombres de gels, de nombreuses bandes non spécifiques de haut poids moléculaire, ne gênant pas la lecture la plupart du temps (cf Figure 18). Les gels correspondant aux PCR avec les amorces WUYTS ont présenté de nombreuses bandes non spécifiques, la lecture des résultats a toutefois été possible (cf Figure 20).

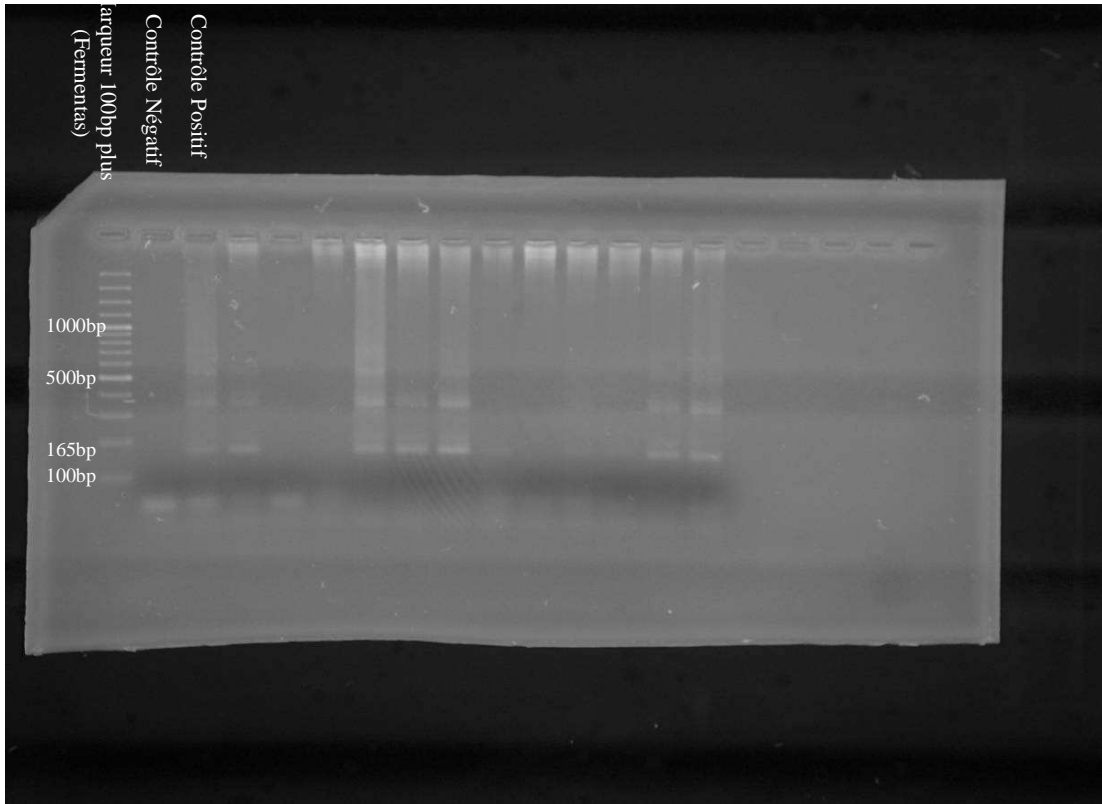


Fig. 16: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TBR sur des échantillons de terrain de bovins

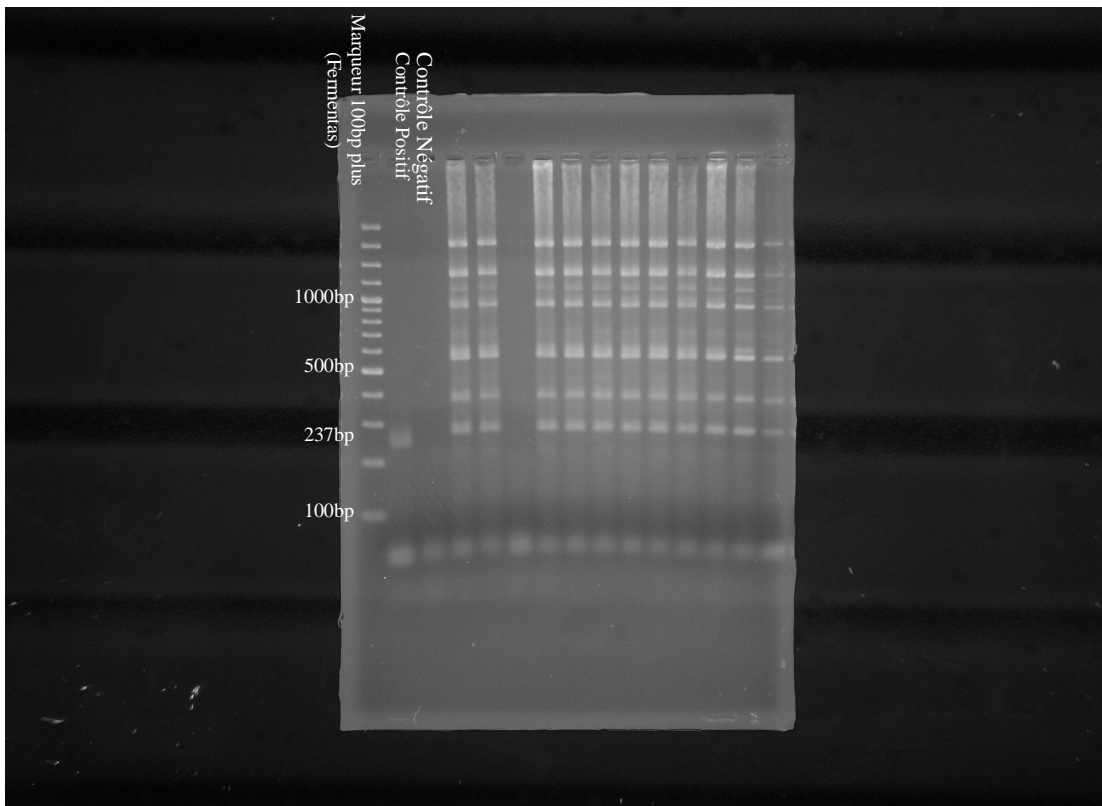


Fig. 17: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces ESAG sur des échantillons de terrain de bovins



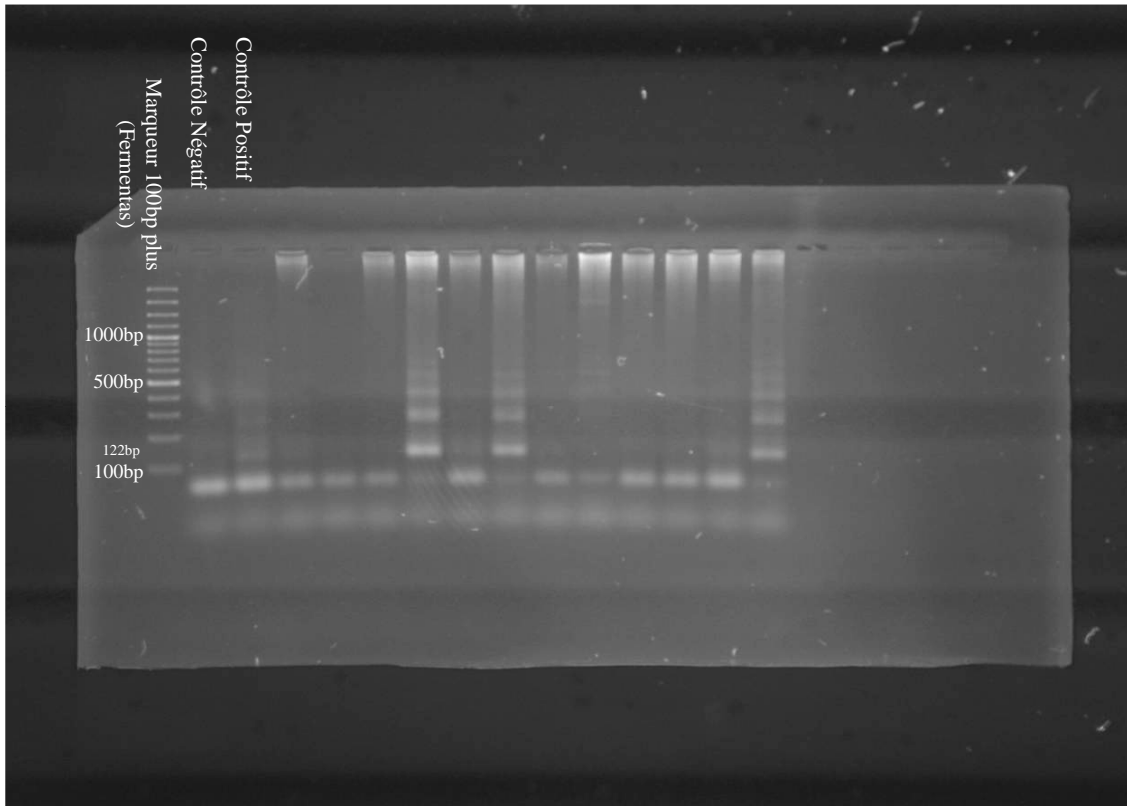


Fig. 18: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TEPAN sur des échantillons de terrain de bovins

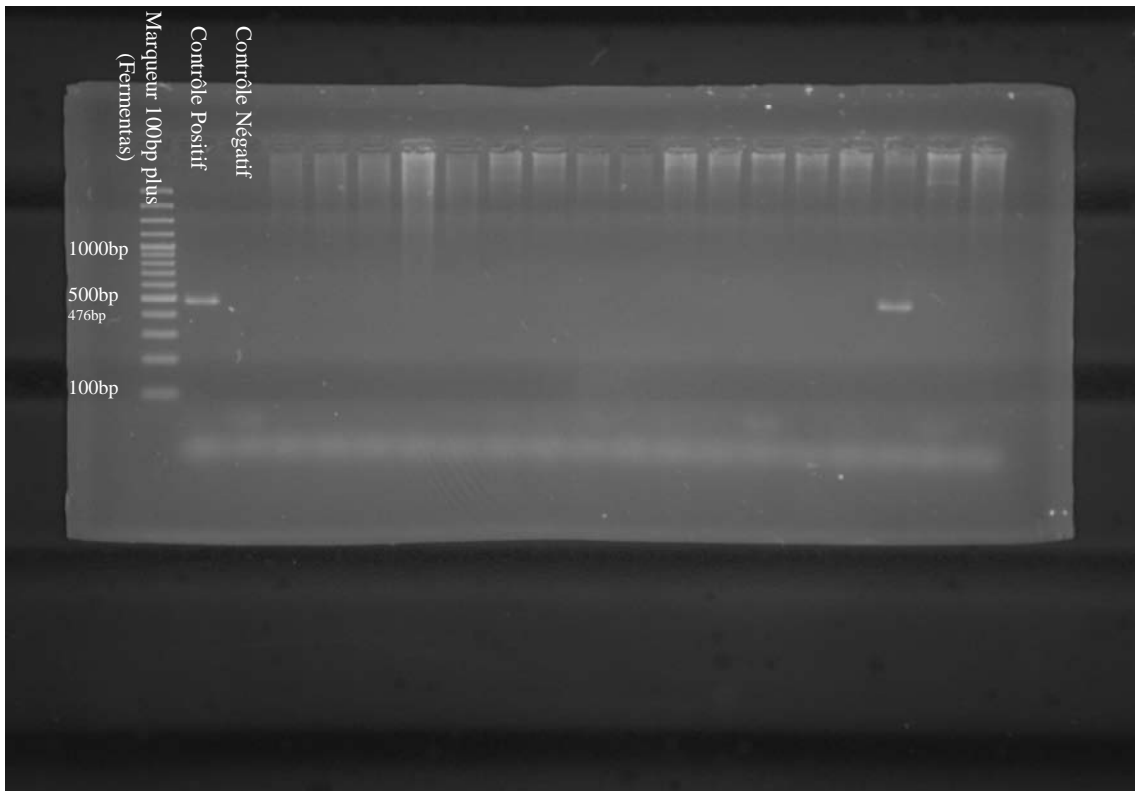


Fig. 19: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces TRYP4 sur des échantillons de terrain de bovins

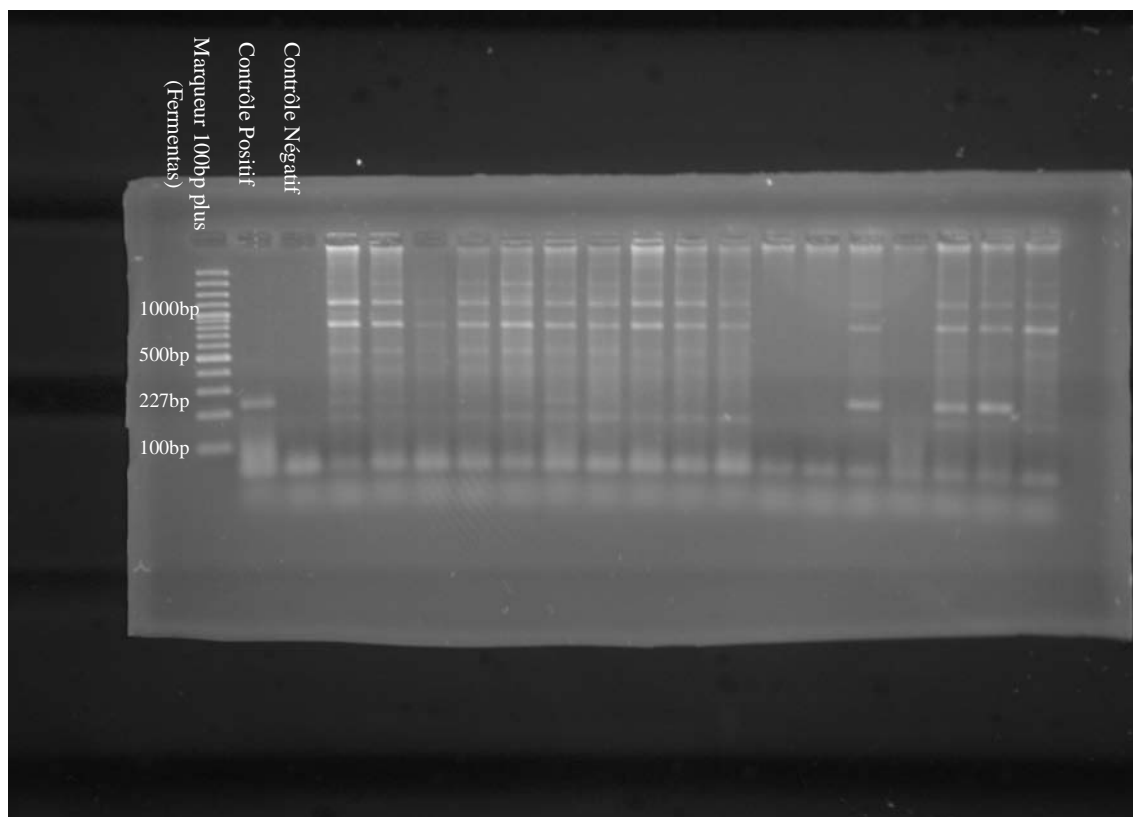


Fig. 20: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les amorces WUYTS sur des échantillons de terrain de bovins

Amorces	Publication (rapporté en trypanosome/ml)	ADN dilué (équivalent nombre de trypanosomes)		Sang rat (trypanosome/ml)	
		de	à	De	à
TBR	2	1	0,15	10	1
ESAG	100	2	0,3	100	50
TEPAN	50	3	0,6	100	50
TRYP4	Non évalué	3	0,6	1000	100
WUYTS	100	3	0,6	1000	100

Tabl. 3: Bilan des résultats de seuils de détection des amorces évaluées dans ce travail et dans les publications d'origine.

