

**UNIVERSITE MONPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
UFR DES SCIENCES**

N° Attribué par la bibliothèque

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : *Microbiologie et maladies transmissibles*

Formation doctorale : *Parasitologie*

Ecole doctorale : *Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé*

Titre

**Caractérisation génétique de *Trypanosoma brucei* s.l.: implications
épidémiologiques et nouvelles perspectives**

Présentée et soutenue publiquement

Par

Mathurin Koffi

Le 8 Décembre 2006

Jury

Mme. Geneviève MILON, Directrice de Recherche Institut Pasteur Paris
M. Philippe VINCENDEAU, Professeur, Université Bordeaux II
M. André GARCIA, Directeur de Recherche, IRD Cotonou
M. Bernard GODELLE, Professeur, Université Montpellier II
M. Gérard DUVALLET, Professeur, Université Montpellier III
M. Gérard CUNY, Directeur de Recherche, IRD Montpellier

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

*Je voudrais dédier cette thèse à mon petit frère Pierre Clavaire
Brou parti trop tôt pour profiter de son intelligence. Là où il se
trouve, qu'il sache que je traquerai cette maladie partout où il me
sera possible.*

Remerciements

Une thèse est rédigée par un individu certes, mais le produit final est l'expression phénotypique d'un ensemble de gène-individus, agissant dans une interaction complexe multifonctionnelle. Cet ensemble de gène-individus comprend entre autres des gènes de ménage (dont l'altération est létale à la thèse) agissant en amont de la thèse. Cependant chaque gène reste indispensable à son rôle car certains sont hautement différenciés, tandis que d'autres jouissent d'une grande plasticité. C'est cet ensemble de gène-individus qu'il me sied ici le plaisir d'honorer en leur disant merci.

Nous avons commencé ce travail en Côte d'Ivoire dans le cadre d'un Grand Programme Mobilisateur « Trypanosomoses » financé par le Fond d'Aide à la Coopération du Ministère français des Affaires Etrangères. Il est aussi le fruit d'une collaboration très soutenue Institut Pierre Richet/ Institut de recherche pour le Développement (IPR/IRD). A cet effet je voudrais dire merci à Messieurs les Président et Directeur de l'IRD, Monsieur le Directeur de l'Institut Pierre Richet, le Professeur Koné Moussa. Je voudrais aussi remercier le directeur du Département de Soutien et Formation au pays du sud de l'IRD (DSF/IRD) pour m'avoir octroyé une allocation de recherche pendant trois ans.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude, pour leur présence à ce jury, à Madame Geneviève Milon, Messieurs Bernard Godelle, Phillippe Vincendeau, Gérard Duvallet et André Garcia.

Je remercie particulièrement :

Gérard Cuny, mon directeur de thèse qui m'a accueilli dans son unité de recherche et a dirigé ce travail avec compétence et rigueur de part ses grandes qualités scientifiques, une très bonne maîtrise de l'outil moléculaire et une bonne connaissance du parasite de notre étude. Je suis plus qu'heureux d'avoir eu un directeur de thèse dont la disponibilité et la grandeur d'esprit m'ont permis de travailler dans une ambiance très chaleureuse. Votre sens de l'humour reste un atout inconditionnel dans vos rapports humains et m'a permis d'être à mon aise chaque fois que je devais discuter avec vous. Je vous exprime toute ma gratitude pour m'avoir accepté et encadré ce travail.

Philippe Solano, tu es tout à fait ce qu'on appelle chez nous les Baoulés « Dé fouè » qui signifie sauveur. Je t'ai rencontré lors de la partie théorique de mon DEA auquel tu as participé en tant qu'enseignant extérieur et depuis ce temps je ne t'ai plus jamais quitté. Tu m'a accueilli dans ton labo « THA et glossines » que tu as dirigé sans faille jusqu'aux évènements de guerre connus par la Côte d'Ivoire. Tes compétences et tes qualités de collaborations ne sont plus à démontrer tant par le nombre d'articles produits que par le nombre de projet auxquels tu participes. Avec toi c'est toute la famille Solano que je remercie.

Vincent Jamonneau, je pourrais appliquer à toi la fameuse phrase du poème de Lamartine : « Un seul être vous manque et tout est dépeuplé ». Tu as été en amont comme Philippe Solano, je t'ai retrouvé à l'Institut Pierre Richet, où tu m'as initié à la caractérisation des trypanosomes par les isoenzymes. A Montpellier où je suis venu te rejoindre, nous avons poursuivis les travaux que nous avons initiés à l'Institut Pierre Richet et qui sont l'aboutissement de cette thèse. Tu es celui qui a le plus subi mes caprices car au travail comme les jours non ouvrables, je passais plus de temps avec toi qu'avec quiconque. Je peux le dire sans me tromper que sans toi cette thèse n'aurait pas existée. Il n'existe pas de mots qui exprimeraient exactement ce que tu représentes pour moi. Avec toi c'est également toute la famille Jamonneau que je remercie.

Sophie Ravel, tu incarnes la rigueur du LRCT. Par une gestion combien méticuleuse tu demeures l'épine dorsale de notre laboratoire. En te côtoyant j'ai beaucoup appris en biologie moléculaire mais également comment prendre soin d'un laboratoire de recherche pour qu'il puisse présenter une bonne santé. Merci de ta contribution à ma formation.

Anne Geiger, Alicia Bert, Bernadette Tchicaya, Stéphane Herder, Pascal Grébaut et Delphine Patrel avec qui j'ai partagé le laboratoire pendant ces trois années de thèse, vous avez toujours été prompt à répondre à des questions qui me tracassaient ou à m'aider à obtenir un quelconque accessoire du laboratoire. Je vous suis reconnaissant de votre aide.

Thierry de Meeüs de part ta connaissance parfaite de la génétique des microorganismes, tu m'as appris à maîtriser les logiciels d'analyse de génétique des populations, tu as également apporté des corrections très utiles à mon manuscrit et beaucoup

éclairé en matière de génétique des microorganismes. Tu as toujours été présent toutes les fois que nous t'avons sollicité. Je voudrais ici te dire merci du fond du coeur.

Christian Barnabé, toi également tu m'as beaucoup apporté. C'est dans votre laboratoire que nous avons effectué toutes les manipulations de la technique MLEE. Nous avons bénéficié de tes conseils éclairés. Tu m'as également aidé dans la compréhension de plusieurs logiciels d'analyse. Tu as lu mon manuscrit et porté des corrections utiles. Reçois ici mes remerciements les plus soutenus.

A toute la famille Courtin à Montpellier, je dis merci pour leur bonté et un merci particulier à Courtin fils né Fabrice pour m'avoir offert une très belle carte pour la présentation de mes sites d'études et hébergé lors de mon séjour à Bobodioulasso.

A toute l'équipe « Trypano » de l'IPR, en commençant par le nouveau chef que j'appelle affectueusement « Doyen Kaba », Grand Louis, Bamoro (mon délinquant), Alain Koffi, Fabien Dofini, Gboko Ouattara, Sanou René, Alexis de Sinfra, Fabien Kouakou de Bouaflé, ce travail c'est en partie vous qui l'avez effectué sur le terrain et je vous en suis plus que reconnaissant. Votre sympathie, votre solidarité n'ont d'égaux que votre connaissance du terrain et votre volonté à lutter contre la maladie du sommeil.

Je remercie aussi l'équipe du PRCT : Docteur Djè Norbert que je félicite pour sa nouvelle promotion de chef du Programme National de Lutte contre la THA, Côte d'Ivoire, Benjamin Miezan, Blé Leopold, Gabin et Dion.

Merci aussi au Programme National de Lutte contre la THA de Guinée avec à sa tête Monsieur Mamadi Camara, sans toute fois oublier le ministère de la santé guinéenne.

Je remercie vivement mes professeurs d'Université de Cocody à Abidjan. Le chef du laboratoire de génétique, Dr Kouassi Auguste, le professeur Abdourahaman Sangaré, mon encadreur de DEA, Dr Coulibaly ainsi que tous les autres enseignants qui m'ont inculqué la connaissance et plus particulièrement le goût de la génétique.

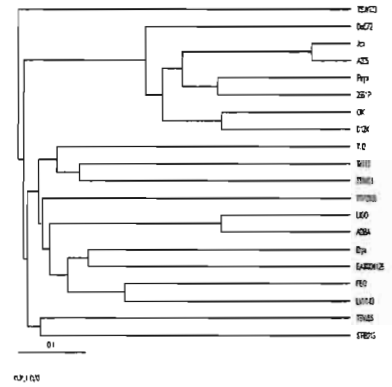
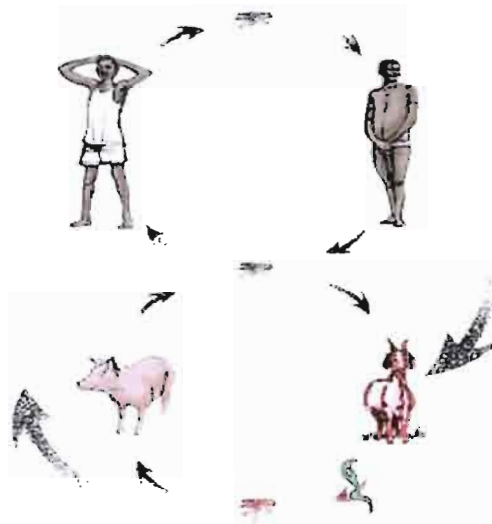
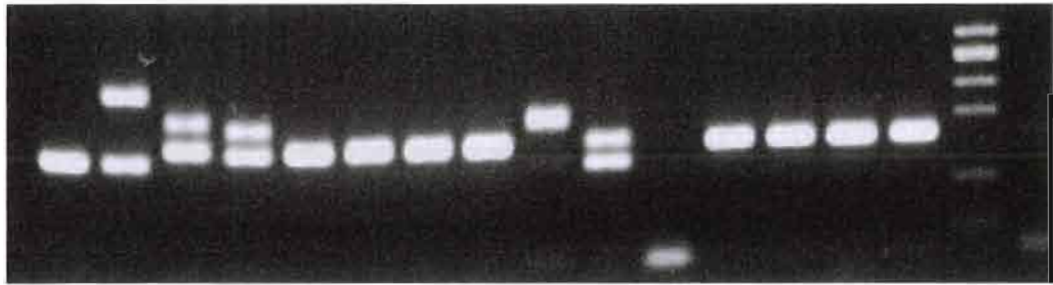
J'ai une pensée émue pour tous les malades qui ont accepté de participer à cette étude et je les en remercie. Je leur souhaite à tous une bonne santé.

Merci à tous mes amis de la fac en particulier à Loukou Etienne, Hermann Assoua, Mathieu Yao, Sokouri Didié, Diedro Lath. Merci également à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à mon épanouissement. Mme Marie claire Kouassi, Mme Assamoi, Mme Ano Béatrice, Seydou Traoré, mes nièces, mes neveux, Marie Laure Brou, Lydie Kahé, Hermance Koffi, Samuel Bobo et tous les autres.

A mes parents, à mes frères et soeurs

REMERCIEMENTS	3
INTRODUCTION	10
PREMIERE PARTIE: ETATS DES CONNAISSANCES	14
Chapitre 1. Historique de la THA et situation actuelle.....	14
1. 1. Les premières descriptions de la maladie.....	14
1. 2. Identification de l'agent pathogène	15
1. 3. Evolution de la maladie au cours du 20 ^{ème} siècle	17
1. 4. Situation actuelle de la THA	18
Chapitre 2. Les trypanosomes.....	21
2. 1. Taxonomie.....	21
2. 2. 1. Morphologie et Cycle évolutif	26
2. 2. 2. Structure du génome	30
2. 2. 2. 1. Génome nucléaire.....	30
2. 2. 2. 2. Génome kinétoplastique.....	31
2. 2. 3. Reproduction de <i>T. brucei</i> s.l., le débat clonalité versus sexualité.....	32
2. 2. 4. Variation antigénique des trypanosomes africains et évitement du système immunitaire	33
2. 4. 1. Diagnostic.....	39
2. 4. 1. 1. Examens sérologiques.....	39
2. 4. 1. 2. Examens parasitologiques	40
2. 4. 2. Examen du liquide céphalo-rachidien (LCR) et diagnostic de phase	41
2. 4. 3. Traitement de la THA	42
Chapitre 3. Problématique	44
DEUXIEME PARTIE: MISE EN EVIDENCE D'UN BIAIS SELECTIF DES TECHNIQUES D'ISOLEMENT. (ARTICLE 1).....	49
TROISIEME PARTIE: ROLE DE RESERVOIR HUMAIN DE LA THA DES INDIVIDUS SEROPOSITIFS SANS CONFIRMATION PARASITOLOGIQUE	58
QUATRIEME PARTIE: VARIABILITE GENETIQUE DES SOUCHES DE TRYPANOSOMA BRUCEI GAMBIENSE CIRCULANT EN AFRIQUE DE L'OUEST	66
Introduction.....	66
1. Matériel et méthodes.....	67
1. 1. Zones d'étude.....	67
1. 2. Inclusion des sujets d'étude	69
1. 2. 1. Inclusion des patients confirmés	70
1. 2. 2. Inclusion des séropositifs et suspects sérologiques	71
1. 2. 3. Souches de référence.....	74
1. 3. Isolement et culture des trypanosomes	76
1. 4. L'électrophorèse des isoenzymes (MLEE)	76
1. 5. L'amplification de l'ADN microsatellite	77
1. 6. Détection d'infections multiples.....	79
1. 7. Analyses de génétique des populations.....	80

1. 7. 1. Analyse cladistique	80
1. 7. 2. Indice de fixation de Wright	80
1. 7. 3. La mesure du déséquilibre de liaison	81
2. Résultats.....	82
2. 1. Caractérisation isoenzymatique.....	82
2. 2. Caractérisation par PCR/Microsatellites	86
2. 2. 1. Analyse descriptive des marqueurs microsatellites	86
2. 2. 2. Microsatellites et groupe 1 de <i>T. b. gambiense</i>	88
2. 2. 3. PCR/Microsatellites et comparaison de souches isolées d'un même patient	90
2. 2. 4. PCR/ microsatellites et échantillons biologiques	96
2. 3. PCR/Microsatellites et génétique des populations des trypanosomes.....	98
2. 3. 1. Analyses cladistiques	98
2. 3. 2. Structuration génétique par les indices de Wright.....	102
2. 3. 2. 1. Estimation de l'effet de la technique d'isolement.....	102
2. 3. 2. 2. Test de la fiabilité des marqueurs microsatellites	103
2. 3. 2. 3. Différenciation génétique entre les foyers de THA.....	104
2. 3. 2. 4. Différenciation génétique inter-année dans le foyer de Bonon.....	104
2. 3. 2. 5 Test de clonalité.....	105
2. 3. 3. Test de déséquilibre de liaison entre paire de loci.....	106
2. 4. Etude d'une infection mixte expérimentale.....	107
3. Discussion.....	111
3. 1. MLEE et caractérisation génétique du complexe <i>T. brucei</i> s.l	111
3. 2. PCR/Microsatellites et caractérisation génétique du complexe <i>T. brucei</i> s.l.....	113
3. 2. 1. Polymorphisme au sein du groupe 1 de <i>T. b. gambiense</i>	114
3. 2. 2. Biais sélectif des techniques d'isolement et infections mixtes.....	116
3. 2. 3. Reproduction au sein du groupe 1 de <i>T. b. gambiense</i>	118
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	120
BIBLIOGRAPHIE	123
ANNEXES	151
Annexe 1	152
Annexe 2. Illustration du déroulement d'une prospection médicale	153
Annexe 3. Liste des Publications	158



Introduction

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil se manifeste sous forme endémique ou épidémique en Afrique inter-tropicale. Après une grande réduction des cas de trypanosomoses dans les années 1960, grâce à une lutte intensive, cette maladie “oubliée” est actuellement considérée comme une maladie ré-émergente, et dans certains pays on observe des prévalences identiques à celles des années 1925-1930. Plus de 60 millions de personnes sont exposées au risque de la maladie, dans 36 pays de l’Afrique sub-saharienne dont 22 font partie des pays les moins développés au monde. Cependant la surveillance de la maladie ne concerne que 3 à 4 millions de personnes (OMS, 1998 ; 2002), et les cas annuellement rapportés par l’OMS ne reflètent probablement pas la réalité de la situation, mais révèlent simplement l’absence d’une surveillance et d’une lutte exhaustives.

La THA reste une maladie prioritaire pour l’OMS et en tenant compte des DALYs (Disability Adjusted Life Years : somme de la perte d’années de vie par mortalité prématurée et d’années de vie productive par incapacité) se place au troisième rang des maladies parasitaires en Afrique sub-saharienne, derrière le paludisme et la shistosomose (Cattand, 2001).

La THA est une maladie parasitaire à transmission vectorielle due à un protozoaire flagellé de l’espèce *Trypanosoma brucei* s.l.. Sur la base de critères extrinsèques (hôte, distribution géographique et aspect clinique, Hoare, 1972), cette espèce est subdivisée en trois sous-espèces: *Trypanosoma brucei gambiense* Dutton, 1902 (*T. b. gambiense*), responsable de la forme chronique de THA en Afrique de l’Ouest et Centrale, *Trypanosoma brucei rhodesiense* Stephens & Fantham, 1910 (*T. b. rhodesiense*), agent de la forme aiguë de la maladie en Afrique de l’Est et *Trypanosoma brucei brucei* Plimmer & Bradford, 1899 (*T. b. brucei*), non pathogène pour l’homme, parasite du bétail en Afrique intertropicale. La transmission aux hôtes mammifères, homme et animal, est assurée par un insecte vecteur hématophage, la glossine (genre *Glossina*) ou mouche tsé-tsé, chez lequel le parasite accomplit une évolution cyclique plus ou moins complexe avant d’être à nouveau transmis.

La THA évolue chez l’homme en deux phases : la phase lymphatico-sanguine (première période) durant laquelle le parasite se multiplie dans le sang et la lymphe, et la

phase méningo-encéphalitique (deuxième période) qui correspond au passage du trypanosome dans le liquide céphalorachidien (LCR). Au cours de la phase lymphatico-sanguine, le malade présente des signes cliniques non spécifiques tels que des accès de fièvre fréquents, des céphalées ou des signes cutanés. La phase méningo-encéphalitique se caractérise habituellement par l'apparition de troubles neurologiques (troubles du comportement, de la conscience, de la motricité) et sans traitement, conduit à la mort du malade. Dans le cas de la forme chronique à *T. b. gambiense*, la première période peut durer plusieurs années, les symptômes sont peu prononcés, et l'apparition des troubles neurologiques lors de la deuxième période est progressive. Dans le cas de la forme aiguë à *T. b. rhodesiense*, la phase lymphatico-sanguine ne dure que quelques mois, les symptômes sont plus marqués et l'atteinte du système nerveux est brutale. Cependant, cette description classique de la maladie ne reflète qu'une vision partielle de la réalité. En effet, une importante diversité clinique a été observée en Afrique de l'Ouest et Centrale (Jamonneau et al., 2002 ; 2004a), allant de formes asymptomatiques (Lapeyssonie 1960 ; Ginoux & Frézil, 1981) à des formes aiguës (Truc et al., 1997a ; Garcia et al., 2000) « caractéristiques » de la forme rhodésienne.

Historiquement, la lutte contre la THA a reposé essentiellement sur le dépistage et le traitement des malades. Le diagnostic clinique de la maladie étant difficile (Jannin et al., 1993 ; Sternberg, 2004), des tests parasitologiques (diagnostic direct) qui visent à rechercher la présence du parasite dans les liquides biologiques (sang, lymphe et LCR) ou des tests sérologiques (diagnostic indirect) qui cherchent à mettre en évidence l'infection parasitaire ont été développés. Lors du dépistage de terrain, le diagnostic indirect est utilisé pour déterminer les individus sur lesquels porteront les examens du diagnostic direct dont seul le résultat positif (mise en évidence du parasite) peut justifier l'administration d'un traitement (OMS, 1998). Mais les techniques actuellement utilisées manquent souvent de sensibilité et / ou de spécificité : les équipes de dépistage doivent faire face à une situation plus complexe que la dichotomie malade/non-malade et notamment à des sujets positifs en sérologie sans confirmation parasitologique (Garcia et al., 2000) témoins d'une diversité donc de réponses aux tests utilisés.

La diversité clinique et la diversité de résultats aux tests de dépistage témoignent d'une importante diversité de réponses à l'infection liée à des interactions complexes hôtes/parasites (Jamonneau et al., 2004c annexe 3). L'origine de cette diversité doit être recherchée à la fois chez le parasite (variabilité génétique) et chez l'hôte (susceptibilité individuelle à la maladie) (Garcia et al., 2006 annexe 3).

Les travaux présentés dans ce mémoire de thèse se sont donc focalisés sur la caractérisation génétique des souches de trypanosomes circulant dans les foyers de THA d'Afrique de l'Ouest, la structure des populations des parasites pathogènes pour l'homme et leur mode de reproduction.

Première partie
Etat des connaissances

Première partie: Etats des connaissances

Chapitre 1. Historique de la THA et situation actuelle

La Trypanosomose Humaine Africaine ou maladie du sommeil ne se rencontre qu'en Afrique subsaharienne du 14^{ème} degré de latitude nord au 29^{ème} degré de latitude sud, dans les limites de la distribution géographique des glossines (OMS, 1998).

1. 1. Les premières descriptions de la maladie

La maladie du sommeil semble être connue depuis plusieurs centaines d'années en Afrique et la première mention écrite d'un cas de THA remonte au 14^{ème} siècle (1375) quand l'historien Ibn Khaldoun rapporte la mort du sultan Maariy Djazaa, au Mali, aux environs du fleuve Niger, après une maladie se terminant dans un état de sommeil continu. Il faut attendre 1734 et l'ouvrage "The Navy Surgeon" de John Atkins pour trouver une description plus précise de l'affection que l'auteur nomme "sleeping distemper". Par la suite et jusqu'au début du 19^{ème} siècle, la maladie est signalée dans diverses parties de l'Afrique de l'Ouest par des observateurs anglais, français et portugais. Winterbottom, en 1803, dans sa description du "lethargus" remarque l'importance de l'hypertrophie des ganglions du cou. Ce signe était non seulement connu des « négriers », qui refusaient d'acheter des esclaves porteurs d'adénopathies cervicales, mais aussi de plusieurs tribus africaines qui pratiquaient l'ablation systématique des ganglions cervicaux à des fins curatives. Dans le courant du 19^{ème} siècle, de nombreux cas sont signalés en Afrique de l'Ouest et Centrale, mais sans que l'on puisse quantifier l'importance de la maladie. Une première épidémie est alors décrite dans les années 1880-1890, notamment au Congo, en République Centrafricaine et en Ouganda. De nombreux villages sont décimés par la maladie (Martin *et al.*, 1909). Plusieurs milliers de morts du Sénégal au Zaïre sont aussi attribués à la "léthargie". A cette époque l'agent responsable de l'affection n'est toujours pas connu et beaucoup pensent que la maladie a une origine infectieuse et qu'elle est contagieuse. Les malades sont alors souvent exclus des villages pour éviter les contaminations.

1. 2. Identification de l'agent pathogène

Pour Brault & Lapin (1898), “l'agent pathogène pourrait être un protozoaire sanguicole dans le genre du trypanosome”. Les trypanosomes étaient déjà connus puisque les premières descriptions remontent au début des années 1840 (Valentin, en 1841 le décrit chez la truite et Gruby, en 1843, l'observe chez la grenouille). En 1901, Forde observe des “vermicules mobiles” dans le sang d'un capitaine de bateau faisant du trafic fluvial depuis 6 ans en Gambie. Forde et Dutton identifient l'agent pathogène: c'est un trypanosome que Dutton décrit en 1902 sous le nom de *Trypanosoma gambiense* (découvert en Gambie). En 1903, Dutton et Todd retrouvent plusieurs fois le même trypanosome chez des africains en Gambie (Dutton, 1903; Dutton & Todd, 1906), et la même année, Castellani trouve en Ouganda des trypanosomes dans le LCR des malades atteints de THA. Il pense alors qu'il existe deux espèces différentes de trypanosomes humains, l'une sanguicole, peu pathogène et l'autre se localisant dans les centres nerveux et responsable de la maladie du sommeil; il nomme cette dernière espèce: *Trypanosoma ugandense*. Mais toujours en 1903, Bruce et Nabarro constatent que les trypanosomes sanguicoles sont identiques à ceux du système nerveux et qu'ils constituent le premier stade de la maladie. Bruce confirme alors que *Trypanosoma gambiense* est l'agent étiologique de l'endémie sommeilleuse et fournit la preuve expérimentale que les glossines de l'espèce *Glossina palpalis* sont le vecteur de la maladie (Bruce *et al.*, 1909; 1911).

En 1903, une enquête effectuée par Kermorgant fait ressortir qu'à l'époque, la Casamance (Sénégal), le pays lobi et le Yatenga (Haute-Volta, actuel Burkina-Faso), le Wasulu (Guinée) et l'intérieur de la Côte d'Ivoire, étaient particulièrement concernés par la maladie du sommeil. Paul Gouzien (1908) pense que « *l'endémo-épidémie semble d'abord avoir remonté le cours de la Volta principale dès son embouchure dans le Golfe de Guinée, pour s'épandre ensuite vers l'intérieur des terres, par le réseau de ses nombreux affluents* ». A partir de 1908, on rapporte d'Afrique de l'Est, des cas de maladie du sommeil remarquables par leur sévérité et leur courte durée. Stephens & Fantham (1910) étudient une souche isolée sur un des premiers cas reconnu de cette nouvelle forme de maladie et constatent qu'elle diffère de *T. gambiense* par sa grande virulence pour les animaux de laboratoire. Ils nomment ce nouvel agent pathogène *Trypanosoma rhodesiense* (découvert en Rhodésie). En 1912, Kinghorn et Yorke démontrent le rôle de *Glossina morsitans* dans la transmission de ce

parasite, pendant qu'Emile Roubaud et Gaston Bouet prouvent en 1913, que le cycle du trypanosome chez la glossine varie en fonction des espèces de parasites.

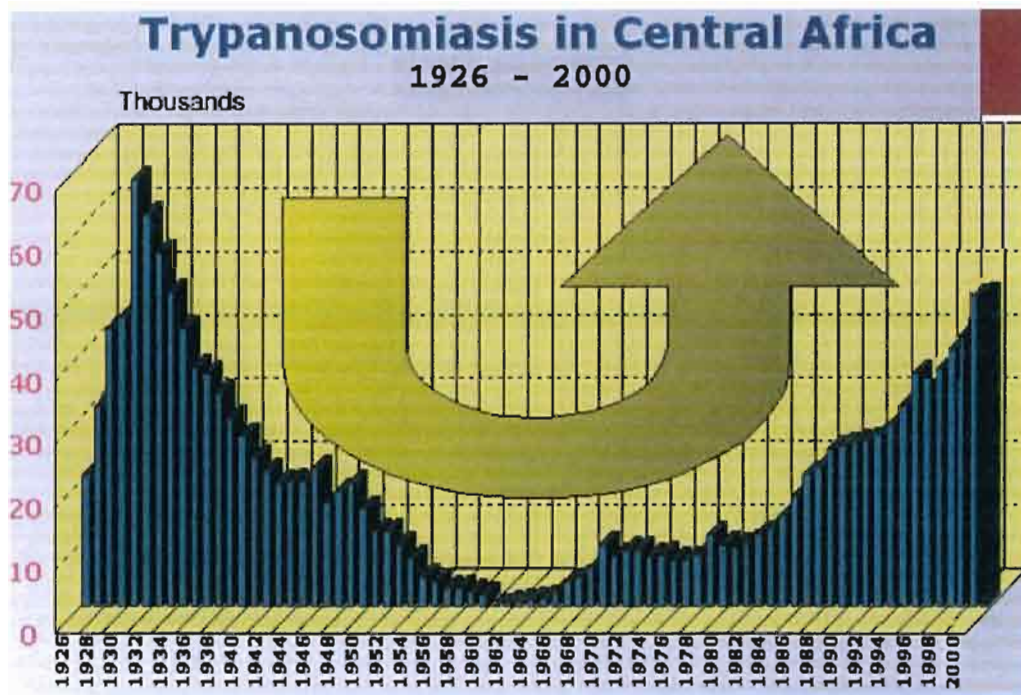


Figure 1. Evolution du nombre de cas de THA en Afrique Centrale de 1926 à 2000 (OMS, 2000)

1. 3. Evolution de la maladie au cours du 20^{ème} siècle

Malgré ces importantes découvertes, la maladie du sommeil continue de sévir intensément en Afrique noire. Une épidémie est déclarée en Afrique de l'Ouest et Centrale au début des années 1920 et la situation devient dramatique dans les années 1924-1926, notamment au Cameroun où 45% des décès lui sont imputables. C'est en 1926, devant l'ampleur de la situation que le médecin militaire français Eugène Jamot (1879-1937) développe les premières équipes mobiles de dépistage et de traitement, qui vont sillonner toutes les zones touchées par l'épidémie entre 1926 et 1932 (Jamot, 1926; 1929; 1932). Ces campagnes d'éradication vont permettre de contenir l'affection et dans les années 1960, les enquêtes épidémiologiques menées dans la plupart des pays d'Afrique noire ne décèlent plus que quelques rares cas de THA (figure 1). *La méthode proposée par Jamot pour combattre la maladie du sommeil reste le modèle de lutte contre une " grande endémie " en zone tropicale* (Gentilini, 1993).

L'élimination presque totale de la maladie a conduit au cours de ces années 60 à l'abandon du dépistage de masse actif, et il n'est pas surprenant, que suite à la rupture des systèmes de contrôle, la maladie ait « ré-émergée » et soit devenue un problème majeur de santé publique.

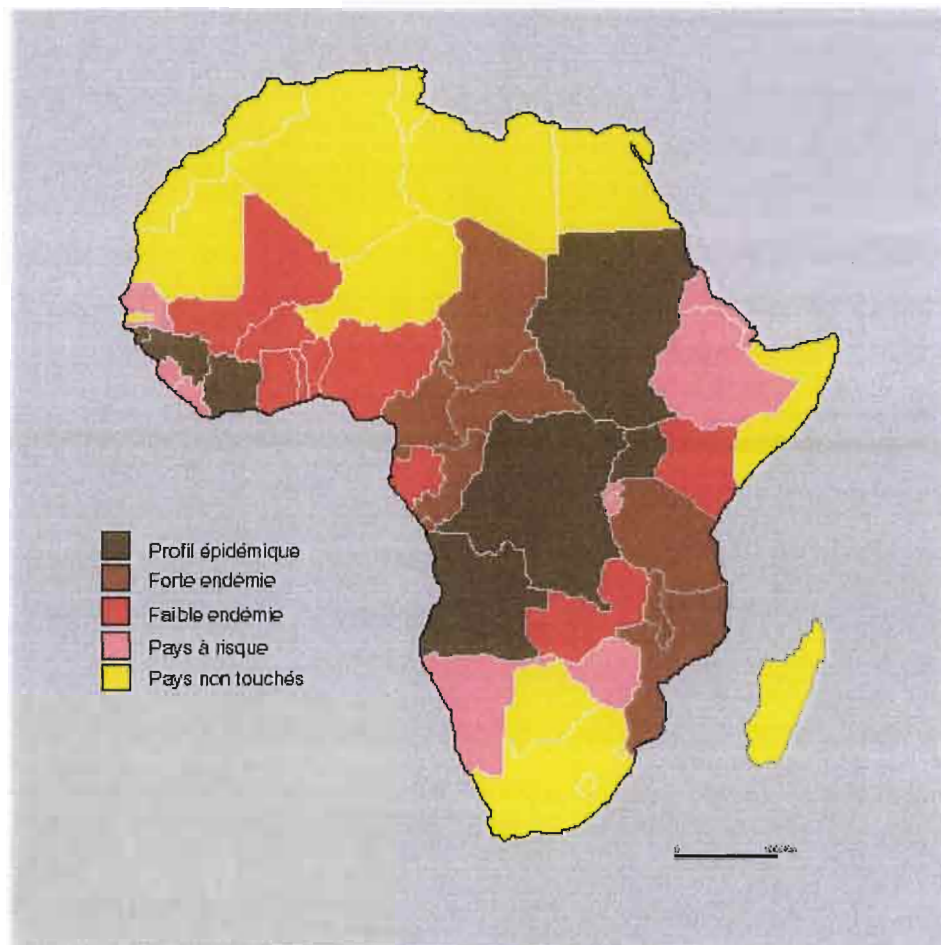
La reprise de l'endémie se fait progressivement à partir de 1970 dans la plupart des foyers historiques. Certains pays réussissent à maintenir un contrôle sur la maladie mais de nombreux autres, ayant abandonné toute surveillance effective, doivent faire face à une situation redevenue épidémique et dramatique. C'est notamment le cas pour la République Démocratique du Congo (RDC, ex-Zaïre), l'Angola, l'Ouganda ou le Sud-Soudan (figure 2). *On peut considérer que la situation épidémiologique réelle de la maladie est aujourd'hui comparable à celle qui prévalait entre 1925 et 1930* (OMS, 2000).

1. 4. Situation actuelle de la THA

Parmi les 36 pays d'Afrique « infestés par les glossines », 30 sont touchés par l'endémie sommeilleuse (figure 2) mais de façon très hétérogène. Les foyers d'un pays sont généralement dispersés (figure 3) et le niveau d'endémicité peut varier considérablement d'un foyer à l'autre, et même au sein d'un foyer, d'une zone à l'autre (Courtin et *al.*, 2005). On distingue les foyers résiduels où le nombre de cas reste faible et constant pendant une longue période (situation endémique) et les foyers en activité où le nombre de cas augmente considérablement (situation épidémique). De nombreux foyers sont actuellement actifs en Afrique de l'Est (Hide, 1999 ; MacLean et *al.*, 2004 ; Piccozzi et *al.*, 2005 ; Fevre et *al.*, 2005) mais surtout en Afrique Centrale (Smith & Bailey, 1997, Simo et *al.*, 2005) .

Actuellement, on estime que 60 millions de personnes sont exposées au risque de contracter la THA, parmi lesquels moins de 4 millions sont sous surveillance régulière (OMS, 2002). Dans les années 2000, le nombre réel de personnes infectées est estimé entre 300 000 et 500 000 par l'OMS. En 2004, après un effort considérable de surveillance en Afrique Centrale notamment, environ 25 000 cas sont rapportés et l'OMS en 2005 annonce la possibilité d'élimination de la maladie du sommeil. Ce nombre de cas ne reflète pas la réalité de la situation, mais montre simplement l'absence d'une détection de masse, et l'absence ou l'insuffisance de dépistage dans de nombreux foyers, en particulier en Afrique de l'Ouest. L'importance de la THA dans certains pays, par exemple le Libéria, la Sierra Léone, le Ghana, le Burkina Faso ou la Guinée Bissau, reste totalement méconnue ; en Guinée et en Côte d'Ivoire, de récentes prospections médicales (1997 à 2005) ont permis de dépister plusieurs centaines de malades notamment dans les foyers de Boffa et Dubreka en Guinée (Camara et *al.*, 2005), et dans les foyers de Bonon, Sinfra, Oumé en Côte d'Ivoire (Kaba et *al.*, 2006).