#### **4. Discussion**

Les résultats obtenus doivent être considérés comme une comparaison des différentes amorces plus que comme une valeur absolue de limites de détection (cf. Tableau 3). En effet, le dosage de l'ADN par spectrophotométrie est une estimation, dont l'équivalence avec un nombre de parasite dépend encore d'une valeur estimée du poids du génome de trypanosome. De même, il est toujours difficile de connaître avec une grande précision les parasitemies exactes issues de dilutions successives, malgré la répétition des évaluations et les vérifications de la parasitemie de départ. Néanmoins, les résultats obtenus permettent de donner une estimation de ces limites de détection. On peut constater, d'après les résultats obtenus, que la plupart des techniques PCR ont des limites de détection inférieures à celle qu'offrent d'autres techniques parasitologiques comme l'observation directe d'une goutte de sang entre lame et lamelle (5 000 à 10 000 trypanosomes/ml) Cependant, la méthode de Woo présente une limite de détection aux alentours de 50 à 100 trypanosomes par millilitre de sang (Desquesnes and De La Rocque 1995; Desquesnes, Tresse 1996), ce qui est, par rapport à nos estimations sur sang de rats infectés, assez intermédiaire vis-à-vis des performances des différentes amorces. En effet, si les amorces TBR, ESAG et TEPAN détectent des parasitemies inférieures ou égales, les amorces TRYP4 et WUYTS n'ont pas, dans nos travaux, atteint des seuils de détection inférieurs à 100 trypanosomes par ml. Les travaux réalisés sur TRYP4 avaient déjà indiqué une assez faible sensibilité, l'atout essentiel résidant dans son caractère polyspécifique, et sa capacité à détecter des infections multiples et à caractériser le trypanosome par le poids moléculaire du ou des produits obtenus (Desquesnes et al. données non publiées, communication personnelle). Pour WUYTS, nos données sont concordantes avec la publication initiale dans la mesure où la PCR permet de mettre en évidence la présence de 1 à moins de 1 trypanosome par réaction. Bien sûr il faut noter que la parasitemie équivalente à ce résultat dépend de la taille de l'échantillon introduit dans le milieu réactionnel. Ainsi si on travaille avec un échantillon de 10 $\mu$ l introduit dans la réaction, alors 1 trypanosome par réaction (par 10 $\mu$ l) correspond à une parasitemie de 100 tryp/ml. Si on travaille avec un échantillon de 1 $\mu$ l, 1 trypanosome par réaction (par 1 $\mu$ l) correspond alors à une parasitemie de 1000 tryp/ml. Ces équivalences sont encore modifiées selon la technique d'extraction utilisée, à savoir si la technique est sans effet sur la concentration de l'ADN ou si elle engendre une concentration ou une dilution de l'ADN. Néanmoins, dans les conditions utilisées et dans un contexte asiatique, la PCR avec WUYTS ou TRYP4 ne semblerait pas apporter une avancée considérable en termes de sensibilité par rapport à une technique telle que la technique de Woo. L'atout de TRYP4 pourrait se trouver dans la capacité de détecter des infections

multiplés, mais en Asie, cet atout est d'importance moindre car le seul trypanosome pathogène connu dans cette région est *T. evansi*, et ces amorces ne permettent pas de le distinguer des autres trypanozoon. En revanche, si nous sommes à des seuils de détection semblables à certaines techniques parasitologiques, il faut cependant noter que la PCR permet un traitement différé des échantillons dans le temps et dans l'espace, et qu'elle permet de procéder à un grand nombre d'échantillons à la fois, ce qui n'est pas le cas des méthodes parasitologiques, souvent longues, et dont le résultat est hautement variable selon le manipulateur, le temps de lecture, le mode et la durée de conservation des prélèvements (Holland, Claes et al. 2001).

L'amorce TEPAN a montré des résultats intéressants, avec une sensibilité intermédiaire mais une bonne stabilité des résultats au cours des tests. Il faut également remarquer que d'après la publication initiale, l'utilisation d'enzymes de restriction Sau 3 AI permet la réduction du schéma de bande lié aux oligomères (Panyim, Viseshakul et al. 1993). En multipliant le nombre de séquences unitaires dans le milieu réactionnel, il serait alors possible d'augmenter la sensibilité de la technique. Toutefois l'utilisation d'un tel procédé ajouterait environ 50 centimes d'euro par réaction de PCR, ce qui peut s'avérer inapplicable étant donné le prix déjà élevé de la PCR pour une application vétérinaire le plus souvent collective.

Concernant ESAG, les premières étapes de l'évaluation ont donné des résultats prometteurs en terme de sensibilité, malgré la non répétition de la séquence cible dans le génome de *T. evansi*. Cependant, la tendance à produire des bandes non spécifiques, déjà observée lors des dilutions de sang de rat parasitémiq, s'est fortement accentuée dans la phase de test sur les échantillons de terrain de bovins. Des PCR avec ces mêmes amorces ESAG ont été réalisées avec d'autres types d'extraction (ex : Chelex, Genekam) et n'ont alors plus montré de bandes non spécifiques. Dans ces cas, la PCR était en mesure de détecter des parasitémies de l'ordre de 500 à 1000 trypanosomes/ml. Ceci permet de suggérer deux éléments : d'une part, le choix de l'amorce n'est pas le seul à influencer la sensibilité de la PCR (données non publiées), et d'autre part, l'extraction au phénol chloroforme, bien qu'optimale dans la plupart des cas, pourrait engendrer une présence trop importante d'ADN dans l'échantillon, gênant l'hybridation d'ESAG avec la séquence cible, et donnant ainsi lieu à ces nombreuses bandes non spécifiques. Ceci semble confirmé par le fait que les bandes non spécifiques augmentent lorsque le signal spécifique diminue (et donc la parasitémie).

Une hypothèse permettant d'expliquer la présence de ces bandes non spécifiques serait l'interaction d'ESAG avec une séquence d'un autre agent pathogène. La publication

initiale de cette amorce mentionne en effet l'absence de réaction croisée avec *T. theileri*, mais souligne que cela n'a pas été étudié pour *Anaplasma*, *Theileria* et *Babesia*. Or un ensemble de tests concernant d'autres pathogènes ont été effectués sur ces mêmes échantillons, et ont révélé de fortes prévalences de babésioses notamment (donnée non publiées, communication personnelle Jittapalapong et al.). Toutefois, la présence de bandes non spécifiques sur les dilutions de sang de rat parasitémique peut mettre en doute cette hypothèse. En revanche, une autre hypothèse envisageable est celle de l'interaction avec des séquences d'ADN de l'hôte, le travail initial ayant été réalisé sur le buffle et non sur sang de bovin. Ce phénomène rendant impossible la lecture et l'interprétation des résultats, il n'est pas envisageable d'utiliser les amorces ESAG sans une phase supplémentaire : un travail plus approfondi sur la spécificité de ce couple d'amorce est hautement souhaitable, ainsi qu'un travail d'optimisation des paramètres de la PCR si cela peut permettre de diminuer ce phénomène. Enfin, bien que toutes les précautions aient été prises lors des manipulations, on ne peut entièrement écarter la possibilité d'une dégradation partielle des amorces. En effet une rupture des amorces pourrait provoquer ce genre de schéma multi bandes. Les amorces ESAG ont donc été nouvellement synthétisées, et utilisées sur les mêmes échantillons afin d'écarter cette dernière hypothèse. Un résultat similaire a été obtenu avec de très nombreuses bandes non spécifiques rendant la lecture des gels d'électrophorèse impossible. L'hypothèse de l'altération des amorces est donc peu probable et nous conduit à conclure que dans ce contexte, l'utilisation des amorces ESAG pour la détection de *T. evansi* dans le sang de Bovins n'est pas adaptée.

La plus grande sensibilité et la plus grande stabilité dans les résultats semblent être obtenues par l'utilisation des amorces TBR, puisque les différentes observations convergent : ce couple d'amorce a permis à plusieurs reprises de détecter moins d'un trypanosome, et a été de manière constante plus performante que les autres dans les mêmes conditions. Cette sensibilité particulière est à mettre en relation avec la séquence cible amplifiée par le couple d'amorce, qui est une séquence hautement répétitive d'ADN satellite (estimé à 20 000 copies). Il semble même que l'on puisse encore améliorer la technique par le biais d'utilisation d'enzyme de restriction *Sau 3 AI* sur le même principe que pour l'amorce TEPAN, comme cela avait été suggéré dès la première publication de ces amorces, ou tout autre technique permettant de fragmenter ces portions d'ADN satellite en séquences unitaires. De plus, le signal induit par ces amorces, bien que parfois un peu faible, a toujours été net et lisible et n'a jamais présenté de bandes non spécifiques. Il semble donc que, dans des conditions similaires, le couple d'amorce TBR représente, par rapport aux autres amorces testées, un optimum quand aux limites de détections et à la qualité du signal.

Il a souvent été mis en cause la signification biologique des résultats PCR, suggérant la possibilité de persistance de matériel génétique parasitaire longtemps après l'infection. Ce travail montre donc qu'il faut en fait une parasitémie non négligeable pour être en mesure de positiver le résultat de la PCR, et d'autres travaux ont montré à plusieurs reprises une négativation des résultats de PCR, de 12h (Wuyts, 1994) à 24h (Holland, 2001) seulement après traitement des animaux parasitémiques (et positifs en PCR). La PCR est donc un outil permettant la détection d'une infection effective et en cours, mais avec une parasitémie assez faible, ce qui constitue bien un avantage réel de cet outil et justifie largement son utilisation plus extensive.

Quoiqu'il en soit, il existe d'importantes variations de sensibilité selon les amorces utilisées, mais également selon les techniques et les conditions de préparation et de réalisation de la PCR. Il convient donc d'être conscient et réaliste sur les capacités réelles de l'outil utilisé, et d'en tirer les conclusions adaptées quant aux résultats diagnostiques obtenus. Ainsi, lors de la mise en place du diagnostic PCR dans un laboratoire, il pourrait être à recommander d'effectuer une phase d'essai préliminaire afin d'évaluer et d'optimiser les performances de l'outil dans les conditions locales.

De manière plus générale, il pourrait être intéressant et bénéfique que les travaux concernant la PCR sur *Trypanosoma evansi* s'orientent vers une optimisation et une consolidation des outils déjà en place, plutôt que la mise au point de nouvelles amorces qui n'offrent que peu d'avancées par rapport à celles existant déjà. Par ailleurs il est souhaitable de voir inclure dans les travaux de mise au point de nouvelles amorces, une phase d'évaluation de sensibilité et de limite de détection, en comparaison avec les amorces les plus performantes. Dès lors, il est justifié par le présent travail de proposer que les amorces TBR soient utilisées en tant que « gold standard », pour l'évaluation comparative de toute autre amorce en développement. Il faut noter en revanche qu'en termes de spécificité, ces amorces TBR ne peuvent pas constituer une référence car leur spécificité s'arrête au sous-genre Trypanozoon. Il serait donc intéressant de travailler vers une augmentation de la spécificité envers *T. evansi*, ce qui s'avèrerait particulièrement bénéfique dans des régions où des infections poly spécifiques peuvent avoir lieu.

Malgré ces tendances générales, il est important de noter qu'il existe une grande variabilité dans les résultats. Cette variabilité se manifeste à plusieurs niveaux : elle peut être entre différents laboratoires, différents manipulateurs d'un même laboratoire, mais aussi entre plusieurs répétitions de série pour un même manipulateur.

Nous avons pu constater que les couples d'amorces présentant les plus fortes capacités de détection avaient également une assez forte variabilité. Il semblerait qu'à de

tels niveaux de dilution, l'«aléa de pipetage», à savoir la probabilité que le microlitre pipeté contienne la séquence cible, prend de l'importance et rend le résultat de la PCR parfois peu reproductible. Ceci permet également d'expliquer, que dans les fortes dilutions, la zone d'extinction puisse être représentée par une dilution négative suivie d'une dilution positive : malgré la probabilité décroissante de pipeter la séquence cible, il est possible qu'elle ne fasse pas partie du  $\mu\text{l}$  prélevé à la dilution D alors qu'elle y est à la dilution D+1. Outre cet aléa de pipetage, le fait d'opérer en limite de sensibilité fait que des facteurs propices ou non à la réaction de PCR peuvent prendre le dessus dans certaines conditions.

Dans notre étude, les couples d'amorce TBR et ESAG ont montré ce type de résultats, avec de fortes capacités de détection mais une importante variabilité. Toutefois une différence est notable entre les deux : la séquence cible de TBR est une séquence hautement répétée de l'ADN satellite des mini-cercles kinétoplastiques de *T. evansi*, alors que la séquence cible d'ESAG fait partie de l'ADN génomique dont le nombre de répétition est bien inférieur. Il en découle que pour TBR, malgré une importante dilution, un grand nombre de séquences cibles sont présentes dans l'échantillon, ce qui explique d'une part le seuil de détection très bas, mais également la meilleure stabilité des résultats par rapport à ESAG.

La variabilité observée par rapport aux publications initiales pourrait être en partie induite par la variabilité génétique des souches. En effet, des mutations ponctuelles au niveau du site d'hybridation de l'amorce peuvent altérer son efficacité.

Enfin, il est important de considérer que les conditions dans lesquelles ont été réalisées les travaux ont été largement sub-optimales: pas de séparation en secteurs au cours des différentes étapes de la PCR ni d'autres manipulations (favorisant les contaminations), nombreuses personnes non expérimentées manipulant le matériel sans règle commune d'utilisation, réglementation arbitraire pas toujours scientifiquement justifiée édictée par les plus anciens, stockage non organisé... Ces conditions semblent être également une source importante de variabilité des résultats. On peut en effet voir la réaction PCR comme un événement dont la réussite est plurifactorielle, et qu'il existe en quelque sorte un seuil à dépasser pour pouvoir observer un résultat positif. Ainsi, il est envisageable que malgré la réunion de l'ensemble des réactifs, d'autres facteurs (y compris certains facteurs pouvant altérer la qualité de ces réactifs) ne permettent pas de dépasser ce seuil et d'obtenir un résultat positif. Ce phénomène peut même se manifester au niveau de l'échantillon, apportant une variabilité au sein même d'un pool commun d'échantillon. Ceci peut entrer pour une part dans les problèmes de répétabilité observés au cours de ces manipulations. La restructuration du laboratoire de biologie moléculaire est donc nécessaire et en prévision, malgré la difficulté de changer les habitudes.

Dans des conditions limites, il est donc nécessaire de prendre en permanence toutes les mesures pour réduire les effets de ce phénomène et évaluer de manière la plus objective possible l'effet de ces conditions de manipulation sur les résultats, et plus précisément sur la sensibilité et la variabilité de la technique utilisée.

## **5. Conclusion**

Ce travail a permis de souligner qu'il existait d'importantes variations de sensibilité entre les différentes amorces destinées au diagnostic par PCR des infections à *Trypanosoma evansi*. Il en découle que toute mise au point d'un couple d'amorce devrait être accompagnée d'une évaluation comparative de la sensibilité et de la qualité de signal. L'évaluation comparative réalisée a permis de montrer que les amorces TBR restent les plus performantes en termes de sensibilité et de qualité du signal, ce qui nous incite à considérer ces amorces comme une référence à laquelle toute autre amorce devrait être comparée. Les amorces TBR doivent ainsi devenir un Gold standard dans les travaux d'évaluation des amorces. Notre travail a également pu mettre en évidence les qualités des amorces TEPAN. Malgré une limite de détection ne permettant pas de détecter des concentrations aussi faibles que TBR, on remarquera toutefois que le signal obtenu est parfois plus fort et visible. Si une différence existe entre les amorces, une autre source de variabilité est induite par les conditions d'utilisation d'un couple d'amorce particulier. Ainsi, lors de la mise en place d'un outil diagnostique PCR, il est indispensable de réaliser ce type de travaux préliminaires destinés à standardiser l'outil utilisé et évaluer ses performances effectives. Une étape d'optimisation par rapport aux conditions locales de travail est également fondamentale avant toute utilisation extensive. Enfin, nous avons vu la mise en échec des amorces ESAG lors de leur utilisation chez le bovin malgré leurs résultats encourageant chez le modèle rongeur : la validation chez l'espèce cible visée est donc indispensable si elle est différente de l'espèce utilisée en tant que modèle expérimental. Par ailleurs, nous avons pu évoquer au cours de ces travaux l'influence des techniques de préparations des échantillons sur les résultats de la PCR et sur les performances générales du test diagnostique. Cette problématique a été abordée dans un travail en partie réalisé conjointement à celui présenté ici, par répétition des manipulations sur les dilutions en série de sang parasité avec différents types d'extraction, afin d'évaluer l'effet du type de préparation et l'interaction avec le couple d'amorce utilisé. Ce travail en cours de réalisation et d'analyse permettra, toujours dans une démarche d'évaluation et d'optimisation des techniques utilisées, de prendre conscience de ces effets, de les estimer avec précision et de faire les recommandations adéquates.



## **Partie III : Etude sérologique chez les bovins laitiers en Thaïlande**

Le Department of Livestock Development (DLD) et l'Université de Kasetsart (KU) ont depuis près de deux ans, initié une grande enquête sur l'élevage bovin laitier en Thaïlande, afin d'étudier différentes pathologies (Brucellose, toxoplasmose, néosporose, etc...). Cette enquête, bien qu'encore à ses débuts, a permis de fournir, en une période de 15 mois, environ 2000 échantillons de sang de bovins laitiers. Dans le cadre de la collaboration entre l'Université de Kasetsart et le CIRAD pour la mise en place du projet d'étude de *Trypanosoma evansi* en Thaïlande, il a donc été décidé d'inclure le Surra dans les maladies abordées par cette enquête. Afin d'exploiter au mieux cette banque d'échantillons, il était nécessaire de mettre en place un outil diagnostique fiable et standardisé. Le choix a porté sur un test sérologique ELISA qui avait déjà été utilisé chez des bovins dans un cadre expérimental au Burkina Faso (Dia and Desquesnes 2007). La démarche a donc consisté en une première étape de standardisation de l'outil ELISA, puis à son application à la banque de sérum de bovins laitiers constituée.

### **1. Mise au point et standardisation d'un outil Ac-ELISA**

Une technique de standardisation a été proposée et publiée dans la revue scientifique et technique de l'office international des épizooties en 1997 (Desquesnes 1997). Elle établit l'importance de standardiser selon des critères internationaux, mais également à l'échelle régionale. En effet, la réactivité des échantillons provenant des populations infectées et non infectées varie selon les secteurs géographiques, la standardisation internationale doit alors faire place à la standardisation régionale et s'attacher à :

- l'échantillonnage des populations de référence locales ;
- l'établissement des fréquences de distribution des populations locales infectée et non infectée ;
- le choix de témoins représentatifs des populations locales (échantillons de référence secondaires) ;
- l'expression des résultats de la réaction par rapport à ces témoins ;
- la détermination du seuil de positivité (Desquesnes 1997).

## 1.1 Méthode de sélection des échantillons de référence

Dans le but de sélectionner des échantillons positifs et négatifs de référence, un premier lot de 500 échantillons a été analysé par ELISA et le résultat exprimé en DO (Densité Optique).

Une limite arbitraire et temporaire a été fixée telle que les  $DO < 0,250$  étaient considérées comme négative. Afin de constituer un groupe d'environ 300 échantillons négatifs, les « fermes non infectées » ont été définies comme les fermes ne présentant aucun animal avec une  $DO > 0,250$ .

La DO moyenne ( $Moy_{neg}$ ) de ces échantillons a été calculée et trois témoins négatifs, représentatifs de la population négative (réponse basse, moyenne et haute), ont été sélectionnés de telle sorte que leur DO soit égale, et 10% au dessus et en dessous de la moyenne :  $TN_1 = Moy_{neg}$  ;  $TN_2 = 0.9 \times Moy_{neg}$  ;  $TN_3 = 1.1 \times Moy_{neg}$

De la même manière, une limite arbitraire et temporaire a été fixée pour constituer un groupe de positifs, par sélection des  $DO > 0,500$ . La DO moyenne de tous ces échantillons positifs a été calculée et trois témoins positifs représentatifs de la « population positive » ont été sélectionnés :  $TP_1 = Moy_{Pos}$  ;  $TP_2 = 0.9 \times Moy_{Pos}$  ;  $TP_3 = 1.1 \times Moy_{Pos}$

Puis l'ELISA a de nouveau été réalisée pour tous les échantillons, en double, avec 3 témoins positifs et 3 témoins négatifs sur chaque plaque. Les valeurs de la DO des puits « blancs » ont été automatiquement déduites de la valeur de chaque échantillon. Les résultats ont été exprimés par un pourcentage de positivité relative (PPR), comme décrit précédemment (Desquesnes 1997), selon le rapport:

$$PPR \text{ d'un échantillon} = \frac{DO \text{ moyenne de l'échantillon} - DO \text{ moyenne des TN}}{DO \text{ moyenne des TP} - DO \text{ moyenne des TN}}$$

Le seuil de positivité (SP) a été déterminé en se basant sur le PPR moyen du groupe d'échantillons négatifs constitué à partir des fermes non infectées :

$$SP (\%) = Moy \text{ PPR}_N (\%) + 3 \text{ écarts types } (\%)$$

Un échantillon a ensuite été déclaré positif lorsque son PPR était supérieur au SP..

## 1.2 Méthodes de préparation et validation d'un antigène produit localement pour l'ELISA

Dans le but de s'assurer que l'antigène produit avec une souche locale de *T. evansi* donnera des résultats similaires aux résultats obtenus avec l'antigène produit en France (isolé sur dromadaire originaire des Canaries), un lot d'échantillon contenant

approximativement 20% d'échantillons positifs a été testé en ELISA avec les deux antigènes. Le nombre d'échantillons positifs obtenus avec les deux tests a été comparé. Un test de Wilcoxon pour séries appariées a été appliqué aux deux séries de RPP pour tester l'équivalence des résultats. (Des détails sur la méthode de préparation se trouvent en Annexe 1)

## **1.3 Résultats de la mise en place de l'outil Ac-ELISA**

### **1.3.1 Préparation d'antigènes de *T. evansi***

La préparation d'antigène au Cirad (France) et à Kasetsart (Thaïlande) a fourni une concentration protéique de 1 mg/ml et 6,8 mg/ml respectivement. Dans tous les cas, la sensibilisation des plaques a été réalisée avec une concentration de 5 µg de protéines par ml de tampon carbonaté (ph 9,6).

### **1.3.2 Sélection des échantillons de référence**

Dans la première étape, un groupe de 500 échantillons provenant de 59 fermes a été testé par ELISA. Parmi elles, 39 fermes ont été supposées non infectées (regroupant 306 échantillons avec  $DO < 0,250$ ) et 20 fermes (regroupant 194 animaux) ont été identifiées comme infectées, avec un total de 23 échantillons présentant des  $DO > 0,500$ .

Les 23 échantillons positifs ont présenté une  $DO_{Moy_{pos}}$  de 0,834. Les témoins positifs ont alors été sélectionnés pour des valeurs proches de:

$$TP_1 = 0,834 ; TP_2 = 0,750 ; TP_3 = 0,917$$

Les 306 échantillons négatifs ont fourni une  $DO_{Moy_{neg}}$  de 0,136. Les témoins négatifs ont ainsi été sélectionnés pour des valeurs proches de :

$$TN_1 = 0,136 ; TN_2 = 0,122 ; TN_3 = 0,149$$

De ce groupe de 306 échantillons négatifs a été calculé le seuil de positivité:

$$SP = 0\% + 3 \times 6\% = 18\%$$

Un échantillon est donc déclaré positif lorsque son PPR dépasse 18%.

### **1.3.3 Comparaison des résultats obtenus avec les deux types d'antigènes**

Dans la seconde étape, le test des 1979 échantillons par ELISA a été réalisé, et les résultats exprimés en PPR.

Lors de la comparaison de 40 échantillons en ELISA avec l'antigène local et importé, les mêmes huit échantillons étaient positifs. Le test de Wilcoxon pour séries appariées sur les PPR, ont indiqué une valeur de  $Z=1,30$ , soit inférieur à  $1,96$  ( $p=0,9$ ), ce qui ne permet pas, au risque 5%, d'écarter l'hypothèse d'équivalence des deux séries : les distributions des PPR obtenues avec les deux antigènes ne sont donc pas significativement décalées. L'antigène produit en Thaïlande a donc pu être validé pour un usage ultérieur.

### **1.3.4 Discussion/conclusion**

L'antigène produit en Thaïlande à partir d'un parasite isolé d'un cervidé sauvage a donné des résultats très comparables à ceux obtenus avec l'antigène produit en France avec un parasite isolé d'un dromadaire des îles Canaries. Cette observation confirme la forte homogénéité des antigènes solubles de *T. evansi*, ce qui autorise une large utilisation et diffusion des tests ELISA qui, avec les mêmes protocoles de production d'antigène, de réalisation d'ELISA et l'application de cette procédure de standardisation, est en mesure de donner des résultats comparables. Suite à ce travail préliminaire, le laboratoire de parasitologie vétérinaire de l'université de Kasetsart dispose d'un outil d'Ac-ELISA utilisable pour les travaux d'étude de *Trypanosoma evansi*. Par la suite, ces méthodes pourront être diffusées chez les partenaires du projet en Thaïlande et dans les pays voisins. Toutefois, il faut noter que les résultats sont parfois difficiles à interpréter notamment lorsque les duplicats d'un échantillon présentent des valeurs de DO très différentes. Ce phénomène est assez classiquement attribué à des erreurs de manipulation et nécessite de retester les échantillons concernés. La formation continue des techniciens de laboratoire semble donc importante afin de conserver l'atout que constitue la mise en place de cet outil standardisé, et de s'assurer de l'optimisation de son utilisation.