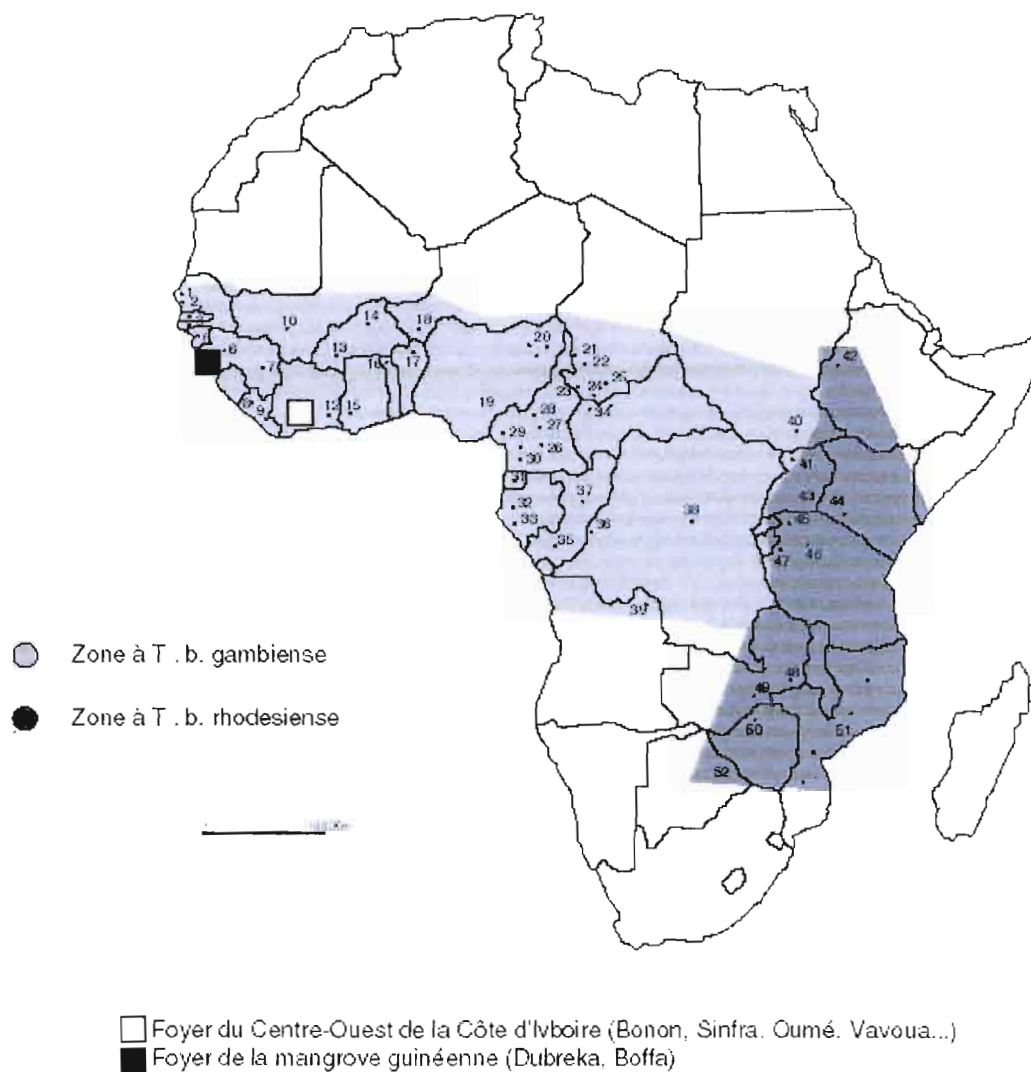
Figure 2. Répartition géographique de la Trypanosomiase Humaine Africaine en fonction du niveau d'endémie (source: OMS, 2002)



On distingue:

- les pays où la maladie prend un profil épidémique en raison d'une très forte prévalence cumulée et d'une forte transmission: ANGOLA, REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO, OUGANDA, SOUDAN;
- les pays de forte endémie, où la prévalence est moyenne, mais en augmentation: CAMEROUN, CONGO, CÔTE D'IVOIRE, CENTRAFRIQUE, GUINEE, MOZAMBIQUE, TANZANIE, TCHAD;
- les pays de faible endémie: BENIN, BURKINA-FASSO, GABON, GHANA, GUINÉE EQUATORIALE, KENYA, MALI, NIGIERA, TOGO, ZAMBIE;
- les pays dont le statut actuel est très mal connu: BURUNDI, BOSTWANA, ETHIOPIE, LIBERIA, NAMIBIE, RWANDA, SENEGAL, SIERRA-LEONNE.

Figure 3. Répartition géographique des foyers de Trypanosomiase Humaine Africaine en activité ou éteints (source: Médecine tropicale, Gentilini, 1993)



* La liste complète des foyers peut être consultée: Médecine tropicale (Gentilini, 1993), p. 126. Ne sont cités sur ce document, que les foyers mentionnés dans ce travail.

Chapitre 2. Les trypanosomes

L'étymologie du nom trypanosome vient du grec : *τροπανον σωμα* (*trupanon soma*), qui signifie "qui a le corps en forme de tarière". Cette appellation vient de la morphologie du parasite et son mode de déplacement hélicoïdal. Ce nom a été proposé en 1842 par un français, Gruby, pour un parasite de grenouille (*Trypanosoma rotatorium*). Depuis cette époque, on a retrouvé des trypanosomes chez de nombreuses espèces de poissons, de reptiles, d'oiseaux et de mammifères, chez leurs vecteurs (insectes ou sangsues) et également chez les plantes. Certains trypanosomes montrent une grande ubiquité et s'adaptent à diverses espèces animales (ex : *T. evansi* ou *T. congolense*, qui parasite indifféremment les porcins, les ovins, les caprins, les bovidés, les équidés et les canidés). D'autres au contraire sont des parasites spécifiques (au moins dans les conditions naturelles) comme *T. equiperdum*, parasite des équidés.

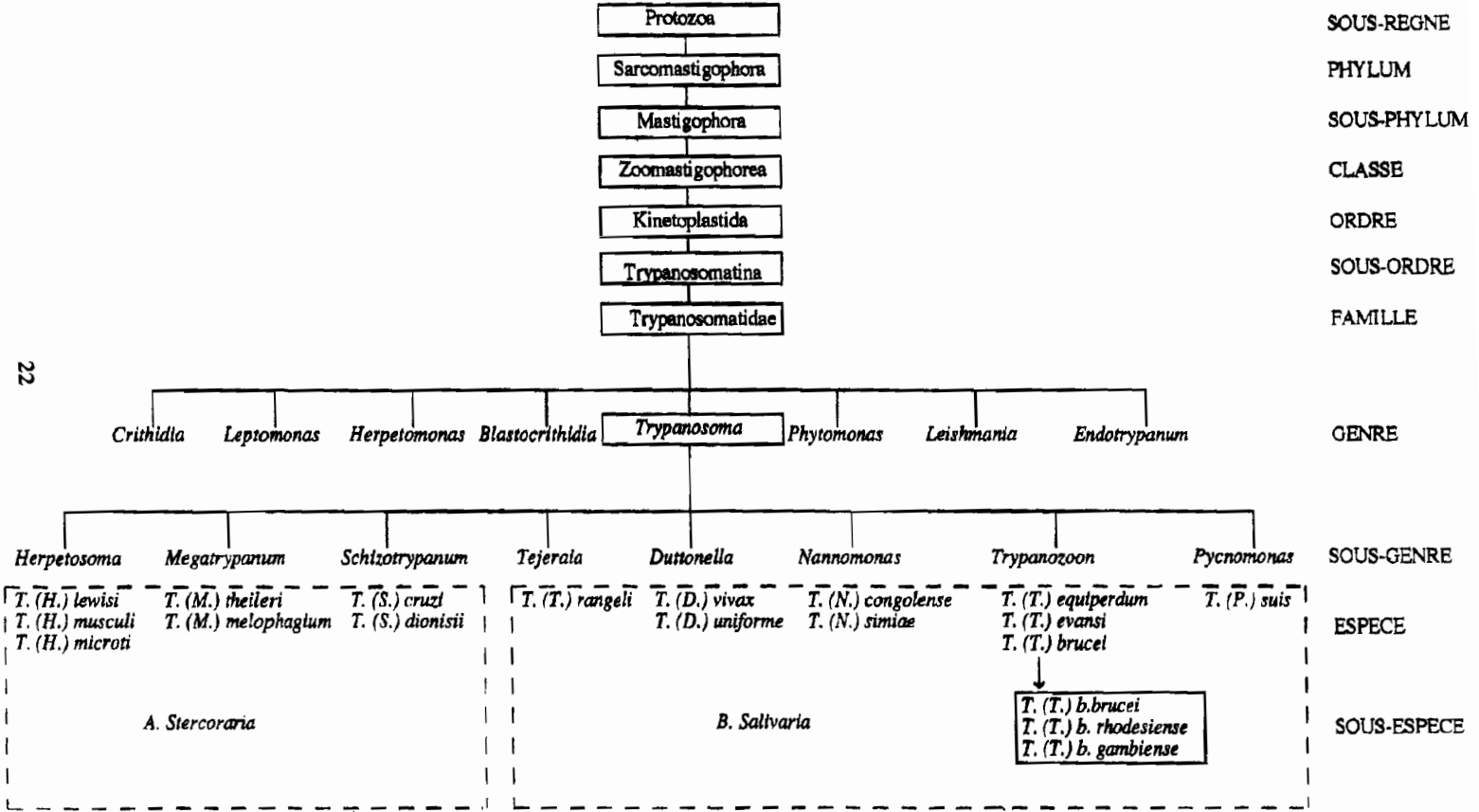
2. 1. Taxonomie

D'après la classification d'Hoare (1972) revue par Lévine *et al.* (1980) et Anez (1982) présentée en figure 4, les trypanosomes agents des trypanosomoses africaines sont des Protozoaires du phylum *Sarcomastigophora* Hönigberg et Balamuth, 1963, de la classe *Zoomastigophorea* Calkins, 1909, de l'ordre *Kinetoplastida* Hönigberg, 1963, de la famille *Trypanosomatidae* Döflein, 1991, du genre *Trypanosoma* Gruby, 1843. La classification au sein de ce genre a été établie en fonction du mode de transmission des parasites de l'invertébré vecteur à l'hôte vertébré. On distingue ainsi deux sections : *Stercoraria* et *Salivaria*.

La section *Stercoraria* se caractérise par un mode de transmission "postérograde". Les formes métacycliques infestantes se trouvent dans la partie postérieure du tube digestif. L'infestation se fait après dépôt de fèces, par pénétration des trypanosomes dans la peau. Cette section comprend 3 sous genres : *Megatrypanum* (*Trypanosoma theileri*), *Herpetosoma* (*Trypanosoma lewisi*) et *Schizotrypanum* (*Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas). La section *Salivaria* se caractérise par un mode de transmission "antérograde". Les parasites infestants sont dans la partie antérieure du tube digestif. L'infestation de l'hôte

vertébré se fait par piqûre d'un insecte. Cette section regroupe 5 sous-genres: *Tejeraia*, *Duttonella* (*Trypanosoma vivax*), *Nannomonas* (*Trypanosoma congolense*), *Pycnomonas* et *Trypanozoon*.

Figure 4. Classification des trypanosomes de mammifères
 (d'après Hoare 1972, Levine et al., 1980, Anez, 1982)



Dans le cadre de notre étude, nous nous intéressons uniquement au sous-genre *Trypanozoon* Lühe 1906 qui regroupe les trypanosomes pathogènes pour l'homme. Le sous-genre *Trypanozoon* regroupe trois espèces qui sont *T. evansi*, *T. equiperdum* et *T. brucei* sensu lato (s.l.), toutes indistinguables morphologiquement.

T. evansi Balbiani, 1888 est l'espèce la plus répandue d'un point de vue géographique (Luckins & Dwinger, 2004). C'est un trypanosome qui présente un spectre d'hôtes très large incluant plusieurs animaux domestiques (responsable du surra chez les équidés et du debab chez les camélidés) mais aussi un grand nombre d'animaux sauvages (Desquesnes, 1997). Plusieurs auteurs ont aussi fait état d'infections humaines à *T. evansi* dont très récemment, chez un patient dépisté en Inde (Joshi et al., 2005, Truc et al., 2006). Il est présent hors de la "zone glossine" (Afrique du Nord, Asie, Amérique latine et Guyane) et il est transmis mécaniquement par des *Tabanidae* et des stomoxes. *T. equiperdum* Döflein, 1901 est responsable de la dourine des équidés d'Afrique du Nord, d'Asie et d'Europe. Il a la particularité d'être transmis par voie sexuelle. Cependant, le statut spécifique de *T. evansi* et de *T. equiperdum* a été récemment mis en doute (Claes et al., 2005 ; 2006 ; Li et al., 2005 ; 2006). Par exemple, concernant *T. equiperdum*, Claes et al. (2005) ont proposé une définition alternative de la dourine : une maladie contagieuse et chronique des équidés causées par *T. b. brucei* ou *T. evansi* transmis directement d'animaux en animaux au cours du coït, ou par des insectes vecteurs.

Trypanosoma brucei ssp.se se subdivise classiquement en 3 sous-espèces sur des critères cliniques, d'hôtes, et de distribution géographique. On distingue donc :

- *T. b. brucei* (Plimmer & Bradford, 1899) : agent pathogène responsable de la "Nagana" sur toute l'aire de répartition des glossines (Afrique intertropicale), chez l'animal, mais réputé non pathogène pour l'homme. Cette maladie provoque des ravages dans les troupeaux domestiques de bétail (Sidibé, 1997 ; Solano, 1998) et cause ainsi un grave handicap économique.

- *T. b. rhodesiense* (Stephens & Fantham, 1910) : agent pathogène responsable d'une forme aiguë de THA en Afrique de l'Est. Il est principalement transmis par des glossines du groupe *morsitans*, qui vivent dans les régions de savane (glossines savaniques). La forme dite rhodésienne est une zoonose typique. Une vaste gamme d'animaux domestiques et sauvages constitue un réservoir très important de la maladie. La transmission à l'homme (souvent

considéré comme hôte accidentel) se fait suivant le cycle animal sauvage ou domestique-mouche-homme.

- *T. b. gambiense* (Dutton, 1902) : responsable de la forme dite chronique de THA en Afrique de l'Ouest et Centrale. Il est transmis principalement par les glossines du groupe *palpalis* qui vivent essentiellement en zone de forêt dégradée, et dans les galeries forestières bordant les rivières (glossines ripicoles) en zone de savane humide. Dans le cas de cette forme dite gambienne, le cycle de transmission homme-mouche-homme semble prédominer. On a longtemps considéré *T. b. gambiense* comme un parasite spécifiquement humain mais l'existence d'un réservoir animal domestique ou sauvage dans les zones à risque a été mise en évidence (Melhitz, 1986; Simo et al., 2005; Njiokou et al., 2006). L'importance épidémiologique de ce réservoir animal dans la transmission et le maintien de la maladie est encore mal connue et controversée (Noireau et al., 1987 ; Njiokou et al., 2006).

2. 2. Biologie du parasite

2. 2. 1. Morphologie et Cycle évolutif

Les trypanosomes sont des cellules fusiformes, leur taille varie selon l'espèce. *T. brucei* ssp., mesure de 12 à 42 μm de long sur 2 à 3 μm de large (voir photo figure 5). Il se multiplie essentiellement par division binaire longitudinale. En microscopie optique, outre les constituants fondamentaux de la cellule (noyau, cytoplasme et membrane), les trypanosomes se caractérisent par la présence d'un kinétoplaste (organite cytoplasmique) et d'un flagelle rattaché à la paroi du corps par une membrane ondulante (figure 6). Le kinétoplaste est situé dans la partie postérieure de la cellule, près du corps basal du flagelle, à l'intérieur de la grande mitochondrie qui s'étend sur toute la longueur du corps cellulaire, il contient de l'ADN extra nucléaire (l'ADN kinétoplastique, voir ci-dessous, « Structure du génome »). Le flagelle, dirigé vers l'avant, naît d'un corps basal situé à l'intérieur de la poche flagellaire et assure la mobilité du trypanosome. Le niveau de développement du flagelle permet de distinguer les différents stades morphologiques du parasite au cours de son cycle évolutif.



Figure 5. Formes trypomastigotes de *T. b. gambiense* en culture in vivo chez le rongeur , (observation x1000).(Souche S1/1/6 IR pm), mettant en évidence les deux types morphologiques forme longue (slender) / forme courte (stumpy) circulant dans le sang de l'hôte mammifère, ici une souris Balbc (photo, Ravel S.)

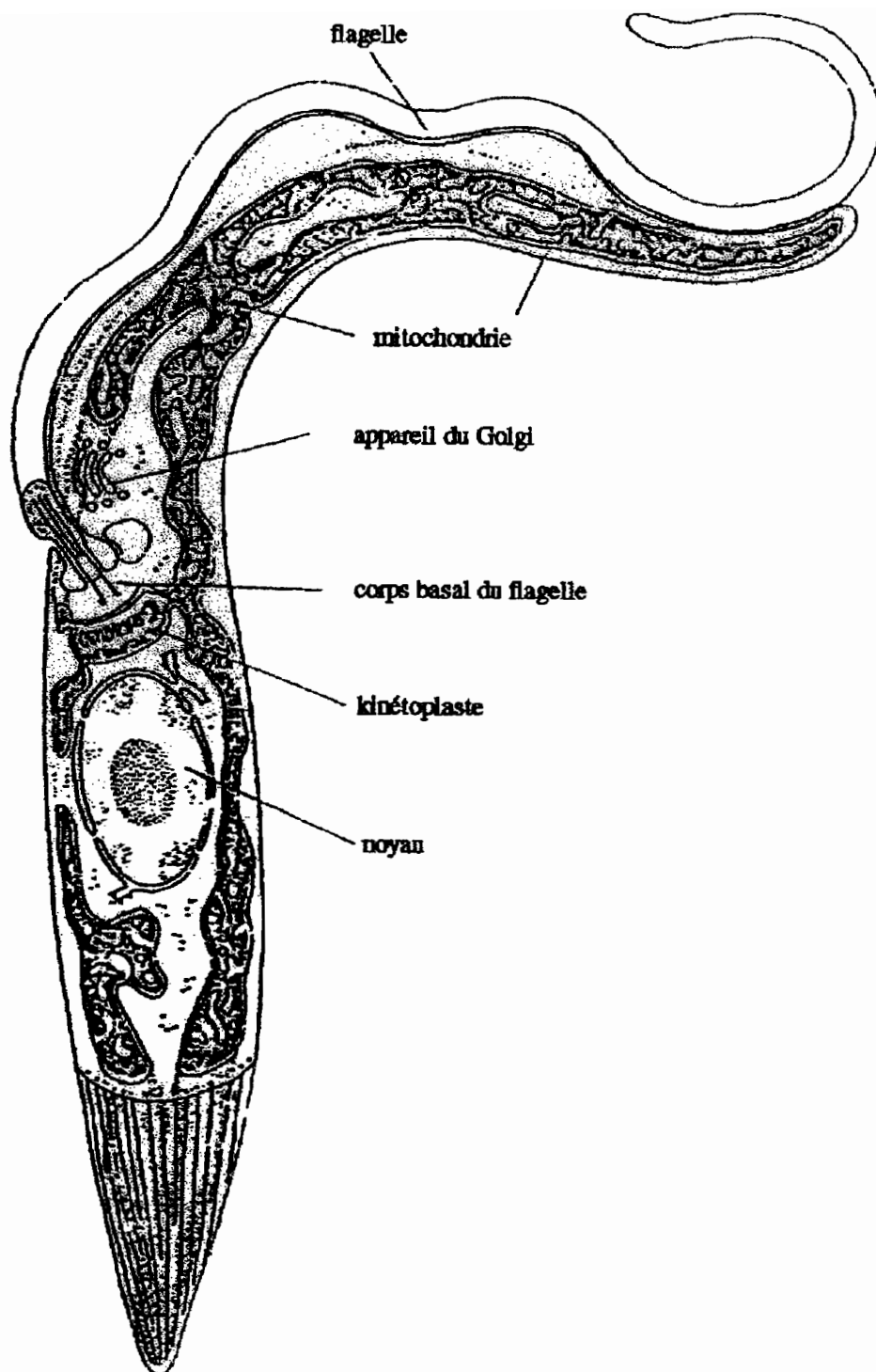


Figure 6. Ultrastructure de *Trypanosoma brucei* (microscopie électronique, Vickerman, 1969)

Le cycle de vie (figure 7) de *T. brucei* ssp., parasite dixène obligatoire, s'effectue chez un hôte mammifère vertébré, et chez un hôte vecteur, un insecte hématophage du genre *Glossina*. Comme tous les trypanosomes du sous-genre *Trypanozoon*, *T. brucei* ssp. est caractérisé par un polymorphisme accusé selon les stades de développement. Inoculés chez l'hôte vertébré par la piqûre de l'insecte vecteur, les parasites se multiplient d'abord dans le collagène dermique et passent ensuite dans la circulation générale par voie sanguine ou lymphatique avec un séjour plus ou moins prolongé dans les nœuds lymphatiques. Après cette période lymphatico-sanguine plus ou moins longue (qui peut durer plusieurs années), les trypanosomes finissent par envahir le liquide céphalo-rachidien et les centres nerveux pour des raisons et par des mécanismes encore mal connus. Chez l'hôte vertébré, sous l'effet de la variation antigénique, les formes trypomastigotes sanguicoles se présentent sous deux types morphologiques principaux (voir photographie figure 5 et cycle évolutif figure 7). Les formes grêles ou allongées (type slender), présentant un long flagelle libre, se multiplient activement et sont essentiellement présentes pendant les pics parasitaires. Elles représentent la principale cible de la réponse immunitaire à médiation humorale de l'hôte. Les formes trapues ou courtes (type stumpy) sont moins immunogènes. Elles ne se divisent plus chez l'hôte vertébré et représentent des formes de préadaptation à l'hôte vecteur chez qui elles sont les seules à pouvoir se développer. A ces deux formes principales s'ajoutent toutes les formes intermédiaires qui se situent entre les deux types morphologiques précédents marquant les passages successifs d'une forme à l'autre. Des auteurs ont fait l'hypothèse selon laquelle le passage des formes longues aux formes courtes aiderait au contrôle de la parasitémie et augmenterait la survie de l'hôte. Tout ceci dans l'objectif d'accroître la probabilité d'un succès de transmission des trypanosomes à un hôte nouveau. La réussite d'une infection serait fonction du ratio stumpy/slender (Breidbach et *al.*, 2002 ; Seed & Wenck, 2003)

Chez l'insecte vecteur qui se contamine lors d'un repas sanguin par piqûre d'un mammifère infesté, les formes trapues se différencient en formes procycliques dont la multiplication s'accompagne par une évolution vers la forme épimastigote. Ces dernières se caractérisent par la présence d'un réseau extensif de tubes mitochondriaux et d'une membrane ondulante. Après passage dans l'intestin et dans l'espace péritrophique, les parasites remontent dans les glandes salivaires et se différencient en formes trypomastigotes métacycliques infestantes, prêtes à être inoculées chez l'hôte mammifère à l'occasion d'un nouveau repas sanguin. Ce stade se caractérise par un noyau central, un kinétoplaste situé près

de l'extrémité postérieure et enfin, un manteau de surface recouvrant la totalité du corps cellulaire.

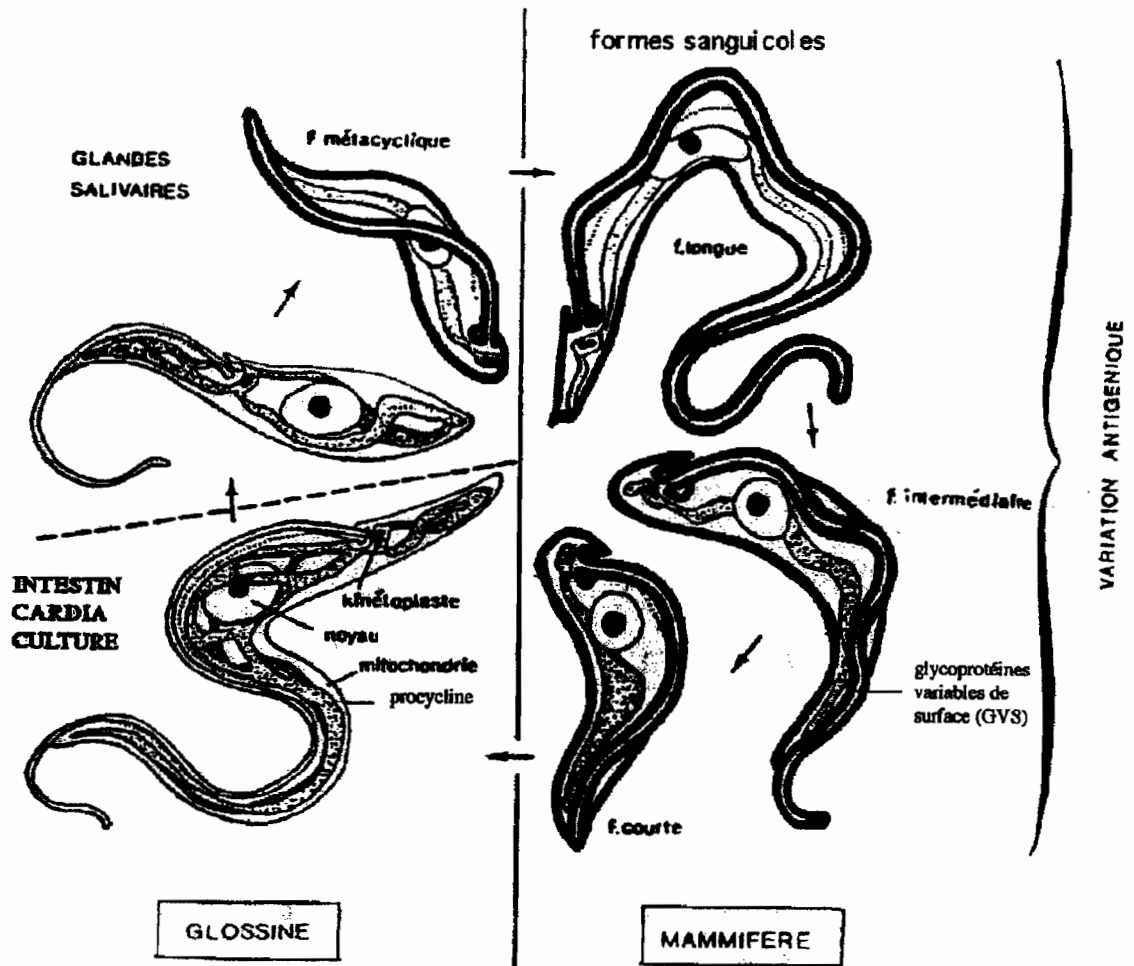


Figure 7. Cycle évolutif de *Trypanosoma brucei* (Vickerman, 1969)

2. 2. 2. Structure du génome

L'ADN de *T. brucei* ssp. est en grande partie situé dans le noyau cellulaire (96%). Les 4% restant sont situés dans le kinétoplaste (Borst *et al.*, 1982).

2. 2. 2. 1. Génome nucléaire

L'organisation du génome des trypanosomes n'a pu être étudiée par des méthodes cytologiques nécessitant l'emploi de la microscopie photonique, en raison de l'absence de condensation des chromosomes pendant chaque cycle cellulaire (Vickerman & Preston, 1970). Cependant, cette difficulté a été surmontée par l'analyse électrophorétique en champs pulsés (PFGE) du matériel génomique (Van der Ploeg *et al.*, 1984 ; Wells *et al.*, 1987). Le génome nucléaire haploïde de *T. brucei* s.l. est d'environ 35 Mb et varie en taille selon les isolats de trypanosomes, d'environ 25% (El-Sayed *et al.*, 2000). L'ADN nucléaire de ces organismes majoritairement diploïdes est distribué en trois classes de chromosomes selon leur taille : les méga chromosomes, au nombre de 11 paires allant de 1Mb à 6Mb (Numérotés de I à XI, du plus petit au plus grand) ; plusieurs chromosomes intermédiaires de 200 à 900 kb, de ploïdie inconnue et dont le nombre est très variable d'un stock à l'autre (Gibson & Borst, 1986), et environ 100 mini chromosomes linéaires de 50 à 150 kb (revue dans El-Sayed *et al.*, 2000).

Près de 12% des ADN sont formés de séquences hautement répétées, 20% de séquences moyennement répétées et enfin 68% de séquences non répétées (Michels *et al.*, 1991). La quasi totalité des télomères des méga chromosomes et des chromosomes intermédiaires sont des sites d'expressions notamment des gènes codant pour des glycoprotéines variables de surface (GVS) impliquées dans le phénomène de la variation antigénique (voir ci-dessous). Les télomères des mini chromosomes sont principalement constitués de gènes non exprimés de GVS et semblent jouer le rôle d'entrepôts pour ces gènes (El Sayed, *et al.*, 2000 ; 2003 ; Barry, *et al.*, 2003).

Le caractère diploïde des trypanosomes a été mis en évidence par la quantification de l'ADN et par l'analyse du polymorphisme des fragments de restriction (Borst *et al.*, 1981 ; Gibson *et al.*, 1985). Un trypanosome contiendrait approximativement 1×10^{-13} g d'ADN par cellule (Borst *et al.*, 1982).

2. 2. 2. 2. *Génome kinétoplastique*

L'ADN kinétoplastique des protozoaires correspond au génome mitochondrial des cellules eucaryotes (Fairlamb et *al.*, 1978). Il est formé de deux types de molécules : les minicercles, en très grand nombre (500 à 20000) et les maxicercles en très faible nombre (10 à 100). Ces deux types de molécules sont enchevêtrés les uns dans les autres en formant le réseau d'ADN kinétoplastique (ADNk). Estimé à environ 1 Kpb, les minicercles sont hautement variables au sein d'une espèce, voire au sein d'une souche. Chez *T. b. brucei* par exemple, le nombre de classes de séquences différentes est estimé entre 100 et 300 pour une souche donnée de parasite (Stuart, 1979). Au niveau spécifique, ces minicercles sont formés d'une région conservée de 100 à 150 pb et d'une région variable de 850 à 900 pb (Chen & Donelson, 1980). Une séquence de 12 nucléotides présente sur la région conservée est hautement préservée au sein de différentes espèces, voir même de différents genres (Kidane et *al.*, 1984 ; Sugiisaki & Le Ray, 1987). N'tambi & Englund (1985) ont montré que cette séquence correspond, en fait, à l'origine de la réplication des minicercles appelée la « séquence universelle des minicercles ». L'existence d'une ou de plusieurs séquences transcrites sur les minicercles a été longtemps controversée (Simpson, 1987). Cependant, les travaux de Pollard et *al.*, (1990), Pollard & Hajduk (1991) et de Stuart (1991) ont démontré clairement le rôle joué par les minicercles, après transcription en ARN, dans le phénomène « d'édition des ARN » des trypanosomes.

A l'exception de *Trypanosoma evansi*, tous les trypanosomes de la section *Salivaria* possèdent des maxicercles (Simpson, 1987). Ces derniers sont au nombre de 20 à 50 par trypanosome. Leur taille est en moyenne 20 fois supérieure à celle des minicercles (20 à 23 Kpb). Chez tous les *Kinétoplastidae*, ces maxicercles sont formés d'une région conservée de 17 Kpb et d'une région variable de trois à six Kpb. Les maxicercles portent les gènes codant pour les ARN ribosomiques des mitochondries. En plus, ils codent pour certaines protéines impliquées dans les phénomènes d'oxydation mitochondriale. L'ensemble de ces gènes est porté par la région conservée. Aucun transcrit de la région variable n'a été, jusque là, mis en évidence.

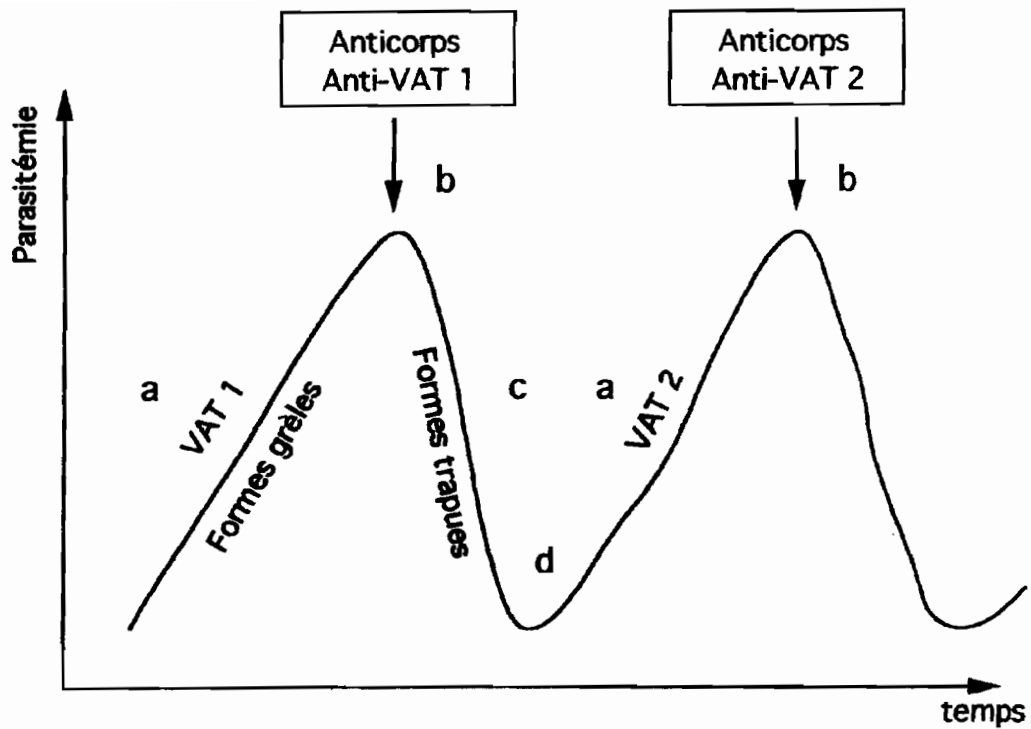
2. 2. 3. Reproduction de *T. brucei* s.l., le débat clonalité versus sexualité

Jusqu'en 1980, on considérait que le trypanosome, asexué, ne se reproduisait que par division binaire longitudinale. Cette multiplication était fréquemment observée en microscopie. Cependant, depuis la découverte de la diploïdie, plusieurs auteurs se sont interrogés sur une éventuelle reproduction sexuée des trypanosomes. Des échanges génétiques ont été mis en évidence au cours du cycle chez le vecteur par des expériences de croisement en laboratoire (Jenni *et al.*, 1986; Sternberg *et al.*, 1988; Gibson, 1989; Degen *et al.*, 1995; Tait *et al.*, 1996). Ces échanges, non-obligatoires, auraient lieu dans l'intestin postérieur (Schweizer & Jenni, 1991) et dans les glandes salivaires de la glossine (Gibson & Whittington, 1993). Il fallait alors déterminer l'importance de ce phénomène dans les populations naturelles.

Tait (1980) propose un modèle panmictique (ségrégation allélique mendélienne, équilibre d'Hardy-Weinberg respecté, et échanges génétiques). Par contre, Cibulskis (1988) observe un déséquilibre de liaison entre certains loci ainsi que l'absence ou la déficience de certains génotypes dans les populations naturelles de *T. brucei* ssp.. Il évoque ainsi la présence d'un processus de multiplication asexuée au sein de ces populations. Dans le cadre de la théorie de la clonalité des protozoaires parasites, Tibayrenc *et al.* (1990) et Tibayrenc & Ayala (1991) proposent un modèle de reproduction essentiellement clonal. Les différents variants génétiques observés (zymodèmes dans le cas d'une identification isoenzymatique, schizodèmes dans le cas d'une identification par les RFLP) sont alors considérés comme des clones naturels stables dans l'espace et dans le temps. La diversité génétique observée est alors attribuée à des échanges génétiques rares dans les cycles naturels, mais insuffisants pour " brouiller le tableau " d'une structure clonale (Mathieu-Daudé, 1991; Mathieu-Daudé *et al.*, 1995; Gibson, 1995; Hide *et al.*, 1996 ; Tibayrenc, 1995). Récemment, plusieurs auteurs ont relancé le débat sexualité / clonalité en utilisant de nouveaux outils et de nouvelles méthodes d'analyses génétiques (MacLeod *et al.*, 2005 ; de Meeüs *et al.*, 2005 ; 2006a Gibson *et al.*, 2006). Nous tenterons lors de ce travail d'apporter des éléments nouveaux à ce débat.

2. 2. 4. Variation antigénique des trypanosomes africains et évitement du système immunitaire

Les trypanosomes africains tels que *Trypanosoma brucei* s.l. se développent dans le sang, et la lymphe des mammifères et sont donc sujets à des attaques spécifiques et non spécifiques de leur système immunitaire (Donelson, 2003). Pour échapper à ces réponses immunitaires, les trypanosomes s'enveloppent d'une GVS dont l'identité moléculaire change périodiquement. Lorsque le trypanosome est inoculé à un hôte vertébré, il se transforme rapidement en forme grêle et se multiplie très activement. Une réaction immunitaire à médiation humorale se met en place en 4 à 5 jours pour combattre cette première agression (figure 8). Une grande partie des trypanosomes est alors détruite, mais certains d'entre eux survivent grâce à un changement de GVS sous une forme trapue (qui ne se multiplie plus) avant de se retransformer en forme grêle de division et recommencer ce processus (Donelson & Turner, 1985). Il y aurait plus de 1000 couvertures antigéniques possibles. On parle de « Variant Antigen Type, VAT » pour une population de trypanosomes recouvert de la même GVS.