## **2. Matériel et méthode de l'enquête sur l'élevage bovin laitier**

### **2.1 Echantillonnage et réalisation des prélèvements**

Une stratification géographique a été réalisée sur les 4 régions qui constituent le pays. Le calcul du nombre total d'échantillons nécessaires par région a été basé sur une prévalence attendue de 10% (d'après les études précédentes), de manière à évaluer la prévalence avec une précision relative de 30% (soit une précision absolue visée de 3%) au risque 5%. Il a ainsi été déterminé qu'il fallait collecter 384 échantillons par région. Les vaches et veaux (au dessus de 5 jours) ont été sélectionnés dans des fermes elles-mêmes sélectionnées par les services vétérinaires locaux du district concerné (Department of Livestock Development). Le nombre de prélèvements réalisés dans chaque ferme a été basé sur le nombre d'animaux que contenait la ferme selon les règles suivantes :

- si le nombre total d'animaux était <6 : tous les animaux étaient prélevés
- si le nombre total d'animaux était >5 et <21 : 5 à 20 animaux étaient prélevés
- si le nombre total d'animaux était >20 : plus de 20 animaux étaient prélevés.

Le sang a été prélevé à la veine jugulaire sur tube sec (ainsi que sur tube citraté pour la réalisation de PCR). Le sang sur tube sec a été laissé 24h à 4°C afin de permettre la formation d'un caillot puis centrifugé (3000 trs/min, 10 min), puis le sérum a été collecté et stocké dans des microtubes (Eppendorf) à -20°C jus qu'à la réalisation de l'ELISA.

Le sang sur tube citraté a également été conservé à -20°C jusqu'à la procédure de préparation d'échantillon pour la PCR.

### **2.2 Réalisation des ELISA *T.evansi***

La technique utilisée est issue des techniques décrites précédemment (Desquesnes 1997; Desquesnes, Bosseno et al. 2007; Dia and Desquesnes 2007). Brièvement, des plaques Microtest 96-well Polysorp Nunc® (Nunc®, Roskilde, Denmark) ont été sensibilisées par 100 µl/puit d'antigène soluble de *T. evansi* de concentration 5µg/ml de protéine dans du tampon carbonate pH 9,6, et incubé une nuit à 4°C. Les plaques ont ensuite été rincées au PBS (Phosphate buffer saline) et le tampon de blocage (PBS comportant 7% de lait écrémé) a été ajouté à raison de 150µl/puit, avec une agitation permanente à 200 rpm pendant 45 minutes à 37°C. Le tampon de blocage était ensuite jeté. Les sérums dilués au 100<sup>ème</sup> dans du tampon de blocage ont ensuite été transférés en doubles exemplaires sur les plaques

ELISA. Après 30 minutes à 37°C et 200 rpm, les plaques ont été lavées 5 fois avec du PBS 0,1% Tween 20® (Sigma®, Saint Louis, USA) (Tampon de lavage). Puis 100µl d'IgG anti-bovin conjugué à la peroxydase dilué au 10 000ème dans du tampon de blocage ont été ajoutés aux plaques, suivi d'une incubation de 30 min à 37°C et 200 rpm. Après 5 lavages avec le tampon de lavage, 100µl de complexe substrat/chromogène TMB (K blue® TMB substrate, Neogen corp.) ont été ajoutés. Les plaques ont été agitées puis incubées pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. La densité optique a été mesurée à 630 nm dans un lecteur ELISA (Dynex MRC revelation, Bio-active co ltd).

## 2.3 Réalisation des analyses PCR

Nous utiliserons ici les résultats issus de la partie II de ce travail concernant la méthode PCR, et utiliserons plus particulièrement les résultats obtenus avec les amorces TBR1 et TBR2 sur les échantillons que le test ELISA a déterminé comme étant positifs et dont les échantillons étaient encore disponibles sous forme de sang en tube citraté afin d'en effectuer l'extraction d'ADN. Nous rappelons que :

- la préparation d'ADN a été réalisée par application d'un protocole d'extraction au phénol-chloroforme sur 30 µl de sang.
- Les PCR ont été réalisées dans 10µl de milieu réactionnel avec 1µl d'échantillon préparé en respectant les concentrations et conditions décrites par Masiga *et al.* (1992).
- La migration des produits de PCR (et du marqueur moléculaire Generuler 100bp plus, Fermentas®) a été réalisée dans un gel d'agarose à 2%, par application d'un courant de 120V pendant 1h.
- Le gel a ensuite été révélé par marquage au bromure d'éthidium et lecture sous lampe UV.

(se référer à la partie II pour plus de détails)

## 2.4 Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant les logiciels Excel, EpiInfo et MapInfo et a consisté en un calcul et cartographie des prévalences obtenues par zones étudiées. Un Chi2 de Pearson a permis d'étudier l'effet de l'âge sur le risque d'infection. Enfin la comparaison des tailles d'échantillons selon le statut infectieux des fermes a été réalisée à l'aide d'un test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Withney.

### **3. Résultats**

#### **3.1 Echantillonnage**

L'enquête a permis la collecte de 1979 échantillons provenant de 222 fermes laitières, localisées dans 31 districts (sur 926) distribués à travers le pays dans 13 Provinces (sur 77) : Udorn thani, Khon Khaen, Sakon Nakhon, Nakorn Radch Srima, Chiang Mai, Lum Pang, Chiang Rai, Pat ta lung, Kanjanaburi, Radchaburi, Nakorn Patom, Saraburi et Lopburi. Le nombre souhaité de prélèvements a été atteint pour les régions Nord (642), Nord-Est (460) et Centre (690) mais pas pour la région Sud (187).

Dans les régions Nord, Nord-Est et Centre, 3 à 5 provinces ont été échantillonnées contre seulement une dans le Sud. D'autre part, dans chaque province, un nombre variable de districts ont été échantillonnés, de 1 à 7. Finalement, dans chaque district un nombre également variable de fermes ont été prélevées, en moyenne 7 mais avec un fort écart type de 5, les nombres de fermes prélevées variant de 1 à 24.

Les âges des animaux prélevés s'étendent de 6 jours à 16 ans, avec une médiane à 5 ans. Les premier et troisième quartiles se trouvent respectivement à 3 ans et 6 ans, et le nombre de veaux d'âges inférieurs à 1 an était égal à 5% du nombre total d'animaux prélevés.

Notons que dans 4 fermes, les consignes d'échantillonnages n'ont pas été strictement respectées, nous reviendrons sur ce point dans la discussion.

#### **3.2 Résultats généraux**

Parmi les 1979 échantillons testés, provenant de 222 fermes, 163 étaient positifs ( $8,2 \pm 1,2$  %) et appartenaient à 56 fermes ( $25 \pm 6$  % des fermes). Un total de 597 des animaux prélevés étaient exposés à un animal infecté (30% de la population échantillonnée). Au sein des fermes infectées, la prévalence était de  $27,3 \pm 3,6$  % (163/597).

#### **3.3 Groupes d'âges**

En classant les animaux en trois groupes d'âge, on observe une augmentation des taux de prévalence avec l'âge : de 4,7% (<2 ans) à 8,9% (2-5 ans) et 11,0% (>5 ans). Toutefois, cette analyse en trois groupes n'est pas statistiquement significative. En revanche, en considérant deux groupes par rapport au seuil d'1 an et prenant en compte les fermes infectées qui comportent à la fois des animaux des deux groupes, la prévalence était nulle

chez les <1an, et le taux de prévalence de 30% chez les >1an, était significativement supérieur ( $\chi^2=8.89$  ;  $p<0.01$ ).

### 3.4 Distribution géographique

Le détail des résultats pour chaque province et district est présenté dans la figure 21 et le tableau 4, dans lesquels, pour chaque niveau (Région, Province, District), P est le pourcentage d'échantillons positifs (estimation de la prévalence), Pf le pourcentage de fermes infectées et Pif la prévalence moyenne dans les fermes infectées.

Au niveau régional, les régions Nord, Nord-Est, Centre et Sud ont montré des taux de prévalence de 11,2%, 9,3%, 6,4% et 2,1% respectivement. Ceci suggère une prévalence décroissante du Nord vers le Sud, mais étant donné le faible nombre de districts étudiés, cette observation requiert confirmation ultérieure à la lueur de données supplémentaires à recueillir dans les différentes régions. Toutefois, un fait important souligné ici est la présence d'anticorps spécifiques de *Trypanosoma evansi* partout sur le territoire.

Au niveau provincial, seule la province de Nakorn Radcha Srima (1 province sur 13 étudiées) n'a pas montré de trace sérologique d'infection à *Trypanosoma evansi* ; il faut toutefois remarquer que seules deux fermes ont été sondées dans un seul district de cette province. Les plus hauts taux de prévalence ont été observés dans la province de Chang Mai (21%) dans la région Nord (bordant le Myanmar), dans les provinces d'Udon Thani et Sakon Nakhon (16% et 19%) de la région Nord-Est (bordant le Laos), et au centre dans la province de Saraburi (17%). Dans les 12 provinces présentant des traces sérologiques de *T. evansi*, 5 à 75% des fermes (Pf) étaient infectées (cf. Tableau 4). La prévalence moyenne dans ces fermes infectées (Pif) s'étendait de 7 à 60% (moyenne  $28.1 \pm 4.1\%$ ).

Au niveau du district, 22 des 31 districts (71%) ont présenté des animaux séropositifs, avec des taux de prévalence s'étendant de 1 à 46%. Trois provinces montrent des fourchettes de taux de prévalence particulièrement étendues au niveau de leurs districts: Chiang Rai (Nord), avec 5 District en-dessous de 5% et 2 au-dessus de 40% ; Udon Thani (Nord-est) avec 2 districts à 0% et 1 avec 26%, et Ratchaburi (Centre), avec 2 districts en-dessous de 3% et 2 au-dessus de 20%.

Au niveau de la ferme, 56 fermes sur 222 ( $25 \pm 6 \%$ ) avaient des animaux séropositifs. Les taux de prévalence s'étendaient de 0 à 100%. Tous les districts



présentaient à la fois des fermes infectées et des fermes non infectées, à l'exception de deux districts dans lesquels une seule ferme avait été étudiée, et du district de Koon Tan (province de Chang Rai) dans lequel les trois fermes étudiées ont présenté de très fortes prévalences (moyenne  $43 \pm 8 \%$ ). Certains districts ont présenté des fourchettes de taux de prévalence des fermes importantes. Par exemple, dans le district de Sri That (province d'Udon Thani), les taux de prévalence étaient  $>60\%$  dans 2 fermes et  $<5\%$  dans 3 autres fermes. Les plus fortes prévalences de ferme ont été observées dans le district de Muak Lek (Saraburi), avec 3 fermes dont au total 13 des 15 animaux étaient séropositifs et Pa Ya Meng Rai (Chang Rai) avec 13/15 animaux séropositifs. Les taux de prévalence dans les fermes infectées s'étendent de 7 à 100% (moyenne  $31,6 \pm 3,8\%$ ).

Afin d'évaluer l'impact potentiel de l'infection, la notion d'animal exposé a été introduite et défini comme tout animal prélevé dans la même ferme qu'un animal séropositif. Le taux d'animaux exposés atteint 30% des animaux prélevés. Un tiers de la population échantillonnée pourrait ainsi être considérée comme exposé à un risque d'infection par *T.evansi*. La comparaison de la carte issue de cette étude (cf. Figure 21) avec la carte de densité de l'élevage bovin (cf. Figure 22) et celle de l'élevage bovin laitier (cf. Figure 23) permet de se rendre compte de la menace potentielle que représente le Surra. On peut ainsi observer une superposition de zones fortement touchées avec des fortes densités d'élevage, notamment dans les provinces de Chiang Mai, Khon Khaen, Saraburi et Radchaburi.

Region	Province	District	Total farm number	Farm numbers by prevalence categories					
				P = 0%	P < 10%	10% < P < 30%	P ≥ 30%		
North-East	Udorn thani	Sri That	P = 26 ± 5 %	5	2	1	0	2	
		Kud Jab	P = 0 %	5	5	0	0	0	
		Maeung	P = 0 %	3	3	0	0	0	
	Khon Khaen	Maeung	P = 1 ± 1 %	11	10	0	1	0	
		Nam Pong	P = 0 %	7	7	0	0	0	
		Ubonrat	P = 4 ± 3 %	11	10	0	1	0	
	Sakon Nakhon	Kra Nuan	P = 12 ± 7 %	4	3	0	0	1	
		Maeung	P = 19 ± 4 %	14	6	0	4	4	
	Nakorn Radcha Srima								
North	Chiang Mai								
	Lum Pang								
	Chiang Rai	Maeung	P = 0 %	4	4	0	0	0	
		Mae lao	P = 10 ± 6 %	5	2	0	3	0	
		Phan	P = 2 ± 2 %	5	4	1	0	0	
		Terng	P = 2 ± 1 %	9	7	2	0	0	
		Pa Ya Meng Rai	P = 46 ± 9 %	2	1	0	0	1	
		Koon Tan	P = 43 ± 8 %	3	0	0	1	2	
South	Pat ta lung	Mae Sai	P = 4 ± 3 %	1	0	1	0	0	
		Muang	P = 2 ± 1 %	14	11	3	0	0	
Center	Kanchanaburi	Ta Moang	P = 2 ± 2 %	10	9	0	1	0	
		Ta ma ka	P = 0 %	9	9	0	0	0	
		Lao Kwan	P = 0 %	1	1	0	0	0	
		Non	P = 0 %	1	1	0	0	0	
	Ratchaburi	Ban pong	P = 2 ± 2 %	8	7	0	1	0	
		Potaram	P = 21 ± 6 %	7	4	0	2	1	
		Chom bung	P = 0 %	4	4	0	0	0	
		Muang	P = 20 ± 18 %	1	0	0	1	0	
	Nakorn Patom	Kampang saen	P = 6 ± 2 %	13	8	0	3	2	
		Muang	P = 3 ± 3 %	7	6	0	1	0	
	Saraburi								
	Lopburi								
			<b>Total</b>	222	166 (75 %)	10	25	21	
							56 (25 %)		

Tabl. 4 : Bilan des résultats par région, province, district et ferme

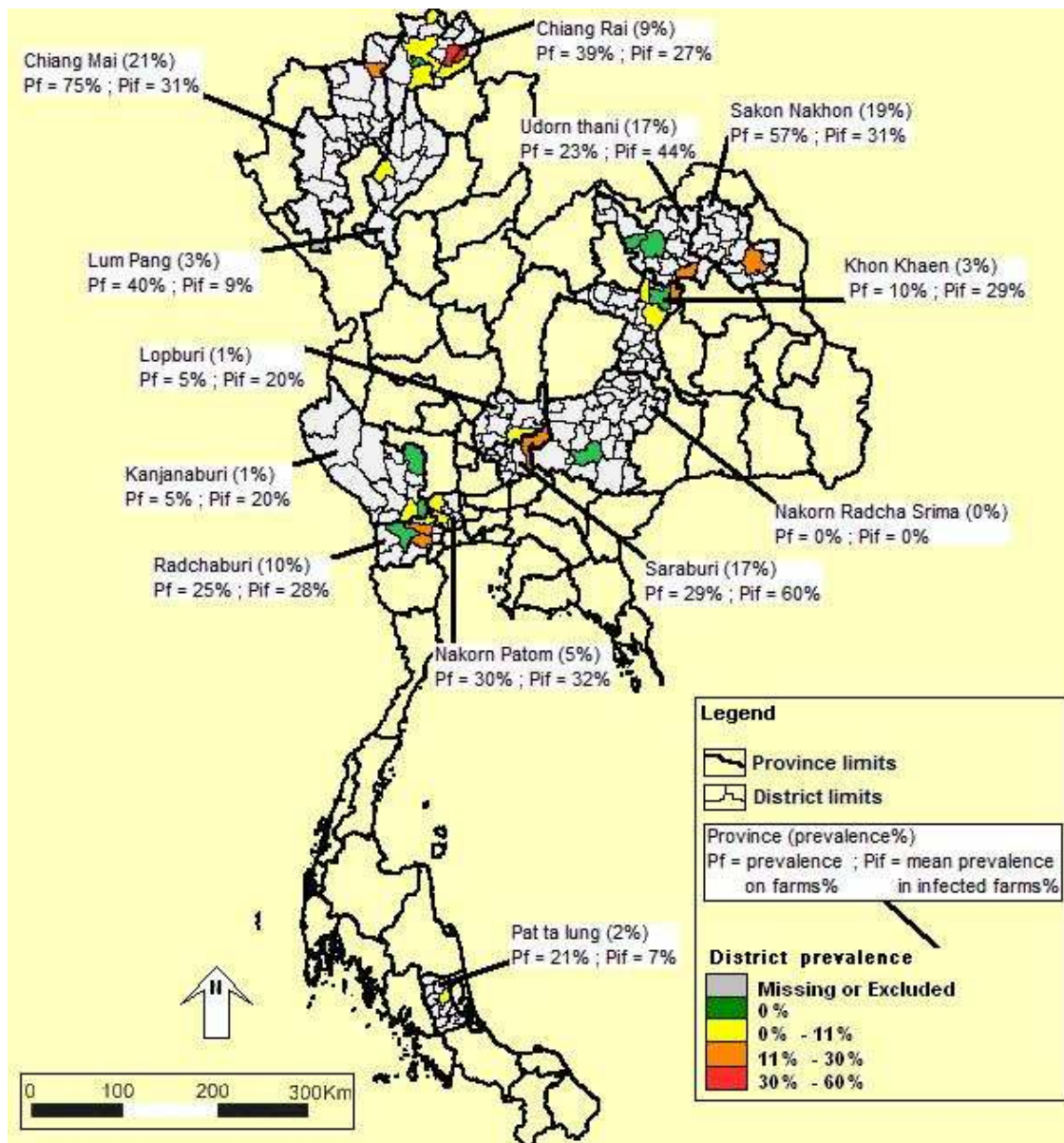


Fig. 21: Répartition des zones étudiées en Thaïlande et bilan des résultats observés par province (encadrés) et par district (échelle de couleur).

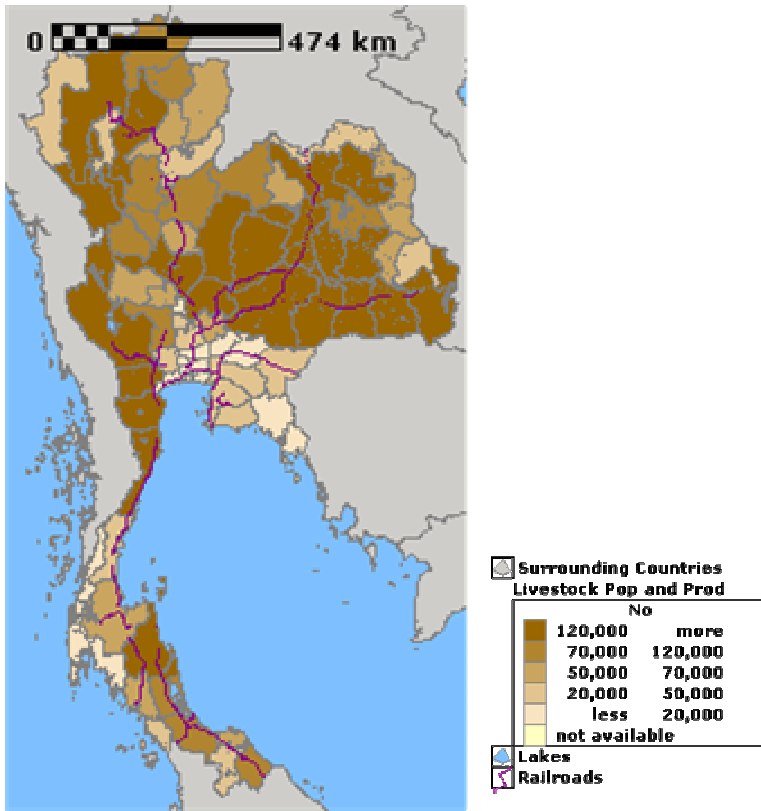


Fig. 22: Densité d'élevage bovin (en nombre de têtes) par province en Thaïlande (source : FAO-GLiPHA)

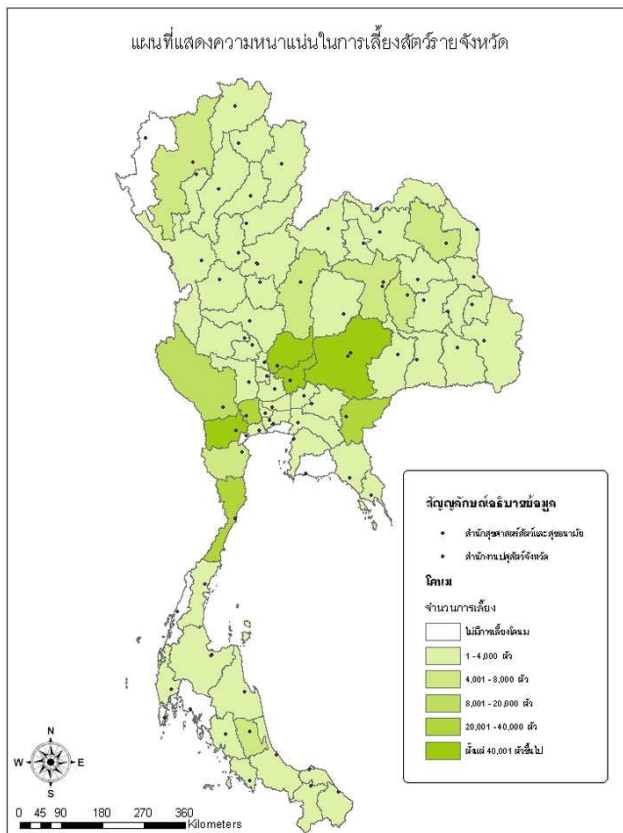


Fig. 23: Densité d'élevage bovin laitier (en nombre de têtes) par province en Thaïlande (source : DLD)

### 3.5 Résultats des PCR

L'utilisation de TBR1 et TBR2 a permis de détecter 55 infections parmi les 119 sérums testés positifs par ELISA, soit 46%. Dans le tableau 4, sont compilés les résultats de prévalence (ELISA et PCR) obtenus par fermes positives en ELISA dont il a été possible de faire l'analyse PCR des échantillons. Les prévalences PCR sont en fait calculées suite à la réalisation des PCR sur les échantillons positifs en ELISA, ce qui revient à négliger le nombre d'échantillons positifs en PCR (parasite présent) mais négatifs en ELISA (réponse immunitaire non installée).

Fermes	prévalence ELISA	prévalence PCR
2 M.1 T.Huanakam	60%	40%
151 M.1 T. Huanakam	67%	53%
124 M.5 T.Sritaad	4%	4%
112 M.20 T.Bankor	13%	0%
127 M.6 T.Bandong	25%	0%
Mrs.Anong Wongpon	50%	17%
172 M.10 Bandongsomboon	40%	40%
2 M.8 Bannonsawan	40%	20%
30 M.10 Bandongsomboon	40%	0%
Research and animal breedingT.Huiyang	14%	14%
Research and animal breedingT.Huiyang 2	29%	29%
Research and animal breedingT.Huiyang 3	14%	14%
Research and animal breedingT.Huiyang 4	57%	43%
43 M.10 Bandongsomboon	13%	13%
Farm 2 Mrs.Sompit Boonruaeng	35%	9%
Farm 3 Mr.Udon Karaka	14%	14%
Farm 4 Mr.Chollasub Kosumarn	11%	11%
Farm 6 Mr.Supin Jomjit	58%	50%
Farm 7 Mr.Prapun Sommai	60%	25%
Farm1 Mongkol Farm	5%	0%
Farm3 Jariya Farm	13%	0%
Farm25 Mr.Surachet Tedsing	87%	33%
Farm27 Mr.Sawang Chaichana	18%	9%
Farm28 Mr.Kumma Jomduang	77%	15%
N.R.	10%	10%
186 M.2 T.lampam	5%	5%
94/1 M.7 T.lampam	8%	8%

Tabl. 5: Prévalence par ELISA et prévalence par PCR obtenus par ferme positives en ELISA (et testable par PCR)

Des commentaires plus précis de ces résultats seront réalisés dans la discussion.

## 4. Discussion

### 4.1 Discussion générale des résultats

Cette enquête sérologique préliminaire réalisée sur l'élevage bovin laitier montre que l'infection à *T. evansi* est très largement répartie à travers la Thaïlande : il y a eu mise en évidence de réaction immune contre *T. evansi*, donc contact avec le parasite, mais la présence même du parasite a également été confirmée par les résultats de PCR, prouvant la circulation active du parasite au sein de cette population.

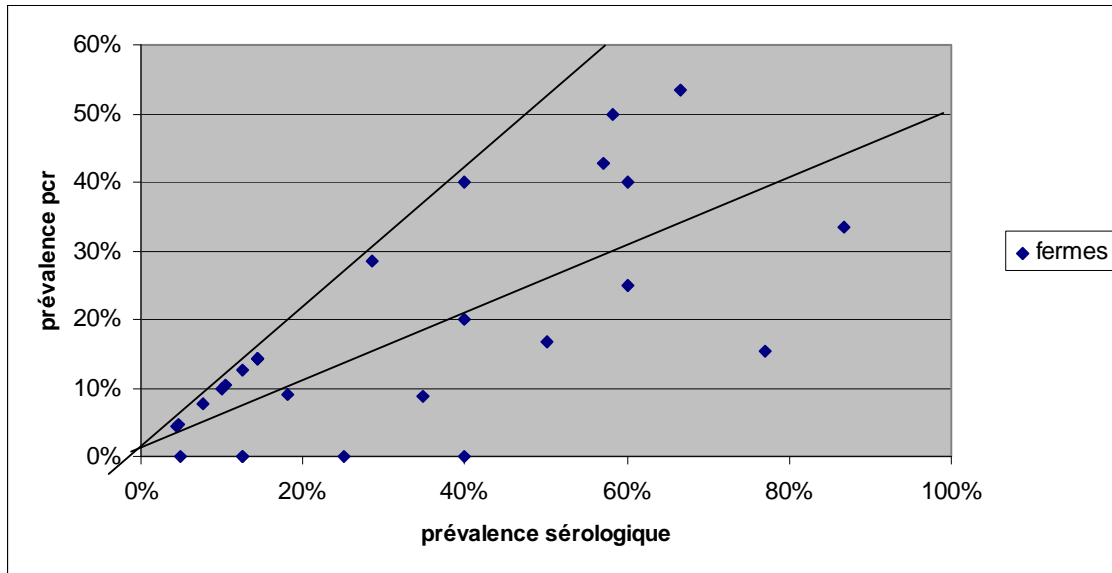
*L'hétérogénéité de prévalence et des situations épidémiologiques :*

Les résultats ont également permis de mettre en évidence une très forte hétérogénéité, à tous les niveaux géographiques observés : région, province, district et même au sein d'un district entre les fermes (avec pour ces trois derniers des fourchettes de prévalence de 0-21%, 0-46% et 0-100% respectivement). Ceci met en évidence la variété des schémas épidémiologiques présents. Ainsi, dans certaines zones, l'infection n'a pas pu être détectée (ex : Nakorn Radcha Srima, bien que l'échantillon prélevé dans cette zone fut de petite taille). Certaines zones présentent des cas sporadiques, comme c'est le cas par exemple dans la province de Lopburi où seul un animal a été trouvé infecté parmi 19 fermes échantillonnées. Des situations enzootiques s'observent aussi, soit avec des prévalences modérées (ex : Province de Pat Ta Lung où 3 fermes sur 14 ont été trouvées infectées, avec une prévalence moyenne de  $7 \pm 7$  %), soit avec de fortes prévalences (situation enzootique comme c'est le cas dans le province de Chiang Mai avec 6 fermes infectées sur 8, présentant une prévalence moyenne de  $31 \pm 9$  %). Finalement, des fermes de certaines provinces ont présenté des séroprévalences extrêmement élevées, reflétant probablement des situations épizootiques (cas de la province de Saraburi où 7 fermes sur 24 ont été trouvées infectées avec une prévalence moyenne de  $60 \pm 13$  %).