Les trypanosomes inoculés, revêtant tous la même couverture antigénique (VAT 1) se transforment rapidement en formes grèles et se multiplient activement dans le système lymphatico-sanguin de l'hôte pour former une population VAT 1 (a). Une réaction immunitaire à médiation humorale (fabrication d'anticorps anti-VAT 1) combat rapidement cette première invasion (b). La plupart des trypanosomes sont détruits (c). Les survivants évoluent en formes trapues, sous laquelle ils peuvent changer leur couverture antigénique pour former une nouvelle population VAT-2 (d). Les trypanosomes reprennent leur formes grèles de division et sont à l'origine d'un deuxième pic de parasitémie responsable d'une nouvelle réaction immunitaire (fabrication d'anticorps anti-VAT 2).

Figure 8. Représentation schématique de l'évolution de la parasitémie dans le sang de l'hôte en fonction du temps, illustration du phénomène de la variation antigénique

D'après Vickerman (1989), un pic de parasitémie est caractérisé par le surnombre d'un VAT majeur dit homotype. Pendant que la réaction à médiation humorale se met en place, un changement de GVS est à l'origine de populations minoritaires ou hétérotypes, mises en évidence par réaction d'immunofluorescence (Van Merveinne et *al.*, 1975). Le sacrifice de l'homotype permet alors une forte croissance de l'un des hétérotypes qui pourra se multiplier à son tour sans pression immune et être à l'origine d'un second pic de parasitémie (voir figure 8). Ce nouvel homotype sera sacrifié aux dépens de nouveaux hétérotypes et ainsi de suite. Des sites d'expression de GVS (SE-GVS) situés sur les parties télomériques des mégachromosomes et des chromosomes intermédiaires assurent l'expression d'une seule GVS à un moment précis. Un grand nombre de gènes GVS muets sont dispersés dans tout le génome (notamment dans les parties télomériques des mini-chromosomes). Beaucoup de questions restent non résolues concernant notamment les mécanismes de changement de GVS (revue dans McCulloch, 2004). Les dernières avancées en termes de recherche sur les mécanismes de la variation antigénique sont résumées dans Pays (2005 ; 2006). Quoi qu'il en soit, ce mécanisme de la variation antigénique perturbe l'homéostasie de l'hôte et freine l'acquisition d'une véritable immunité protectrice. Cette variabilité et ce phénomène d'échappement représentent des obstacles importants dans la mise au point d'un vaccin.

Chez le vecteur, les formes trapues ingérées perdent leur manteau de GVS au cours de l'évolution en formes procycliques, qui est remplacé par une enveloppe de procycline ou « Procyclic Acidic Repetitive Protein » (PARP) (Mowatt & Clayton, 1988 ; Roditi et *al.*, 1989). Cette enveloppe, comme la précédente, est solidaire de la membrane plasmique par l'intermédiaire de glycosyl phosphatidyl inositol. Ainsi, les gènes codant pour les GVS ne s'expriment plus pendant le passage du parasite chez la glossine et cette expression ne reprend chez le vecteur qu'au stade métacyclique infestant.

2. 3. Aspects cliniques de la THA

Les signes et symptômes qui caractérisent la maladie du sommeil sont en général les mêmes pour la forme chronique gambienne et pour la forme aiguë rhodésienne, la différence étant l'évolution plus ou moins rapide vers l'atteinte neurologique puis la mort (pour une revue voir Sternberg, 2004). La maladie évolue chez l'homme en deux phases ou périodes: la première période (phase lymphatico-sanguine) durant laquelle le parasite se multiplie dans le sang et dans la lymphe, et la deuxième période (phase méningo-encéphalitique) qui correspond au passage du parasite dans le liquide céphalorachidien (LCR) puis à l'envahissement du système nerveux central (SNC). La classification actuelle (OMS, 1986 ; 1998, 2002) du stade de la maladie repose sur les modifications des résultats de l'examen du LCR.

Chez l'homme, l'inoculation du trypanosome se caractérise cliniquement par l'apparition d'une lésion cutanée (chancre d'inoculation), rougeâtre et douloureuse (furoncle non-purulent) au niveau de la piqûre infestante. Cette lésion est le témoin de la multiplication du trypanosome *in situ*, qui envahit alors le système lymphatique puis sanguin. Elle est fréquemment observée dans l'infection à *T. b. rhodesiense* mais rare dans l'infection à *T. b. gambiense*. Ensuite, au cours de la première période, les symptômes les plus couramment rapportés sont la fièvre, les céphalées, l'asthénie et des douleurs musculaires et articulaires. Ces symptômes apparaissent de façon cyclique (on parle de pics fébriles) et sont témoins de la production de vagues successives de parasites et de réponses immunitaires (Donelson & Turner, 1985). Des signes plus spécifiques traduisent l'envahissement des différents viscères tels que le foie, la rate et le cœur, et l'hépatosplénomégalie ainsi que des troubles cardiovasculaires sont rencontrés. Des signes cutanés, spécifiques ou non, sont très fréquents (prurit, éruptions cutanées et trypanides). Les adénopathies cervicales (signes de Winterbottom) apparaissent pendant cette période, en réponse à l'envahissement ganglionnaire, et témoignent de l'activité intense du système immunitaire. Il semble que l'apparition de ces adénopathies soit souvent tardive et qu'elle marque le début de l'envahissement du SNC, précédant et accompagnant donc le début de la seconde période (Ginoux & Frezil, 1981). D'autres signes cliniques comme des oedèmes (des membres ou de la face) ou des troubles endocriniens (aménorrhée, impuissance) apparaissent aussi en cours de première période et s'aggravent au cours de la deuxième période.

La plupart des signes cliniques décrits pour la première phase persistent lors de la deuxième phase: certains signes ont tendance à s'effacer tels que les adénopathies,

l'hépatosplénomégalie ou les signes cutanés. Les troubles du sommeil (insomnies nocturnes, somnolences diurnes, hypersomnie permanente), les troubles moteurs, les troubles sensitifs (hyperesthésie, paresthésie), les troubles du tonus (hypertonie, hypotonie), les troubles de la coordination, les réflexes anormaux (réflexes ostéo-tendineux, archaïques et cutanés), les troubles neuro-endocriniens (stérilité et perte de libido, trouble de la soif) et l'altération de l'état mental (conscience ralentie, confusion mentale, désorientation, coma, agressivité, indifférence, euphorie, dépression) sont autant de signes fréquemment rencontrés et qui caractérisent l'atteinte neurologique spécifique de la deuxième période. Cette énumération n'est pas exhaustive et tout signe neurologique insolite doit alerter sur un risque de trypanosomose (Gentilini, 1993). En l'absence de traitement, l'état général du malade se dégrade et il s'achemine plus ou moins rapidement vers la cachexie sommeilleuse terminale (état grabataire) puis sombre dans le coma et meurt d'encéphalopathie.

Dans le cas de la forme chronique de le THA, la première période peut durer de plusieurs mois à plusieurs années, la parasitémie fluctuante restant souvent faible et ayant tendance à décroître. Au cours de cette période, les symptômes sont peu prononcés et le malade n'éprouve pas souvent le besoin de consulter un médecin. L'apparition des troubles neurologiques lors de la deuxième période est souvent très progressive. Dans le cas de la forme aiguë rhodésienne, la première période ne dure que quelques semaines à quelques mois, les symptômes sont plus marqués, l'atteinte du système nerveux est brutale et la mort peut survenir en quelques mois.

Il est cependant actuellement de plus en plus admis que la dichotomie : forme chronique à *T. b. gambiense* versus forme aiguë à *T. b. rhodesiense* ne reflète qu'une vision partielle de la réalité. Concernant la forme gambienne, on observe une grande diversité d'évolutions « cliniques » allant de formes totalement asymptomatiques à des formes aiguës (revue dans Jamonneau *et al.*, 2002 ; 2004c). En Afrique de l'Est, la littérature fait état d'un accroissement de la sévérité du sud vers le nord (Ormerod, 1967), et l'existence de formes asymptomatiques dues à *T. b. rhodesiense* est de plus en plus fréquemment mentionnée (revue dans MacLean *et al.*, 2004). Un nombre croissant d'éléments tend à faire penser que la variabilité génétique des trypanosomes pourrait être impliquée dans la diversité de tableaux cliniques observés, aussi bien pour la forme « gambienne » que « rhodésienne » de la maladie.

Les signes cliniques manquent de spécificité et leur fréquence est variable selon les individus et les foyers. Ils peuvent orienter le diagnostic, mais ne permettent pas de l'établir (Jannin *et al.*, 1993), surtout dans le cas de la forme chronique gambienne pour laquelle la

phase lymphatico-sanguine est parfois totalement asymptomatique (Frézil, 1983 ; Force-Barge, 1991).

2. 4. Diagnostic et traitement de la THA

2. 4. 1. Diagnostic

De nombreuses méthodes de diagnostic direct ou indirect existent pour confirmer le diagnostic de la THA (décrites dans Chappuis et *al.*, 2005). Nous ne décrivons ici que les méthodes actuellement utilisées en pratique courante et notamment celles qui l'ont été dans cette thèse. Les méthodes de diagnostic direct ou tests parasitologiques cherchent à mettre en évidence la présence du parasite dans les liquides biologiques (sang, lymphe et LCR) alors que les méthodes de diagnostic indirect ou tests sérologiques recherchent des traces de passage ou de présence du parasite par la mise en évidence d'anticorps ou d'antigènes spécifiques. En pratique les tests sérologiques (bon marché et simple d'application) sont utilisés préalablement pour déterminer les sujets sur lesquels porteront les tests parasitologiques (plus onéreux et moins pratiques). Ensuite, sont effectués sur les sujets confirmés porteurs de trypanosomes, le ou les tests du diagnostic de phase sur le LCR, qui conditionnent le traitement à administrer

2. 4. 1. 1. Examens sérologiques

Parmi les méthodes sérologiques, le Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT *T. b. gambiense*, Magnus *et al.*, 1978) est actuellement le plus utilisé en matière de dépistage de masse. Il répond à toutes les exigences d'un test de terrain: très simple d'emploi, bon marché et de lecture immédiate (Noireau *et al.*, 1986a). Le réactif du test CATT est une suspension lyophilisée de trypanosomes sanguicoles fixés, stabilisés et colorés au bleu de Coomassie. Ils appartiennent à un sérotype bien défini et sélectionné : le Litat 1.3, qui permet d'obtenir une réactivité optimale dans les différents foyers de THA. Le test ne nécessite qu'une goutte de sang, et en présence d'anticorps spécifiques, les parasites forment des agglutinats macroscopiques colorés et visibles à l'œil nu. Néanmoins, ce test recommandé par l'OMS (OMS 1998) pour le dépistage de masse présente, comme tous les tests sérologiques, des inconvénients. Des études ont montré qu'il manquait de sensibilité et de spécificité : manque de sensibilité dans le cas d'infections précoces (les anticorps recherchés ne circulent

pas encore dans le sang) ou d'infections ne produisant pas les anticorps (Dukes *et al.*, 1992); manque de spécificité souvent attribué à des réactions croisées avec d'autres trypanosomes ou d'autres parasites humains (Noireau *et al.*, 1986a), à la persistance d'anticorps durant plusieurs mois, voire plusieurs années après traitement (Diallo *et al.*, 1996).

De nouvelles techniques ont été développées ces dernières années pour améliorer le diagnostic sérologique, comme le Latex/*T. b. gambiense* (Büscher *et al.*, 1991 ; 1994), mais les résultats de l'évaluation (Jamonneau *et al.*, 2000a ; Penchenier *et al.*, 2003) montrent que les mêmes problèmes demeurent. Actuellement, des résultats prometteurs ont été obtenus par une méthodes de détection d'anticorps (par ELISA) dans la salive des patients, qui présente en plus l'avantage d'un prélèvement non invasif (Lejon *et al.*, 2006), mais cette technique est encore en cours d'évaluation.

Quoiqu'il en soit, en cas de positivité de l'un de ces tests, le parasite devra être mis en évidence par une méthode directe pour décider du traitement (OMS, 1998). Lumsden *et al.*, 1981 rapportaient déjà que les méthodes indirectes ne devaient être considérées que comme un complément nécessaire aux méthodes directes pour un dépistage plus exhaustif.

2. 4. 1. 2. Examens parasitologiques

Le diagnostic de certitude de la THA passe donc nécessairement par la mise en évidence du parasite dans un des milieux biologiques accessibles de l'hôte (sang, lymphe, liquide céphalo-rachidien). La recherche du parasite dans la lymphe se fait, en cas de présence d'adénopathies cervicales, par examen direct du suc ganglionnaire entre lame et lamelle au microscope optique. La recherche du parasite dans le sang peut se faire par l'examen au microscope optique du frottis sanguin ou de la goutte épaisse. Cependant, dans le cas de la THA, la parasitémie est souvent très faible (Truc *et al.*, 1994) et pour obtenir une meilleure sensibilité, on utilise souvent des méthodes de concentration comme la centrifugation en tubes capillaires (CTC, Woo, 1970), la filtration sur colonne échangeuse d'ions (miniature Anion Exchange Centrifugation Technique, mAECT, Lanham & Godfrey 1970; Lumsden *et al.*, 1977) et le Quantitative Buffy Coat (QBC, Bailey & Smith 1992). Concernant la forme gambienne, parmi les méthodes directes, la mAECT offre les meilleurs résultats (Lumsden *et al.*, 1979; Dukes *et al.*, 1984; Truc *et al.*, 1998a,b) au laboratoire comme sur le terrain (sensibilité = 100 trypanosomes/ml). Elle a été mise au point par Lanham & Godfrey (1970) et miniaturisée par Lumsden *et al.* (1977) et consiste à séparer les trypanosomes des éléments

figurés du sang sur DEAE cellulose. Les parasites sont visualisés au microscope avec un objectif à grande focale.

Afin d'améliorer la sensibilité de ces méthodes parasitologiques, notamment pour détecter les faibles parasitémies souvent rencontrées chez les patients atteints de THA, des techniques basées sur la détection d'ADN de trypanosomes par PCR ont été récemment développées (revue dans Jamonneau *et al.*, 2004d ; Chappuis *et al.*, 2005). Ces techniques sont difficiles d'utilisation sur le terrain, demeurent encore restreintes à la recherche, et la question reste encore de savoir si une PCR positive signe réellement une infection active de THA, et si on doit ou non traiter un individu positif à ce test (Solano *et al.*, 2002 ; Jamonneau *et al.*, 2004d).

2. 4. 2. Examen du liquide céphalo-rachidien (LCR) et diagnostic de phase

La recherche des trypanosomes dans le LCR contribue à déterminer le stade de la maladie (diagnostic de phase, une revue des méthodes vient d'être publiée par Kennedy, 2006). Cette recherche peut se faire de façon directe par simple ou double centrifugation du LCR (Cattand *et al.*, 1988; Miezán *et al.*, 2000) ou de façon indirecte: dosage de protéines (protéïnorachie), comptage des cellules (cytorachie). D'après l'OMS (1986, 1998), les critères de deuxième période sont : une cytorachie supérieure à 5 éléments/ml et/ou une protéïnorachie supérieure à 37 mg/100 ml. La présence de l'un ou l'autre de ces critères, avec ou sans mise en évidence de trypanosomes, signe le diagnostic de deuxième période. Mais la protéïnorachie au protocole lourd et onéreux est de moins en moins utilisée.

Le seuil de la cytorachie défini par l'OMS est actuellement controversé car la présence de 5 cellules/ml de LCR ne traduit pas forcément la présence du parasite dans le SNC. Plusieurs auteurs proposent de passer ce seuil à 20 cellules/ml (Bisser *et al.*, 1997; Truc *et al.*, 1999). Ainsi en Côte d'Ivoire, le programme national a défini 3 phases : la première phase (absence de trypanosome et cytorachie ≤ 5), la seconde phase précoce (absence de trypanosome et cytorachie comprise entre 6 et 20), et la troisième phase (présence du parasite ou cytorachie > 20). La seconde phase précoce est alors traitée de la même façon que la première phase (voir ci-dessous). Le degré d'altération de la barrière hémato-méningée, corrélé avec la gravité de l'atteinte, peut être évalué par plusieurs examens biochimiques (dosages d'Immunoglobulines du LCR) et pourrait être un bon marqueur du deuxième stade de la maladie (Bisser *et al.*, 1997; Lejon *et al.*, 1999). Là aussi, des techniques basées sur la

détection d'ADN de trypanosomes par PCR ont été développées pour améliorer le diagnostic de phase (Truc *et al.*, 1999), mais là encore, la question de savoir s'il faut traiter un individu positif en PCR demeure (Jamonneau *et al.*, 2004d, en annexe 3). Des méthodes basées sur les troubles du sommeil sont en cours d'évaluation et les résultats préliminaires semblent prometteurs (Buguet *et al.*, 2005).

2. 4. 3. Traitement de la THA

Une revue de l'ensemble des méthodes de traitement actuelle de la THA vient d'être publiée (Brun & Balmer, 2006). Classiquement, un malade en première période sera traité à la pentamidine dans le cas d'une infection à *T. b. gambiense*, ou à la suramine sodique pour *T. b. rhodesiense*. Un malade en seconde période sera généralement traité au mélarsoprol quelle que soit la forme de THA. Mais la forme gambienne peut être aussi traitée à l'éflornithine pour la seconde période. Les thérapeutiques utilisées pour les malades en première période sont considérés peu toxiques et ne provoquent quasiment pas d'effets secondaires. En revanche, le mélarsoprol, un dérivé arsenical hautement toxique, est responsable d'environ 10% d'encéphalopathies réactives, dont la moitié sont mortelles, parmi les patients traités. La fréquence et la gravité de ces effets secondaires soulignent l'importance des tests biologiques permettant le diagnostic précis de phase de la THA.

Outre le coût des traitements de la THA limitant leur distribution, les cas d'échec aux médicaments couramment utilisés (mélarsoprol) se multiplient (OMS, 2002 ; Pepin & Mpia ; 2005). Actuellement les recommandations au niveau international pour la seconde période sont des traitements raccourcis pour le mélarsoprol, et/ou un traitement de première intention à l'éflornithine (Fèvre *et al.*, 2006). Des études sont en cours pour mettre au point des nouvelles stratégies thérapeutiques, principalement en République Démocratique du Congo (Médecin Sans Frontière) et en Ouganda (Epicentre). Ces nouvelles stratégies visent à utiliser des nouvelles molécules (Nifurtimox, Bouteille *et al.*, 2003), à tester des bithérapies (Enanga *et al.*, 1998) et à mettre en place des « stratégies raccourcies » (Legros *et al.*, 2002). Une revue des nouvelles stratégies de traitement de la THA est désormais disponible (Fèvre *et al.*, 2006). La conception d'un vaccin serait, bien entendu la solution idéale, mais elle se heurte entre autres à la variation antigénique du parasite.

La THA se caractérise donc par:

- *une diversité de réponses aux tests de dépistage qui rend difficile le diagnostic de la maladie sur lequel repose la prise de décision thérapeutique,*
- *une diversité de tableaux cliniques liée probablement à la variabilité génétique du trypanosome et à la susceptibilité individuelle.*

Chapitre 3. Problématique

La caractérisation sub-spécifique de *T. brucei* s.l. a toujours été très discutée car les différents groupes taxonomiques qui le constituent ne sont pas morphologiquement différents. Hoare (1972) distingue 3 sous-espèces en se basant sur des caractères extrinsèques (aspects cliniques, hôtes et répartition géographique). Mais la différenciation sub-spécifique basée sur ces caractères (notamment cliniques) semble insuffisante. Si l'on se réfère à des caractères plus « intrinsèques » des trypanosomes, les mêmes difficultés émergent. Par exemple, plusieurs auteurs ont observé que *T. b. rhodesiense* et *T. b. brucei* étaient plus virulents (la virulence est définie ici comme la capacité du parasite à se multiplier chez un hôte de laboratoire) que *T. b. gambiense* après inoculation chez le rongeur de laboratoire (Wery *et al.*, 1977; Frezil *et al.*, 1979) mais d'autres isolats de *T. b. brucei* se sont avérées faiblement virulentes chez ces mêmes animaux (Mehlitz, 1986).

L'utilisation des techniques moléculaires a permis des avancées importantes sans toutefois résoudre totalement la question. L'individualisation des différentes sous-espèces en tant qu'entités génétiques distinctes reste douteuse (Gibson, 1986). La technique d'électrophorèse des isoenzymes (MLEE) a permis d'individualiser un groupe génétiquement homogène, correspondant à 80 % des isolats humains d'Afrique de l'Ouest et Centrale. Ce groupe est communément appelé le "groupe 1" de *T. b. gambiense* (Gibson, 1986). Les 20% restants ont été étiquetés par les auteurs comme "*gambiense* groupe 2", "non *gambiense*" ou encore groupe "bouaflé" (Zillman *et al.*, 1984 ; Gibson & Welde, 1985 ; Mehlitz, 1986, Mihok *et al.*, 1990 ; Godfrey *et al.*, 1990 ; Truc & Tibayrenc, 1993). Ce dernier groupe, génétiquement très hétérogène, comprend aussi des souches isolées de l'animal. En Afrique de l'Est, la MLEE n'a pas permis de distinguer clairement les souches de *T. b. rhodesiense* et de *T. b. brucei* (Godfrey *et al.*, 1990). Bien que la majorité des souches se regroupent dans une vaste entité, il semble exister des subdivisions homogènes (définies avec l'apport des études sur le kDNA) : trois groupes ont été identifiés au sein de *T. b. brucei*, Sindo, Kakumbi et Kiboko (Tait *et al.*, 1985; Godfrey *et al.*, 1990) et deux groupes au sein de *T. b. rhodesiense* Busoga et Zambezi (Stevens *et al.*, 1992). Certaines souches caractéristiques du groupe Busoga, isolées en Afrique Centrale et principalement chez des animaux, ont formé un nouveau groupe: le groupe Bouaflé/Busoga (Stevens & Godfrey, 1992). (annexe 1).

Les résultats obtenus par les techniques de “Restriction Fragment Length Polymorphisms” (RFLP, Gibson *et al.*, 1985), d’hybridations avec des sondes génomiques (Hide *et al.*, 1990; Mathieu-Daudé *et al.*, 1994), de Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD, Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990 ; Tibayrenc *et al.*, 1993; Mathieu-Daudé *et al.*, 1995 ; Kanmogne *et al.*, 1996 ; Jamonneau *et al.*, 2000a) et d’ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP, Masiga et Turner 2004 ; Agbo *et al.*, 2002 ; 2003) ont confirmé ceux obtenus par l’identification isoenzymatique : un groupe homogène au sein de *T. b. gambiense* (le groupe 1) et un groupe hétérogène rassemblant les souches du groupe bouaflé, celles de *T. b. brucei* et de *T. b. rhodesiense*. Ceci conforte l’hypothèse qui décrit *T. b. rhodesiense* (Tait *et al.*, 1985) et le groupe bouaflé comme étant des variants de *T. b. brucei* (Gibson *et al.*, 1999) capables de s’adapter à l’homme.

Si elle semble insuffisante, la caractérisation isoenzymatique de souches de trypanosomes a permis de conforter l’hypothèse d’une relation entre génétique parasitaire et diversité clinique. En effet, la caractérisation des souches isolées durant les récentes épidémies dans le sud-est de l’Ouganda a montré que certains “types de tableaux cliniques” pouvaient être associés à un zymodème particulier (Smith & Bailey, 1997). Aux souches du zymodème B17 du groupe “busoga” sont associées des formes cliniques plutôt graves à évolution rapide avec présence dans 92% des cas d’un chancre d’inoculation. A l’inverse, aux souches des zymodèmes du groupe “Zambezi” sont associées des formes cliniques plus chroniques à évolution lente, avec atteinte progressive du système nerveux, et une absence fréquente de chancre d’inoculation. En Côte d’Ivoire, Truc *et al.* (1997a) suspectent que les souches du groupe « bouaflé » sont responsables de formes cliniques aiguës (*rhodesiense-like*) alors que les souches du groupe 1 sont responsables de formes chroniques.

Jusqu’au début des années 1990, les trypanosomes étaient principalement isolés par inoculation à des rongeurs (IR). Mais, *T. b. gambiense* a la particularité d’être très peu virulent sur les rongeurs (10 à 50% de taux d’isolement seulement), ce qui a longtemps été un frein aux études génétiques sur ces trypanosomes (Wéry *et al.*, 1977; Mehlitz, 1978; Frezil *et al.*, 1979; Babiker & Le Ray, 1981). Pour pallier ces difficultés, un milieu d’isolement a été mis au point, le Kit for In Vitro Isolation of trypanosomes (KIVI Aerts *et al.*, 1992) qui a permis d’obtenir des meilleurs taux d’isolement (50 à 80%) et qui présentait aussi l’avantage d’être très pratique pour une utilisation sur le terrain (Jamonneau *et al.*, 2000a; 2002; Njiokou *et al.*, 2004a; 2005).

Cependant un important monomorphisme génétique a été mis en évidence au sein des souches isolées par cette technique en Côte d’Ivoire et en Guinée (Jamonneau *et al.*, 2000a ;

2002). Les auteurs ont alors suspecté l'existence d'un biais sélectif du KIVI. Ce biais sélectif a été mis en évidence à partir de porcs porteurs de trypanosomes en utilisant deux techniques d'isolement différentes KIVI et l'inoculation aux rongeurs (IR). Des différences génétiques ont pu être mises en évidence entre les souches isolées par KIVI et celles isolées par IR provenant du même hôte (**Article 1**).

Le biais des méthodes d'isolement intervient également sur la détection des infections mixtes : une différence de génotype a ainsi été mise en évidence entre deux souches isolées d'un même malade (par le KIVI) à des phases différentes des processus morbides (Truc *et al.*, 2002). L'existence d'infections multiples intra-spécifiques de *T. brucei* s.l. par des génotypes différents a été observée chez la glossine (Stevens *et al.*, 1994; MacLeod *et al.*, 1999), chez les bovins domestiques (MacLeod *et al.*, 2000) et chez le porc (Scott, 1981 ; Jamonneau *et al.*, 2004a) et beaucoup plus occasionnellement chez l'homme (Godfrey *et al.*, 1990). Si de telles infections se confirmaient chez l'homme, celles-ci ne pourraient être détectées qu'en caractérisant les trypanosomes directement à partir d'échantillons biologiques (Truc *et al.*, 2002 , Jamonneau *et al.*, 2004a).

Grâce à sa spécificité et à sa sensibilité, la PCR a permis des avancées importantes dans la détection des trypanosomes. Si cette technique paraît difficilement applicable sur le terrain, elle a considérablement amélioré le diagnostic et la détermination du stade de la maladie. Elle a également montré son efficacité dans le suivi post-thérapeutique. Une revue sur l'apport et les limites de la PCR dans le diagnostic de la THA est présentée en annexe 3 (Jamonneau *et al.*, 2004d en annexe 3). Récemment, le suivi de six patients asymptomatiques ayant refusé le traitement (Jamonneau *et al.*, 2004a en annexe 3), a montré que la PCR pouvait détecter la présence du trypanosome chez des séropositifs pour lesquels le trypanosome n'avait pu être mis en évidence par les techniques classiques. Cette situation est retrouvée sur le terrain : les équipes de lutte contre la THA sont confrontées dans leur pratique quotidienne à des situations bien plus complexes que la dichotomie malade/non malade. Dans les foyers de THA, trois types de sujets sont rencontrés : (1) des sujets sains dont le test de diagnostic indirect est négatif; (2) des sujets malades dont le test utilisé pour le diagnostic direct a montré des trypanosomes et (3) des sujets dont le diagnostic indirect est positif mais chez qui le trypanosome n'a pas été mis en évidence. Ces derniers ne sont pas traités. Nous avons vérifié sur un effectif plus important que ces sujets séropositifs témoignaient soit de la circulation de souches non virulentes ou non pathogènes soit d'un meilleur contrôle de la maladie (Jamonneau *et al.*, 2004c en annexe 3), et pouvait constituer un réservoir contribuant à la maintenance et à la ré-émergence de la THA dans des foyers endémiques (**Article 2**).

Une meilleure compréhension de l'épidémiologie et un contrôle plus efficace de la THA nécessite, entre autres études, de rechercher le rôle du parasite et de sa diversité génétique dans la diversité de réponses à l'infection. Les travaux présentés dans ce mémoire sont centrés sur la caractérisation de la diversité génétique de *T. b. gambiense* en relation avec la distribution géographique et en relation avec la diversité de réponses à l'infection d'une part et l'étude de la structuration génétique des populations de trypanosomes et de leur évolution spatio-temporelle d'autre part.

Initialement prévue en alternance entre l'Institut Pierre Richet de Bouaké, et le Laboratoire de Recherches et de Coordination sur les Trypanosomoses de Montpellier, cette étude a souffert des événements politiques survenus en Côte d'Ivoire en 2004. La difficulté d'accès aux foyers de THA a contraint à modifier les programmes d'échantillonnage et à réduire le suivi des souches de trypanosomes dans le temps et l'espace.

Deuxième partie
Mise en évidence d'un biais sélectif des
techniques d'isolement.

Deuxième partie: Mise en évidence d'un biais sélectif des techniques d'isolement. (Article 1)

Identification of *Trypanosoma brucei* circulating in a sleeping sickness focus in Côte d'Ivoire: assessment of genotype selection by the isolation method

Vincent Jamonneau^{a,*}, Christian Barnabé^{b,1}, Mathurin Koffi^{c,2},
Bocar Sané^{c,1}, Gérard Cuny^a, Philippe Solano^a

^a Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR 035, Laboratoire de Recherche et de Coordination sur les Trypanosomoses, Programme Santé Animale, TA 207/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

^b Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Génétique des Maladies Infectieuses, UR 062, UMR CNRS-IRD 9926, B.P. 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

^c Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR 035, Centre Pierre Richet, 01 B.P. 1500 Bouaké, Côte d'Ivoire, France

Received 27 February 2003; received in revised form 11 April 2003; accepted 11 April 2003

Abstract

Genetic studies of *Trypanosoma brucei* have been mainly based on rodent inoculation (RI) for isolation of trypanosome strains. However, *Trypanosoma brucei gambiense* is difficult to grow in rodents. The development and use of the Kit for In Vitro Isolation (KIVI) of trypanosomes has led to a better isolation success. However, some authors report a genetic monomorphism in *T. b. gambiense*, and the extensive use of the KIVI was suspected as being responsible for this low genetic diversity. In the present work, trypanosome stocks were isolated from both humans and pigs in an active sleeping sickness focus in Côte d'Ivoire. Two methods were simultaneously used for this purpose: KIVI and rodent inoculation. None of the human stocks grew in rodents. Some of the stocks originating from pigs could be isolated with both methods. Each of these stocks (from the same pig) showed a different isoenzymatic pattern according to the isolation method used. All the human stocks identified belonged to the major zymodeme 3 of *T. b. gambiense* group 1, whereas the stocks isolated from pigs belonged to a new group of zymodemes even if they were genetically closely related. These observations may have significant implications when analysing the population structure of *T. brucei*, and also raise again the question of the importance of the animal reservoir in Human African Trypanosomiasis (HAT).

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Trypanosoma brucei*; Isoenzyme electrophoresis; Kit for In Vitro Isolation (KIVI); Rodent inoculation; Animal reservoir; Côte d'Ivoire

1. Introduction

The species *Trypanosoma brucei sensu lato* is classically divided into three subspecies on the basis of human infectivity and geographical distribution, as they are morphologically indistinguishable: *Trypanosoma brucei gambiense* is responsible for the chronic form of Human African Trypanosomiasis (HAT) in West and Central Africa, *T. b. rhodesiense* the agent of acute form in East Africa, and *T. b. brucei* considered as not pathogenic for humans. *T. brucei s.l.* has been shown to undergo sexual recombination in the laboratory (Jenni et al., 1986), but the frequency of this

phenomenon in natural populations remains a controversial issue that needs to be clarified since it has great implications on the epidemiology and control of the disease (Tibayrenc et al., 1990; Macleod et al., 2000).

In addition, within *T. b. gambiense*, acute cases have also been suspected in West Africa (Truc et al., 1997a), leading to controversy on the subspecies classification of *T. brucei s.l.* Biochemical and molecular markers have been used extensively in an attempt to establish a reliable classification. The only group which can be considered as a taxonomic unit is the one defined as *T. b. gambiense* group 1 (Gibson, 1986), which represents 80% of all West and Central African human isolates. Other trypanosome strains isolated in West and Central Africa which did not belong to this group were classified in a very heterogeneous *T. b. gambiense* group 2, or Bouaffle group (Godfrey et al., 1990). Some of the strains isolated from domestic and wild animals in these regions are similar to some human-isolated stocks (Mehlitz et al., 1982;

* Corresponding author. Tel.: +33-4-67-59-39-19;
fax: +33-4-67-59-39-19.

E-mail address: vincent.jamonneau@mpl.ird.fr (V. Jamonneau).

¹ Tel.: +33-4-67-41-61-00.

² Tel.: +22-5-31-63-95-43; fax: +22-5-31-63-27-38.

Truc et al., 1991; Nkinin et al., 2002), raising the question of the importance of the animal reservoir.

In most of the genetic studies of trypanosomes isolated from human and animal mentioned earlier, isolation of trypanosomes has been achieved by inoculation of infected blood to laboratory rodents and multiplication by *in vivo* culture. However, due to low virulence of *T. b. gambiense* in rodents, there has been insufficient field sampling for genetic population studies (Dukes et al., 1991). A kit has been developed for *in vitro* isolation of trypanosomes in the field (KIVI, Aerts et al., 1992; Truc et al., 1992). The KIVI medium allowed the transformation from bloodstream form to procyclic form, the later being easily cultivated on axenic Cunningham medium (Cunningham, 1977). This has led to successful genetic identification of trypanosomes from humans, domestic and wild animals from field studies (Truc et al., 1997a,b; Jamonneau et al., 2000, 2002).

Jamonneau et al. (2000, 2002) showed that *T. b. gambiense* displayed very little genetic diversity using several biochemical and molecular markers on a several years sampling of trypanosomes isolated from humans in various foci of Côte d'Ivoire. They suggested that the exhaustive use of the KIVI might be responsible for this apparent low genetic diversity. For instance, there has not been any stock of the Bouaffle group isolated from humans since the KIVI has been used as the isolation technique. Hence, the aim of the present work was to compare genetically by Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), trypanosomes isolated from humans and pigs in a HAT focus in Côte d'Ivoire, by using two isolation techniques for each sample: KIVI and rodent inoculation (RI).

2. Materials and methods

2.1. Study area and blood samples

The study was undertaken in the focus of Bonon (6°55' N, 6° W), in the pre-forest zone of Central-western Côte d'Ivoire. From a total of 74 patients diagnosed with HAT during a medical survey conducted in April 2000, the first 16 patients who gave their consent after explanation of the objective and rationale of the study were used in this work. Patients were treated by medical staff of the National Control Program following the protocols approved by the Ministry de la Santé of Côte d'Ivoire. Stocks were isolated from these 16 patients using both the KIVI and RI methods (see below). Within the same focus, in the localities where patients were found, blood was taken from a total of 18 pigs, and was inoculated in both KIVI and rodent for each of them.

2.2. Isolation and culture

In the field, KIVI were kept in the shade at ambient temperature (25–30 °C) until arrival in the laboratory, where they were maintained at 27 °C. Three examinations a week were

continued up to a maximum of 8 weeks after inoculation. The positive KIVI were sub-inoculated in Cunningham's medium (Cunningham, 1977) supplemented with foetal calf serum and antibiotics, according to the protocol described by Truc et al. (1992). The pellets of parasites were conserved in liquid nitrogen until used.

For each patient, one heparinized tube of 5 ml of blood was taken by venepuncture. For each pig, one heparinized tube of 5 ml of blood was taken from the jugular vein. From each heparinized tube (human and pig), 0.5 ml of blood were injected intraperitoneally in two mice. The mice were inoculated with cyclophosphamide (Endoxan, 300 mg/kg) 2 days after blood injection and then every 5 days, and were followed up during 2 months by microscope examination of a fresh drop of blood from the tail, every 3 days from the 6th day after inoculation. When parasitaemia became high (10^8 trypanosomes/ml), blood from the mouse was passaged in rats. When the parasitaemia in the rat reached 10^8 trypanosomes/ml, a cardiac puncture was made, and trypanosomes from the blood were filtered by using a macro anion exchange column (Lumsden et al., 1977). The pellets of parasites were conserved into liquid nitrogen until used.

2.3. Multilocus enzyme electrophoresis

Proteins were extracted from the pellets according to Truc et al. (1991). Stocks were characterized by MLEE on cellulose acetate plates (Helena®) and 10 enzymatic systems representing 13 loci were revealed: ALAT (EC. 2.6.1.2), GOT (EC. 2.6.1.1), Nhd (EC. 3.2.2.1), Nhd (EC. 3.2.2.1), ME (EC. 1.1.1.40), PEP-2 (EC. 3.4.11), MDH (EC. 1.1.1.37), IDH (1.1.1.42), PGM (EC. 2.7.5.1) according to Truc et al. (1991) and Truc and Tibayrenc (1993), and SOD (EC. 1.15.1.1) according to Stevens et al. (1989). All chemicals were obtained from Sigma®. For analysis procedure, UPGMA dendrogram was built, starting with the Jaccard's genetic distances (*d*, Jaccard, 1908) calculated from MLEE results for visualizing the relationships between the stocks (Sneath and Sokal, 1973). Reference stocks of *T. b. brucei* and *T. b. gambiense* groups 1 and Bouaffle were included, as well as stocks of *Trypanosoma congolense*-like groups for the UPGMA comparison (Table 1). Reference stocks had been isolated using the KIVI method during or after 1991, those before 1991 having been isolated by RI.

3. Results

Of the 16 KIVI performed on human samples, 12 (patients, 1–12) gave a positive result (75%; Table 2). Unfortunately, RI was negative for all 16 patients. Thus, stocks of patients 13–16 could not be isolated by either KIVI or RI. Both the KIVI and RI gave a positive result for 8 out of 18 pig samples (samples, 17–24). Of the 10 remaining pigs, five stocks were isolated only by KIVI (samples, 25–29), while five pigs gave a negative result with both KIVI and RI

Table 1
Reference stocks used for MLEE characterization with corresponding zymodeme and taxonomic identification

Stock	Host	Year	Country	Focus	Zym.	Species	Ref.
DAL072	Human	1978	CI	Vavoua	1	<i>T. b. g 1</i>	1
Trazic	Human	1991	CI	Sinfra	2	<i>T. b. g 1</i>	2
Sique	Human	1991	CI	Sinfra	3	<i>T. b. g 1</i>	2
SH002	Human	1988	CI	Daloa	4	<i>T. b. g 1</i>	2
SH028	Human	1992	CI	Daloa	5	<i>T. b. g 1</i>	2
SH017	Human	1989	CI	Aboisso	6	<i>T. b. bfl</i>	2
SH196	Human	1990	CI	Daloa	7	<i>T. b. bfl</i>	2
SH133	Human	1990	CI	Daloa	8	<i>T. b. g 1</i>	2
SH276	Human	1992	CI	Daloa	10	<i>T. b. bfl</i>	2
SINF1	Human	1992	CI	Sinfra	11	<i>T. b. g 1</i>	2
SINF5	Human	1992	CI	Sinfra	12	<i>T. b. g 1</i>	2
TH2	Human	1978	CI	Daloa	14	<i>T. b. bfl</i>	3
TSW53	Pig	1982	CI	Bouaflé	15	<i>T. b. bfl</i>	1
I04	Kob	1993	CI	Comoé	16	<i>T. b. bfl</i>	2
Porc C9	Pig	1988	CI	Daloa	18	<i>T. b. bfl</i>	2
KP465	Pig	1991	CI	Bouaflé	23	<i>T. b. bfl</i>	2
TSW103	Pig	1977	Liberia	Sanniquelle	27	<i>T. cong.</i>	4
KK39	Kob	1980	CI	Comoé	33	<i>T. b. bfl</i>	5
AB14	Hartebeest	1980	CI	Comoé	37	<i>T. b. bfl</i>	1
1972	Human	1993	CI	Sinfra	38	<i>T. b. g 1</i>	2
D25/41	Human	1994	CI	Sinfra	39	<i>T. b. g 1</i>	2

Kob, *Kobus kob*; Hartebeest, *Alcelaphus buselaphus*; CI, Côte d'Ivoire; Zym., Zymodeme; *T. b. g 1*, *Trypanosoma brucei gambiense* group 1; *T. b. bfl*, *Trypanosoma brucei* Bouaflé group, *T. cong.*, *Trypanosoma congolense*; Ref.: 1, Stevens et al., 1992; 2, Truc et al., 1997a; 3, Mehltitz et al., 1982; 4, Gashumba et al., 1988; 5, Young and Godfrey, 1983.

(samples, 30–34). Thus, KIVI and RI were positive for 13 and 8 out of 18 pigs, respectively, (72.2 and 44.4%, respectively).

As RI was negative for all human subjects, stocks isolated by KIVI from humans were named stocks 1–12 (Table 3). Stocks isolated by KIVI from pig were named “no. of the pig KIVI” and stocks isolated by RI were named “no. of the pig Rod.”. For instance, pig no. 19, positive by both KIVI and RI, gave two stocks: 19 KIVI and 19 Rod.

Isoenzyme patterns of all stocks isolated are detailed in Table 3. Stocks were grouped by zymodeme. For example, 19 KIVI, 23 KIVI and 27 KIVI belonged to the same zymodeme, Z44. Of the 13 loci analyzed, 7 (IDH, MDH, ME1, NH11, NHI2, NHd and PGM) were monomorphic for all stocks. The phenotypes ALAT (6-7-8), ME2 (1-2-3) and PEP-2 (1-2-4) were specific to stocks isolated from humans. Locus GOT gave a diagnostic pattern for each isolation method (5-7-8 for KIVI and 8 for RI). Locus PEP-2 was diagnostic for both isolation method and host of origin: stocks

isolated from human by KIVI were 1-2-4, from pig by KIVI were 1-3-5, and from pig by RI were 1-5. The SOD system was the most polymorphic, but the two different patterns observed for SODa and the four patterns observed for SODb were not specific for neither the host of origin nor the isolation method.

All the stocks isolated from humans belonged to zymodeme 3 (Z3), like the Sique reference stock (Truc et al., 1997a). Stocks isolated from pig by either KIVI or RI showed different patterns corresponding to six new zymodemes, which we named, Z44–Z49. Within the group of stocks isolated from pigs with RI, nearly all were monomorphic except 19 Rod., which differed from the others by SODb (3-5-7 no. 3-7). Within the group of stocks isolated from pigs with KIVI, some variation occurred at loci SODa and SODb. Each pig sample that could be isolated using the two methods (KIVI and RI) resulted in two different zymodemes according to the isolation method; this constitutes the most important result of this study.

Phenetic relationships between zymodemes (including the reference stocks and the new zymodemes) are shown in the dendrogram (Fig. 1). Three groups of zymodemes can be seen: the first one groups the Bouaflé group reference stocks except Z7, the second one groups the *gambiense* group 1 reference stocks including Z3, and the third one is constituted by Z7 and the new zymodemes isolated from pig using both KIVI and RI. These new zymodemes are genetically close to each other and seem to be different from both the bouaflé (except Z7) and the *gambiense* group 1 stocks. It should be noted that this observation does not support those of Stevens

Table 2
Isolation results for both the KIVI and the rodent inoculation, performed on the 16 patients and the 18 pigs of our study

Stock	Host	KIVI	Rodent
1–12	Human	+	–
13–16	Human	–	–
17–24	Pig	+	+
25–29	Pig	+	–
30–34	Pig	–	–

Table 3
Isoenzyme patterns of the stock isolated and corresponding zymodemes (Z.)

Stock	Host	Meth.	ALAT	GOT	IDH	MDH	ME1	ME2	NHi1	NHi2	NHd	PEP2	PGM	SODa	SODb	Z.
1–12	Human	KIVI	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	11-12	3-6-7-12-14	3-5	3
19 KIVI	Pig	KIVI	4	5-7-8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-3-5	11-12	1-2-5-11-13	3-7	44
23 KIVI	Pig	KIVI	4	5-7-8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-3-5	11-12	1-2-5-11-13	3-7	44
27 KIVI	Pig	KIVI	4	5-7-8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-3-5	11-12	1-2-5-11-13	3-7	44
17 KIVI	Pig	KIVI	4	5-7-8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-3-5	11-12	1-2-5-11-13	3-5-6-7	45
18 KIVI	Pig	KIVI	4	5-7-8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-3-5	11-12	1-2-5-11-13	3-5-6-7	45
20 KIVI	Pig	KIVI	4	5-7-8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-3-5	11-12	1-2-5-11-13	3-5-6-7	45
22 KIVI	Pig	KIVI	4	5-7-8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-3-5	11-12	1-2-5-11-13	3-5-6-7	45
25 KIVI	Pig	KIVI	4	5-7-8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-3-5	11-12	1-2-5-11-13	3-5-6-7	45
29 KIVI	Pig	KIVI	4	5-7-8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-3-5	11-12	1-2-5-11-13	3-5-6-7	45
24 KIVI	Pig	KIVI	4	5-7-8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-3-5	11-12	3-6-7-12-14	3-5	46
28 KIVI	Pig	KIVI	4	5-7-8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-3-5	11-12	3-6-7-12-14	3-5	46
21 KIVI	Pig	KIVI	4	5-7-8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-3-5	11-12	3-6-7-12-14	3-5-7	47
26 KIVI	Pig	KIVI	4	5-7-8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-3-5	11-12	3-6-7-12-14	3-5-7	47
19 Rod.	Pig	Rd.	4	8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-5	11-12	1-2-5-11-13	3-5-7	48
17 Rod.	Pig	Rd.	4	8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-5	11-12	1-2-5-11-13	3-7	49
18 Rod.	Pig	Rd.	4	8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-5	11-12	1-2-5-11-13	3-7	49
20 Rod.	Pig	Rd.	4	8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-5	11-12	1-2-5-11-13	3-7	49
21 Rod.	Pig	Rd.	4	8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-5	11-12	1-2-5-11-13	3-7	49
22 Rod.	Pig	Rd.	4	8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-5	11-12	1-2-5-11-13	3-7	49
23 Rod.	Pig	Rd.	4	8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-5	11-12	1-2-5-11-13	3-7	49
24 Rod.	Pig	Rd.	4	8	5	5-6	2	1	3	3	9	1-5	11-12	1-2-5-11-13	3-7	49

Rd., Rodent; Meth., Isolation method; numbers indicate presence of patterns at a given locus.

et al. (1992) and Truc et al. (1997a,b) for whom the SOD patterns were specific: (i) SODa 3-6-7-12-14, SODb 3-5 for *gambiense* group I, and (ii) SODa 1-2-5-11-13, SODb 3-7 for Bouafle group. Some stocks of our study isolated from pig presented these two kinds of pattern (Z46 is SODa 3-6-7-12-14, SODb 3-5 and both Z44 and Z49 are SODa 1-2-5-11-13, SODb 3-7, see Table 3) while they cluster out of these two groups. It should be noted that the bootstrap values corresponding to the three groups of zymodemes are not significant (data not shown).

4. Discussion

In this work carried out in Côte d'Ivoire, stocks from sleeping sickness patients and pigs from the same area were isolated simultaneously by two isolation methods, KIVI and RI, in order to study a possible selective effect of the use of KIVI, which had been suspected in previous works (Jamonneau et al., 2000, 2002). Some stocks originating from pigs could be isolated by the two methods and a difference of banding pattern was observed between stocks isolated by KIVI and stocks isolated by RI from the same pig.

Here, the two isolation methods used implicate different lifecycle stages (procyclic forms for KIVI, bloodstream for RI). It should be noted that other authors found differences in isoenzyme patterns within *T. b. gambiense* which they attributed to metabolic differences between trypanosome lifecycle stages (Kaukas et al., 1990). Hence, one could wonder if the differences observed in the present work could not be due only to physiological differences between procyclic and

bloodstream forms. First, as in Kaukas et al. (1990) we also noted that the following loci were monomorphic: IDH, NHd, NHi, PGM. We obtained the same results as theirs for the variable locus GOT (ASAT of Kaukas et al., 1990), which differentiated procyclic and bloodstream forms. But, on other loci we obtained different results: Kaukas et al. (1990) found some polymorphism on ALAT and MDH that they still attributed to metabolic differences. In our work, MDH and ALAT showed the same pattern whatever the isolation technique used, and ALAT was polymorphic but regardless of the lifecycle stage. Furthermore, we observed some polymorphism on other loci that were not polymorphic in the work of Kaukas et al. (1990): ME, PEP-2, SOD. Since different patterns were also observed on stocks isolated by the same technique, we may conclude that this polymorphism was not only due to differences of trypanosome lifecycle stages but probably corresponds to an intrinsic genetic variation.

Our hypothesis is that these pigs were probably infected by two or more different genotypes of *T. brucei s.l.* which were selected by the isolation method. It might be possible that the same phenomenon has occurred in the work of Kaukas et al. (1990). This kind of selection has been reported in experimental infections of rodents: when two different stocks are inoculated in a mouse, one of them grows at the expense of the other (Seed, 1978). Further investigations are required in order to confirm this result, especially, for stocks isolated from humans.

Intra-specific multiple infections of *T. brucei s.l.* have already been described in tsetse flies (Stevens et al., 1994; Macleod et al., 1999), in cattle (Macleod et al., 2000), in pigs (Scott, 1981) and more occasionally in humans (Godfrey

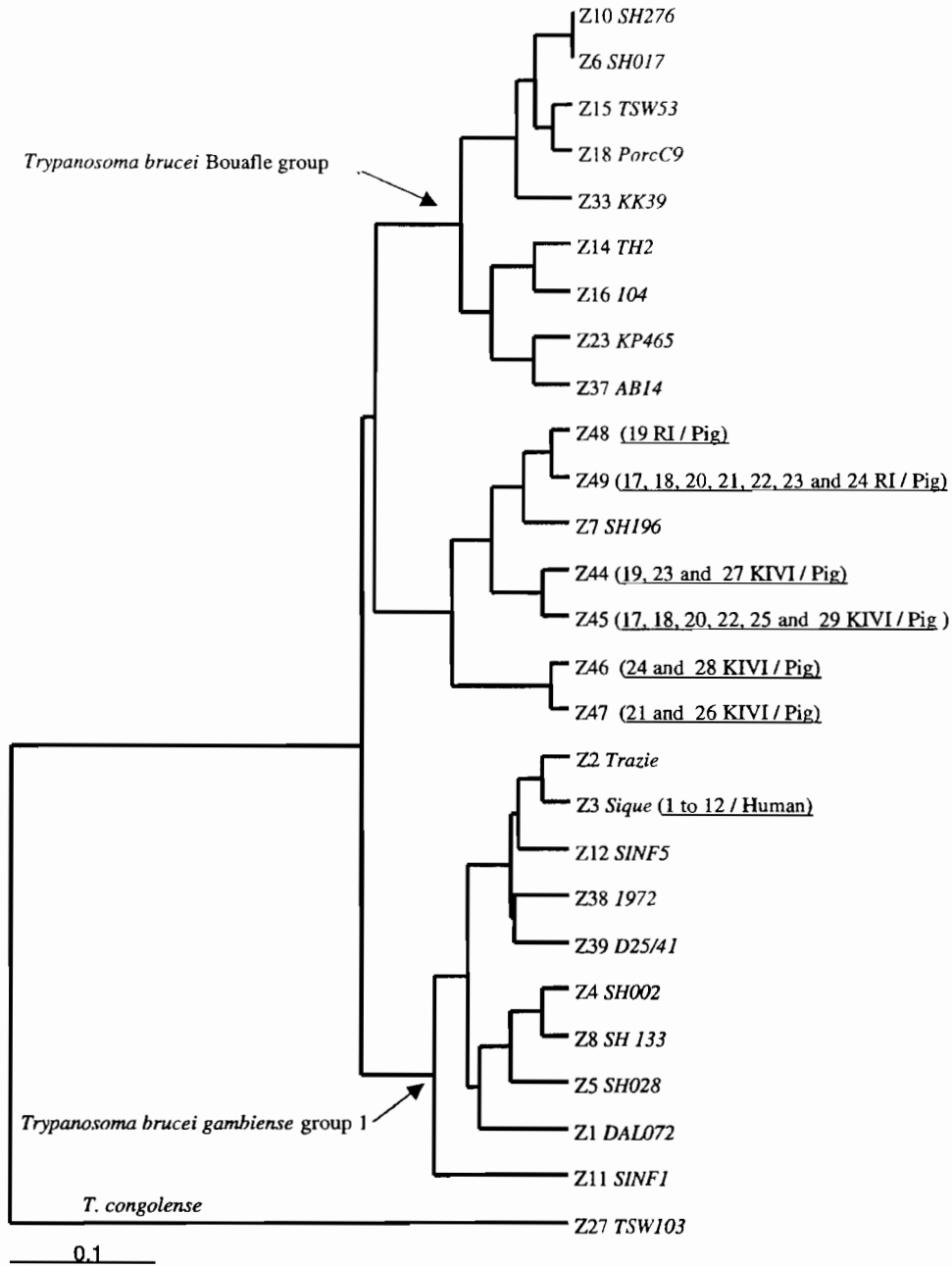


Fig. 1. The reference stocks are in italics and are preceded by their zymodeme number. The stocks obtained in the present study are underlined, are also preceded by their zymodeme number, and are followed by the host of origin (e.g. sample Z48 (19RI/pig), is sample number 19, isolated from pig by rodent inoculation, and belongs to zymodeme 48).

et al., 1990). Mixed infections of two genotypes of *T. b. gambiense* group 1 have been recently observed by Truc et al. (2002) using micro-satellite markers on double isolation of stocks by KIVI from the same patient at two different times (these two stocks were identified as zymodeme 3 by MLEE). Indeed, in this latter work, MLEE identification of the stocks isolated from human with KIVI confirmed the unusual genetic homogeneity of stocks isolated

by this method, justifying the suspicion of a selective effect of the KIVI (Jamonneau et al., 2000, 2002) applied on human stocks. Unfortunately, this study did not help us to answer this question because none of the human stocks grew in rodents, thus confirming the usually low isolation success of RI for *T. b. gambiense*, which justified the use of KIVI.

The selective effect of the isolation and/or cultivation techniques has already been reported in bacteria and also in other

parasitic diseases, e.g. Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) (Breniere et al., 1992; Bosseno et al., 2000) and for leishmaniasis (*Leishmania donovani*; Dey et al., 2002). In HAT, this selective effect had been already suspected in several studies (e.g. Dukes et al., 1991) but has not been really investigated so far to our knowledge.

The selective effect of isolation techniques has important implications in term of population genetics of the organism studied and on the epidemiology of the corresponding disease. For example, in HAT, if the trypanosomes stocks under study were isolated by using only one method, a clonal structure with only one genotype might arise (e.g. zymodeme 3 of *T. b. gambiense* with KIVI in West Africa, Jamonneau et al., 2000), whereas the real population structure remains unknown. This has been termed 'iceberg bias' (Tibayrenc, 1999). This problem of sampling might be resolved by trying to directly identify trypanosomes from the biological fluids of humans (blood, CSF and lymph fluid) without isolation and culture, and by using specific molecular markers. Recently, developed markers, such as micro- or mini-satellites (Macleod et al., 2000; Truc and Cuny, 2001), seem promising tools for this purpose.

The stocks isolated from pigs with both KIVI and RI represented six new zymodemes, which clustered together. Therefore, whatever the isolation method, stocks isolated from pigs were different from the stocks isolated from humans. Hence, from the results of this work, pigs might not be incriminated as an animal reservoir of trypanosomes pathogenic to humans. Conversely, in Cameroon, Nkinin et al. (2002) reported that a frequent zymodeme pathogenic to humans was also found in pigs. However, in our study, zymodeme Z7 isolated from humans, which groups in the dendrogram with the new group of zymodemes isolated from pigs, had previously been classified as Bouaffle group (Truc et al., 1997a). Furthermore, the bootstrap values corresponding to the three groups of zymodemes here are not significant. This means that the stocks isolated from pigs are genetically very close to the 'human' stocks. In addition, while the group of stocks from pigs does not seem to belong neither to *T. b. gambiense* group 1 nor to the Bouaffle group in the dendrogram, some of them presented SODa and SODb patterns previously described as specific to these groups (Stevens et al., 1992; Truc et al., 1997a,b). However, as the blood infectivity incubation test (BIIT, Rickman and Robson, 1970) was not performed, and considering the hypothesis of a selective effect of the KIVI and the limited number of pigs sampled, it is difficult to conclude the role of pigs in terms of animal reservoir in our study area. Further studies are in progress to shed light on this issue.

Acknowledgements

We thank the HAT team of the Institut Pierre Richet in Bouaké and the National Control Program for HAT of Côte d'Ivoire for their excellent technical support. This work was

supported by the Institut de Recherche pour le Développement (IRD), by the Agence Française de la Francophonie (AUF), and by the French Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche. We thank G. Manners for editorial advice.

References

- Aerts, D., Truc, P., Penchenier, L., Claes, Y., Le Ray, D., 1992. A Kit for In Vitro Isolation of trypanosomes in the field: first trial with sleeping sickness patients in the Congo. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 394–395.
- Bosseno, M.F., Yacsik, N., Vargas, F., Breniere, S.F., 2000. Selection of *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes (clonet 20 and 39) isolated from Bolivian tryatomines following subculture in liquid medium. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95, 601–607.
- Breniere, S.F., Bosseno, M.F., Revollo, S., Rivera, M.T., Carlier, Y., Tibayrenc, M., 1992. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 335–341.
- Cunningham, I., 1977. New culture medium for maintenance of tsetse tissues and growth of trypanosomatids. *J. Protozool.* 21, 325–329.
- Dey, T., Afrin, F., Anam, K., Ali, N., 2002. Infectivity and virulence of *Leishmania donovani* promastigotes: a role for media, source, and strain of parasite. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 270–274.
- Dukes, P., McNamara, J.J., Godfrey, D.G., 1991. Elusive trypanosomes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 85, 21–32.
- Gashumba, J.K., Baker, R.D., Godfrey, D.G., 1988. *Trypanosoma congolense*: the distribution of enzymatic variants in East and West Africa. *Parasitology* 96, 475–486.
- Gibson, W.C., 1986. Will the real *Trypanosoma brucei gambiense* please stand up. *Parasitol. Today* 2, 255–257.
- Godfrey, D.G., Baker, R.D., Rickman, L.R., Mehlitz, D., 1990. The distribution, relationships and identification of enzymatic variants within the subgenus *Trypanozoon*. *Adv. Parasitol.* 29, 1–39.
- Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 44, 223–270.
- Jamonneau, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., Simaro, P., Truc, P., 2000. Exploration of the distribution of *Trypanosoma brucei* ssp. in West Africa, by multilocus enzyme electrophoresis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94, 643–649.
- Jamonneau, V., Garcia, A., Ravel, S., Cuny, G., Oury, B., Solano, P., N'Guessan, P., N'Dri, L., Sanon, R., Frézil, J.L., Truc, P., 2002. Genetic characterization of *Trypanosoma brucei* ssp. and clinical evolution of Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Trop. Med. Int. Health* 7, 610–621.
- Jenni, L., Marti, J., Schweizer, J., Betschart, B., Le Page, R.W.F., Wells, J.M., Tait, A., Paindavoine, P., Pays, E., Steinert, M., 1986. Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature* 322, 173–175.
- Kaukas, A., Gashumba, J.K., Lanham, S.M., Dukes, P., 1990. The substitution of procyclic for bloodstream form *Trypanosoma brucei gambiense* in isoenzyme studies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 242–245.
- Lumsden, W.H.R., Kimber, C.D., Strange, M., 1977. *Trypanosoma brucei*: a miniature anion exchange/centrifugation technique for the detection of low parasitemias in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 421–424.
- Macleod, A., Turner, C.M.R., Tait, A., 1999. A high level of mixed *Trypanosoma brucei* infections in tsetse flies detected by three hypervariable mini-satellites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102, 237–248.
- Macleod, A., Tweedie, A., Welburn, S.C., Maudlin, I., Turner, C.M.R., Tait, A., 2000. Mini-satellite marker analysis of *Trypanosoma brucei*: reconciliation of clonal, panmictic, and epidemic population genetic structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13442–13447.

- Mehlitz, D., Zillmann, U., Scott, C.M., Godfrey, D.G., 1982. Epidemiological studies on the animal reservoir of *gambiense* sleeping sickness. Part III. Characterization of *Trypanozoon* stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Tropenmed. Parasitol.* 33, 113–118.
- Nkinin, S.W., Njiokou, F., Penchenier, L., Grebaut, P., Simo, G., Herder, S., 2002. Characterization of *Trypanosoma brucei* s. l. subspecies by isoenzymes in domestic pigs from the Fontem sleeping sickness focus of Cameroon. *Acta Trop.* 81, 225–232.
- Rickman, L.R., Robson, J., 1970. The testing of proven *Trypanosoma brucei* and *T. rhodesiense* strains by the blood incubation infectivity test. *Bull. World Health Organ.* 42, 911–916.
- Scott, C.M., 1981. Mixed populations of *Trypanosoma brucei* in a naturally infected pig. *Tropenmed. Parasitol.* 32, 221–222.
- Seed, J.R., 1978. Competition among serologically different clones of *Trypanosoma brucei gambiense* in vivo. *J. Protozool.* 25, 526–529.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., 1973. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. In: Kennedy, D., Park, R.B. (Eds.), Freeman, San Francisco.
- Stevens, J.R., Nunes, V.L.B., Lanham, S.M., Oshiro, E.T., 1989. Isoenzyme characterization of *Trypanosoma evansi* isolated from capybaras and dogs in Brazil. *Acta Trop.* 46, 213–222.
- Stevens, J.R., Lanham, S.M., Allingham, R., Gashumba, J.K., 1992. A simplified method for identifying subspecies and strain groups in *Trypanozoon* by isoenzymes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86, 9–28.
- Stevens, J.R., Mathieu-Daude, F., Mcnamara, J.J., Mizen, V.H., Nzila, A., 1994. Mixed populations of *Trypanosoma brucei* in wild *Glossina palpalis palpalis*. *Trop. Med. Parasitol.* 45, 313–318.
- Tibayrenc, M., 1999. Toward an integrated genetic epidemiology of parasitic protozoa and other pathogens. *Ann. Rev. Genet.* 33, 449–477.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F.J., 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 2414–2418.
- Truc, P., Cuny, G., 2001. Répartition et propagation de la trypanosomiase humaine Africaine: intérêt de l'identification génétique des trypanosomes. *Med. Trop.* 61, 433–436.
- Truc, P., Tibayrenc, M., 1993. Population genetics of *Trypanosoma brucei* in Central Africa: taxonomic and epidemiological significance. *Parasitology* 106, 137–149.
- Truc, P., Mathieu-Daude, F., Tibayrenc, M., 1991. Multilocus isoenzyme identification of *Trypanosoma brucei* stocks isolated in Central Africa: evidence for an animal reservoir of sleeping sickness in Congo. *Acta Trop.* 49, 127–135.
- Truc, P., Aerts, D., Mcnamara, J.J., Claes, Y., Allingham, R., Le Ray, D., Godfrey, D.G., 1992. The direct in vitro isolation of *Trypanosoma brucei* from man and animals, and its potential value for the diagnosis of Gambian trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 627–629.
- Truc, P., Formenty, P., Diallo, P.B., Komoin-Oka, C., Lauginie, F., 1997a. Confirmation of two distinct classes of zymodemes of *Trypanosoma brucei* infecting patients and wild mammals in Côte d'Ivoire: suspected difference in pathogenicity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91, 951–956.
- Truc, P., Formenty, P., Duvallet, G., Komoin-Oka, C., Diallo, P.B., Lauginie, F., 1997b. Identification of trypanosomes isolated by KIVI from wild mammals in Côte d'Ivoire: diagnostic, taxonomic and epidemiological considerations. *Acta Trop.* 67, 187–196.
- Truc, P., Ravel, S., Jamonneau, V., N'Guessan, P., Cuny, G., 2002. Genetic variability within *Trypanosoma brucei gambiense*: evidence for the circulation of different genotypes in Human African Trypanosomiasis patients in Côte d'Ivoire. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 1–4.
- Young, C.J., Godfrey, D.G., 1983. Enzyme polymorphism and the distribution of *T. congolense* isolates. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 77, 467–481.

Troisième Partie
Rôle de réservoir humain de la
THA des individus séropositifs
sans confirmation parasitologique

Troisième Partie: Rôle de réservoir humain de la THA des individus séropositifs sans confirmation parasitologique

Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: A potential human reservoir of parasites?

M. Koffi^{a,b}, P. Solano^b, M. Denizot^a, D. Courtin^c, A. Garcia^c,
V. Lejon^d, P. Büscher^d, G. Cuny^a, V. Jamonneau^{a,*}

^a Institut de Recherche Pour le Développement, Unité de Recherche 177, Programme Santé Animale, TA 207/G,
Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

^b Institut de Recherche Pour le Développement, Unité de Recherche 177, Institut Pierre Richet, 04 BP 293 Abidjan 04, Côte d'Ivoire

^c Institut de Recherche Pour le Développement, Unité de Recherche 010, Faculté de Pharmacie,
4 Avenue de L'observatoire, 75270 Paris, France

^d Institute of Tropical Medicine Antwerp (ITMA), Department of Parasitology, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerp, Belgium

Received 25 November 2005; received in revised form 18 January 2006; accepted 13 April 2006

Abstract

The serological and parasitological tests used for *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis (HAT) diagnosis have low specificity and sensitivity, respectively, and in the field, control program teams are faced with subjects with positive serology but negative parasitology who remain untreated. The aim of this work was to explore, using PCR tool, the significance of these aparasitemic serological suspects. Since discordant PCR results have been observed earlier with different extraction methods, two DNA extraction methods were compared (the Chelex 100[®] resin and the DNeasy[®] Tissue kit). The study was conducted on 604 blood samples: 574 from parasitologically confirmed patients, aparasitemic serological suspects and endemic controls collected in Côte d'Ivoire and 30 from healthy volunteers collected in France. No significant differences were observed between the PCR results obtained with the two extraction methods. Concerning PCR, problems of reproducibility and discordances with both serological and parasitological test results were observed, mainly for the aparasitemic serological suspects. In addition to previous results that pointed to the existence of non-virulent or non-pathogenic trypanosome strains and of individual susceptibility leading to long term seropositivity without detectable parasitaemia but positive PCR, the results of this study support the notion of a long lasting human reservoir that may contribute to the maintenance or periodic resurgences of HAT in endemic foci.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Trypanosoma brucei gambiense*; Human African trypanosomiasis; PCR; Serological suspects; Human reservoir; Côte d'Ivoire

1. Introduction

Human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness remains an important public health problem in Sub-Saharan Africa. About 55 million people are exposed to the risk of infection and it is estimated that there are about 300,000–500,000 infected but untreated

* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 59 39 19;

fax: +33 4 67 59 39 20.

E-mail address: vincent.jamonneau@mpl.ird.fr (V. Jamonneau).

people (WHO, 1998). Hence, as control heavily relies on the detection and treatment of patients especially for the chronic form of the disease caused by *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) and occurring in West and Central Africa, a reliable diagnosis is of key importance.

A broad clinical diversity (features and evolutions) is observed in *T. b. gambiense* HAT (Jamonneau et al., 2000, 2002; Sternberg, 2004), thus rendering difficult accurate diagnosis only based on clinical investigation (Jannin et al., 1993). Diagnosis is therefore generally based on direct (parasitological) or indirect (serological) evidence of blood, lymph or cerebrospinal fluid (CSF) invasion by trypanosomes (reviewed in Lejon et al., 2003 and Chappuis et al., 2005). Because the drugs used for treatment may have potentially side effects (Legros et al., 2002), demonstration of the parasite in tissue fluids of a patient is required before the initiation of chemotherapy (WHO, 1998).

Mass screening of the population at risk for *T. b. gambiense* infection is currently performed using the serological tests in order to select individuals with positive response to trypanosome antigens on whom parasitological examinations are carried out. Thanks to its simplicity and low price, the most commonly serological test used in the field is the Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT/*T. b. gambiense*, Magnus et al., 1978). The parasitological tests are based on the detection of trypanosomes in lymph node aspirates, blood and CSF. Currently, the most sensitive parasitological technique is the miniature anion-exchange/centrifugation technique (mAECT, Lumsden et al., 1979; Chappuis et al., 2005).

In the field, control program teams are faced with three categories of individuals: apparently healthy subjects with negative serological tests; sleeping sickness cases with positive serological and parasitological tests and subjects with positive serology but negative parasitology. This phenomenon of apparently aparasitemic serological suspects may be due to cross reactivity of CATT with animal trypanosomes (Noireau et al., 1986a) or other infectious diseases (Diallo et al., 1996), or due to failing parasite detection tests due to weak or fluctuating parasitaemia (Dukes et al., 1984; Truc et al., 1994). Finally, for some subjects, a phenomenon of control of infection by means of an appropriate immune system response is suspected (Garcia et al., 2000). In these two latter cases, subjects who remain untreated may represent a potential parasite reservoir that could be responsible for the persistence of transmission and re-emergence of historical sleeping sickness foci.

Polymerase chain reaction (PCR) has been increasingly applied in diseases for which early and reliable

diagnosis is required while asymptomatic carriers and/or fluctuating parasitaemia are frequent (reviewed in Yera et al., 2003). When applied to HAT diagnosis, higher sensitivity and specificity have been reported compared to parasitological methods and serological ones, respectively (Kanmogne et al., 1996; Penchenier et al., 1996, 2000; Kabiri et al., 1999; Kyambadde et al., 2000; Solano et al., 2002; Radwanska et al., 2002; Jamonneau et al., 2003; Becker et al., 2004). However, some problems of reproducibility and discordances with serological tests have been reported mainly on aparasitemic serological suspects (Kyambadde et al., 2000; Garcia et al., 2000; Solano et al., 2002). The aim of this work was to explore, using PCR, the significance of this complex phenomenon of positive serology without parasitological confirmation. The TBR1/2 primers (Moser et al., 1989) which were shown to be highly sensitive for HAT diagnosis (Penchenier et al., 2000; Solano et al., 2002; Jamonneau et al., 2003) were used in this study, and two simple DNA extraction methods were compared: the Chelex 100[®] resin method, an easy procedure, but which was suspected to give problems of sensitivity and reproducibility of PCR attributed to incomplete DNA purification (Ravel et al., 2004; Becker et al., 2004), and the DNeasy[®] Tissue kit, predicted to yield better purification of DNA thus avoiding the problems of PCR sensitivity and reproducibility.

2. Materials and methods

2.1. Study area and collection of samples

Samples from patients were collected in 2003 and 2004 in the active sleeping sickness focus in Central-West Côte d'Ivoire, during active surveillance (medical survey) carried out by the National Control Program (NCP) in collaboration with Institut Pierre Richet (IPR) and Institut de Recherche Pour le Développement (IRD). Blood was also collected from French volunteers (30) who had never been travelled to Africa (healthy subjects, H).

The HAT diagnostic procedure in the field was performed according to HAT National Control Program recommendations. Briefly, people were first screened using CATT on whole blood (Magnus et al., 1978). CATT whole blood seropositives were tested subsequently in CATT on plasma (Magnus et al., 1978). Subjects positive with CATT on whole blood and negative with CATT on plasma were called "serological suspects" or C+ and did not undergo further microscopic examinations. Parasitological tests (mAECT and direct examination of lymph node aspirate) were only performed on the sub-

jects positive in CATT on blood and on plasma (i.e. not performed on C+ subjects). Positive ones (trypanosomes seen by microscopy) were considered as sleeping sickness cases or “patients” (T+) and negative ones were called “seropositive” or PI+. In each area, some subjects negative in CATT on whole blood (parasitological tests not performed according to the diagnostic procedure) living in the focus (C–) were invited for giving blood as endemic negative controls. Signed or oral consent was obtained from each subject included in this study. Sampling consisted of 574 blood samples collected in heparinized vacutainers: 38 T+, 250 PI+, 213 C+ and 73 C–. For each sample, 1 ml blood was aliquoted in 1.5 ml microcentrifuge tube. All samples were stored at –20 °C for subsequent PCR analysis.