*Commentaires sur les résultats PCR :*

Il est possible, à partir des résultats de prévalence ELISA et PCR de tracer un graphe « prévalence PCR » = f (« prévalence ELISA ») (cf. graphe 2). On observe que les prévalences PCR ont systématiquement été inférieures ou égales aux prévalences ELISA, avec des écarts très variables, comme en témoigne la disposition des différentes fermes sur ou en dessous de la droite « prévalence PCR = prévalence ELISA » du graphe 2. Au total, seuls 46% des échantillons positifs en ELISA se sont avérés positifs en PCR. Cette grande

différence est liée à la nature très différente des deux tests. En effet le test ELISA permet de donner une indication du statut immunologique des animaux testés, et donc d'un contact de l'animal avec le parasite cible au cours de sa vie. En revanche, le test PCR, qui détecte la présence d'ADN dans le sang de l'hôte, donne une indication sur la présence du parasite et donc sur les infections en cours. Les différences de prévalences obtenues par ces deux techniques peuvent ainsi être liées au fait qu'une immunité persiste après une infection dont l'animal aurait guéri. Ceci peut également être lié avec la capacité caractéristique de *T. evansi* de persister chez le bovin à l'état latent en localisation profonde, sans forme circulante. On perçoit alors différents cas. Certains élevages présentent une bonne corrélation entre les deux valeurs de prévalence. Pour les élevages de faible prévalence, ceci correspond au cas où quelques animaux seulement sont infectés et ont développé une réponse immunitaire. Certains élevages présentent à la fois une forte séroprévalence et une forte prévalence PCR, traduisant une forte circulation du parasite au sein de l'élevage. Enfin on peut distinguer des élevages pour lesquels la séroprévalence est élevée mais peu d'échantillons sont positifs en PCR, ce qui peut être interprété comme d'ancien foyer épizootique dans lesquels la circulation parasitaire aurait diminué mais où le cheptel resterait encore fortement immunisé. Ces résultats mettent donc encore une fois en évidence la diversité des schémas épidémiologiques. Seulement 4 fermes présentant des animaux positifs en sérologie, indiquent une prévalence nulle par PCR. Ceci peut refléter l'absence du parasite (mais la persistance des anticorps dirigés contre *T. evansi*), ou sa présence à un niveau indétectable par PCR: soit en raison d'une parasitémie trop faible, soit lorsque le parasite se trouve en milieu extravasculaire. Ceci souligne l'atout des techniques sérologiques par rapport à la PCR qui ne met en évidence que des infections en cours ou de parasitémies suffisamment importantes. Ces cas suggèrent également le manque d'efficacité du contrôle chimique de la trypanosomose par le manque de biodisponibilité des molécules en localisations profondes, lieux de refuge des trypanosomes.



Graph. 2: Prévalence obtenue par technique PCR en fonction de la prévalence obtenue par technique ELISA.

*Répartition géographique :*

On a pu observer des prévalences souvent plus élevées dans les districts des zones frontalières avec le Myanmar et le Laos, ou encore dans la région centrale. Ces zones correspondent aux zones les plus importantes pour l'élevage bovin laitier, ce qui permet de se rendre compte de l'impact potentiel du Surra sur l'élevage dans ces provinces, et également d'appréhender l'effet de la concentration d'animaux de provenances diverses sur la prévalence de cette infection. Il sera intéressant d'étudier de manière plus approfondie le rôle de l'importation d'animaux depuis les pays frontaliers comme le Laos ou le Myanmar. A noter que les zones les plus touchées ne sont pas nécessairement les zones frontalières, car l'achat et l'importation de nombreux animaux concernent les plus grosses exploitations, qui se trouvent principalement dans la région centrale de la Thaïlande. Il convient donc d'étudier les introductions transfrontalières d'animaux, conjointement aux mouvements internes d'animaux en Thaïlande.

Toutefois, concernant la distribution géographique, il est toujours difficile de donner des conclusions solides car un faible nombre de districts (31 sur 926) et de provinces (13 sur 77) ont été échantillonnés, ce qui ne permet pas encore d'avoir une image représentative de la distribution de *T. evansi* en Thaïlande.



#### *Aperçu de l'impact potentiel de l'infection à Trypanosoma evansi :*

Malgré une prévalence générale plutôt modérée ( $8,2 \pm 1,2\%$ ), on constate un taux d'infection des fermes de  $25 \pm 6\%$ , et de larges fourchettes de prévalence. On peut également constater qu'au niveau local (bien sûr indépendamment des limites administratives), certains groupes de fermes sont sévèrement affectés par l'infection à *T. evansi*, avec des taux de prévalence supérieurs à 80%. Dans ces zones, l'impact pourrait être considérable. D'autre part, l'observation du nombre d'animaux exposés au niveau de cette enquête, souligne la menace potentielle que constitue ce parasite sur l'élevage. Il pourrait être intéressant de développer, dans l'optique de définir son impact effectif et potentiel, la proportion réelle d'animaux à risque et exposés, à la lueur de l'analyse des pratiques d'élevages (isolement, mélange d'animaux, échanges, transports...), mais également d'étendre l'étude aux zones géographiques encore non explorées.

#### *Influence de l'âge sur le taux d'infection :*

Cette étude a montré des taux de prévalence plus élevés chez les animaux >1an : les animaux de moins de 1 an n'ont présenté aucun signe sérologique d'infection. Ceci pourrait être lié à une exposition moins importante aux insectes piqueurs des animaux les plus jeunes, ainsi qu'à un rôle d'écran des animaux adultes protégeant ainsi les jeunes (Foil *et al.* 1985; Barros and Foil 2007). Toutefois, l'abondance et le comportement des vecteurs restent encore à étudier de manière plus approfondie.

#### *Taille des troupeaux échantillonnés et nombre d'échantillons :*

Les tailles moyennes d'échantillon dans les fermes infectées et non infectées ont été calculés, respectivement 10,7 (médiane : 7 ; 1<sup>er</sup> quartile : 5 ; 2<sup>ème</sup> quartile : 13 ; étendue 47) et 8,6 (médiane 5 ; 1<sup>er</sup> quartile : 5 ; 2<sup>ème</sup> quartile : 10 ; étendue : 86) animaux, et le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney a montré une différence significative au risque de 5% ( $z=3,06$  ;  $p=0,002$ ). Cette observation permet de suspecter un effet de la taille du troupeau. En effet, les grosses fermes qui achètent de nombreux animaux ont une plus forte probabilité d'introduire des animaux potentiellement infectés en provenance d'autres régions: fermes voisines, autres districts ou province, ou d'autres voies d'importation (non contrôlées) à partir de pays voisins. Malheureusement, en l'absence de marquage et de recensement systématique des animaux, la taille du troupeau reste un paramètre difficile à mesurer, si

bien que peu d'informations sont disponibles au niveau des fermes échantillonnées. On ne peut donc écarter l'introduction d'un biais de sélection lors de l'échantillonnage, qui aurait conduit à un nombre de prélèvement plus important dans les fermes infectées. Ceci aurait pour conséquence, outre l'absence de conclusion possible sur l'effet de la taille du troupeau, d'amplifier artificiellement les prévalences calculées aux rangs district, province et région. Toutefois, les directives d'échantillonnages doivent théoriquement garantir une certaine proportionnalité entre la taille du troupeau et le nombre d'animaux prélevés, ce qui limite probablement l'importance de ce biais. Il faut aussi noter que la significativité obtenue est en partie liée au grands effectifs considérés, mais qu'une différence moyenne de 2 têtes n'a pas de signification pratique réelle. D'autre part un fait vient contredire cette hypothèse d'orientation systématique du biais vers la surestimation des prévalence : dans 4 fermes appartenant à trois provinces, les règles de sondages n'ont effectivement pas été respectée puisque plus de 30 animaux ont été prélevés (50, 52, 63 et 88 respectivement à Chiang Rai (Maeung et Mae Sai), Kanchanaburi, Nakorn Patom (Kanpang Saey)). Trois de ces 4 fermes n'étaient pas infectées, et une n'avait que 2 animaux infectés. Ceci a eu tendance à sous-estimer légèrement les prévalences de ces 4 provinces (pas plus de 1 à 2 %), ce qui indique que les fermes les plus « motivées » ne sont pas forcément les plus à risque d'infection, rendant peu prévisible le sens de l'effet induit par un biais de sélection. Ce point soulève donc quelques questions qu'il serait intéressant d'approfondir, notamment en affinant la précision des données générées par l'enquête et en assurant un respect plus strict du protocole.

## **4.2 Discussion théorique de la méthodologique**

Le plan d'échantillonnage choisi a fixé des nombres d'animaux à prélever au niveau régional (384 animaux par région). Sans autre précision sur le protocole, ceci suggère un sondage élémentaire, c'est-à-dire un tirage au sort sur une base de sondage couvrant tous les animaux de la région. Ceci est tout d'abord irréaliste de par l'étendue que constitue une région et l'absence de coordination entre les différents niveaux de subdivision qu'elle comporte (provinces et districts). De plus, il n'existe pas de telles bases de sondage des animaux à l'échelle régionale. Sans plus de détail sur le protocole, on s'exposerait alors à d'important biais de sélection. Notons par ailleurs que l'estimation de la prévalence à l'échelle de la région n'est pas celle qui présente le plus grand intérêt en raison justement de l'étendue des ces zones, et donc de l'hétérogénéité des situations qu'elles regroupent. Une solution aurait pu être d'effectuer un échantillonnage à plusieurs degrés ou en grappe. Une sélection aurait alors été effectuée aux degrés « province », « district » et « fermes ». Dans

chaque ferme sélectionnée, l'échantillonnage aurait pu être réalisé par application d'un taux de sondage ou par sondage exhaustif.

Bien que non détaillé dans le protocole, l'échantillonnage en degré s'est en réalité imposé de lui-même au cours de l'enquête. Les provinces ont été sélectionnées selon leur importance vis-à-vis de l'élevage bovin laitier. Bien qu'on perde en termes de représentativité au niveau régional et national, il y a un intérêt évident de se concentrer sur les zones de fortes densités d'élevage, notamment dans l'évaluation de l'impact effectif et potentiel des différentes maladies étudiées. Pour le degré « district », le mode de sélection des districts n'a pas été précisé, de même pour les fermes au sein des districts (les nombres de districts par province, ou de fermes par districts échantillonnés sont très variables). Ces tâches ont été confiées aux services vétérinaires locaux ou branches locales de la DLD (Department of Livestock Development) et peu d'information est disponible sur la méthode de sondage utilisée à ces niveaux. Il est donc possible que des biais de sélection aient été introduits, altérant la représentativité de l'échantillonnage réalisé. Ceci impose certaines précautions d'interprétation des résultats, et notamment des estimations des prévalences aux différents niveaux géographiques.

L'hétérogénéité des conditions d'échantillonnage et des taux de sondages appliqués aux différents niveaux pourrait représenter une part de l'hétérogénéité observée. Toutefois, l'estimation des prévalences au niveau des fermes est probablement peu biaisée, et présente déjà cette forte hétérogénéité. Cette observation n'est donc pas à remettre en cause et constitue une information importante générée par cette étude.

Pour finir, il faut noter que la récolte de ces près de 2000 échantillons a été réalisée sur une période d'environ 15 mois sans que les saisons de prélèvements n'aient été renseignées. Or on sait que la trypanosomose à *Trypanosoma evansi* présente des variations saisonnières d'incidence (Löhr, Pohlpark et al. 1985). L'hétérogénéité observée serait alors une résultante de l'hétérogénéité géographique et saisonnière.

#### **4.3 Retour sur le contexte de l'étude : apports et les perspectives**

Comme nous l'avons dit, l'échantillonnage réalisé ne permet pas d'avoir une image exacte de la prévalence de *T. evansi* dans les zones étudiées. Et en raison du faible nombre de districts et de provinces investiguées, il n'est pas possible de tirer plus de conclusions sur la distribution géographique de *T. evansi* ni d'éventuelles localisations préférentielles. Toutefois, il est important de remettre cette étude dans son contexte : cette enquête sur l'élevage bovin laitier, a été réalisée dans le but d'étudier plusieurs maladies (cryptosporidiose, toxoplasmose, néosporose...). Ainsi, une banque de sérum a été

constituée et est utilisée pour tester différents pathogènes. C'est cette banque de sérum qui a été exploitée pour l'étude de la trypanosomose à *Trypanosoma evansi*. L'objectif n'était donc pas d'avoir une estimation précise et exacte des prévalences sur le territoire mais plutôt de donner des résultats préliminaires sur la distribution de *Trypanosoma evansi* dans différentes zones. Deux caractères principaux ont ainsi pu être mis en évidence : le caractère ubiquiste de *T.evansi* sur le territoire, conjointement à une grande hétérogénéité d'atteinte des élevages et des zones. Ces informations seront importantes dans la mise en place des futures études spécifiques de *T.evansi*. En effet la réalité du terrain comporte certaines difficultés difficilement contournables : manque de coordination des différentes entités administratives en rapport à l'élevage, absence de recensement détaillé des élevages et des animaux de ces élevages. Ceci rend difficile la réalisation d'enquêtes transversales à grande échelle, pour lesquelles la standardisation des protocoles d'échantillonnage et de récolte de données (description des élevages, pratiques d'élevage, échanges d'animaux, etc...) serait idéale mais relativement illusoire. Ces contraintes incitent à s'orienter plutôt vers des études de cas ou des suivis longitudinaux d'élevages ou de zones. Dans cette optique, il semble important d'établir une typologie détaillée de l'élevage en Thaïlande, afin de pouvoir sélectionner un panel d'élevages représentatifs. Ces suivis permettront une meilleure approche de la dynamique d'infection dans un élevage ou une zone et de l'impact sanitaire et économique de l'infection à *Trypanosoma evansi*. La mise en place pendant le stage d'une base de données permettra une saisie plus rapide et une utilisation facilitée des données récoltées au cours des études à venir.

Ainsi, il ne fait pas de doute que cette étude préliminaire a permis de générer une information utile à la suite du projet. Malgré les précautions d'interprétation qui doivent être prises, on ne peut que souligner l'importance de ce type de travail. En effet, dans le cadre de la mise en place d'un projet d'étude de *Trypanosoma evansi* en Thaïlande et en Asie du Sud-est, il est important de générer des résultats préliminaires et de les faire connaître au moyen de publications. Ceci permet de créer une prise de conscience de l'importance de la problématique, de diffuser l'existence et la mise en place d'un pôle d'étude de *T. evansi*. De plus, ces travaux permettent de créer une dynamique autour du projet et de consolider et de promouvoir la collaboration avec les structures locales. Enfin, ces résultats initiaux permettent ainsi de dégager de nouvelles pistes de travail adaptées aux contraintes du terrain.