2.2. DNA extraction procedure

A first DNA extraction (Chelex) from thawed blood samples was based on the procedure described in Penchenier et al. (1996) using an anion chelating resin (Chelex 100® Resin, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Briefly, 500 µl of blood were transferred into a 1.5 ml microcentrifuge tube containing 500 µl of pure water. To lyse the cells, the mixture was vortexed every other 2 min at room temperature for 10 min. The mixture was then centrifuged at 13,000 × g for 4 min, the supernatant gently removed and discarded and the pellet resuspended into 400 µl of a 5% (w/v) Chelex suspension in sterile purified water. The tubes were then vortexed for 1 min, incubated at 56 °C for 1 h and at 95 °C for 30 min and centrifuged at 13,000 × g for 5 min. The supernatant was used as a template in PCR essays.

A second DNA extraction was performed using DNeasy® Tissue kit (Qiagen). For the preparation of samples, 500 µl of blood were transferred into a 1.5 ml microcentrifuge tube containing 500 µl of pure water. The mixture was vortexed every other 2 min at room temperature for 10 min. The mixture was then centrifuged at 13,000 × g for 4 min, the supernatant gently removed and discarded and the pellet resuspended into 200 µl of PBS. The prepared samples were processed according to the instructions provided by the manufacturer. The last step of the protocol consisted in the elution of DNA in 400 µl AE buffer.

2.3. PCR conditions

PCR was performed according to Penchenier et al. (1996) using TBR1–2 primers (TBR1: 5'-CGA-ATG-AAT-ATT-AAA-CAA-TGC-GCA-G-3'; TBR2: 5'-AGA-ACC-ATT-TAT-TAG-CTT-TGT-TGC-3') tar-

getting a 177 bp satellite DNA in *Trypanosoma brucei sensu lato* (Moser et al., 1989). PCR was carried out in a final volume of 50 µl containing 10 pmol of each primer, 0.2 mM of each desoxyribonucleotide, 1× incubation buffer with 1.5 mM MgCl₂, 0.5 units of Taq polymerase (QBIogene, Ilkirch, France) and 10 µl DNA sample. PCR amplification was performed in triplicate in three different essays to test the reproducibility. When the expected 177 bp product was visible, the PCR was considered positive.

3. Results

When triplicate PCR gave three positive or three negative results, the sample was considered as + or –, respectively. When a discordance was observed (for example: two PCR positive results and one PCR negative result for the same sample), the sample was considered as doubtful (±).

A comparison between Chelex and DNeasy® extraction methods was first performed on 255 blood samples: 12 T+, 82 PI+, 99 C+, 32 C– and 30 H. The results are given in Table 1. Results are clearly similar concerning T+, C– and H subjects. For PI+ and C+ individuals, no significant difference ($p > 0.10$) was observed whatever the extraction method. Then, taking into account this result, all the remaining samples were processed only by the Chelex method which is cheaper and easier from a technical point of view.

The PCR results obtained with the 574 blood samples from Côte d'Ivoire and the 30 H subjects processed by the Chelex method are given in Table 2. All 30 H subjects did not show any amplification signal whereas one posi-

Table 1
PCR results for the 255 blood samples processed with the two DNA extraction methods

PCR	Chelex			DNeasy®		
	+	±	–	+	±	–
12 T+	11 (92)	1 (8)	0	12 (100)	0	0
82 PI+	7 (9)	14 (17)	61 (74)	5 (6)	20 (24)	57 (70)
99 C+	1 (1)	8 (8)	90 (91)	5 (5)	14 (14)	80 (81)
32 C–	1 (3)	0	31 (97)	0	3 (9)	29 (91)
30 H	0	0	30	0	0	30

Percents are given in parentheses; T+: positive in CATT on whole blood, positive in CATT on plasma and positive in parasitological tests (mAECT and/or direct examination of lymph node aspirate); PI+: positive in CATT on whole blood, positive in CATT on plasma but negative in parasitological tests; C+: positive in CATT on whole blood but negative in CATT on plasma and in parasitological tests; C–: endemic controls, negative in CATT on whole blood (CATT on plasma and parasitological tests not performed according to the diagnostic procedure); H: healthy subjects who had never been in Africa.

Table 2
PCR results for the 574 blood samples from Côte d'Ivoire and the 30 H processed with the Chelex method

	PCR		
	+	±	–
38 T+	36 (95)	2 (5)	0
250 Pl+	38 (15)	55 (22)	157 (63)
213 C+	9 (4)	32 (15)	172 (81)
73 C–	1 (1)	3 (4)	69 (95)
30 H	0	0	30 (100)

Percents are given in parentheses; T+: positive in CATT on whole blood, positive in CATT on plasma and positive in parasitological tests (mAECT and/or direct examination of lymph node aspirate); Pl+: positive in CATT on whole blood, positive in CATT on plasma but negative in parasitological tests; C+: positive in CATT on whole blood but negative in CATT on plasma and in parasitological tests; C–: endemic controls, negative in CATT on whole blood (CATT on plasma and parasitological tests not performed according to the diagnostic procedure); H: healthy subjects who had never been in Africa.

tive and three doubtful results were observed within the 73 C–. Concordant results were noticed between parasitological tests and PCR results on the patients, since 36 T+ out of 38 gave a positive result by PCR. The two remaining T+ gave a doubtful PCR result.

PCR gave a positive or a doubtful result for 93 (38 + 55) out of 250 Pl+ (37%) and 41 (32 + 9) out of 213 C+ (19%). A total of 92 doubtful results out of 574 (16%) were observed, for which 32 out of the 213 C+ subjects (15%, representing 35% of the doubtful results), and 55 out of the 250 Pl+ (22%, representing 60% of the doubtful results).

4. Discussion

The aim of this work was, using PCR, to explore the significance of aparasitemic but serologically positive subjects (Pl+ and C+) in HAT. PCR was performed using TBR1/2 primers on blood samples from Côte d'Ivoire (C–, C+, Pl+ and T+) and France (H), from which DNA was extracted by two methods (Chelex and DNeasy®).

The Chelex method has been questioned because of possible incomplete purification of DNA leaving inhibiting factors in the PCR reaction mixture (Ravel et al., 2004; Becker et al., 2004). However, when compared to the DNeasy® method which offers a total purification of DNA (see DNeasy® Tissue Handbook provided with the kit), no significant differences were observed between the PCR results obtained with these two methods. This confirms the potential of the easily applicable Chelex method for DNA purification, as also recently reported by Becker et al. (2004) in real-time PCR assays,

and shows that the problem of reproducibility of PCR in serological suspects is not due to the DNA extraction method used.

Our results confirm the high specificity and sensitivity of PCR since all healthy subjects (H) and 95% of C– subjects were negative and since all parasitological confirmed cases (T+) gave a positive or a doubtful result. The 5% positive or doubtful cases within the C– group (such cases had already been observed by Solano et al., 2002) can be explained by limited sensitivity of the CATT (in case of early infection or absence of the LiTaT 1.3 gene in circulating trypanosome strains for example, Truc et al., 1994; Enyaru et al., 1998) or, more probably, by a cross reaction of the PCR with a transient infection with *T. b. brucei*, as already suspected by Garcia et al. (2000). Indeed, the here used TBR1/2 primers amplify DNA of *T. brucei* s.l. species comprising *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* but also *T. b. brucei* which is non-pathogenic for humans. Unfortunately, PCRs that are specific for *T. b. gambiense* (i.e. *T. b. gambiense* group 1) are targeting a single copy gene (Radwanska et al., 2002) thus limiting the sensitivity of these tests in case of low parasitaemia, which is commonly observed in *T. b. gambiense* HAT.

On the C+ and Pl+ subjects, our study confirms both the earlier observed discordances between PCR and CATT (Kyambadde et al., 2000; Garcia et al., 2000) and between PCR and parasitological tests (Penchenier et al., 2000; Solano et al., 2002). All these discordances may be due to cross reactions of CATT with antibodies induced by other parasitic diseases (Noireau et al., 1986a, 1987; Penchenier et al., 1991; Diallo et al., 1996), cross reactions of PCR with transient infection with *T. b. brucei* mentioned above or extremely low *T. b. gambiense* parasitaemia.

Indeed, problems of both (i) PCR reproducibility and (ii) discordances between PCR and CATT on one side, and PCR and parasitology on the other side, occur in the same group of C+ and Pl+ subjects. Then another hypothesis can be put forward: these persons are actually infected with *T. b. gambiense* but their parasitaemia is so low that parasitological tests will remain negative and that PCR will randomly be positive or negative since the target DNA concentration is at the very detection limit of the test.

In a 8-year follow-up (from 1995, year of HAT diagnostic, to 2002) of six asymptomatic patients positive in serology and parasitology in 1995, but refusing treatment (Sinfra focus, Côte d'Ivoire), it was observed that these patients remained always positive or doubtful in CATT but none of them showed any parasite from 1998 to 2002. However, in 2002, trypanosome DNA was consistently detectable in their blood and, moreover, mixed

infections with two different trypanosome stocks, *T. b. gambiense* group 1 and another stock belonging to *T. brucei s.l.*, was strongly suspected (Jamonneau et al., 2000, 2004). Without PCR, these asymptomatic patients with detectable parasites in 1995 would have been considered as seropositive PI+ (i.e. never diagnosed as HAT cases). In another longitudinal follow-up of 77 PI+ individuals from the same Sinfra focus, observations on parasitologically negative but serologically positive persons with non-consistent PCR results suggested the existence of an individual susceptibility to HAT infection, i.e. “human trypanoresistance” (Garcia et al., 2000). The existence of non-virulent or non-pathogenic trypanosome strains and of human individual susceptibility leading to long-term seropositivity without detectable parasitaemia but positive PCR strongly suggests the existence of a human reservoir of trypanosomes. This human reservoir may contribute to the maintenance or periodic resurgences of human African trypanosomiasis in endemic foci, often attributed to an animal reservoir (Mehlitz et al., 1982; Noireau et al., 1986b; Njiokou et al., 2006). The respective roles of host and parasite in this complex phenomenon of positive serology but negative parasitology must be further investigated.

A complementary study of the role of the host and of the parasite (and of their potential interactions) on the variability of response to infections is essential (see Lambrechts et al., 2006). The information generated from this area will advance knowledge of host and parasite mechanisms which influence the pathogenesis and manifestation of diseases and then in HAT will have a major impact on drug, diagnostic tool and vaccine strategy development but also on the investigation of the mechanisms implied in the re-emergence phenomenon.

Acknowledgments

We particularly acknowledge all the technicians from the HAT team of the Institut Pierre Richet for their help in sampling. We thank IRD, Service de Coopération et d'Action Culturelle d'Abidjan (SCAC), and FAO/IAEA CRP no.11413 RBF for their financial support.

References

- Becker, S., Franco, J.R., Simarro, P.P., Stich, A., Abel, P.M., Steverding, D., 2004. Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 50, 193–199.
- Chappuis, F., Loutan, L., Simarro, P., Lejon, V., Büscher, P., 2005. Options for field diagnosis of human African trypanosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 133–146.
- Diallo, P.B., Truc, P., Méda, H.A., Kamenan, A., 1996. Diagnostic sérologique de la Trypanosomiase Humaine Africaine à *Trypanosoma brucei gambiense*: 1-obtention et utilisation d'antigènes bruts dans les tests ELISA et d'agglutination au latex. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 89, 262–268.
- Dukes, P., Rickman, L.R., Killick-Kendrick, R., Kakoma, I., Wurapa, F.K., de Raadt, P., Morrow, R., 1984. A field comparison of seven diagnostic techniques for human African trypanosomiasis in the Luangwa Valley, Zambia. *Tropenmed. Parasitol.* 35, 141–147.
- Enyaru, J.C.K., Matovu, E., Akol, M., Sebikali, C., Kyambadde, J., Schmidt, C., Brun, R., Ogwal, L.M., Kansime, F., 1998. Parasitological detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in serologically negative sleeping-sickness suspects from north-western Uganda. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92, 845–850.
- Garcia, A., Jamonneau, V., Magnus, E., Laveissière, C., Lejon, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., Van Meirvenne, N., Büscher, P., 2000. Follow-up of card agglutination trypanosomiasis test (CATT) positive but apparently aparasitemic individuals in Côte d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population. *Trop. Med. Int. Health* 5, 786–793.
- Jamonneau, V., Garcia, A., N'Guessan, P., N'Dri, L., Sanon, R., Laveissière, C., Frézil, J.L., Truc, P., 2000. Clinical and biological evolution of human African trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94, 831–835.
- Jamonneau, V., Garcia, A., Ravel, S., Cuny, G., Oury, B., Solano, P., N'Guessan, P., N'Dri, L., Sanon, R., Frézil, J.L., Truc, P., 2002. Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei* ssp. and clinical evolution of human African trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Trop. Med. Int. Health* 7, 610–621.
- Jamonneau, V., Solano, P., Garcia, A., Lejon, V., Djé, N., Miezian, T.W., Cuny, G., Büscher, P., 2003. Stage determination and therapeutic decision in human African trypanosomiasis: value of PCR and IgM quantification on the cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients in Côte d'Ivoire. *Trop. Med. Int. Health* 8, 589–594.
- Jamonneau, V., Ravel, S., Garcia, A., Koffi, M., Truc, P., Laveissière, C., Herder, S., Grébaud, P., Cuny, G., Solano, P., 2004. Characterization of *Trypanosoma brucei s.l.* infecting asymptomatic sleeping sickness patients in Côte d'Ivoire: a new genetic group? *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 98, 329–337.
- Jannin, J., Moulia-Pelat, J.P., Chanfreau, B., Penchenier, L., Louis, J.P., Nzaba, P., de la Baume, F.E., Eouzenou, P., Cattand, P., 1993. Trypanosomiase Humaine Africaine: étude d'un score de présomption de diagnostic au Congo. *Bull. World Health Organ.* 71, 215–222.
- Kabiri, M., Franco, J.R., Simarro, P.P., Ruiz, J.A., Sarsa, M., Steverding, D., 1999. Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7. *Trop. Med. Int. Health* 10, 658–661.
- Kanmogne, G.D., Asonganyi, T., Gibson, W.C., 1996. Detection of *Trypanosoma brucei gambiense*, in serologically positive but aparasitaemic sleeping-sickness suspects in Cameroon, by PCR. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 90, 475–483.
- Kyambadde, J.W., Enyaru, J.C.K., Matovu, E., Odiit, M., Carasco, J.F., 2000. Detection of trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using the polymerase chain reaction. *Bull. World Health Organ.* 78, 119–124.
- Lambrechts, L., Fellous, S., Koella, J.C., 2006. Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends Parasitol.* 22, 12–16.
- Legros, D., Ollivier, G., Gastellu-Etchegorry, M., Paquet, C., Burri, C., Jannin, J., Büscher, P., 2002. Treatment of human African trypanosomiasis, present situation and needs for research and development. *Lancet Infect. Dis.* 2, 437–440.

- Lejon, V., Boelaert, M., Jannin, J., Moore, A., Büscher, P., 2003. The challenge of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness diagnosis outside Africa. *Lancet Infect. Dis.* 3, 804–808.
- Lumsden, W.H., Kimber, C.D., Evans, D.A., Doig, S.J., 1979. *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias—adaptation for field use. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 312–317.
- Magnus, E., Vervoort, T., Van Meirvenne, N., 1978. A card-agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *T. gambiense* trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 59, 169–176.
- Mehlitz, D., Zillmann, U., Scott, C.M., Godfrey, D.G., 1982. Epidemiological studies on the animal reservoir of gambiense sleeping sickness. Part III: characterization of *Trypanozoon* stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Tropenmed. Parasitol.* 33, 113–118.
- Moser, D.R., Cook, G.A., Ochs, D.E., Bailey, C.P., McKane, M.R., Donelson, J.E., 1989. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology* 99, 57–66.
- Njiokou, F., Laveissière, C., Simo, G., Nkinin, S., Grébaud, P., Cuny, G., Herder, S., 2006. Wild fauna as probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. *Infect. Genet. Evol.* 6, 147–153.
- Noireau, F., Gouteux, J.P., Frézil, J.L., 1986a. Sensibilité du test d'agglutination sur carte (Testryp CATT) dans les infections porcines à *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* en République du Congo. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 66, 63–68.
- Noireau, F., Gouteux, J.P., Toudic, A., Samba, F., Frézil, J.L., 1986b. Importance épidémiologique du réservoir animal à *Trypanosoma brucei gambiense* au Congo. Part 1: prévalence des trypanosomes animaux dans les foyers de maladie du sommeil. *Tropenmed. Parasitol.* 37, 393–398.
- Noireau, F., Gouteux, J.P., Duteurtre, J.P., 1987. Valeur diagnostique du test d'agglutination sur carte (Testryp CATT) dans le dépistage de masse de la trypanosomiase humaine au Congo. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 80, 797–803.
- Penchenier, L., Jannin, J., Mouliat-Pelat, J.P., Elfassi de la Baume, F., Fadat, G., Chanfreau, B., Eouzenou, P., 1991. Interpretation of the CATT (card agglutination trypanosomiasis test) in the screening for human trypanosomiasis due to *Trypanosoma brucei gambiense*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 71, 221–228.
- Penchenier, L., Dumas, V., Grébaud, P., Reifenberg, J.M., Cuny, G., 1996. Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomiasis. *Parasite* 4, 387–389.
- Penchenier, L., Simo, G., Grébaud, P., Nkinin, S., Laveissière, C., Herder, S., 2000. Diagnosis of human trypanosomiasis, due to *Trypanosoma brucei gambiense* in central Africa, by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 392–394.
- Radwanska, M., Claes, F., Magez, S., Magnus, E., Pérez-Morga, D., Pays, E., Büscher, P., 2002. Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67, 289–295.
- Ravel, S., Mariani, C., Grébaud, P., Jamonneau, V., Cuisance, D., Cuny, G., 2004. Inhibition of the DNA amplification of trypanosomes present in tsetse flies midguts: implications for the identification of trypanosome species in wild tsetse flies. *Parasite* 11, 107–109.
- Solano, P., Jamonneau, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., Dje, N.N., Miezán, T.W., Lejon, V., Büscher, P., García, A., 2002. Comparison of different DNA preparation protocols for PCR diagnosis of Human Trypanosomiasis. *Acta Trop.* 82, 349–356.
- Sternberg, J.M., 2004. Human African trypanosomiasis: clinical presentation and immune response. *Parasite Immunol.* 26, 469–476.
- Truc, P., Bailey, J.W., Doua, F., Laveissière, C., Godfrey, D.G., 1994. A comparison of parasitological methods for the diagnosis of gambian trypanosomiasis in an area of low endemicity in Côte d'Ivoire. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 419–421.
- WHO, 1998. Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 881.
- Yera, H., Tzen, M., Dupouy-Camet, J., 2003. Molecular biology for detection and characterisation of protozoan infections in humans. *Eur. J. Protistol.* 39, 435–443.

Quatrième partie
Variabilité génétique des souches de
Trypanosoma brucei gambiense
circulant en Afrique de l'Ouest

Quatrième partie: Variabilité génétique des souches de *Trypanosoma brucei gambiense* circulant en Afrique de l'Ouest

Introduction

Un certain nombre de marqueurs moléculaires ont été utilisés pour aborder l'étude de la variabilité génétique de *T. brucei* s.l. : le SRA gene (serum resistance associated gene, De Greef et al., 1989 ; 1992 ; Xong et al., 1998 ; Milner & Hajduk, 1999 ; Gibson et al., 2002 ; Radwanska et al., 2002), les éléments génétiques mobiles comme les transposons (MGE-PCR, Hide & Tilley, 2001 ; Tilley et al., 2003 ; Simo et al., 2005), les séquences minisatellites (MacLeod et al., 2000 ; 2001) et les séquences microsatellites (Biteau et al., 2000 ; Truc et al., 2002). Ces marqueurs ont permis, en Afrique de l'Est, de différencier des trypanosomes non infectants pour l'homme (*T. b. brucei*) des trypanosomes infectants pour l'homme (*T. b. rhodesiense*) (Welburn et al., 2001 ; Fèvre et al., 2005). De même un polymorphisme du gène SRA en fonction de la localisation géographique et de l'aspect clinique (MacLean et al., 2006) a été démontré

Les marqueurs microsatellites, présentent un double avantage : ils permettent de détecter des infections multiples, fréquemment observées lors d'infections parasitaires (Macedo et al., 2001) ; ils sont particulièrement adaptés, grâce à leurs propriétés (haut degré de polymorphisme intra-spécifique et d'hétérozygotie, abondance dans les génomes, facilités d'interprétation, neutralité supposée, transmission mendélienne, codominance), à l'étude des relations entre espèces très proches ou entre populations d'une même espèce (Bruford & Wayne, 1993 ; Bowcock et al., 1994). Ils ont déjà été très utilisés pour étudier la structure des populations de plusieurs espèces de parasites dont *Plasmodium falciparum* (Razandrainibe et al., 2005) ; *Theileria parva* (Oura et al., 2003 ; 2005 ; Odongo et al., 2006) ; *Leishmania*, sous genre *Viannia* (Russel et al., 1999) ; *Leishmania tropica* (SchwenKenbecher et al., 2004 ; 2006) ; *Leishmania donovani* (Jamjoom et al., 2002), *Leishmania infatum* (Bulle et al.,

2002) ; *T. cruzi* (Macedo et al., 2001 ; Oliveira et al., 1998 ; 1999) ; *Toxoplasma gondii* (Ajzenberg et al., 2002).

Appliqués à la caractérisation des trypanosomes lors d'études préliminaires, ils se sont notamment avérés informatifs pour la distinction inter-spécifique (Biteau et al., 2000). Nous avons aussi à l'aide de ces marqueurs mis en évidence chez l'homme l'existence d'infections mixtes avec des trypanosomes du groupe 1 de *T. b. gambiense* et d'un nouveau groupe de trypanosomes pathogènes pour l'homme et circulant chez le porc (Jamonneau et al., 2004a, annexe 3). Ces infections mixtes pourraient être responsables d'une forme particulièrement chronique de THA, avec des parasitémies très faibles, et pourraient être impliquées dans le phénomène de séropositivité sans confirmation parasitologique, ainsi que dans le maintien d'un réservoir humain de trypanosome (Jamonneau et al., 2004a annex 3).

Nous avons étudié la variabilité génétique des souches de trypanosomes circulant dans quatre foyers d'Afrique de l'Ouest en comparant des souches isolées ou non de malades, des souches de séropositifs et de suspects sérologiques en espérant tirer des implications épidémiologiques et des perspectives nouvelles pour la lutte.

1. Matériel et méthodes

1. 1. Zones d'étude

La surveillance épidémiologique de la THA en Afrique de l'Ouest, menée par les PNLTHA et l'IRD/IPR, avec le soutien de l'OMS et des coopérations française et belge notamment, montre, sur la base des informations disponibles, que le Centre - Ouest ivoirien et la zone de mangrove guinéenne sont les deux zones les plus touchées de l'Afrique de l'Ouest (Kaba et al., 2006, Camara et al., 2005). L'échantillonnage a été effectué dans deux foyers ivoiriens : Bonon et Oumé, et dans deux foyers guinéens : Dubreka et Boffa (figure 9).



Figure 9: Localisation des foyers de THA prospectés dans le cadre de l'étude

1. 2. Inclusion des sujets d'étude

Deux types de sujets ont été inclus dans l'étude : (i) des patients confirmés porteurs de trypanosomes par les tests parasitologiques, ainsi que (ii) des individus positifs aux tests sérologiques mais négatifs en parasitologie.

Le schéma classique du dépistage de masse (OMS, 1998) a été utilisé. Brièvement, après une phase de sensibilisation précédant la prospection médicale, l'ensemble de la population présente le jour de la prospection est recensée et du sang (70 µl) est prélevé par ponction digitale dans un tube hématocrite hépariné pour chaque sujet, dans le but de réaliser un test sérologique, le Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT, Magnus et *al.*, 1978) sur sang total (CATT sg). Les individus positifs à ce test (agglutination visible, signe d'une réaction antigènes / anticorps recherchés) sont prélevés au pli du coude (5 ml de sang sur tube Vacutainer® hépariné) pour effectuer un CATT sur plasma (CATT Pl) plus spécifique que le CATT sg. Les tests parasitologiques: mini Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT, Lumsden et *al.*, 1979) sur le sang, et la recherche des trypanosomes dans le suc ganglionnaire (étalé à l'état frais entre lame et lamelle) prélevé en cas de présence d'adénopathies cervicales, sont effectués pour les sujets positifs au CATT Pl. Les sujets positifs aux tests parasitologiques sont confirmés malades (T+), les individus positifs au CATT Pl mais négatifs en parasitologie sont qualifiés de séropositifs (Pl+) et les individus positifs au CATT sg mais négatifs au CATT Pl, pour lesquels les tests parasitologiques ne sont pas effectués ont été qualifiés de suspects sérologiques (C+) (figure 10). L'annexe 2 décrit les différentes étapes du déroulement d'une prospection médicale.

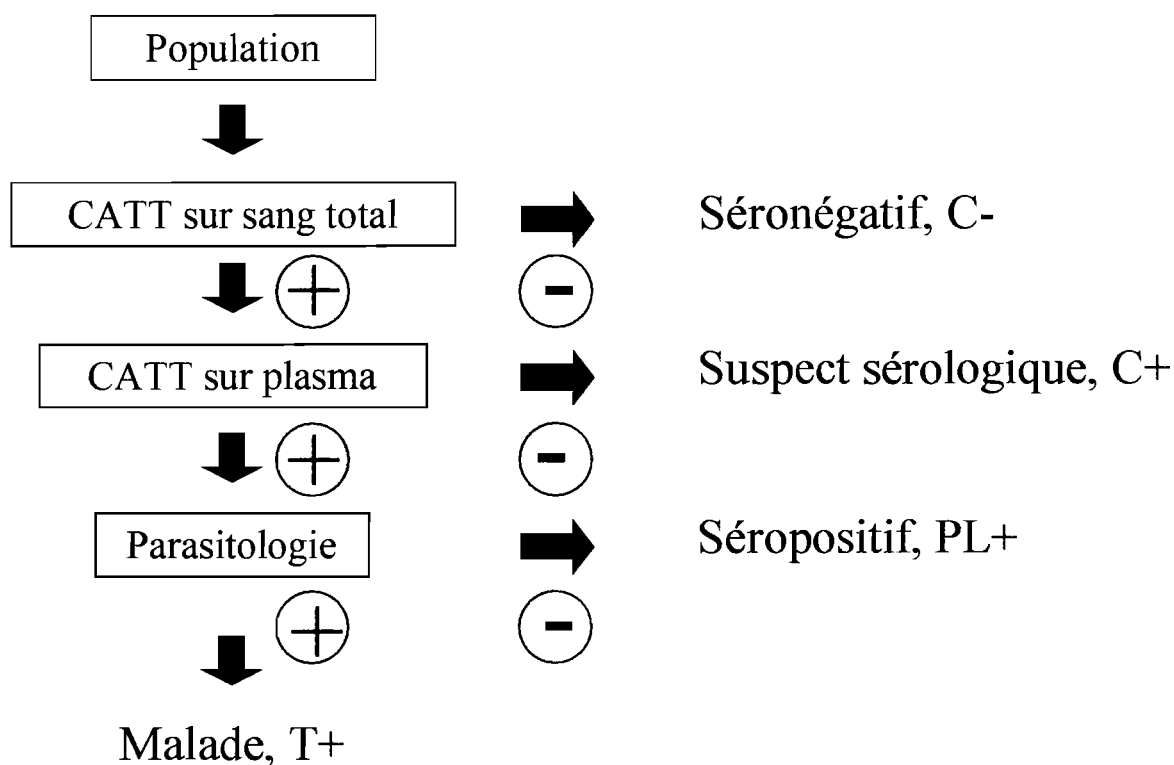


Figure 10. Schéma du mode de dépistage effectué lors des prospections médicales et terminologie employée

1. 2. 1. Inclusion des patients confirmés

Les six prospections médicales menées dans le cadre de cette étude (voir tableau 1) ont permis de visiter 55134 personnes et de dépister 265 malades. Parmi ces derniers, 129 ayant donné leur consentement ont été intégrés dans notre étude. Les plus faibles proportions de malades intégrés observées en Guinée sont dues à des problèmes de logistique concernant notamment la conservation et le transport des échantillons.

Tableau 1. Bilan des prospections médicales menées dans le cadre de l'étude, patients intégrés et retenus pour les étapes de caractérisation

Prospections médicales	Bonon 2000	Oumé 2001	Bonon 2002	Dubreka 2002	Boffa 2002	Bonon 2004	Total
Personnes visitées	15289	8071	8284	5327	9637	8526	55134
Nombre de séropositifs (PI+)	170	46	96	76	153	102	643
Séroprévalences	1,11	0,56%	1,16%	1,40%	1,60%	1,20%	1,16%
Patients Dépistés (T+)	74	7	33	40	91	20	265
Prévalences	0,48%	0,09%	0,40%	0,75%	0,90%	0,23%	0,48
Patients intégrés	38	7	33	10	31	10	129
Patients retenus*	18	2	14	7	20	10	71

*Patients retenus, pour lesquels une souche a été isolée

1. 2. 2. Inclusion des séropositifs et suspects sérologiques

Des sujets séropositifs (PI+) et des suspects sérologiques (C+) ont été identifiés lors de la prospection médicale de Bonon 2004. Quinze PI+ parmi les 38 PI+ et les 9 C+ positifs en PCR (troisième partie, article 2) ont été inclus dans notre étude.

Le tableau 2 liste l'ensemble des patients (T+, PI+ et C+) retenus pour cette étude. Sont indiqués pour chacune, si un isolat sur KIVI a été réalisé lors de la prospection médicale (KIVI pm) et/ou au centre de traitement (KIVI tt), si une inoculation à des souris a été effectuée (IR pm), ou si des échantillons biologiques ont été récoltés (EB). Par la suite, les souches seront répertoriées par le numéro du patient suivi de son mode d'isolement ou de récolte. Par exemple : S1/1/6 KIVI pm et S1/1/6 KIVI tt.

Tableau 2. Liste de la totalité des patients retenus pour la caractérisation génétique des trypanosomes

Patient	Foyer	Année	Statut	KIVI pm	KIVI tt	IR pm	EB pm
40/1	Bonon	2000	T+	+	+	+	NF
402/1	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
B12/2/8	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
B3/1/3	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
DF1/4	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
F41/7/2	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
F5/1 OM	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
F7/1/2	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
G10/6/2	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
G11/6/4	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
G11/8/2	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
G17/6/1	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
G3/10/25	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
S24/7/9	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
S27/16/13	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
S27/2/6	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
S3/4/1	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
T66/4/2	Bonon	2000	T+	+	+	NF	NF
T33/1/7	Bonon	2000	T+	+	-	+	NF
B17/2	Oumé	2001	T+	+	+	NF	NF
CP1/2	Oumé	2001	T+	+	+	NF	NF
S1/1/6	Bonon	2002	T+	+	NF	+	NF
S12/9/5	Bonon	2002	T+	+	NF	+	NF
S14/5/1	Bonon	2002	T+	+	NF	+	NF
S7/2/2	Bonon	2002	T+	+	NF	+	NF
T41/4/14	Bonon	2002	T+	+	NF	+	NF
TT2/4	Bonon	2002	T+	+	NF	+	NF
TT22/1	Bonon	2002	T+	+	NF	+	NF
P2/2	Bonon	2002	T+	+	NF	-	NF
S15/1/1 P	Bonon	2002	T+	+	NF	-	NF
T59/3/16	Bonon	2002	T+	+	NF	-	NF
TT31/1 P	Bonon	2002	T+	+	NF	-	NF
TT8/2 P	Bonon	2002	T+	+	NF	-	NF
163/1 R	Bonon	2002	T+	-	NF	+	NF
Cb5/1 R	Bonon	2002	T+	-	NF	+	NF
3 Année/2	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Dob 1/2	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Dob 7/11	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Guen 4/1	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Lab 13/5	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Lab 15/2	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Lab 27/4	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Lac 11/1	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Lac 14/3	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Lac 22/10	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Lac 22/11	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Sac 23/3	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF

Souc 1/2	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Thic 29/7	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Wab 18/23	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Wab 22/6	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Wab 6/1	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Wab 6/2	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Yenb 3/17	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
Yenb 41/2	Boffa	2002	T+	+	NF	NF	NF
4 Année/3	Dubreka	2002	T+	+	NF	NF	NF
Bro7/16	Dubreka	2002	T+	+	NF	NF	NF
Kac 4/10	Dubreka	2002	T+	+	NF	NF	NF
Kanb 16/16	Dubreka	2002	T+	+	NF	NF	NF
Kanb 28/2	Dubreka	2002	T+	+	NF	NF	NF
Kanb 9/5	Dubreka	2002	T+	+	NF	NF	NF
Khob 34/1	Dubreka	2002	T+	+	NF	NF	NF
B4/F303	Bonon	2004	T+	+	NF	+	+
B4/G27	Bonon	2004	T+	+	NF	+	+
B4/I314	Bonon	2004	T+	+	NF	-	+
B4/U163	Bonon	2004	T+	+	NF	-	+
B4/I315	Bonon	2004	T+	-	NF	+	+
B4/E120	Bonon	2004	T+	-	NF	-	+
B4/E427	Bonon	2004	T+	-	NF	-	+
B4/G13	Bonon	2004	T+	-	NF	-	+
B4/I245	Bonon	2004	T+	-	NF	-	+
B4/I36	Bonon	2004	T+	-	NF	-	+
BL17	Bonon	2004	C+	NF	NF	NF	+
BL11	Bonon	2004	C+	NF	NF	NF	+
BL52	Bonon	2004	C+	NF	NF	NF	+
BL47	Bonon	2004	C+	NF	NF	NF	+
BL18	Bonon	2004	C+	NF	NF	NF	+
B4/D515	Bonon	2004	C+	NF	NF	NF	+
B4/E337	Bonon	2004	C+	NF	NF	NF	+
B4/G541	Bonon	2004	C+	NF	NF	NF	+
B4/F136	Bonon	2004	C+	NF	NF	NF	+
B4/H272	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/I351	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/J520	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/U1	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/U184	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/G128	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/U197	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/G126	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/U27	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/R307	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/U309	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/RA313	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/D154	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/Q18	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+
B4/U70	Bonon	2004	PI+	NF	NF	NF	+

KIVI = Kit for In Vitro Isolation of trypanosomes ; KIVI pm = KIVI effectué lors de la prospection médicale ; KIVI tt = KIVI effectué au centre de traitement ; IR = Inoculation au Rongeur, EB = Echantillon Biologique ; T+ = patients confirmés, Pl+ = séropositif ; C+ = suspect sérologique ; NF = Non Fait ; + = échantillon disponible; - = échantillon non disponible

Au total 84 souches isolées sur KIVI, 14 souches isolées par IR, 10 EB provenant de patient (T+) et 24 EB provenant de sujets positifs en sérologie mais non confirmés T+ (Pl+ et C+) ont été analysés.

1. 2. 3. Souches de référence

Des souches de référence de trypanosomes ont été utilisées pour comparer les deux techniques MLEE et PCR/Microsatellites : une souche de *T. congolense* et 19 souches de l'espèce *T. brucei* s.l.: sept souches appartenant au groupe 1 de *T. b. gambiense*, sept souches appartenant au groupe « bouaflé », trois souches de la sous-espèce *T. b. brucei*, et deux souches appartenant à *T. b. rhodesiense*. Ces souches sont référencées dans le tableau 3.