## **Conclusion**

Ce travail a permis la mise au point d'un outil standardisé d'Ac-ELISA au sein du laboratoire de parasitologie vétérinaire de l'université de Kasetsart (Bangkok, Thailand), avec production de ses propres antigènes à partir d'une souche locale isolée, et qui s'est avérée présenter des résultats comparables à ceux obtenus avec l'antigène de référence. Malgré l'affinement des techniques de manipulation qu'il reste à effectuer, le laboratoire dispose donc désormais d'un outil performant pour réaliser des enquêtes sur la présence de *Trypanosoma evansi* sur le territoire. De telles enquêtes ont été initiées et apportent leurs premiers résultats. Ces résultats mettent en évidence une large répartition de *Trypanosoma evansi* sur le territoire et une grande diversité des prévalences, et donc vraisemblablement des schémas épidémiologiques, d'une zone à l'autre du pays. Ces premiers résultats permettent aussi de mettre en évidence les besoins de ce projet ainsi que des pistes de travail, et constituent une phase d'approche indispensable. Ils permettent de déterminer les stratégies d'étude les plus adaptées au contexte et les plus à même de générer les informations indispensables à la compréhension de la distribution du parasite, des facteurs qui l'influencent, ainsi que des rôles particuliers des échanges d'animaux transfrontaliers et nationaux, pour, à terme, évaluer avec rigueur et précision l'impact de *Trypanosoma evansi* en Thaïlande et en Asie du Sud-est. Un déterminant essentiel de la maîtrise et donc de la réussite d'une telle entreprise est la capacité financière du projet qui seule peut légitimer auprès des partenaires un ordonnancement correct des méthodologies d'enquête.



## Conclusion générale

Le travail sur les outils diagnostiques est fondamental en tant que première étape vers l'approfondissement des connaissances sur *Trypanosoma evansi* qui devra porter autant sur l'épidémiologie de la maladie et ses vecteurs que sur les impacts médicaux (en particulier immunitaire) et économiques du surra. Le projet initié en Thaïlande va permettre l'implication de l'ensemble des provinces du pays, ainsi qu'à terme, de l'ensemble des pays de l'Asie du Sud-Est à travers leurs différentes universités et services d'élevage. Le projet associe également ces structures loco-régionales avec un ensemble de partenaires des organismes de recherche internationaux spécialisés sur cette trypanosomose (France, Espagne, Belgique, Angleterre, Australie, Mauritanie, Venezuela etc.). L'évaluation, l'optimisation, la standardisation et la diffusion des outils diagnostiques sont essentielles afin de pouvoir regrouper des informations fiables et comparables. Ces informations seront en particulier générées grâce à la mise en place d'enquêtes multi-espèces, ce qui nécessite des travaux supplémentaires du même type afin de valider les techniques dans les différentes espèces étudiées. Des enquêtes longitudinales réalisant le suivi de zones touchées permettront de mieux connaître l'évolution de cette infection dans le temps et la dynamique de l'infection dans un troupeau. Ainsi la conjugaison de ces travaux transversaux multi-espèces et de ces suivis longitudinaux permettront de donner une analyse de plus en plus précise et fine de l'épidémiologie de cette maladie en Asie du Sud-Est. En outre, les autres techniques développées comme la LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification ou « PCR à température constante »), seront évaluées dans l'objectif d'une application plus vaste de cette technique de diagnostic dans la région, car cette dernière ne nécessite pas les équipements sophistiqués de la PCR classique.

De tels travaux à l'échelle régionale sont primordiaux dans le cadre de l'étude du Surra dont le principal mode de diffusion est lié aux déplacements (commerce et transhumance) d'animaux infectés. La fiabilité et la standardisation des données générées dans chaque pays sont d'autant plus importantes qu'elles permettront une meilleure compréhension des modes de diffusion de *Trypanosoma evansi*. Ces données devront en effet être utilisées pour modéliser la dynamique d'infection au sein d'un troupeau ainsi que sa diffusion en particulier liée aux échanges commerciaux nationaux et transfrontaliers. Une meilleure connaissance de ces phénomènes permettra également et une évaluation plus juste de l'impact de *Trypanosoma evansi* à travers l'Asie et une compréhension des points déterminant dans la lutte contre cette infection.









## **ANNEXES**

## **ANNEXE 1 : Préparation d'antigènes solubles de *T. evansi* pour l'Ac-ELISA**

- Isolement d'une souche de *T. evansi* et conservation sous forme cryostabilisat en azote liquide
- Multiplication de la souche par inoculation intrapéritonéale à 2 rats wistar, jusqu'à atteinte d'une parasitémie de  $10^8$  parasites/ml (4 à 6 jours)
- Anesthésie des rats au chloroforme et sacrifice par collecte du sang parasité
- Préparation d'une colonne de DEAE cellulose (DEAE-cellulose, Sigma<sup>®</sup>) saturée d'une solution PSG
- Dépôt de papier filtre à la surface de la cellulose et dépôt du sang à filtrer au dessus
- Migration des parasites à travers la cellulose et écoulement de la solution tampon contenant les trypanosomes dans une tubulure partant du fond de la seringue
- Après migration complète des trypanosome, récupération du filtrat, et deux lavages successifs des trypanosomes avec une solution PSG (ph=8) et centrifugation à 10000 g pendant 10 minutes
- Le surnageant est jeté, et le pellet est mesuré et resuspendu à 1/20 (vol/vol) dans de l'eau distillé, additionnée d'un cocktail anti-enzyme (Complete protease inhibitor cocktail, Roche<sup>®</sup> ref: 11697498001) à la concentration de 1 dose pour 8,5ml
- Le lysat de parasites est exposé à 5 cycle de 2 minutes de congélation dans l'azote liquide/5 minutes décongélation dans un incubateur à 37°C
- Lysat conservé sur glace passé au sonicateur 2 min 3 fois, à 60% de cycle actifs et puissance 7 (Sonicateur 130W, Fisher bioblock scientific<sup>®</sup>) puis centrifugé 10 min à 10000g à 4°C
- Le surnageant est collecté et le pellet jeté puis la concentration protéique du surnageant évaluée par lecture à la lumière UV à 260 et 280 nm (Adams normograph dérivé de Warburg et Christian 1942)
- Le sunageant est aliquoté et conservé à -80°C pour la conservation à long terme et -20°C pour la conservation à plus court terme.

## **ANNEXE 2 : Préparation des échantillons au phénol chloroforme pour la réalisation de PCR**

1. Prélever 100µl de l'échantillon de sang et mélanger à 500µl de solution de dénaturation, mélanger 5 à 10 min
2. Ajouter 150µl de chloroforme et 150µl de phenol (pH=7,9), melagner pendant 10 minutes
3. Centrifugation 13 000 rpm pendant 5 min pour reséparer les deux phases
4. Collecter la phase supérieure (500-550) dans un nouveau microtube en prenant soin de ne pas perturber l'interface avec la phase phénolique
5. Répéter les opérations 2., 3. et 4. en collectant un volume de 400µl de la phase supérieure à transférer dans un nouveau microtube
6. Précipiter l'ADN en ajoutant 1ml d'éthanol absolu, inverser plusieurs fois le tube sans secouer, et conserver 30 min à -80°C ou 24h à -20°C
7. Centrifugation 13 000 rpm pendant 10 min. etirer le surnageant avec précaution
8. Laver le pellet d'ADN à l'éthanol 75%. Centrifugation 13 000 pendant 5 min. Eliminer le surnageant et laisser sécher à l'air le pellet.
9. Resuspendre le pellet d'ADN dans un tampon

## Bibliographie

- Artama, W. T., M. W. Agey, et al. (1992). "DNA comparisons of *Trypanosoma evansi* (Indonesia) and *Trypanosoma brucei* spp." Parasitology 104: 67-74
- AUSVETPLAN (2006). "Surra.",  
[www.animalhealthaustralia.com.au/fms/Animal%20Health%20Australia/AUSVETPLAN/surra13final.pdf](http://www.animalhealthaustralia.com.au/fms/Animal%20Health%20Australia/AUSVETPLAN/surra13final.pdf).
- Borde, I. (2006). La PCR, Université Pierre et Marie Curie,  
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/PCR/index.htm#>.
- Borst, P., F. Fase-Fowler, et al. (1987). "Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*." Mol Biochem Parasitol. **23**(1): 31-8.
- Borst, P., M. Van der Ploeg, et al. (1982). "On the DNA content and ploidy of trypanosomes." Mol. Biochem. Parasitol. **6**: 13-23.
- Camargo, R. E., G. L. Uzcanga, et al. (2004). "Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*." Vet Parasitol **123**(1-2): 67-81.
- Chansiri, K., S. Khuchareontaworn, et al. (2002). "PCR-ELISA for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in animals and vector." Mol Cell Probes **16**(3): 173-7.
- Cheah, T. S., R. A. SANI, et al. (1999). "Epidemiology of *Trypanosoma evansi* infection in crossbred dairy cattle in Malaysia." Trop Anim Hlth Prod **31**: 25-31.
- Claes, F., D. Verloo, et al. (2003). "The expression of RoTat 1.2 variable surface glycoprotein (VSG) in *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*." Vet Parasitol. **116**(3): 209-16.
- Curasson, G. (1943). "*Trypanosoma vivax* et variétés." in: Traité de protozoologie vétérinaire et comparée Tome 1 Trypanosomes. Ed Vigot Frères, Paris: 270-278.
- Davison, H. C., M. V. Thrusfield, et al. (1999). "Evaluation of antigen detection and antibody detection tests for *Trypanosoma evansi* infections of buffaloes in Indonesia." Epidemiol Infect **123**(1): 149-55.
- Desquesnes, M. (1997). "Standardisation internationale et régionale des épreuves immuno-enzymatiques: méthode, intérêts et limites." Rev Sci Tech Off Int Epiz **16**: 809-823.
- Desquesnes, M. (2004). Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. CIRAD-EMVT publication, OIE, Paris, ISBN 92-9044-634-X.
- Desquesnes, M., G. Bossard, et al. (2008). "First outbreak of *Trypanosoma evansi* in camels in metropolitan France." Vet Rec **162**(23): 750-2.
- Desquesnes, M., M. F. Bosseno, et al. (2007). "Detection of Chagas infections using *Trypanosoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reactions with *Trypanosoma cruzi*." Infect Genet Evol **7**(4): 457-62.
- Desquesnes, M. and S. De La Rocque (1995). "Comparaison de la sensibilité du test de WOO et d'un test de détection des antigènes de *Trypanosoma vivax* chez deux moutons expérimentalement infectés avec une souche guyanaise du parasite." Rev Elev Med Vet Pays Trop **48**: 247-253.
- Desquesnes, M., G. McLaughlin, et al. (2001). "Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA." Int. J. Parasitol. **31**: 610-614.

- Desquesnes, M., S. Ravel, et al. (2002). "PCR identification of *Trypanosoma lewisi*, a common parasite of laboratory rats." Kinetoplast International Symposium.
- Desquesnes, M. and L. Tresse (1996). "Evaluation de la sensibilité du test de WOO pour la détection de *Trypanosoma vivax*." Rev Elev Med Vet Pays Trop **49**: 315-321.
- Desquesnes, M. and L. Tresse (1999). "Resistance to diminazene aceturate and isometamidium chloride in some South American. *T. vivax* and *T. evansi*, consequences on treatment and chemoprophylaxis. In Proceedings of First Symposium on New World Trypanosomes:20-22 November 1996." Georgetown, Guyana: 128-138.
- Dia, M. L. and M. Desquesnes (2007). "Infections expérimentales de bovins par *Trypanosoma evansi*: pathogénicité et efficacité du traitement au Cymélarosan." Revue Africaine de Santé et de Productions Animales **5**(1-2): in press.
- Diall, O., E. Banjyana-Songa, N. De Vos, D. Benahman, S. Muyldermans, R. Hammers, N. Van-Meirvenne, G. Uilenberg (1992): Detection and strain identification of *Trypanosoma evansi* by PCR amplification of a kinetoplast minicircle DNA sequence for use in diagnosis and epidemiology of camel trypanosomiasis. In: Resistance or Tolerance of Animals to Disease and Veterinary Epidemiology and Diagnostic Methods. Proceedings of EEC Contractants Workshop 2-6 November 1992, Rethymor, Crete, Greece
- Dobson, R. (2008). Modelling outbreaks of *Trypanosoma evansi* (surra) and its impact on host populations. AB-CRC National workshop for emerging infectious diseases.
- Eisler, M. C., J. Brandt, et al. (2001). "Standardised tests in mice and cattle for the detection of drug resistance in tsetse-transmitted trypanosomes of African domestic cattle." Vet Parasitol **97**(3): 171-82.
- El Rayah, I. E., R. Kaminsky, et al. (1999). "Drug resistance in Sudanese *Trypanosoma evansi*." Vet Parasitol. **80**(4): 281-7.
- Elamin, E. A., M. O. el Bashir, et al. (1998). "Prevalence and infection pattern of *Trypanosoma evansi* in camels in mid-eastern Sudan." Trop Anim Health Prod. **30**(2): 107-14.
- FAO/IAEA (1994). "Establishment of external quality assurance procedures for use with FAO/IAEA ELISA kits." FAO/IAEA: 1-15.
- Foil, L. D., W. V. Adams, et al. (1987). "Bloodmeal residues on mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens." J Med Entomol. **24**(6): 613-6.
- Gibson, W. C., P. Dukes, et al. (1988). "Species-specific DNA probes for the identification of African trypanosomes in tsetse flies." Parasitology **97**: 63-73.
- Gibson, W. C. and J. K. Gashumba (1983). "Isoenzyme characterization of some Trypanozoon stocks from a recent trypanosomiasis epidemic in Uganda." Trans R Soc Trop Med Hyg. **77**(1): 114-8.
- Herbert, W. J. and W. H. R. Lumsden (1976). "*Trypanosoma brucei*: A rapid "matching" method for estimating the host's parasitemia." Experimental Parasitology **40**(3): 427-431.
- Herrera, H. M., A. M. Davila, et al. (2004). "Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil." Vet Parasitol **125**(3-4): 263-75.
- Hoare, C. A. (1972). "The trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph." Blackwell Scientific Publications, Oxford,U.K.: 749p.