Tableau 3. Souches de référence identifiées par MLEE et PCR/Microsatellite

Souches	Forme	Hôte	Origine	Année d'isolement	Espèce	Ref.
Jua	Procyclique	Homme	Cameroun	1979	Tbg1	1
Peya	Procyclique	Homme	Congo	1980	Tbg1	1
A005	Procyclique	Homme	Cameroun	1988	Tbg1	1
Dal972	Procyclique	Homme	CI	1986	Tbg1	1
OK	Sanguicole	Homme	Congo	1974	Tbg1	1
2561	Procyclique	Homme	CI	1997	Tbg1	2
D12K	Sanguicole	Homme	Congo	1980	Tbg1	3
TH113	Procyclique	Homme	CI	1978	Tbbfl	4
TSW65	Procyclique	Porc	CI	1982	Tbbfl	1
TSW53	Sanguicole	Porc	CI	1982	Tbbfl	1
Ligo	Sanguicole	Homme	CI	1984	Tbbfl	5
Abba	Sanguicole	Homme	CI	1983	Tbbfl	5
TH2	Procyclique	Homme	CI	1978	Tbbfl	6
Biyamina	Sanguicole	Homme	Soudan	1982	Tbbfl	3
FeoS	Sanguicole	Homme	Togo	1961	Tbb	7
Eatro 1125	Procyclique	Bushbuck	Uganda	1966	Tbb	5
Stib 215	Procyclique	Lion	Tanzanie	1971	Tbb	8
TRPZ166	Procyclique	Zébu	Zambie	1982	Tbrh	4
LVH143	Sanguicole	Homme	Kenya	1982	Tbrh	4
TSW103	Sanguicole	Porc	Liberia	1977	Tcong	9

CI, Côte d'Ivoire ; Tbg1, groupe 1 de *Trypanosoma brucei gambiense*; Tbbfl, *Trypanosoma brucei* groupe bouaflé; Tbb, *Trypanosoma brucei brucei*; Tbrh, *Trypanosoma brucei rhodesiense*; Tcong, *Trypanosoma congolense*, Ref.: 1, Stevens et al., (1992); 2, Jamonneau et al., (2000a); 3, Godfrey et al., (1990); 4, Mathieu-Daudé et al., (1994); 5, Hide et al., (1990); 6, Melhitz (1982); 7, Tait et al., (1984); 8, Gibson (1986); 9, Gashumba et al., (1988).

1. 3. Isolement et culture des trypanosomes

L'isolement des trypanosomes s'est fait sur rongeur (IR, Babiker & Le Ray, 1981) qui permet d'isoler puis de cultiver *in vivo* des formes sanguicoles de trypanosomes, et par la méthode KIVI (Kit for *In Vitro* Isolation of trypanosomes, Aerts *et al.*, 1992, Truc *et al.*, 1992) qui consiste à transformer les formes sanguicoles en formes procycliques facilement cultivables *in vitro* sur milieu axénique.

1. 4. L'électrophorèse des isoenzymes (MLEE)

Il existe actuellement environ 30 systèmes enzymatiques qui ont été adaptés à la caractérisation des trypanosomes. Malheureusement, certains de ces systèmes sont complètement monomorphes quand il s'agit de caractériser les trypanosomes de l'espèce *T. brucei* s.l., et certains ne génèrent qu'un très faible polymorphisme très peu informatif. Huit systèmes enzymatiques, représentant 11 loci, ont été sélectionnés sur la base de résultats obtenus lors d'études antérieures (loci les plus polymorphes, Truc *et al.*, 1991 ; 1997a ; 1997b ; Jamonneau *et al.*, 2000a ; 2002): ALAT, GOT, Nhi (2 loci, Nhi1 et Nhi2), Nhd, ME (2 loci, ME1 et ME2), PEP-2, IDH, (réalisés selon les protocoles décrits par Truc *et al.* (1991) et Truc et Tibayrenc (1993)) et SOD (2 loci, SODa et SODb, réalisés selon le protocole décrit par Stevens *et al.* (1989)). Les noms et les codes de ces enzymes sont donnés dans le tableau 4.

Tableau 4. Sigles, noms et codes d'identification (EC = Enzyme Commission) des 8 systèmes enzymatiques étudiés

Sigle	Nom	Code EC
ALAT	Alanine aminotransférase	EC 2.6.1.2
GOT	Glutamate oxaloacétate transaminase	EC 2.6.1.1
Nhi	Nucléoside hydrolase (substrat = Inosine)	EC 3.2.2.1
Nhd	Nucléoside hydrolase (substrat = Déoxyinosine)	EC 3.2.2.1
ME	Enzyme malique	EC 1.1.1.40
PEP-2	Peptidase (substrat = L-Leucyl-L-Alanine)	EC 3.4.11 ou 13
IDH	Isocitrate déshydrogénase	EC 1.1.1.42
SOD	Super oxyde dismutase	EC 1.15.1.1

1. 5. L'amplification de l'ADN microsatellite

Cette technique a été appliquée à toutes les souches isolées (KIVI et/ou IR) et échantillons biologiques (EB) prélevés dans le cadre de notre étude, ainsi qu'à l'ensemble des souches de référence.

Des marqueurs ont déjà été définis lors d'études antérieures cherchant à différencier les différentes espèces et sous-espèces de trypanosomes d'intérêts médical et vétérinaire. Certains d'entre eux nous sont apparus potentiellement informatifs dans le cadre de notre étude, comme M6C8 CA et MT3033 AC/TC (Biteau *et al.*, 2000) et TRBPA1/2 (Truc *et al.*, 2002) que nous avons utilisés. Nous avons aussi défini sept nouveaux couples d'amorces à partir des banques de données du séquençage de *T. brucei* disponibles sur le site www.sanger.ac.uk, Welcome Trust Sanger Institute. Nous avons donc utilisé 10 couples d'amorces (ou loci) pour la caractérisation par PCR/Microsatellites. La description de chacun de ces couples d'amorces est donnée dans le tableau 5.

Tableau 5. Description des 10 couples d'amorces utilisés pour la caractérisation par PCR/Microsatellites

Amorces	Motif répété	Séquences (5'-3')	Localisation chromosomique
Micbg1	(CA) _n	TAACCCCAAATGCTCTCCCC CACACCACAGCCAATTCCGCC	II (T. brucei)
Micbg4	(AT) _n	CCATTTGTTACAGCCACAAAGTT GACGGCTTCATCATCGGGGG	II (T. brucei)
Micbg5	(AT) _n	CAAAGCAAAGGAGAAGCGTGA CCCAGTTGGACTTGTTAACGGT	X (T. brucei)
Micbg6	(AC) _n (AT) _n	CGGTGTAGTGGCATTCCGGT GCTCGCCGCCTCATGAGGTG	XI (T.b. g.)
Misatg4	(CA) _n	GAAGTAACTCTATACGGGTGG GTTTTCCCTTGTTGTAATC	XI (T.b. g.)
Misatg8	(AC) _n (AT) _n (GT) _n	TGGTGCACCTCCGTGTCCTG GCCGCCAGCACCTCACACGC	IV (T. brucei)
Misatg9	(AC) _n	GAGCTCTTACTTATTGCCCGTCT GTGGGGAAGAACAAGCAGA	V (T.b. g.)
M6C8	(CA) _n	CTTTC AACCGCCTTATCAGC GGCTAGTTACACTGTAGTTCTC	XI (T.b. g.)
MT3033	(AC/TC) _n	GAGTGACAATGGTGAAGATCG TTTTCTTTGGTGCTTGTGAG	X (T.b. g.)
TRBPA1/2	(AACCTG) _n	GCGCCGACGATACCAATGG AACGGATTCAGCGTTGCAG	X (T.b. g.)

La spécificité de ces amorces a été testée en les comparant avec les séquences disponibles dans les banques: aucune homologie n'a été trouvée avec les génomes humain et murin, ni avec d'autres parasites (plasmodium, leishmania). De même, aucun produit d'amplification n'a été obtenu avec *T. congolense*.

L'amplification par PCR est réalisée dans un thermocycleur PTC-100 TM (MJ Research Inc., Etats-Unis). La PCR est effectuée dans un volume final de 50 µl contenant 10 pmol de chaque amorce, 0.2 mM de chaque désoxyribonucleotide (dNTP), 1X de tampon d'enzyme contenant 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 unité de Taq polymerase (MP Biomedicals, Ilkirch, France) et 10 µl d'échantillon d'ADN extrait avec le DNeasy[®] Tissue kit (Qiagen). Les réactions de PCR ont été optimisées pour chacun des couples d'amorces :

- pour les loci Micbg1, Micbg4, Micbg5, Micbg6, Misatg8 et TRBPA : après dénaturation à 95° C pendant 3 min., 40 cycles avec dénaturation à 95° C de 30 sec., un

annealing à 60° C de 30 sec., une élongation à 72° C de 1 min., suivis d'une élongation finale de 5 min. à 72° C.

- pour les loci Misatg4 et Misatg9 : après dénaturation à 95° C pendant 3 min., 2 cycles avec dénaturation à 95° C de 30 sec., un annealing à 60° C de 30 sec., une élongation à 72° C de 1 min., puis 38 cycles avec dénaturation à 95° C de 30 sec., un annealing à 56° C de 30 sec., une élongation à 72° C de 1 min., suivis d'une élongation à 72° C de 5 min.

- pour les loci M6C8 et MT3033 : après dénaturation à 95° C pendant 3 min., 2 cycles avec dénaturation à 95° C de 30 sec., un annealing à 60° C de 30 sec., une élongation à 72° C de 1 min., puis 38 cycles avec dénaturation à 95° C de 30 sec., un annealing à 55° C de 30 sec., une élongation à 72° C de 1 min., suivis d'une élongation à 72° C de 5 min.

Après vérification de l'amplification sur gel d'agarose, les fragments amplifiés ont été séparés sur gel d'acrylamide 10 % non dénaturant

1. 6. Détection d'infections multiples

In vitro : deux souches présentant des profils distincts avec toutes les amorces, S12/9/5 IR pm (*T. b. gambiense* groupe 1), et Biyamina (souche de référence du groupe bouaflé) ont été utilisées. Les ADN ajustés à 10ng/μl ont été mélangés à des rapports 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000.

In vivo : un stabilat de chaque souche a été décongelé puis dilué dans du PSG 2% afin d'obtenir pour chaque souche une parasitémie de $10^{7.5}$ parasites/ml. Les deux dilutions de souches ont été mélangées en quantité égale et injectées à 10 souris immunodéprimées à raison de 0.3ml par souris i.p. La parasitémie des souris a été contrôlée quotidiennement pendant 14 jours à partir du premier jour suivant l'injection, et quelques gouttes de sang caudal ont été récoltées.

1. 7. Analyses de génétique des populations

Les résultats obtenus par les deux techniques de caractérisation utilisées : MLEE et PCR/Microsatellites ont été analysés par :

1. 7. 1. Analyse cladistique

La matrice des distances de Jaccard (Jaccard, 1908) a été élaborée par le logiciel Phyltools (version 1.32, Buntjer, J. B), et les relations phylogéniques ont été établies par i) une méthode phnétique : des dendrogrammes construits à partir de la matrice de distances ont été élaborés selon le procédé UPGMA = Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Averages (Sneath & Sokal, 1973) à l'aide du logiciel Phylip (Felsenstein, 1993, 3.5C ed. Seattle. WA. Departement of Genetics, University of Washington) et visualisés grâce au logiciel Treeview (Page, 1996) ; ii) une méthode de parcimonie : des arbres évolutifs consensus, construits à partir d'arbres obtenus par la méthode du maximum de parcimonie de Wagner, (Wagner, 1961), ont été élaborés et visualisés par les mêmes logiciels.

1. 7. 2. Indice de fixation de Wright

Dans le cas d'une population stratifiée en trois niveaux hiérarchiques (individus réunis en sous-populations d'une grande population totale), nous pouvons définir les trois F-statistiques de Wright (ou indices de fixation de Wright) (Wright, 1965). Le F_{IS} (I pour individus et S pour sous-populations) est une mesure de la part d'homozygotie qui provient d'une déviation par rapport au régime de reproduction panmictique idéale dans les sous-populations (rencontre au hasard des gamètes dans chaque sous-population), on dit souvent aussi que le F_{IS} mesure le déficit en hétérozygotes local moyen (sur l'ensemble des sous-populations). Le F_{ST} mesure l'effet Wahlund (ou structuration des populations), c'est-à-dire la part d'homozygotie des individus de la population totale (d'où l'indice T) provenant de la subdivision de ces derniers en sous-populations de tailles limitées (indice S), on dit aussi qu'il mesure la différenciation génétique entre sous populations. En fin le F_{IT} mesure

l'homozygotie des individus de la population totale résultant des deux précédents phénomènes.

1. 7. 3. La mesure du déséquilibre de liaison

On parle de déséquilibre de liaison lorsque les différents allèles aux différents loci ne paraissent pas s'associer au hasard. En effet, de façon idéale lorsque deux loci à deux allèles chacun (allèles A et a au premier locus et allèles B et b au deuxième locus) sont en équilibre de liaison, alors le gamète AB survient en probabilité avec une fréquence $P_{AB} = P_A P_B$ dans la population, P_A et P_B étant les fréquences alléliques de A et de B respectivement dans la population. Dans le cas contraire $P_{AB} = P_A P_B + D$, où D est le déséquilibre de liaison entre les deux loci. Un déséquilibre de liaison significatif suggère soit une liaison physique entre les deux loci (s'ils sont très proches, par exemple), soit un système de reproduction non panmictique (absence ou manque de recombinaison).

Les mesures du F_{IS} (mesure de la variabilité intra-populations), du F_{ST} (mesure de la variabilité inter-populations), du F_{IT} ainsi que la mesure du déséquilibre de liaison ont été déterminées par le logiciel F-STAT version 2.9.4.(Goudet, 1995).

2. Résultats

2. 1. Caractérisation isoenzymatique

L'ensemble des souches isolées par KIVI et par IR ainsi que les souches de référence ont été caractérisées par MLEE. Tous les loci (11) se sont avérés polymorphes. Le moins polymorphe, *Nhi2*, et le plus polymorphe, *SODb*, ont généré respectivement deux et huit phénotypes différents. Les souches présentant les mêmes profils électrophorétiques ont été regroupées en zymodèmes (Tableau 6). En tenant compte de l'ensemble des 11 loci étudiés, les 20 souches de référence se répartissent dans 16 zymodèmes différents. Les 98 souches isolées lors de la phase d'échantillonnage se répartissent dans cinq zymodèmes : un zymodème regroupe la majorité des souches de référence de *T. b. gambiense* groupe I, l'ensemble des 84 souches isolées sur KIVI ainsi qu'une seule souche isolée par IR (T33/1/7 IR pm) ; les 13 autres souches IR se répartissent dans les 4 autres zymodèmes. Des différences entre souche KIVI et souche IR isolées d'un même patient semblent confirmer le biais sélectif des techniques d'isolement et l'existence d'infections mixtes. Cependant, ces différences seraient uniquement dues à un polymorphisme des loci GOT et PEP-2. Les souches KIVI présentent un profil GOT « 5-7-8 » et PEP-2 « 1-2-4 » alors que les souches IR (sauf T33/1/7 IR pm) ont un profil GOT « 8 » et un profil PEP-2 « 4 » ou « 2-4 ». Des problèmes de reproductibilité des profils obtenus à ces deux loci indiquent que la différence phénotypique observée entre souche KIVI et souche IR isolées d'un même patient ne reflète pas une différence génotypique. Ces problèmes peuvent être dus à : **i)** la faible virulence sur rongeurs des souches du groupe 1 de *T. b. gambiense* qui a rendu difficile la production de masse des trypanosomes, les culots récoltés étant souvent de petite taille altérant ainsi la qualité des extraits enzymatiques. Ainsi, la seule souche IR appartenant au Z1 (T33/1/7 IR pm, profils GOT « 5-7-8 » et PEP-2 « 1-2-4 », reproductibles, est celle pour laquelle on a obtenu le plus gros culot de trypanosomes ; **ii)** une différence d'expression et/ou d'activité enzymatique entre les formes procycliques (souches KIVI) et les formes sanguicoles (souches IR). Par exemple au locus GOT, les profils « 5-7-8 » observés pour les souches IR ont montré

une bande 8 très intense et des bandes 5 et 7 très faibles mais présentes. L'activité de l'enzyme « 8 » a donc tendance à masquer celle des enzymes « 5 » et « 7 ».

L'analyse des résultats a été refaite sans tenir compte des loci GOT et PEP-2. Sur la base des 9 loci restants, on constate que les souches de référence se répartissent exactement dans les mêmes zymodèmes (Z1, et Z6 à Z21). Mais les 98 souches isolées ne se rassemblent plus que dans les zymodèmes Z1 et Z2 ; le Z1 regroupe la quasi totalité des souches (84 isolées sur KIVI, 12 des 14 souches isolées par IR). Un seul polymorphisme au niveau du locus SODa permet de différencier le Z1 du Z2 (Tableau 6), et cette fois-ci de manière reproductible. De même les deux seules souches de référence du groupe 1 de *T. b. gambiense* n'appartenant pas au Z1 (DAL 972 = Z9 et 2561 = Z10) ne diffèrent du Z1 que par un seul locus (IDH pour DAL 972 et ME2 pour 2561). Tous ces résultats confirment l'appartenance des souches isolées en Côte d'Ivoire et en Guinée au groupe 1 de *T. b. gambiense* ainsi que l'importante homogénéité génétique au sein de ce groupe. Ils confirment également la grande hétérogénéité des groupes bouaflé, *T. b. brucei* et *T. b. rhodesiense* (toutes les souches de ces groupes diffèrent sur au moins deux loci) ainsi que la spécificité de certains profils SODa (toutes les souches du groupe 1 de *T. b. gambiense* ont un profil SODa 3-6-7-12-14 ou 3-6-7-11-12 alors que la plupart des autres souches ont un profil SODa 1-2-5-11-13) (Tableau 6).

Aucune différence n'a été mise en évidence par MLEE entre les souches isolées sur KIVI en Côte d'Ivoire et celles isolées en Guinée. De même, on n'observe aucune différence entre les souches KIVI pm et KIVI tt. Les deux seules souches de notre échantillonnage identifiées comme appartenant au Z2 sont des souches IR (TT2/4 IR pm et 163/1 IR pm). Ce zymodème ne semble isolable que par IR (deux succès sur 14 par IR et aucun succès sur 84 par KIVI). Nos résultats montrent également une différence entre la souche TT2/4 KIVI pm (Z1) et la souche TT2/4 IR pm (Z2), toutes deux isolées du même patient, suggérant l'existence d'une infection mixte chez ce patient et d'une aptitude différentielle de l'une ou de l'autre des souches à croître dans un milieu à un moment donné.

Tableau 6 : Résultats bruts de la caractérisation par MLEE de l'ensemble des souches isolées dans le cadre de l'étude et des souches de référence.

N° de souches	Systèmes enzymatiques											Zymodèmes
	Nhd	ALAT	IDH	ME1	ME2	Nhi1	Nhi2	SODa	SODb	GOT	PEP-2	Z
40/1 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	8	2-4	1
40/1 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
40/1 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
402/1 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
402/1 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
B12/2/8 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
B12/2/8 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
B3/1/3 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
B3/1/3 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
DF1/4 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
DF1/4 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
F41/7/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
F41/7/2 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
F5/1 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
F5/1 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
F7/1/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
F7/1/2 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
G10/6/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
G10/6/2 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
G11/6/4 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
G11/6/4 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
G11/8/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
G11/8/2 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
G17/6/1 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
G17/6/1 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
G3/10/25 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
G3/10/25 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
S24/7/9 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
S24/7/9 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
S27/16/13 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
S27/16/13 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
S27/2/6 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
S27/2/6 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
S3/4/1 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
S3/4/1 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
T66/4/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
T66/4/2 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
T33/1/7 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
T33/1/7 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
B17/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
B17/2 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
CP1/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
CP1/2 KIVI tt	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
S1/1/6 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
S1/1/6 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	8	1-2-4	1
S12/9/5 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
S12/9/5 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	8	4	1
S14/5/1 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1

S14/5/1 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	8	4	1
S7/2/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
S7/2/2 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	8	4	1
T41/4/14 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
T41/4/14 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	8	4	1
TT2/4 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
TT2/4 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-11-12	3-5	8	2-4	2
TT22/1 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
TT22/1 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	8	2-4	1
P2/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
S15/1/1 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
T59/3/16 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
TT31/1 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
TT8/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
163/1 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-11-12	3-5	8	2-4	2
Cb5/1 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	8	2-4	1
3année/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Dob 1/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Dob 7/11 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Guen 4/1 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Lab 13/5 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Lab 15/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Lab 27/4 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Lac 11/1 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Lac 14/3 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Lac 22/10 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Lac 22/11 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Sac 23/3 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Souc 1/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Thic 29/7 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Wab 18/23 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Wab 22/6 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Wab 6/1 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Wab 6/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Yenb 3/7 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Yenb 41/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
4année/3 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Brob 7/16 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Kac 4/10 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Kanb 16/16 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Kanb 28/2 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Kanb 9/5 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Khob 34/1 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
B4/F303 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
B4/F303 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	8	4	1
B4/G27 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
B4/G27 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	8	4	1
B4/I314 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
B4/U163 KIVI pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
B4/I315 IR pm	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	8	4	1
A005	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
Eatro 1125	8-9	5-6	5-6-7	2	1	3	3	1-2-5-11-13	1-3-4-7	3-4-5	1-2-4	3
Biyamina cl B	9	6-7-8	5	2	1	3	3	1-2-5-11-13	3-5-7	8	2-4	4
Stib 215	9-12	6-7-8	5-6-7	Abs	1	4	3	1-2-5-10-11-13	3-5	5-7-8	2-4	5
TH2	9	6	5	2	1-2-3	3	3	1-2-5-11-13	3-7	5-7-8	1-2-4	6

<i>D12K</i>	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	4-8	4	1
<i>Féo</i>	9	6-7-8	5-6-7	2	1	3	3	1-2-5-11-13	1-3-4-7	8	4	7
<i>LVH 143</i>	9-12	5-6	5	2	1	3	3	1-2-5-11-13	1-2-4	8	1-2-4	8
<i>OK</i>	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	4-8	4	1
<i>Dal 972</i>	9	6-7-8	Abs	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	9
<i>2561</i>	9	6-7-8	5	2	3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	10
<i>TSW65</i>	9-11	5-6	5	2	1	3	3	1-2-5-11-13	3-7	5-7-8	1-2-4	11
<i>TSW53</i>	9-11	4-5-6	5	2	1	3	3	2-3-6-12-14	3-7	8	2-4	12
<i>Peya</i>	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
<i>Jua</i>	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	3-6-7-12-14	3-5	5-7-8	1-2-4	1
<i>TH113</i>	9-11	5-6	5	2	1	3	3	1-2-5-11-13	3-5	5-7-8	1-2-4	13
<i>TRPZ166</i>	8-9	5-6	6	2	1	3	3	1-2-5-11-13	2-4	5-7-8	1-2-4	14
<i>TSW103</i>	2-3-4	3	5	3-4-5	Abs	3	1	4-12	1-4	4	7-9	15
<i>Abba</i>	9	6-7-8	5	2	1-2-3	3	3	1-2-5-11-13	3-5-6-7	5-7-8	4	16
<i>Ligo</i>	9	4-5-6	5	2	1-2-3	3	3	1-2-5-11-13	3-5-6-7	8	4	17

Abs = absence de bande

Z = zymodèmes obtenus en tenant compte de l'ensemble des 9 loci (Z1 à Z17)

2. 2. Caractérisation par PCR/Microsatellites

2. 2. 1. Analyse descriptive des marqueurs microsatellites

Les 10 couples d'amorces ont été testés, et deux d'entre eux (*Misatg8* et *Micbg4*) produisant des profils difficilement interprétables sur gel d'acrylamide, ont été exclus de la suite de l'étude. Les huit couples d'amorces restants ont été utilisés sur l'ensemble des souches isolées par KIVI (*KIVI pm* et *KIVI tt*) et par IR, aux souches de référence et à l'ensemble des échantillons biologiques (EB) provenant des T+ (patients confirmés), PI+ (séropositifs) et C+ (suspects sérologiques). Des dédoublement de bandes ont été observés sur gel d'acrylamide (voir le gel représenté figure 12). Cela pourrait être du à un bégaiement de la Taq polymérase, phénomène souvent observé lors d'études sur d'autres types d'organismes. Pour uniformiser la lecture des profils nous avons toujours considéré la bande la plus basse du dédoublement qui est en général la plus intense.

Tous les marqueurs se sont montrés très polymorphes avec un nombre d'allèles variant de 12 (*Micbg6*) à 28 (*M6C8*). Les tailles des allèles varient de 075 à 310 pb (Tableau 7).

Tableau 7: Nombre et taille des allèles obtenus avec les 8 marqueurs microsatellites utilisés

Marqueurs	Nombre d'allèles	Nombre d'allèles de <i>T. b. g 1</i>	Taille des allèles en pb
Micbg1	19	7	136-310
Micbg5	15	6	166-238
Micbg6	12	2	162-266
Misatg4	20	7	87-309
Misatg9	23	13	116-256
M6C8	28	13	075-275
MT3033	17	5	122-196
TRBPA1/2	19	8	129-275

Comparée aux MLEE, la PCR/Microsatellites montre un plus grand polymorphisme allélique. Ainsi, les 101 souches qui composent le zymodème Z1 et les deux souches du zymodème Z2 présentent plusieurs profils multilocus (microdèmes) différents en PCR/Microsatellites. Les loci Micbg1, Micbg5, Misatg4, Misatg9, M6C8, MT30/33 et TRBPA1/2 se sont montrés plus polymorphes comparés au locus Micbg6 appliqués aux échantillons de notre étude. Mais tous les loci se sont montrés très polymorphes pour les souches de référence n'appartenant pas au groupe 1 de *T.b. gambiense* groupe 1. Il faut noter que le nombre importants d'allèles générés à ces huit loci est largement du aux polymorphismes observés sur ces souches de référence (Figure 11).

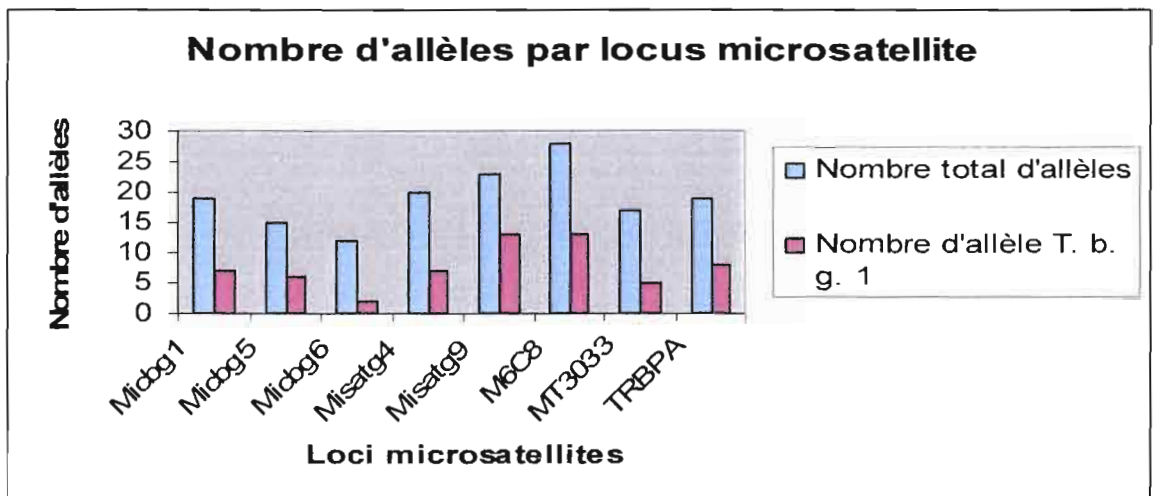


Figure 11: Comparaison du nombre d'allèles générés par le groupe 1 de *T. b. gambiense* au nombre d'allèles total par locus microsatellite.

Le polymorphisme mis en évidence au sein du groupe 1 de *T. b. gambiense* permet d'analyser la distribution des différents génotypes dans ce groupe. Les résultats décrits ci-dessous se basent uniquement sur des observations faites à partir des tableaux 8, 9 et 10 résumant les résultats bruts obtenus par PCR/Microsatellites.

2. 2. 2. Microsatellites et groupe 1 de *T. b. gambiense*

Les souches de référence n'appartenant pas au groupe 1 de *T. brucei gambiense* ont montré des profils alléliques différents de ceux obtenus avec les souches de ce groupe 1 dans la plus part des cas (il y a quelques cas rares comme la souche Biyamina du groupe bouaflé qui présente des allèles spécifiques du groupe 1 de gambiense avec les marqueurs Misatg9 et TRBPA).

Si on considère chaque locus un à un, on remarque :

- pour le locus Micbg1, toutes les souches isolées en Côte d'Ivoire (KIVI ou IR) présentent le même profil : 162/194 qui est retrouvé sur huit souches isolées en Guinée ; les autres souches de Guinée présentant le profil : 164/200. Ces deux profils sont également

observés avec les souches de référence du groupe 1 de *T. b. gambiense* (sauf D12K et OK : 160/192).

- pour le locus *Micbg5*, toutes les souches isolées en Côte d'Ivoire (y compris deux souches de référence du groupe 1) présentent le même profil : 170/226, à l'exception de TT2/4 IR pm (174/226) alors que toutes les souches isolées en Guinée présentent sans exception le profil : 172/226.

- pour le locus *Micbg6*, toutes les souches isolées dans le cadre de notre étude ainsi que toutes les souches de référence du groupe 1 de *T. b. gambiense* donnent un profil identique : 182/266.

- pour les loci *Misatg9* et *Misatg4* beaucoup plus polymorphes, on observe que les allèles 115 de *Misatg4* et 184 de *Misatg9* sont majoritaires en Côte d'Ivoire tandis que les allèles 121 et 176 respectivement de *Misatg4* et *Misatg9* sont majoritaires en Guinée. Cette observation est illustrée pour *Misatg9* en figure 12.

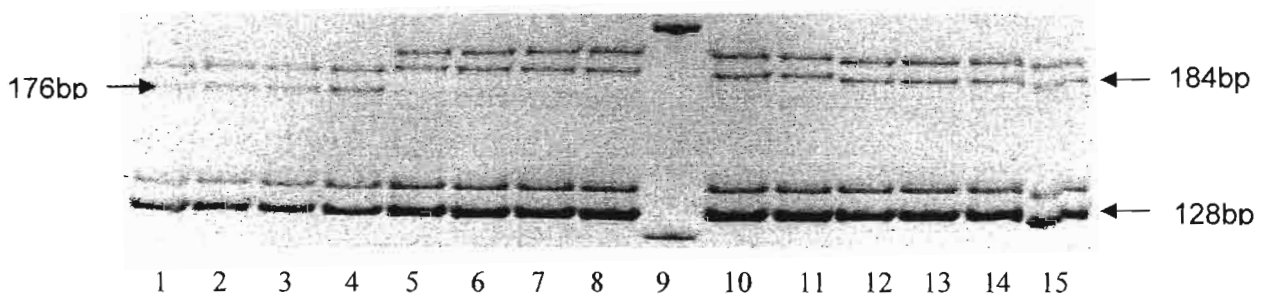


Figure 12 : Gel d'acrylamide obtenu au locus *Misat-g9* mettant en évidence des profils différents entre souches isolées de Guinée (puits 1 à 4) et souches isolées de Côte d'Ivoire (puits 5 à 8 et 10 à 15) (9 = marqueur PM (Φ X174/HaeIII))

- pour le locus *M6C8*, toutes les souches isolées dans le cadre de notre étude ainsi que toutes les souches de référence du groupe 1 de *T. b. gambiense* donnent un profil identique : 085/X (l'allèle X étant variable), à l'exception de la souche de référence Peya (083/157). Le cas de la souche Peya avait déjà été observé (Truc et *al.*, 2002).

- pour le locus *MT30/33*, toutes les souches isolées en Guinée ont donné le même profil : 158/178 et toutes et seulement ces souches ont un profil du type 158/x. Toutes les souches Isolées de Côte d'Ivoire ainsi que les souches de référence du groupe 1 de *T. b.*

gambiense ont un profil du type 154/x. Au niveau des échantillons biologiques trois individus se démarquent de ce profil 154/x et font exception aux résultats décrits par Biteau et *al.* (2000) : un profil où les deux allèles ont des tailles supérieures à 150 pb est spécifique du groupe 1 de *T. b. gambiense*. En effet les échantillons BL18, B4/U184 et B4/E427 présentent respectivement les profils 126/170, 146/166 et 126/170.

- pour le locus TRBPA1/2, la présence d'un allèle à 149 pb est spécifique du groupe 1 de *T. b. gambiense* (Truc et *al.*, 2002), mais son absence ne signifie pas une non appartenance à ce groupe. En effet, plusieurs souches de Guinée, deux souches de Côte d'Ivoire et deux souches de référence du groupe 1 de *T. b. gambiense* ne présentent pas cet allèle. Les deux souches de Côte d'Ivoire en question (TT22/1 KIVI pm et TT22/1 IR pm, (profil = 141/203) sont issues du même patient, ce qui confirme que la souche circulant chez ce patient est différente des autres souches circulant en Côte d'Ivoire. On remarque aussi que le profil 175/175 des souches isolées en Guinée ne provient que de Boffa comme si ce profil était spécifique de ce foyer.

Ces résultats indiquent que les marqueurs microsatellites, au-delà du polymorphisme qu'ils génèrent, sont très informatifs notamment en terme de diagnostic puisque certains d'entre eux sont spécifiques du groupe 1 de *T. b. gambiense* : les loci *Micbg5* et *Micbg 6* semblent générer des profils caractéristiques et nous confirmons les résultats de Biteau et *al.*, pour le loci *M6C8*. De plus, certains semblent diagnostiques d'origines géographiques comme *Micbg5* et *MT30/33*.

2. 2. 3. PCR/Microsatellites et comparaison de souches isolées d'un même patient

Des différences entre souches KIVI pm et KIVI tt isolées du même T+ ont été mises en évidence dans 11 cas sur 20 (voir tableau 8) alors qu'aucune différence n'avait été observée par MLEE. Dans trois de ces cas, G17/6/1, G3/10/25 et S24/7/9, la différence s'observe au niveau d'un seul locus (*Misatg9*) qui génère des allèles très proches (différence de 2 pb) et pourrait être due à un problème d'amplification ou à une mutation lors des phases d'isolement et de culture. En revanche, dans les huit autres cas, la différence est présente à plusieurs loci indépendants. Par exemple les souches G11/6/4 KIVIpm et G11/6/4 KIVItt donnent des profils différents avec les amorces *Misatg9*, *Misatg4*, *M6C8* et *MT30/33*. Ce résultat met en évidence des infections multiples (mélange de souches). Au moins deux

souches différentes, isolées successivement par KIVI (pm et tt) à quelques jours d'intervalle, circulaient chez ces patients.

Des différences entre souches KIVI pm et IR pm isolées d'un même T+ ont été mises en évidence dans 7 cas sur 11 (tableau 8) alors qu'un seul et unique cas avait été observé par MLEE pour TT2/4 KIVI pm et TT2/4 IR pm. Ces différences sont illustrées sur le gel présenté en figure 13 (puits 1 et 2, 3 et 4). Dans trois de ces cas, TT2/4, B4/F303 et B4/G27, la différence s'observe au niveau de plusieurs loci appartenant à des chromosomes non homologues et qui présentent des profils différents avec les amorces Misatg9, Misatg4, M6C8 et TRBPA1/2. Ceci semble aussi mettre en évidence des infections multiples : au moins deux souches différentes isolées simultanément par KIVI et IR, circulaient chez ces patients. Il ne semble pas exister de profils spécifiques des souches isolées par une technique ou par l'autre. La technique d'isolement semble exercer une sélection différentielle qui est fonction de l'aptitude de la souche à croître à un moment donné dans un milieu d'isolement donné.

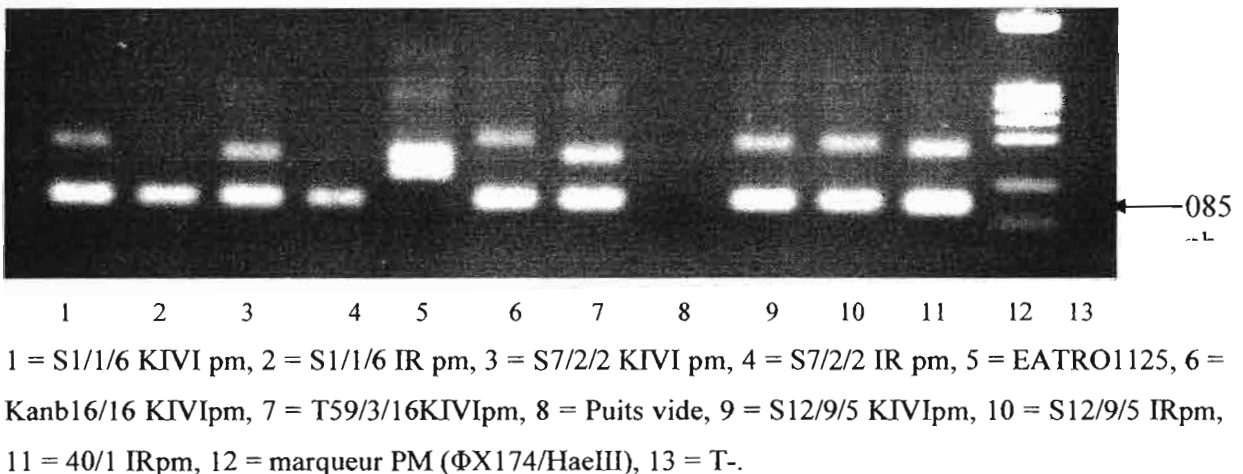


Figure 13: Exemple d'un gel d'agarose mettant en évidence une différence au niveau du locus M6C8 entre souches KIVI et IR isolées simultanément d'un même patient

Tableau 8 : Résultats bruts de la caractérisation par PCR/Microsatellites de l'ensemble des souches isolées dans le cadre de l'étude.