- Holland, W. G., F. Claes, et al. (2001). "A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes." Vet Parasitol **97**(1): 23-33.
- Holland, W. G., T. T. Do, et al. (2003). "The effect of *Trypanosoma evansi* infection on pig performance and vaccination against classical swine fever." Vet Parasitol **111**(2-3): 115-23.
- Holland, W. G., L. N. My, et al. (2001). "The influence of *T. evansi* infection on the immunoresponsiveness of experimentally infected water buffaloes." Vet Parasitol **102**(3): 225-34.
- Holland, W. G., N. G. Thanh, et al. (2005). "Evaluation of diagnostic tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs and subsequent use in field surveys in north Vietnam and Thailand." Trop Anim Health Prod **37**(6): 457-67.
- Indrakamhang, P. (1998). "*Trypanosoma evansi* infection in livestock in Thailand." J Protozool Res **8**: 153-161.
- Jittapalapong, S., T. Inpankaew, et al. (2007). "Molecular detection of divergent trypanosomes among rodents of Thailand." Infect Genet Evol.
- Joshi, P. P., V. R. Shegokar, et al. (2005). "Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report." Am J Trop Med Hyg **73**(3): 491-5.
- Kashemsant, A., M. Pholpark, S. Pholpark, S. Srihakim and K. Leidl (1989). "Epidemiological pattern of *Trypanosoma evansi* in Northeast Thailand and control measures." J Thai Vet Med Assoc **40**(3-4): 84-92.
- Kashiwazaki, Y., M. Pholpark, et al. (1998). "Haemoparasite infections in newly introduced dairy cattle in Loei Province, Thailand: *Trypanosoma evansi* antigen levels by ELISA referring to abortion." Vet Parasitol **80**(2): 99-109.
- Lai, D. H., H. Hashimi, et al. (2008). "Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 1999-2004.
- Löhr, K. F., S. Pholpark, et al. (1986). "*Trypanosoma evansi* infection in buffaloes in North-East Thailand. II. Abortions." Trop Anim Health Prod **18**(2): 103-8.
- Löhr, K. F., S. Pohlpark, et al. (1985). "*Trypanosoma evansi* infection in buffaloes in north-east Thailand. I. Field investigations." Trop Anim Health Prod **17**(2): 121-5.
- Luckins (1998). "Epidemiology of Surra: Unanswered Questions." J. Protozool. Res. **8**: 106-119.
- Luckins, A. G. (1988). "*Trypanosoma evansi* in Asia." Parasitol Today **4**(5): 137-42.
- Luckins, A. G. (1998). "Epidemiology of Surra: Unanswered Questions." J. Protozool. Res. **8**: 106-119.
- Luckins, A. G., R. Boid, et al. (1979). "Serodiagnosis of infection with *Trypanosoma evansi* in camels in the Sudan." Trop Anim Health Prod **11**(1): 1-12.
- Mahmoud, M. M. and A. R. Gray (1980). "Trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. A review of recent research." Trop Anim Health Prod. **12**(1): 35-47.
- Mandal, M., R. Laha, et al. (2008). "First report of Establishment of *Trypanosoma evansi* Infection in Pigeon Nestlings (*Columba Livia*)." J Parasitol **16**: 1.
- Manuel, M. F. (1998). "Sporadic Outbreaks of Surra in the Philippines and its Economic Impact." J Protozool Res **8**(3): 131-138.



- Masiga, D. K., A. J. Smyth, et al. (1992). "Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification." Int J Parasitol **22**: 909-918.
- Mochabo, M. O., P. M. Kitala, et al. (2006). "The socio-economic impact of important camel diseases as perceived by a pastoralist community in Kenya." Onderstepoort J Vet Res. **73**(4): 269-74.
- Moloo, S. K., G. J. Losos, et al. (1973). "Transmission of *Trypanosoma brucei* to cat and dogs by feeding on infected goats." Trans Roy Soc Trop Med Hyg **67**: 287.
- Moser, D. R., G. A. Cook, et al. (1989a). "Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction." Parasitology **99**: 57-66.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol. **51**(Pt 1): 263-73.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction  
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol. **51**(Pt 1): 263-73.
- Nantulya, V. M. (1990). "Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis." Rev Sci Tech Off Int Epiz **9**: 357-367.
- Ngaira, J. M., B. Bett, et al. (2002). "Animal-level risk factors for *Trypanosoma evansi* infection in camels in eastern and central parts of Kenya." Onderstepoort J Vet Res. **69**(4): 263-71.
- OIE (2005). "Surra (*Trypanosoma evansi*)." Mannuel terrestre de l'OIE chapitre 2.5.15: 836-846.
- Onah, D. N., J. Hopkins, et al. (1998). "Increase in CD5+ B cells and depression of immune responses in sheep infected with *Trypanosoma evansi*." Vet Immunol Immunopathol **63**(3): 209-22.
- Panyim, S., N. Viseshakul, et al. (1993). "A PCR method for highly sensitive detection of *Trypanosoma evansi* in blood samples." Proceedings of EEC contractants workshops, "Resistance or tolerance of animals to diseases and veterinary epidemiology and diagnostic methods", Rethymno, Grece, 2-6 November 1992; ed CIRAD-EMVT: 138-143.
- Payne, R. C. (1994). "Effect of Suramin treatment on the productivity of feedlot cattle in a *Trypanosoma evansi* endemic area of Indonesia." Trop Anim Health Prod. **26**: 35-36.
- Payne, R. C., D. Djauhari, et al. (1991). "*Trypanosoma evansi* infection in worked and unworked buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Indonesia." Vet Parasitol. **40**(3-4): 197-206.
- Pearson, R. A., Zerbini, E. , Lawrence, P.R. (1999). "Recent advances in research on draught ruminants." Animal Science **68**: 1-17.
- Pholpark, S., M. Pholpark, et al. (1999). "Influence of *Trypanosoma evansi* infection on milk yield of dairy cattle in northeast Thailand." Prev Vet Med **42**(1): 39-44.
- Rae, P. F., M. V. Thrusfield, et al. (1989). "Evaluation of enzyme immunoassays in the diagnosis of camel (*Camelus dromedarius*) trypanosomiasis: a preliminary investigation." Epidemiol Infect **102**(2): 297-307.
- Raina, A. K., Rakesh-Kumar, et al. (1985). "Oral transmission of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and mice." Vet Parasitol **18**: 67-69.
- Reid, S. A. (2002). "*Trypanosoma evansi* control and containment in Australasia." Trends Parasitol **18**(5): 219-24.

- Reid, S. A. and D. B. Copeman (2000). "Surveys in Papua New Guinea to detect the presence of *Trypanosoma evansi* infection." Aust Vet J **78**(12): 843-5.
- Reid, S. A. and D. B. Copeman (2002). "Evaluation of an antibody-ELISA using five crude antigen preparations for the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in cattle." Vet Parasitol **104**(1): 79-84.
- Reid, S. A. and D. B. Copeman (2003). "The development and validation of an antibody-ELISA to detect *Trypanosoma evansi* infection in cattle in Australia and Papua New Guinea." Prev Vet Med **61**(3): 195-208.
- Reid, S. A., A. Husein, et al. (2001). "Evaluation and improvement of parasitological tests for *Trypanosoma evansi* infection." Vet Parasitol **102**(4): 291-7.
- Reid, S. A., A. Husein, et al. (2001). "The susceptibility of two species of wallaby to infection with *Trypanosoma evansi*." Aust Vet J **79**(4): 285-8.
- Reyna-Bello, A., F. A. Garcia, et al. (1998). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies." Vet Parasitol **80**(2): 149-57.
- Ross, C. A. and A. M. Barns (1996). "Alteration to one of three adenosine transporters is associated with resistance to cymelarsan in *Trypanosoma evansi*." Parasitol Res. **82**(2): 183-8.
- Rybicki, E. (2001). Molecular Biology Techniques Manual, Department of Molecular and Cell Biology, University of Cape Town, <http://www.mcb.uct.ac.za/pcroptim.htm>.
- Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia  
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction  
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Science. **230**(4732): 1350-4.
- Seidl, A., A. M. R. Dávila, et al. (1999). "Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian lowlands." Memorias do Instituto Oswaldo Cruz **94**: 269-272.
- Sharma, D. K., P. P. Chauhan, et al. (2000). "Interaction between *Trypanosoma evansi* and *Haemonchus contortus* infection in goats." Vet Parasitol **92**(4): 261-7.
- Shastri, U. V. and P. D. Deshpande (1981). "*Hyalomma anatolicum anatolicum* (KOCH, 1844) as a possible vector for transmission of *Trypanosoma theileri*, LAVERAN, 1902, in cattle." Vet Parasitol **98**: 151-155.
- Songa, E. B., P. Paindavoine, et al. (1990). "Evidence for kinetoplast and nuclear DNA homogeneity in *Trypanosoma evansi* isolates." Mol Biochem Parasitol **43**(2): 167-79.
- Taylor, T. K., D. B. Boyle, et al. (2008). "Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Trypanosoma evansi*, the agent of surra." Vet Parasitol. **153**(3-4): 255-64. Epub 2008 Feb 13.
- Thekisoe, O. M., T. Honda, et al. (2007). "A trypanosome species isolated from naturally infected *Haemaphysalis hystricis* ticks in Kagoshima Prefecture, Japan." Parasitology. **134**(Pt 7): 967-74. Epub 2007 Feb 19.
- Thekisoe, O. M., N. Inoue, et al. (2005). "Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and parasitological tests for detection of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs." Vet Parasitol **130**(3-4): 327-30.
- Thu, L., L. My, et al. (1998). "Epidemiological survey on *Trypanosoma evansi* infection in Vietnam." J. protozool. Res. **8**: 177-181.

- Tuntasuvan, D. and A. Luckins (1998). "Status of Surra in livestock in Thailand." J. Protozool. Res. **8**: 162-170.
- Verloo, D., W. Holland, et al. (2000). "Comparison of serological tests for *Trypanosoma evansi* natural infections in water buffaloes from north Vietnam." Vet Parasitol **92**(2): 87-96.
- Verloo, D., E. Magnus, et al. (2001). "General expression of RoTat 1.2 variable antigen type in *Trypanosoma evansi* isolates from different origin." Vet Parasitol **97**(3): 183-9.
- Witola, W. H., N. Inoue, et al. (2004). "RNA-interference silencing of the adenosine transporter-1 gene in *Trypanosoma evansi* confers resistance to diminazene aceturate." Exp Parasitol. **107**(1-2): 47-57.
- Witola, W. H., A. Tsuda, et al. (2005). "Acquired resistance to berenil in a cloned isolate of *Trypanosoma evansi* is associated with upregulation of a novel gene, TeDR40." Parasitology. **131**(Pt 5): 635-46.
- Wright, P. F., E. Nilsson, et al. (1993). "Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis." Rev Sci Tech. **12**(2): 435-50.
- Wuyts, N., N. Chokesajjawatee, et al. (1994). "A simplified and highly sensitive detection of *Trypanosoma evansi* by DNA amplification." Southeast Asian J Trop Med Public Health. **25**(2): 266-71.
- Zhou, J., J. Shen, et al. (2004). "Resistance to drug by different isolates *Trypanosoma evansi* in China." Acta Trop **90**(3): 271-5.

Toulouse, 2009

**NOM : PRUVOT**

**Prénom : Mathieu**

**TITRE :**

**DIAGNOSTIC DE *TRYPANOSOMA EVANSI* : Mise en place, standardisation et évaluation d'outils PCR et Ac-ELISA. Application à une étude préliminaire chez le Bovin laitier en Thaïlande**

**RESUME :**

La trypanosomose à *Trypanosoma evansi*, ou Surra, est la trypanosomose la plus largement répartie à travers le monde et touchant le plus grand nombre d'espèces hôtes. Le Surra affecte très fortement l'élevage (bovins, buffles et porcs), et constitue parfois un frein important au développement agricole de certain pays. Les pertes économiques sont énormes bien que le plus souvent très mal estimées. Le besoin de connaissances approfondies sur ce fléau a entraîné la mise en place en Thaïlande d'un projet de recherche sur *Trypanosoma evansi* à visée régionale. L'initiation d'un tel projet nécessite la mise en place préliminaire d'outils diagnostiques performants. La mise en place d'un test Ac-ELISA pour bovins, la mise en place et l'évaluation comparative de différents couples d'amorces PCR et la standardisation de ces outils ont ainsi été réalisées dans le laboratoire de parasitologie de l'université de Kasetsart (Bangkok, Thaïlande). Ce travail rend également compte de l'application de ces outils à une étude préliminaire sur l'élevage laitier en Thaïlande.

**MOTS-CLES :** Surra, trypanosomose, diagnostic, standardisation, enquête transversale, bovin laitier

---

**ENGLISH TITLE :** *TRYPANOSOMA EVANSI* DIAGNOSTIC : *Implementation, standardization and evaluation of PCR and Ab-ELISA diagnostic tools. Application to a preliminary survey in dairy cattle in Thailand*

**ABSTRACT :**

Trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* (Surra) is the widest spread over the world and has the greatest host range. Surra affects severely breeding (cattle, buffalo and pork), and represents a major constraint to farming development. Economic losses are huge but not accurately estimated. The deep need to improve our knowledge of this burden led to the implementation of a research project on *Trypanosoma evansi* in Thailand, at a regional level. The first step of such a project is the preliminary implementation of efficient diagnostic tools. Development of an Ab-ELISA for bovine serum, development and comparative evaluation of various PCR primers, and standardization of these tools have been performed in the department of Parasitology of Kasetsart University (Bangkok, Thailand). The following work will also address the application of these tools to a preliminary survey on dairy cattle in Thailand.

**KEYWORDS :** Surra, trypanosomosis, diagnostic, standardization, transectionnal survey, dairy cattle