N° de souche	amorces microsatellites							
	Micbg1	Micbg5	Micbg6	Misatg9	Misatg4	M6C8	MT3033	TRBPA1/2
40/1 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154178	149203
40/1 IR pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154178	149203
40/1 KIVI tt	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154178	149203
402/1 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
402/1 KIVI tt	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
B12/2/8 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
B12/2/8 KIVI tt	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
B3/1/3 KIVI pm	162192	170226	182266	128184	115145	085157	154170	149203
B3/1/3 KIVI tt	162192	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
DF1/4 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
DF1/4 KIVI tt	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
F41/7/2 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
F41/7/2 KIVI tt	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
F5/10M KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
F5/10M KIVI tt	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
F7/1/2 KIVI pm	162194	170226	182266	128190	117149	085157	154190	149185
F7/1/2 KIVI tt	162194	170226	182266	128184	117149	085165	154190	149203
G10/6/2 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154178	149203
G10/6/2 KIVI tt	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154178	149203
G11/6/4 KIVI pm	162194	170226	182266	130190	117149	085157	154178	149185
G11/6/4 KIVI tt	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149185
G11/8/2 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
G11/8/2 KIVI tt	162194	170226	182266	130190	115145	085157	154178	149185
G17/6/1 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
G17/6/1 KIVI tt	162194	170226	182266	128186	115145	085165	154190	149203
G3/10/25 KIVI pm	162194	170226	182266	128186	115145	085165	154190	149203
G3/10/25 KIVI tt	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
S24/7/9 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
S24/7/9 KIVI tt	162194	170226	182266	128182	115145	085165	154190	149203
S27/16/13 KIVI pm	162194	170226	182266	128186	121145	085149	154190	149185
S27/16/13 KIVI tt	162194	170226	182266	128186	121145	085149	154190	149185
S27/2/6 KIVI pm	162194	170226	182266	130184	121145	085125	154190	149185
S27/2/6 KIVI tt	162194	170226	182266	130184	121145	085149	154190	149185
S3/4/1 KIVI pm	162194	170226	182266	128176	115145	085165	154190	149203
S3/4/1 KIVI tt	162194	170226	182266	130186	121147	085149	154190	149185
T66/4/2 KIVI pm	162194	170226	182266	128176	115145	085165	154190	149203
T66/4/2 KIVI tt	162194	170226	182266	128176	115145	085165	154190	149203
T33/1/7 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
T33/1/7 IR pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154178	149203
B17/2 KIVI pm	162194	170226	182266	128180	115145	085175	154190	149203
B17/2 KIVI tt	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
CP1/2 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
CP1/2 KIVI tt	162194	170226	182266	128180	115145	085175	154178	149167
S1/1/6 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085169	154178	149185
S1/1/6 IR pm	162194	170226	182266	128184	115145	085085	154178	149185
S12/9/5 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115143	085165	154178	149203
S12/9/5 IR pm	162194	170226	182266	128184	115143	085175	154178	149203
S14/5/1 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085175	154190	149203
S14/5/1 IR pm	162194	170226	182266	128184	115145	085175	154190	149203

S7/2/2 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154178	149185
S7/2/2 IR pm	162194	170226	182266	128184	115145	085085	154178	149185
T41/4/14 KIVI pm	162194	170226	182266	128176	115145	085165	154190	149203
T41/4/14 IR pm	162194	170226	182266	128176	115145	085165	154190	149203
TT2/4 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085157	154170	149185
TT2/4 IR pm	162194	174226	182266	128176	121143	085165	154170	149203
TT22/1 KIVI pm	162194	170226	182266	128176	115145	085165	154190	141203
TT22/1 IR pm	162194	170226	182266	128176	115145	085165	154190	141203
P2/2 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085175	154190	149203
S15/1/1 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149203
T59/3/16 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115143	085165	154190	149203
TT31/1 KIVI pm	162194	170226	182266	130184	115143	085165	154190	149203
TT8/2 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115143	085165	154190	149203
163/1 IR pm	162194	170226	182266	128190	117145	085157	154190	149185
Cb5/1 IR pm	162194	170226	182266	128190	115145	085157	154178	149203
3 Année/2 KIVI pm	164200	172226	182266	128170	115143	085157	158178	175175
Dob 1/2 KIVI pm	162194	172226	182266	128170	121143	085175	158178	149185
Dob 7/11 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	149149
Guen 4/1 KIVI pm	162194	172226	182266	128176	121143	085165	158178	149185
Lab 13/5 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	175175
Lab 15/2 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121145	085175	158178	149149
Lab 27/4 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	175175
Lac 11/1 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	175175
Lac 14/3 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	149185
Lac 22/10 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	175175
Lac 22/11 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	149149
Sac 23/3 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	175175
Souc 1/2 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	175175
Thic 29/7 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085157	158178	175175
Wab 18/23 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	149185
Wab 22/6 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	149149
Wab 6/1 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	175175
Wab 6/2 KIVI pm	162194	172226	182266	128176	121139	085175	158178	175175
Yenb 3/7 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	149149
Yenb 41/2 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	149149
4 Année/3 KIVI pm	162194	172226	182266	128192	121143	085175	158178	149203
Brob 7/16 KIVI pm	162194	172226	182266	130192	121143	085175	158178	149203
Kac 4/10 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158178	149149
Kanb16/16	162194	172226	182266	126176	121143	085175	158178	149149
Kanb 28/2 KIVI pm	162194	172226	182266	128176	121143	085085	158178	149185
Kanb 9/5 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085165	158178	149149
Khob 34/1 KIVI pm	162194	172226	182266	130130	115145	085165	158178	149149
70/2 KIVI pm	162194	172226	182266	128190	115149	085165	154190	149203
F4/1 KIVI pm	164200	172226	182266	128184	121143	085175	158190	149149
F31/4 KIVI pm	164200	172226	182266	128184	121143	085175	158190	149149
F10/5 KIVI pm	162194	172226	182266	130190	115143	085165	154178	149203
F35/2 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158190	149149
B5/2 KIVI pm	162194	172226	182266	130190	115143	085165	154178	149203
F34/1 KIVI pm	162194	172226	182266	130190	115143	085165	154178	149203
B18/9 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158190	149149
F2/2 KIVI pm	162194	172226	182266	130190	115143	085165	154178	149203
F7/6 KIVI pm	162194	172226	182266	130190	115143	085165	154178	149203
F55/3 KIVI pm	164200	172266	182266	128176	121143	085175	158190	149149
B15/7 KIVI pm	162194	172226	182266	130190	115143	085175	154178	149203
B34/2 KIVI pm	162194	172226	182266	130190	115143	085165	154178	149203

F12/20 KIVI pm	164200	172226	182266	128176	121143	085175	158190	149149
GCN1 KIVI pm	162194	172226	182266	130190	121143	085165	154178	149203
B4/F303 KIVI pm	162194	170226	182266	130184	121143	085157	154178	149185
B4/F303 IR pm	162194	170226	182266	130184	115145	085165	154178	149185
B4/G27 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	115143	085165	154190	149203
B4/G27 IR pm	162194	170226	182266	128184	115145	085175	154178	149203
B4/I314 KIVI pm	162194	170226	182266	128194	115145	085165	154178	149185
B4/U163 KIVI pm	162194	170226	182266	128184	121145	085157	154178	149185
B4/I315 IR pm	162194	170226	182266	128184	115145	085157	154178	149185

Tableau 9 : Profils microsatellites obtenus avec les échantillons biologiques

N° de souche	amorces microsatellites							
	Micbg1	Micbg5	Micbg6	Misatg9	Misatg4	M6C8	MT3033	TRBPA1/2
<i>B4/F303 EB pm</i>	162194	170226	182266	130184	115145	085165	154178	149185
<i>B4/G27 EB pm</i>	162194	170226	182266	128184	115143	0000	154190	149203
<i>B4/I314 EB pm</i>	162194	170226	182266	128184	115145	085165	154178	149185
<i>B4/U163 EB pm</i>	162194	170226	182266	128184	115145	0000	154190	149185
<i>B4/I315 EB pm</i>	164200	170226	182266	128184	115145	085165	154190	149185
<i>B4/E120 EB pm</i>	162194	170226	0000	0000	115145	085085	154178	149203
<i>B4/E427 EB pm</i>	162194	176210	182266	122256	115145	097195	126170	185215
<i>B4/G13 EB pm</i>	162194	170226	182266	128184	101143	085175	154190	149185
<i>B4/I245 EB pm</i>	162194	170226	182266	0000	0000	085165	154178	149185
<i>B4/I36 EB pm</i>	162194	170226	182266	0000	115145	085165	154178	149185
<i>BL17 EB pm</i>	164200	170226	182266	0000	0000	085175	154190	149203
<i>BL11 EB pm</i>	164200	0000	182266	0000	0000	085085	154178	149149
<i>BL52 EB pm</i>	162194	170226	182266	128190	115145	085157	154178	129129
<i>BL47 EB pm</i>	162194	0000	182266	0000	0000	085181	0000	0000
<i>BL18 EB pm</i>	0000	0000	0000	0000	0000	085085	126170	175203
<i>B4/D515 EB pm</i>	164200	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
<i>B4/E337 EB pm</i>	0000	0000	0000	0000	0000	0000	154190	185185
<i>B4/G541 EB pm</i>	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
<i>B4/F136 EB pm</i>	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
<i>B4/H272 EB pm</i>	162194	170226	182266	0000	0000	085085	154178	149149
<i>B4/I351 EB pm</i>	224224	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
<i>B4/J520 EB pm</i>	162194	170226	0000	0000	0000	075083	154178	149185
<i>B4/U1 EB pm</i>	164200	170226	182266	128184	115143	085175	154190	149185
<i>B4/U184 EB pm</i>	164200	168226	182266	122122	0000	157195	146166	185185
<i>B4/G128 EB pm</i>	164200	170226	182266	128184	0000	085165	154190	191191
<i>B4/U197 EB pm</i>	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
<i>B4/G126 EB pm</i>	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
<i>B4/U27 EB pm</i>	0000	0000	0000	0000	0000	085085	154178	0000
<i>B4/R307 EB pm</i>	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
<i>B4/U309 EB pm</i>	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
<i>B4/RA313 EB pm</i>	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
<i>B4/D154 EB pm</i>	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
<i>B4/Q18 EB pm</i>	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
<i>B4/U70 EB pm</i>	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000

0000 = Absence de produits d'amplification

Tableau 10. : Profil allélique obtenu avec les souches de référence

N° de souche	amorces microsatellites							
	Micbg1	Micbg5	Micbg6	Misatg9	Misatg4	M6C8	MT3033	TRBPA1/2
Eatro 1125	136178	166192	178178	120184	125165	185185	122166	179205
Biyamina cl B	152190	174192	180240	120156	129143	93185	124160	175203
Stib 215	220310	178230	162194	116170	87111	103145	110146	183229
TH 2	190232	166190	174250	132156	109169	135155	126166	185215
D12K	160192	170226	182266	128190	115145	85155	154190	203203
Féo	152178	166166	180234	118186	129165	195275	110110	179275
LVH143	152178	166166	180234	118154	129165	195275	110160	175203
OK	160192	170226	182266	120120	115143	85157	154190	203203
A005	162194	170226	182266	128190	115145	85157	154170	149203
Dal 972	164200	170226	182266	128190	115149	85149	154178	149185
2561	162194	170226	182266	128184	115149	85165	154194	149203
TSW 65	166196	166230	176260	116116	271309	127191	122196	201209
TSW 53	166200	166182	0000	136176	109151	101135	136178	175221
Peya	162194	172226	182266	128184	115143	83157	154190	149185
Jua	162194	170226	182266	128190	115145	85157	154170	149203
TH 113	166210	166166	174174	136196	0000	139161	126174	175229
TRPZ 166	136218	176238	178178	116156	139159	121137	126166	151203
Abba	136168	166182	180180	152166	101147	105137	142170	175221
Ligo	136168	166182	180180	152166	101139	105151	142170	195195
TSW103	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000

0000 = Absence de produits d'amplification

2. 2. 4. PCR/ microsatellites et échantillons biologiques

Les résultats de l'amplification des échantillons biologiques issus des malades T+ de bonon sont présentés sur le tableau 9. Des produits d'amplification ont généralement été obtenus pour ces échantillons. Bien que quelques uns n'aient pas donné de produits d'amplification (un aux loci Micbg6 et Misatg4, deux au locus M6C8 et trois au locus Misatg9). On peut penser pour ces cas que probablement nous nous trouvions à la limite du seuil de détection des marqueurs. Pour neuf des dix EB de malades confirmés, des profils identiques à ceux obtenus pour les souches isolées des mêmes patients sur KIVI et/ou IR et pour l'ensemble des souches isolées sont retrouvés. Pour l'échantillon B4/E427 (qui n'a pas pu être isolé sur KIVI et IR), cinq couples d'amorces sur huit génèrent des profils très différents. On remarque aussi d'autres particularités, comme B4/I315 EB pm qui présente un profil 164/200 avec Micbg1 alors que ce profil semblait spécifique aux souches de Guinée

(voir paragraphe 2. 2. 2.), ou comme B4/G13 EB pm qui donne un profil non retrouvé jusque là, 101/143, avec Misatg4.

Aucun profil d'infection multiple (plus de deux bandes) n'a été mis en évidence sur ces EB comme cela aurait pu être attendu pour B4/F303 et B4/G27. En effet, pour ces deux patients, les souches isolées sur KIVI et par IR, présentaient des différences de profils aux loci Misatg4 et M6C8 pour B4/F303 et aux loci Misatg4, M6C8 et MT30/33 pour B4/G27. Dans le cas de B4/F303, la souche KIVI pm a donné respectivement les profils 121/143 et 085/157 pour Misatg4 et M6C8 alors que la souche IR pm et l'échantillon EB pm ont tous deux donné respectivement les profils 115/145 et 085/165. Deux souches différentes circulaient donc chez le patient au moment du prélèvement de l'EB, mais seule la souche isolée par IR a été identifiée chez ce dernier. Le même cas de figure a été observé pour B4/G27 à la seule différence que c'est la souche isolée sur KIVI qui a été identifiée à partir de l'EB. La PCR/Microsatellites ne semble donc pas pouvoir identifier les infections multiples dans les échantillons biologiques alors qu'elles sont mises en évidence par l'isolement simultané par les deux techniques d'isolement. Cette observation nous a conduit à réaliser une étude expérimentale visant à évaluer la capacité de la PCR/Microsatellites à identifier les infections multiples dans les échantillons biologiques (voir paragraphe 2. 4).

Les marqueurs microsatellites ont aussi amplifié de l'ADN de trypanosomes de plusieurs EB d'individus P1+ et C+ (Tableau 9) confirmant que ces individus sont bien porteurs de trypanosomes. Cependant, seuls deux de ces EB ont donné un produit d'amplification avec tous les marqueurs, six ont donné un produit d'amplification avec cinq, six ou sept marqueurs et sept avec un, deux ou trois marqueurs alors que 10 EB d'individus P1+ et C+ n'ont donné aucun produit d'amplification. Les amorces utilisées ici sont moins sensibles que les amorces TBR1/2 (Moser et *al.*, 1989) utilisées pour le diagnostic des trypanosomes et nous sommes probablement pour ces échantillons en dessous du seuil de détection des amorces microsatellites.

Les résultats obtenus avec cinq P1+ et trois C+, ayant donné un produit d'amplification avec au moins cinq marqueurs sont détaillés ci-après.

Pour sept de ces huit EB, les profils sont les mêmes que ceux obtenus avec les souches isolées sur KIVI et IR. Pour le huitième de ces EB, B4/U184, on obtient des profils très différents et spécifiques pour cinq marqueurs sur sept. Cinq individus présentent un profil 164/200 avec Micbg1 alors que ce profil semblait spécifique aux souches de Guinée. BL52 EB pm et B4/G128 EB pm présentent respectivement un profil homozygote unique 129/129 et 191/191

avec les amorces TRBPA1/2. Il semblerait donc que certains individus Pl+ et C+ soient porteurs des mêmes trypanosomes que ceux circulant chez les T+, mais que certains d'entre eux soient porteurs de trypanosomes particuliers qui n'ont pas été isolés jusque là.

2. 3. PCR/Microsatellites et génétique des populations des trypanosomes

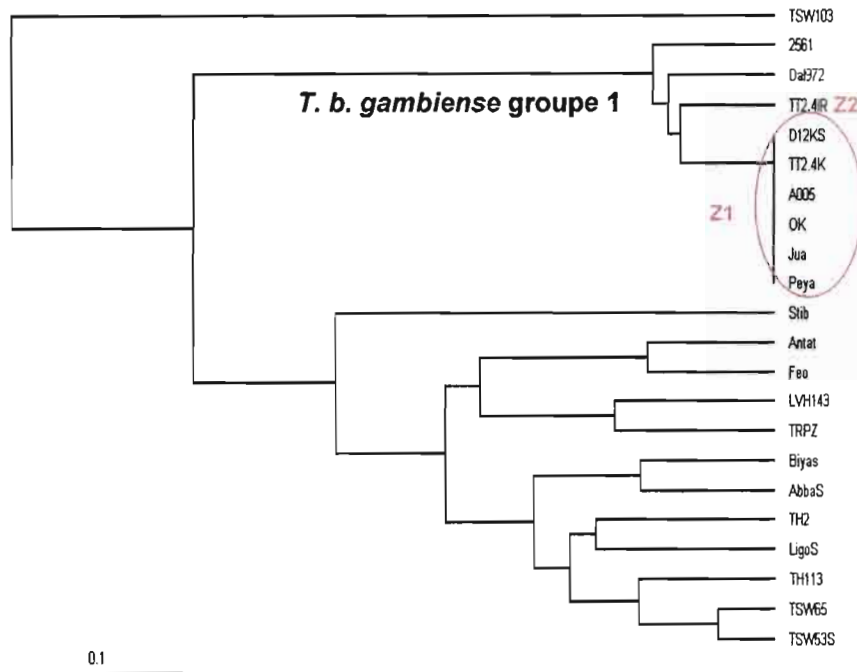
L'échantillonnage suivant a été considéré :

- toutes les souches KIVI pm (19) et IR pm (2) isolées à Bonon en 2000
- toutes les souches KIVI pm (12) et IR pm (9) isolées à Bonon en 2002
- toutes les souches KIVI pm (4) et IR pm (3) ainsi que tous les EB de T+ échantillonnés à Bonon en 2004
- toutes les souches KIVI pm (20) isolée à Boffa en 2002
- toutes les souches KIVI pm (7) isolée à Dubreka en 2002

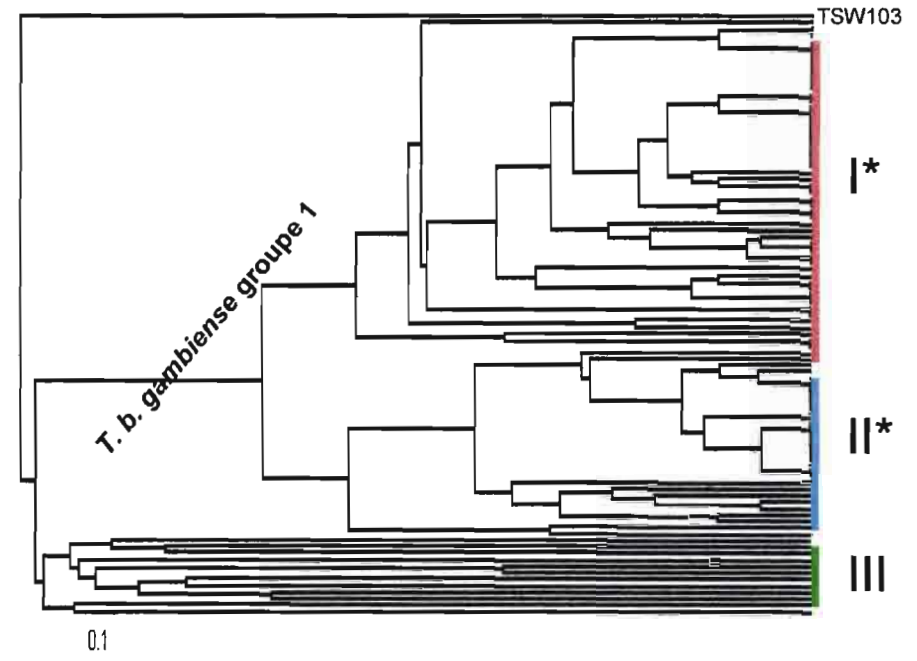
2. 3. 1. Analyses cladistiques

La figure 14 montre les dendrogrammes UPGMA résultant des analyses MLEE et microsatellites pour les souches de référence et l'ensemble des échantillons ci-dessus mentionnés. Ces dendrogrammes montrent que quelque soit la technique utilisée, le groupe 1 de *T. b. gambiense* s'individualise et forme un groupe homogène ; les souches du groupe Bouaflé, de *T. b. brucei* et de *T. b. rhodesiense* forment un ensemble hétérogène sans regroupement possible. Il existe donc une très bonne concordance entre les deux méthodes puisqu'elles montrent que *T. b. gambiense* est probablement monophylétique. Les MLEE ne permettent pas de différencier les souches regroupées dans les zymodèmes Z1 et Z2 (dmax=0,3). Les microsatellites génèrent plus de diversité, et les distances génétiques sont plus grandes. Ils permettent de distinguer deux groupes, un groupe rassemblant la majorité des souches provenant de Guinée et un autre groupe rassemblant la majorité des souches provenant de Côte d'Ivoire.

Les arbres de bootstrap confirment les résultats observés avec les dendrogrammes (figure 15). Le groupe 1 de *T. b. gambiense* homogène, avec des valeurs très significatives (93 pour MLEE, 99 pour les microsatellites) confirmant la robustesse de la phylogénie. Un ensemble hétérogène (valeurs de bootstrap non significatives) ne constituant pas un groupe et rassemblant les souches Bouaflé, les souches de *T. b. brucei* et de *T. b. rhodesiense*. La séparation des deux groupes Guinée/Côte d'Ivoire avec des valeurs de bootstrap peu significatives (34 et 37) indique simplement une tendance au regroupement des souches de zones géographiques différentes.



Dendrogramme MLEE



Dendrogramme PCR/microsatellites

I = souches de Côte d'Ivoire, II = souches de Guinée, III = souches de référence

non *T. b. g.* groupe 1. * les souches de référence du groupe 1 de *T. b. g.* se retrouvent dans I et II.

Figure 14: Comparaison dendrogramme MLEE/PCR-microsatellites

2. 3. 2. Structuration génétique par les indices de Wright

2. 3. 2. 1. Estimation de l'effet de la technique d'isolement

Afin de comprendre l'effet que pourrait produire la technique d'isolement nous avons, à l'aide du logiciel F-stat estimé la différenciation entre les différentes souches en fonction de leur technique d'isolement (Tableau 11). Des souches KIVI, IR et des EB provenant de patients de Bonon, prélevés au même moment ont été comparées. Pour chaque locus (sauf micbg6) les p-values ajustées avec la correction de Bonferroni indiquent qu'il n'y a aucun effet de la technique d'isolement sur la structure de la population des individus échantillonnés. La seule valeur de F_{ST} apparemment significative obtenue (0.085, p-value = 0.02 avec Misatg4 à Bonon 2004) ne le reste pas après correction de Bonferroni ($0.02 \times 7 = 0.14$). Aucune valeur de F_{ST} n'a pu être calculée avec le marqueur micbg6 du fait d'une hétérozygotie fixée pour les deux mêmes allèles sur toutes les souches considérées. Au vu de ces résultats et pour éviter le risque d'échantillonner deux fois la même souche à partir du même patient (ce qui induirait un biais dans la structure réelle des populations), nous n'avons retenu pour la suite des analyses qu'un seul génotype par patient. Ainsi les souches IRpm ont été exclues quand les souches KIVIpm étaient disponibles.

Tableau 11: Estimation de l'effet de la technique d'isolement sur la différenciation entre isolats à Bonon

Marqueurs	Année 2000		Année 2002		Année 2004	
	F_{ST}	<i>p. value</i>	F_{ST}	<i>p. value</i>	F_{ST}	<i>p. value</i>
Micbg1	-0.012	0.9999	NA	NA	-0.008	0.9999
Micbg5	NA	NA	-0.008	0.9999	-0.008	0.9999
Misatg9	-0.045	0.9999	0.025	0.1208	-0.036	0.9999
Misatg4	-0.036	0.9999	-0.004	0.389	0.085	0.0181 (0.14*)
M6C8	-0.029	0.9999	0.012	0.447	0.002	0.3966
MT3033	0.196	0.0723	-0.005	0.6764	0.004	0.5222
TRBPA1/2	-0.021	0.9999	-0.021	0.9999	-0.016	0.7891
All Loci	0.012	0.4761	0	0.7057	0.004	0.5579

* correction de Bonferroni ; le locus Micbg6 n'est pas représenté car aucune valeur n'a pu être calculée.

2. 3. 2. 2. Test de la fiabilité des marqueurs microsatellites

Afin de s'assurer de la neutralité et de la qualité des marqueurs utilisés pour la structuration des populations nous avons calculé le F_{IS} par locus (figure 16).

Parmi les huit loci, Micbg6 exhibe invariablement un F_{IS} de -1 (hétérozygotie fixée dans tous les échantillons) et TRBPA1/2 présente une variance telle que ce locus en devient ininterprétable. Cette variance pourrait s'expliquer par l'existence d'allèles nuls ou une sélection complexe. TRBPA1/2 est d'ailleurs le seul locus microsatellite appartenant à la séquence d'un gène codant (gène codant pour la procycline) et est donc probablement soumis à une pression de sélection. Les autres marqueurs présentent une bonne congruence et des variances assez homogènes les uns par rapport aux autres.

En conséquence, les marqueurs Micbg6 et TRBPA1/2 ont été éliminés.

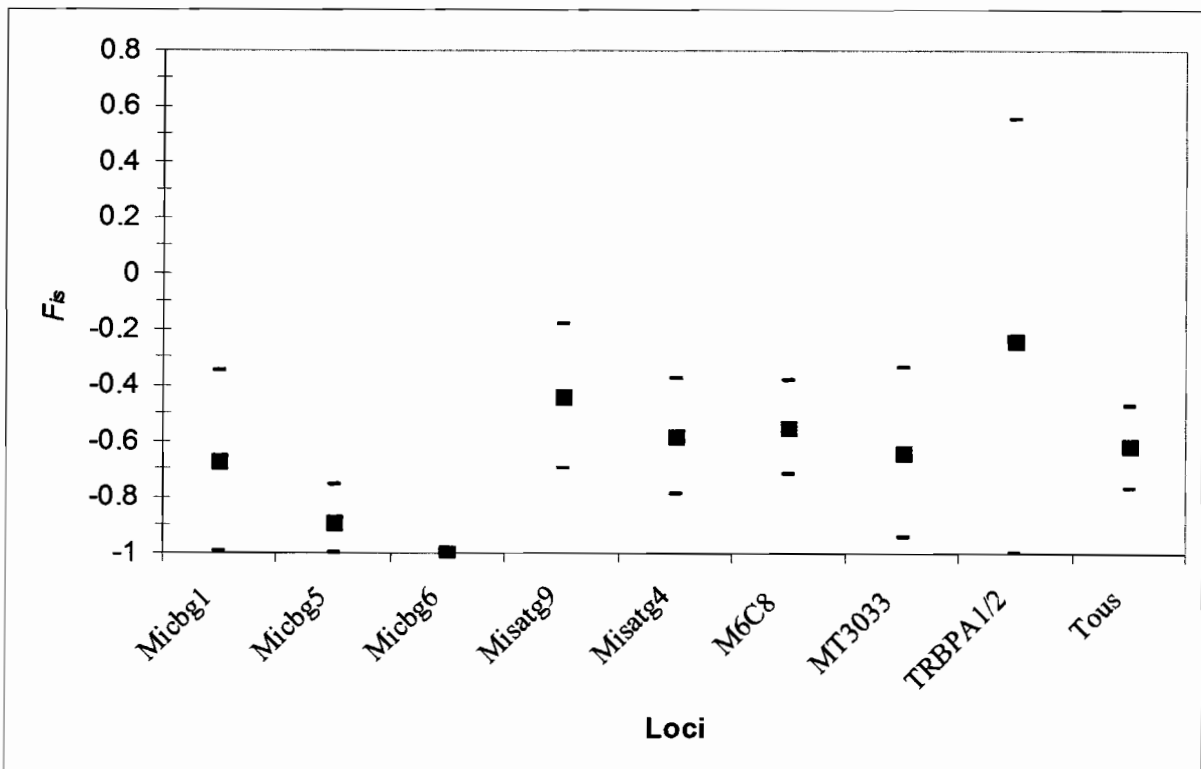


Figure 16: Estimation des F_{IS} par locus microsatellite.

L'intervalle de confiance de chaque locus est estimé à partir des jackknife sur les populations et par bootstrap sur les loci pour la moyenne.

2. 3. 2. 3. Différenciation génétique entre les foyers de THA

Nous avons considéré les trois foyers de Bonon, Boffa et Dubreka pour lesquels il y a eu un échantillonnage au cours de l'année 2002. Les résultats (F_{ST}) mentionnés dans le tableau 12, montrent une différenciation importante et significative entre le foyer de Bonon (Côte d'Ivoire) d'un côté, et les foyers de Boffa et Dubreka (Guinée) de l'autre. On observe aussi une différenciation plus faible mais significative entre les deux foyers guinéens.

Tableau 12: Estimation des F_{ST} entre chaque paire des trois sites échantillonnés au cours de l'année 2002

Foyers	Boffa	Dubreka
Bonon	0.30 (0.0003)	0.21 (0.0003)
Boffa	-	0.06 (0.002)

2. 3. 2. 4. . Différenciation génétique inter-année dans le foyer de Bonon.

La population de Bonon a été échantillonnée sur trois années différentes (2000, 2002 et 2004) ce qui permet de tester l'évolution des fréquences alléliques d'une année à l'autre. Le tableau 13 montre qu'il n'y a aucune différenciation significative de 2000 à 2002 ni de 2002 à 2004. En revanche, cette différenciation même faible (0.03) devient significative entre 2000 et 2004. Elle traduit une certaine stabilité temporelle du génome des trypanosomes du groupe 1 de *T. b. gambiense*. Ceci milite en faveur de tailles importantes des populations locales de ce parasite et donc de ses capacités à maintenir un polymorphisme important.

Tableau 13: Estimation des F_{ST} inter-année à Bonon

Année	2002	2004
2000	-0.0004 (0.27)	0.0292 (0.0033)*
2002	-	0.0069 (0.37)

2. 3. 2. 5 Test de clonalité

Nous avons testé l'hypothèse de la stricte clonalité selon les critères proposés par de Meeüs & Balloux (2005). Selon ces auteurs, dans une population strictement clonale, fortement subdivisée, le F_{ST} et le F_{IS} doivent vérifier les équations $F_{ST} = F_{ST}' = -F_{IS}/(1-F_{IS})$ et $F_{IT} = 0$. Ceci n'est pas tout à fait le cas comme nous pouvons le constater sur la figure 17 : si le F_{ST} est peu différent du F_{ST}' selon l'intervalle de confiance, le F_{IT} de -0,3 fait rejeter l'hypothèse de stricte clonalité. Ce résultat peut s'expliquer par la taille de l'échantillonnage (trop peu de populations contenant trop peu d'échantillons). Si nous faisons l'hypothèse d'une forte structuration des populations de trypanosomes à un niveau géographique (non déterminé), le F_{IS} peut permettre de rendre compte de la structure de la population (voir de Meeüs & Balloux, 2005). Les F_{IS} et les déséquilibres de liaisons observés dans notre étude (paragraphe 2. 3. 3.) sont les témoins d'une structure clonale des populations étudiées ; ils corroborent les résultats obtenus par de Meeüs & Balloux (2005) sur la base des données publiées par MacLeod et al. (2000) (marqueurs minisatellites et trypanosomes infectant pour l'homme) qui montrent un F_{IS} de -0.5. On aurait donc un niveau de structuration important avec un $F_{ST}'=0.35$ (0.34 pour les minisatellites de McLeod et al., 2000).

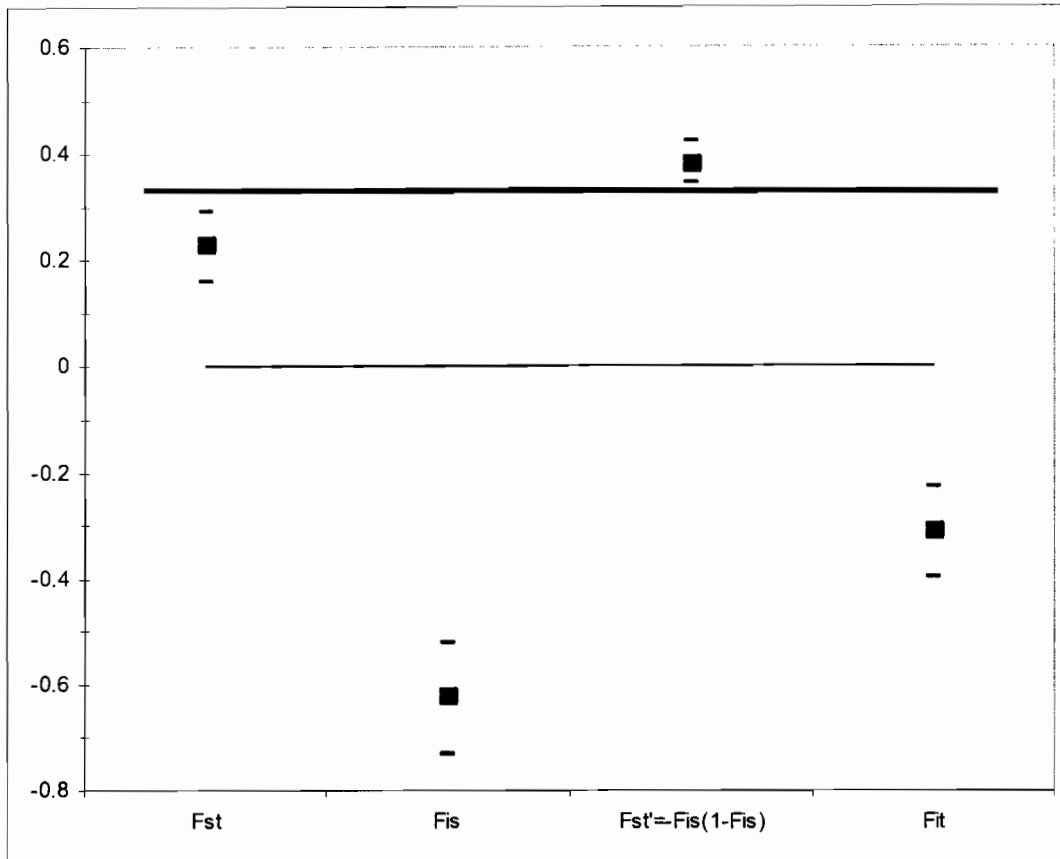


Figure 17: Test de la clonalité: correspondance entre le F_{ST} estimé et $-F_{IS}/(1-F_{IS})$

2. 3. 3. Test de déséquilibre de liaison entre paire de loci

L'association entre loci peut être testée à partir de l'étude du déséquilibre de liaison entre paire de loci et/ou à partir de la mesure d'associations entre génotypes multilocus (Tibayrenc et *al.*, 1991 ; Taylor et *al.*, 1999). Le déséquilibre de liaison par paire de loci a donc été testé avec les six marqueurs microsatellites fiables (voir 2. 3. 2. 2.) avec $(N(N-1)/2)$ combinaisons possibles, soit 15 paires pour les six loci étudiés pour l'ensemble des différentes sous-populations (Bonon, Boffa et Dubreka). Sur les 15 combinaisons, 11 ont montré un déséquilibre de liaison significatif (tableau 14). Après une correction de Bonferroni, 10 combinaisons restent significatives. Ceci traduit une forte liaison statistique entre paires de loci.

Tableau 14: p-value des tests de déséquilibre de liaison par paire de loci sur l'ensemble des sites échantillonnés

Paire de loci	p-value	Correction Bonferroni
Micbg1xMT3033	0.0002	0.003
Micbg5xMT3033	0.0002	0.003
Micbg1xM6C8	0.0009	0.012
MisatG9xMisatg4	0.0010	0.012
Misatg4XMT3033	0.0010	0.011
M6C8xMT3033	0.0011	0.011
Micbg1xMisatg4	0.0014	0.013
Micbg1xMisatg9	0.0033	0.027
Misatg9xM6C8	0.0041	0.028
Misatg4xM6C8	0.0083	0.049
Misatg9xMT3033	0.013	0.064
Micbg5xmisatg9	0.068	0.271
Micbg5xM6C8	0.075	0.226
Micbg5xMisatg4	0.283	0.566
Micbg1xMicbg5	0.657	0.657

2. 4. Etude d'une infection mixte expérimentale

Le gel acrylamide de la figure 18 illustre les résultats obtenus après amplification avec TRBPA1/2 des divers mélanges expérimentaux utilisés. Les dilutions successives (1/10, 1/100 et 1/1000) des souches Biyamina et S12/9/5 IR pm, testées séparément donnent toutes des produits d'amplification. En revanche, seuls les rapports 1/1 contenant les deux souches en même quantité (puits 4) et le rapport 1/10 (Biyamina/S12/9/5 IR pm ; puits 3) présentent les produits d'amplification correspondant aux deux souches. Les autres amorces microsatellites ont donné le même type de résultats.

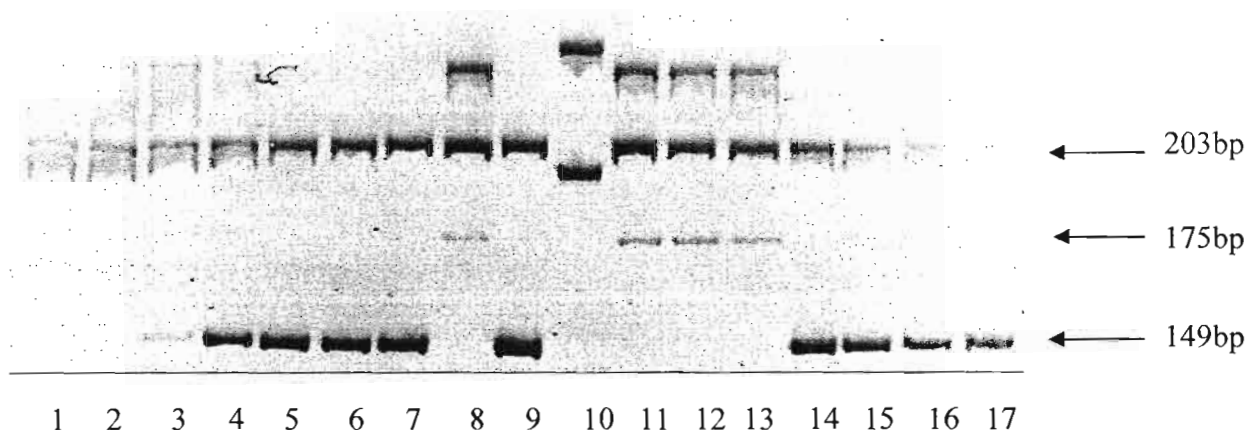


Figure18 : Gel d'acrylamide obtenu avec TRBPA1/2 lors de l'étude expérimentale visant à évaluer l'aptitude de la PCR/Microsatellites à détecter les infections multiples

1 = Biyamina (pur) + S12/9/5 IR pm (1/1000); 2 = Biyamina (pur) + S12/9/5 IR pm (1/100);
 3 = Biyamina (pur) + S12/9/5 IR pm (1/10); 4 = Biyamina (pur) + S12/9/5 IR pm (pur);
 5 = Biyamina (1/1000) + S12/9/5 IR pm (pur); 6 = Biyamina (1/100) + S12/9/5 IR pm (pur);
 7 = Biyamina 1/10 + S12/9/5 IR pm (pur); 8 = Biyamina (pur); 9 = S12/9/5 IR pm (pur);
 10 = marqueur PM (Φ X174 HaeIII); 11 = Biyamina (1/10); 12 = Biyamina (1/100);
 13 = Biyamina (1/1000); 14= S12/9/5 IR pm (1/10); 15 = S12/9/5 IR pm (1/100);
 16 = S12/9/5 IR pm (1/1000), 17= Contrôle positif (40/1 KIVI).

Il semble donc que la PCR/Microsatellites ne soit apte à détecter les infections multiples que dans le cas où les deux souches sont représentées en quantités quasiment égales. Il est alors probable, si on reprend les cas de B4/F303 et B4/G27, que (au moins) deux souches circulaient chez le patient, que ces deux souches ont pu être isolées par les deux techniques d'isolement, mais qu'au moment du prélèvement, une souche était surreprésentée par rapport à l'autre, et donc a été la seule à être détectée dans les EB correspondants.

Ce résultat est confirmé par notre étude expérimentale *in vivo* chez la souris. Les résultats du suivi de parasitémie des souris injectées avec des quantités égales des deux souches sont donnés dans le tableau 15. La souris 1 est décédée dès le premier jour de contrôle, les 9 autres sont mortes entre le 9^{ième} et le 14^{ième} jour après avoir développé d'importantes parasitémies (10^9 trypanosomes/ml). Les premiers trypanosomes ont pu être observés dès le premier jour de contrôle chez la souris 8, alors qu'il a fallu attendre le quatrième jour pour que toutes les souris présentent des parasitémies. Les parasitémies ont

augmenté rapidement et toutes les souris ont atteint une charge parasitaire de 10^9 trypanosomes/ml entre le 5^{ième} et le 8^{ième} jour de suivi.

L'identification PCR/Microsatellites effectuée sur l'ensemble des prélèvements montre que certains marqueurs (Micbg1, M6C8 et TRBPA1/2) ont donné des produits d'amplification dès le premier jour de suivi alors que les trypanosomes n'étaient pas encore détectables à l'observation microscopique. Cette observation est illustrée dans le tableau 15 dans lequel sont exposés les résultats obtenus avec TRBPA1/2. En revanche, d'autres marqueurs (Micbg5, Micbg6, Misatg4 et Misatg9) n'ont donné des produits d'amplification qu'à partir du quatrième jour de suivi. Ceci confirme la différence de sensibilité des marqueurs utilisés observée et décrite précédemment.

Les profils obtenus avec TRBPA1/2 (les autres marqueurs ont donné le même profil de résultats) montrent que les deux souches inoculées aux souris ne sont plus codétectables sur les prélèvements effectués après J3. Seule la souche Biyamina est ensuite identifiée. Les souches du groupe Bouaflé auquel appartient Biyamina sont connues comme étant plus virulentes chez le rongeur que les souches du groupe 1 de *T. b. gambiense*. La souche Biyamina s'est donc probablement multipliée plus rapidement que la souche S12/9/5 IR pm et à partir du 4^{ième} jour, les proportions ont été telles que cette dernière n'était plus détectable par nos marqueurs.

Tableau 15. Evolution de la parasitémie des souris infectées par les deux souches, et résultats de la PCR/Microsatellites TRBPA1/2 sur les prélèvements quotidiens

Souris	Nombre de jours de suivi						
	1	2	3	4	5	7	8
1	dcd						
2	- (B)	- (AB)	5.4 (B)	7.2 (A)	8.1 (A)	8.7 (A)	9.0 (A)
3	- (AB)	- (B)	5.4 (AB)	7.8 (A)	8.7 (A)	9.0 (A)	9.0 (A)
4	- (A)	- (A)	- (AB)	5.7 (A)	8.7 (A)	8.7 (A)	9.0 (A)
5	- (AB)	- (B)	- (AB)	7.2 (A)	8.7 (A)	9.0 (A)	9.0 (A)
6	- (AB)	- (AB)	5.4 (AB)	7.8 (A)	8.7 (A)	9.0 (A)	9.0 (A)
7	- (AB)	- (AB)	5.4 (AB)	7.5 (A)	8.7 (A)	9.0 (A)	9.0 (A)
8	5.4 (AB)	5.7 (A)	6.9 (AB)	7.5 (A)	8.7 (A)	9.0 (A)	9.0 (A)
9	- (AB)	- (AB)	5.4 (AB)	7.5 (A)	9.0 (A)	9.0 (A)	9.0 (A)
10	- (AB)	- (AB)	- (AB)	6.3 (A)	8.7 (A)	9.0 (A)	9.0 (A)

A = profil Biyamina et B = profil S12/9/5 IR pm

Les résultats sont présentés de la façon suivante : « parasitémie (profil observé) »

Toutes les souris sont mortes entre le 9^{ième} et le 14^{ième} jour. La parasitémie est estimée selon Herbert et Lumsden, 1976. Toutes les PCR effectuées sur les prélèvements faits dans cette période (parasitémie de 9) ont aussi montré le profil A

3. Discussion

3. 1. MLEE et caractérisation génétique du complexe *T. brucei* s.l.

Les résultats obtenus avec les huit systèmes enzymatiques (11 loci) utilisés semblaient mettre en évidence une différence entre souches isolées par KIVI et IR du même patient confirmant ainsi le biais sélectif des techniques d'isolement décrit avec *T. b. brucei* chez le porc (article 1). Cependant, en testant la reproductibilité de cette observation basée sur seulement deux loci (GOT et PEP-2), nous avons montré que ce résultat était plus probablement dû à une qualité altérée des extraits enzymatiques, et/ou à une différence d'expression et/ou d'activité enzymatique entre les formes procycliques (souches KIVI) et les formes sanguicoles (souches IR). Ce dernier phénomène a déjà été rapporté par Kaukas et *al.*, (1990). Ces auteurs ont en effet démontré l'effet d'une expression différentielle entre les formes procycliques (qui correspondent au stade de développement chez le vecteur) et les formes sanguicoles (stade de développement chez l'hôte mammifère) qui se traduisait par une différence phénotypique avec certains systèmes enzymatiques (comme GOT et PEP-2). Lors de notre étude sur *T. b. brucei* chez le porc basée sur les MLEE (article 1), nous avons également rapporté une expression différentielle en fonction du stade de développement.

Il apparaît donc délicat d'utiliser les MLEE pour caractériser dans une même étude des trypanosomes à différents stades de développement. En effet, on risque de générer un « polymorphisme artéfactuel » avec toutes les conséquences qu'il peut avoir. Nous avons donc décidé de ne pas tenir compte des résultats obtenus avec les loci GOT et PEP-2. Les résultats obtenus avec les six autres systèmes (neuf loci) confirment le faible polymorphisme observé au sein des souches isolées en Côte d'Ivoire et Guinée (Jamonneau et *al.*, 2000a ; 2002). En effet, la quasi-totalité des souches isolées (KIVI et/ou IR) lors de cette étude appartiennent au même zymodème majoritaire (nommé Z1 ici) que l'on retrouve en Afrique de l'Ouest et Centrale depuis plusieurs années (nommé Z3 lors d'études menées en Côte d'Ivoire, Guinée et Guinée Equatoriale, Truc et *al.*, 1997 a et b; Jamonneau et *al.*, 2000a ; 2002 ; et nommé Z1 lors d'études menées au Cameroun, Njiokou et *al.*, 2004). Nous avons plusieurs fois suspecté ce monomorphisme de n'être « qu'apparant » et lié à la technique d'isolement utilisée, le KIVI (Jamonneau et *al.*, 2002 ; 2003, article 1), ce qui semble se

confirmer dans cette étude puisque les deux seules souches échantillonnées qui ont donné un profil différent (Z2) ont été isolées par IR.

De même, nous suspicions l'existence d'infections multiples chez l'homme (Jamonneau et *al.*, 2003 ; Truc et *al.*, 2002), ce qui a justifié les multiples tentatives d'isolement sur un même patient (KIVI pm / KIVI tt et KIVI / IR) : un seul patient sur 28 a montré une différence entre souche KIVI (Z1) et IR (Z2), différence reproductible avec le locus SODa, mettant donc en évidence chez ce patient une aptitude différentielle de l'une ou de l'autre des deux souches différentes à croître dans un milieu à un moment donné.

L'identité des individus d'une population est hautement dépendante du pouvoir de résolution des outils moléculaires utilisés (Tibayrenc, 1999 ; Agbo et *al.*, 2002). Les gènes codant pour les isoenzymes sont des gènes de ménages (housekeeping genes) très conservés. Il semble que la MLEE basée sur le polymorphisme de ces gènes sous estime la variabilité entre individus du groupe 1 de *T. b. gambiense* pour lesquels les distances entre individus sont probablement très faibles. La MLEE est un bon outil pour caractériser des individus au sein de populations polymorphes (*T. cruzi*, Barnabé et *al.*, 2000) mais ne semble donc pas adaptée pour le typage des trypanosomes du complexe *T. brucei* s.l.. Le monomorphisme obtenu avec les MLEE n'a donc pas permis de poursuivre l'analyse par une étude de génétique des populations et malgré quelques tendances observées concernant l'existence d'un biais sélectif d'isolement et d'infections multiples, cette méthode, qui a montré des difficultés techniques et des problèmes d'interprétation n'a pas permis d'étudier la variabilité génétique de *T. b. gambiense*.

Nous avons choisi d'utiliser, des marqueurs plus polymorphes, les marqueurs microsatellites, plus adaptés à la caractérisation des souches du complexe *T. brucei* s.l. et plus précisément, du groupe 1 de *T. b. gambiense* chez lequel on suspecte l'existence d'un polymorphisme qui pourrait être en partie responsable de la diversité de réponses à l'infection. A ce sujet, on peut citer Tibayrenc : « il n'y a pas de bons ni de mauvais marqueurs mais des marqueurs adaptés à une étude donnée » (Tibayrenc, 1998 ; 1999). Cette notion a été très récemment développée dans une revue qui vient d'être publiée (de Meeüs et *al.*, 2006b).

3. 2. PCR/Microsatellites et caractérisation génétique du complexe *T. brucei* s.l.

Quelques études préliminaires avaient permis de différencier, à l'aide des microsatellites, les différentes espèces et sous-espèces du sous-genre *Trypanozoon* (Biteau et al., 2000), de comparer des souches du groupe 1 de *T. b. gambiense* (Truc et al., 2002) ou d'identifier des trypanosomes directement à partir d'échantillons de sang provenant de patients (Jamonneau et al., 2004a), de porcs (Jamonneau et al., 2004b) et d'organes de glossines (Jamonneau et al., 2004b). Nous avons retenu trois couples d'amorces (particulièrement informatifs) utilisés dans ces études : M6C8 et MT30/33 définis par Biteau et al. (2000) et TRBPA1/2 défini par Truc et al. (2002) ; ce dernier couple a la particularité d'amplifier une séquence microsatellite incorporée dans un gène transcrit et codant pour la procycline (protéine qui compose le manteau protéique des formes procycliques présentes chez le vecteur). Afin de baser notre étude sur un plus grand nombre de loci, nous avons défini à partir des séquences génomiques publiées de *T. brucei* s.l., sept nouveaux couples d'amorces. Deux de ces couples d'amorces ayant donné des résultats difficilement interprétables sur gel d'acrylamide (pour des raisons inconnues) ont été exclus de l'étude.

Nous avons d'abord confirmé la spécificité de ces marqueurs, spécificité qui leur donne l'avantage de pouvoir être utilisés en présence d'ADN de l'hôte mammifère et ce, sans risquer de générer des réactions croisées avec des parasites circulant dans les mêmes aires géographiques mais n'appartenant pas au sous-genre *Trypanozoon*.

Appliqués aux souches isolées lors de notre étude, ces marqueurs ont confirmé, par les analyses descriptives et cladistiques, l'homogénéité du groupe 1 de *T. b. gambiense* comparé à l'hétérogénéité observée avec les souches de référence n'appartenant pas à ce groupe. Ceci conforte l'hypothèse qui décrit le groupe 1 de *T. b. gambiense* comme étant l'espèce *T. b. gambiense* et qui définit le groupe bouaflé et *T. b. rhodesiense* comme étant des variants de *T. b. brucei* qui auraient acquis une résistance au sérum humain (expression du gène SRA par exemple pour *T. b. rhodesiense*) (Gibson et al ; 1999 ; 2002). Les marqueurs microsatellites se sont montrés beaucoup plus polymorphes que les MLEE, générant entre autre une diversité au sein même du groupe 1 de *T. b. gambiense*.

3. 2. 1. Polymorphisme au sein du groupe 1 de *T. b. gambiense*

L'analyse descriptive des résultats bruts obtenus locus par locus a montré que deux marqueurs, Micbg6 et M6C8, ont donné un profil unique spécifique du groupe 1 de *T. b. gambiense*: 182/266 et 085/x respectivement, confirmant ainsi la tendance de ces marqueurs à être un outil potentiel de diagnostic de ce groupe (Biteau et al., 2000). Ces marqueurs pourraient être utilisés pour détecter et/ou identifier les trypanosomes du groupe 1 de *T. b. gambiense* circulant chez le vecteur ou l'éventuel réservoir animal. D'autres marqueurs comme Micbg1, Micbg5, MT30/33 et TRBPA1/2 ont généré plusieurs profils différents mais que l'on peut aussi qualifier de spécifique du groupe 1 de *T. b. gambiense* puisqu'on ne les retrouve pas pour des souches de référence n'appartenant pas à ce groupe. Nous avons aussi observé que plusieurs marqueurs (Micbg1, Micbg5, Misatg9, Misatg4 et MT30/33) généreraient des profils plus ou moins spécifiques de l'origine géographique (Côte d'Ivoire / Guinée) de la souche isolée, ce qui suggérerait l'hypothèse d'une structuration des populations au sein du groupe 1 de *T. b. gambiense*.

Deux marqueurs (Micbg6 et TRBPA1/2) ont été exclus de l'analyse de génétique des populations. Micbg6 montrait invariablement un F_{IS} de -1 du fait d'une hétérozygotie fixée pour tous les échantillons de notre étude (non comprises les souches de référence). TRBPA1/2 quant à lui présentait une importante variance qui pourrait s'expliquer par sa localisation dans une séquence codante.

Les résultats (F_{ST}) ont mis en évidence une différenciation importante et significative entre le foyer de Bonon (Côte d'Ivoire) d'un côté, et les foyers de Boffa et Dubreka (Guinée) de l'autre, mais aussi une différenciation plus faible mais significative entre les deux foyers guinéens.

Nous avons également testé l'évolution des fréquences alléliques sur un pas de temps de 4 ans dans le foyer de Bonon en Côte d'Ivoire. Aucune différenciation significative n'a été mise en évidence entre 2000 et 2002 ni entre 2002 et 2004. Par contre, une différenciation faible mais significative (0,03) est observée entre 2000 et 2004. Elle traduit une certaine stabilité temporelle du génome des trypanosomes du groupe 1 de *T. b. gambiense* et milite en faveur de tailles importantes des populations « locales » de ce parasite et donc de ses capacités à maintenir un polymorphisme important. Or, ces tailles importantes n'étaient pas

forcément attendues, puisque les prévalences de la THA dans ces foyers sont de 0.5 à 1% au maximum. Cette observation suscite deux hypothèses non exclusives :

- une prévalence réelle supérieure de la maladie chez l'homme, qui pourrait s'expliquer par les faibles taux de présentation habituels des populations aux prospections médicales (Kaba et *al.*, 2006); il est généralement admis que les malades sont sous-représentés quand la présentation des populations aux prospections n'est pas maximale (Gentilini, 1993).
- l'existence d'un réservoir animal dont l'importance épidémiologique serait bien réelle, ce phénomène étant très controversé pour la THA à *T. b. gambiense* (Mehlitz, 1982 ; Noireau et *al.*, 1986b ; Jamonneau et *al.*, 2004b ; Njiokou et *al.*, 2006) ; dans le cas présent, l'existence de populations importantes du groupe 1 de *T. b. gambiense* est en faveur d'un passage du compartiment animal au compartiment humain via les tsé-tsé.

Le potentiel de la PCR/Microsatellites à typer les trypanosomes directement à partir des échantillons biologiques (EB) a été confirmé puisque dans l'ensemble, nos marqueurs ont permis de caractériser les trypanosomes des prélèvements de sang effectués sur 10 patients confirmés (T+). Les résultats bruts obtenus ont montré que les trypanosomes identifiés à partir de ces EB étaient les mêmes que ceux isolés par KIVI et IR, sauf pour un de ces EB qui montre des profils très différents et spécifiques pour 5 marqueurs sur 8. Il apparaît nécessaire de confirmer ces résultats sur un large échantillon d'EB. Une étude est actuellement en cours dans plusieurs foyers de THA en Guinée. Il faut préciser ici que plusieurs de nos marqueurs (principalement Misatg9) ont semblé manquer de sensibilité pour amplifier l'ADN de trypanosomes des EB. Il apparaît nécessaire de définir d'autres marqueurs en déterminant de façon expérimentale leur seuil de détection, et de ne sélectionner que les plus sensibles pour des analyses sur EB.

Ce problème du manque de sensibilité de la PCR/Microsatellites se retrouve surtout dans l'identification des trypanosomes d'EB des sujets C+ et PI+ : les tests parasitologiques n'ont pas pu mettre en évidence de parasite chez ces sujets, probablement du fait de faibles parasitémies, alors que les amorces TBR1/2 (Moser et *al.*, 1989) ont amplifié de l'ADN spécifique du sous-genre *Trypanozoon*. Les marqueurs microsatellites qui amplifient une courte séquence répétée à un locus du génome sont logiquement moins sensibles que les amorces TBR1/2 qui amplifient une séquence satellite de 177 pb hautement répétée en tandem. Cependant, nos marqueurs ont quand même amplifié de l'ADN de trypanosomes de plusieurs EB d'individus PI+ et C+ confirmant que ces individus sont potentiellement porteurs de trypanosomes du groupe 1 de *T. b. gambiense* puisque pour la plupart d'entre eux, les

profils obtenus sont similaires à ceux (spécifiques de ce groupe) obtenus pour les trypanosomes isolés et ceux identifiés à partir d'EB de T+. C'est la première description, à notre connaissance, de sujets PI+ et C+ porteurs de trypanosomes pathogènes pour l'homme. Des PCR positives chez ce type de sujets ont déjà été relatées, mais sans que l'on puisse écarter l'hypothèse d'infections transitoires à des trypanosomes non pathogènes pour l'homme (comme *T. b. brucei*) puisque les amorces utilisées lors de ces travaux étaient spécifiques de l'ensemble du sous-genre *Trypanozoon* (Kabiri *et al.*, 1999 ; Kyambade *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2000).

3. 2. 2. Biais sélectif des techniques d'isolement et infections mixtes

L'utilisation des marqueurs microsatellites sur deux souches isolées simultanément du même patient a conforté nos résultats sur le biais sélectif des techniques d'isolement. Cependant cette « sélection » ne semble pas favoriser un génotype particulier et l'analyse de génétique des populations montre qu'il n'y a aucun effet détectable de la technique d'isolement sur la structure de la population des individus échantillonnés lors de cette étude. Ce que l'on peut dire, c'est que si deux ou plusieurs génotypes différents circulent chez un même patient, la technique d'isolement ne permet d'en isoler qu'un seul probablement en fonction de l'aptitude de ce génotype à croître à un moment donné dans un milieu d'isolement donné. La croissance de ce génotype se fait alors aux dépens des autres.

Ce phénomène a déjà été décrit par Seed (1978) qui a montré que si deux souches sont inoculées chez la souris ou mises en culture sur milieu axénique, une souche se développe aux dépens de l'autre. Nous avons aussi observé ce résultat lors de notre étude expérimentale de suivi d'infections mixtes chez le rongeur. Dans tous les cas, la souche de référence du groupe bouaflé (Biyamina) s'est développée aux dépens de la souche de notre étude du groupe 1 de *T. b. gambiense* (S12/9/5 IR pm) confirmant d'ailleurs la plus grande virulence déjà suspectée (Gibson *et al.*, 1999) des souches du groupe bouaflé.

Ce type d'observations assez courant chez les bactéries a déjà été décrit chez d'autres parasites pathogènes pour l'homme comme *T. cruzi* (Brenière *et al.*, 1992) ou *Leishmania donovani* (Dey *et al.*, 2002). Concernant *T. brucei* s.l., l'aptitude d'un génotype à se développer à un moment donné dans un milieu d'isolement donné pourrait être due à la proportion de formes slender et stumpy au moment du prélèvement. Ceci a déjà été suspecté pour le KIVI par McNamara *et al.* (1995). Ce même phénomène, récemment observé dans

notre laboratoire, pourrait aussi être à l'origine de l'aptitude différente de certains génotypes à se développer chez le vecteur (Ravel *et al.*, 2006a, article en annexe 3).

L'existence d'infections multiples intra-spécifiques de *T. brucei* s.l. par des génotypes différents, déjà observée chez la glossine (Stevens *et al.*, 1994; MacLeod *et al.*, 1999), chez les bovins domestiques (MacLeod *et al.*, 2000) et chez le porc (Scott, 1981 ; Jamonneau *et al.*, 2003 ; 2004b) se confirme chez l'homme. Les marqueurs microsatellites, en générant du polymorphisme au sein du groupe 1 de *T. b. gambiense* montrent que des infections mixtes souvent suspectées (Godfrey *et al.*, 1990 ; Jamonneau *et al.*, 2003) sont relativement courantes. On peut alors se demander quel pourrait être le rôle de ces infections multiples dans la diversité de réponses à l'infection.

Les marqueurs microsatellites ne semblent pas détecter les infections multiples à partir des échantillons biologiques. En effet, aucun profil d'infection multiple n'a été mis en évidence sur les EB de T+, alors qu' au moins pour deux patients, deux souches différentes ont été isolées par KIVI et IR. Dans ces deux cas, l'identification des trypanosomes de l'EB a donné soit le profil de la souche KIVI soit celui de la souche IR bien que les deux génotypes soient très probablement présents dans l'EB. Les résultats de notre étude expérimentale confirment que les marqueurs microsatellites ne permettent pas de détecter des infections multiples avec deux génotypes différents sauf dans le cas où ces deux génotypes sont représentés en proportions égales. Il semble donc que la technique PCR ne soit pas adaptée pour détecter des mélanges « disproportionnés », car il est probable que le génotype majoritaire sera préférentiellement amplifié (Barnabé, communication personnelle).

Ces résultats mettent en évidence un inconvénient majeur de la PCR/Microsatellites et plus généralement des autres méthodes comme les séquences minisatellites (MacLeod *et al.*, 2000 ; 2001) ou la MGE-PCR (Hide & Tilley, 2001 ; Tilley *et al.*, 2003) qui potentiellement peuvent aussi permettre le typage des trypanosomes à partir d'EB mais qui comme la PCR/Microsatellites sont basées sur l'amplification de l'ADN. La seule façon de détecter les infections multiples et donc d'en connaître la prévalence et leur rôle éventuel dans la diversité de réponses à l'infection semble être de multiplier les tentatives d'isolement et les prélèvements dans le temps comme nous l'avons fait lors de cette étude. Ainsi, malgré notre conviction de l'existence de l'effet « iceberg » (Tibayrenc *et al.*, 1999) chez *T. brucei* s.l., à savoir des études de génétique des populations qui n'ont pris en compte que la « partie visible » donc très partielle, de la diversité des souches de trypanosomes circulants, due essentiellement au filtre des techniques d'isolement, nous n'avons malheureusement pas pu, dans le cadre de ce présent travail à l'aide de la PCR/Microsatellites directement sur les EB,

mettre en évidence un nombre supérieur de génotypes. Pour autant, nous pensons que cette hypothèse de l'effet iceberg est tout a fait vérifiée chez *T. brucei* s.l., mais qu'il n'existe pas encore un outil suffisamment sensible à partir des EB pour le détecter. Notre étude n'a porté que sur un petit nombre d'EB. Il est prévu lors des prochaines prospections médicales de systématiquement conserver du sang total des malades dépistés et d'en identifier les trypanosomes par PCR/Microsatellites.

Néanmoins, le fait qu'une technique d'isolement et/ou qu'un prélèvement biologique ne sélectionne pas un génotype particulier ne limite pas le potentiel de cet outil pour une étude de génétique des populations de trypanosomes. Pour ce type d'étude, il semble que la caractérisation génétique de trypanosomes d'EB (simples à prélever et conserver) soit suffisante pour avoir une idée plus précise et moins biaisée que par MLEE des populations de trypanosomes circulant dans un lieu donné à un moment donné, ce qui permettrait de s'affranchir des méthodes d'isolement et de culture aux protocoles très lourds et difficiles à mettre en œuvre sur le terrain. Le prochain paragraphe commente les résultats obtenus par cette analyse qui ont permis de mettre en évidence une structure clonale au sein du groupe 1 de *T. b. gambiense*.

3. 2. 3. Reproduction au sein du groupe 1 de *T. b. gambiense*

L'ubiquité du groupe 1 de *T. b. gambiense*, le fort excès d'hétérozygotes et le déséquilibre de liaison que nous avons observés semblent en faveur d'une structure clonale de ce groupe. de Meeüs & Balloux (2005) ont montré que dans une population strictement clonale et fortement subdivisée en plusieurs dèmes, le F_{IS} , le F_{ST} et le F_{IT} devraient vérifier ces deux équations : (1) $F_{ST} = F_{ST}' = -F_{IS} / (1 - F_{IS})$ et (2) $F_{IT} = 0$. Ceci n'est pas exactement ce que nous observons avec notre jeu de données puisque le F_{IT} est égal à -0.31. Nous pouvons faire l'hypothèse que les populations du groupe 1 de *T. b. gambiense* sont fortement structurées et clonales mais que la stratégie d'échantillonnage ne permet pas une bonne estimation du F_{ST} (seulement trois sites de distribution hétérogènes). Dans ce cas, le F_{IS} est le plus informatif et nous avons observé qu'il converge avec celui obtenu par de Meeüs & Balloux (2005) sur les données (marqueurs minisatellites) de MacLeod et al. (2000).

L'inadéquation de nos résultats avec le modèle théorique pourrait être due à un nombre de sous populations modeste et /ou une migration trop importante. Elle pourrait également résulter d'un schéma de migration plus proche du modèle « stepping stone » que

d'un modèle en îles pour les individus de *T. b. gambiense*. Par contre, la présence de reproduction sexuée même rare ne semble pas pouvoir rendre compte de nos résultats, eu égard à l'extrême faiblesse de la variance du F_{IS} .

La caractérisation des trypanosomes par MLEE s'est avérée (en plus des problèmes techniques et d'interprétation rencontrés) inadaptée pour l'étude de la variabilité génétique du groupe 1 de *T. b. gambiense* auquel appartient l'ensemble des trypanosomes échantillonnés dans le cadre de l'étude.

Les marqueurs microsatellites, spécifiques du sous-genre *Trypanozoon* ont généré un grand polymorphisme au sein même du groupe 1 de *T. b. gambiense*, et ont permis

- de confirmer l'existence d'une « sélection » des techniques d'isolement probablement due à l'aptitude d'un génotype à se développer à un moment donné dans un milieu donné
- de mettre en évidence des infections mixtes.
- de montrer que certains individus C+ et PI+ témoins de la diversité de réponses aux tests de dépistage, étaient porteurs de trypanosomes pathogènes pour l'homme ; ces sujets qui ne sont pas traités pourraient constituer un réservoir de parasites dans les foyers de THA, contribuant ainsi aux phénomènes bien connus de re-émergence.
- de mettre en évidence une structuration au sein de ce groupe en relation avec l'origine géographique des trypanosomes identifiés,
- de montrer que l'on peut s'affranchir des techniques d'isolement (et de culture) dans le cadre d'étude de génétique des populations,
- de mettre en évidence une structure clonale de ce groupe

Cependant, ces marqueurs ont aussi montré des limites, et ils ne sont pas en mesure de détecter toutes les infections multiples à partir d'un seul échantillon biologique. Pour l'instant, et en attendant la mise au point de marqueurs plus sensibles l'étude de ces infections multiples (prévalence, rôle dans la diversité de réponses à l'infection) ne reste possible qu'en multipliant les prélèvements et/ou les techniques d'isolement.

Cette étude qui montre une structuration génétique au sein du groupe 1 de *T. b. gambiense* ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude d'éventuelles corrélations entre diversité génétique des trypanosomes et diversité de réponses à l'infection, mais aussi entre structuration des populations de trypanosomes et de leurs vecteurs.

Conclusions et perspectives

Des interactions complexes entre parasites et hôte humain se traduisent par une diversité clinique importante.

Pendant longtemps, comparé à la grande diversité des tableaux et présentations cliniques de la maladie, le monomorphisme des souches de trypanosomes isolées par une méthode *in vitro* a rendu plausible l'hypothèse du rôle primordial de l'hôte dans cette diversité. Cependant, le faible taux d'isolement des souches parasitaires a conduit à suspecter un biais dû à la technique utilisée. Au moyen de deux techniques indépendantes, MLEE et microsatellites, ce biais a été démontré et pourrait être à l'origine de la quasi disparition du groupe « bouaflé » qui n'est plus mis en évidence ni dans cette étude, ni dans des études précédentes. L'utilisation des marqueurs microsatellites sur un plus grand nombre d'échantillons biologiques et/ou un isolement systématique sur rongeur confirmeront ou infirmeront cette hypothèse. Mais, une « évolution épidémiologique » dans les foyers pourrait être également invoquée pour expliquer cette disparition: au début du réveil d'un foyer, en phase d'épidémisation, circulerait un plus grand nombre de génotypes, dont certains très pathogènes évoquant le type « rhodésien » ; au fur et à mesure, il y aurait une certaine diminution de diversité des génotypes et aussi de la pathogénicité pour aboutir à une dominance de génotypes d'un zymodème majeur, et de tableau clinique modéré.

Au cours des campagnes de dépistage, des sujets avec des sérologies positives mais négatifs en parasitologie sont détectés. Une sérologie positive peut être la conséquence d'une réaction croisée avec d'autres parasites, comme des trypanosomes animaux. La négativité des tests parasitologiques peut être associée à de faibles ou fluctuantes parasitémies. Mais, reste une catégorie de sujets qui maintiennent une sérologie positive dans le temps, sans confirmation parasitologique, et pour lesquels aucune souche ne peut être isolée. L'utilisation d'un diagnostic plus sensible et plus spécifique a montré chez ces sujets, la présence de trypanosomes, parfois même d'infections mixtes, directement dans des échantillons biologiques. Ces sujets pourraient être infectés par des souches peu virulentes ou contrôlèrent l'infection au moyen d'une immunité acquise contre les trypanosomes; cette dernière hypothèse évoque une similarité avec la trypanotolérance bovine, impliquant le système immunitaire et son contrôle génétique. Ces sujets ne sont généralement pas traités, et ils pourraient constituer un réservoir de parasites.

La variabilité génétique des trypanosomes pourrait également rendre compte de la diversité des formes cliniques. Les marqueurs microsatellite ont montré une diversité génétique et une structuration géographique des populations de trypanosomes au sein du groupe 1 de *T. b. gambiense*. Cette structuration géographique entre souches de Côte d'Ivoire et de Guinée pourrait être reliée à des différences apparues lors des phases d'échantillonnage sur le terrain : séroprévalences supérieures en Guinée, prévalence des sujets dépistés à la ponction ganglionnaire très supérieure dans les foyers guinéens (80% contre 20% en Côte d'Ivoire où les sujets sont donc principalement dépistés par la mAECT). Une étude plus exhaustive, qui débute en Afrique de l'Ouest, devrait permettre de mieux caractériser le rôle de la diversité génétique de ces trypanosomes dans le phénomène de diversité de réponses à l'infection.

Sur la base de résultats récents sur la génétique des vecteurs (Camara et al., 2006; Ravel et al., 2006b), cette structuration géographique pourrait également être liée aux populations de vecteurs, et à leur capacité vectorielle. *Glossina palpalis palpalis* dans les foyers ivoiriens (zone forestière) et *G. p. gambiensis* dans les foyers guinéens de notre étude, sont les vecteurs des trypanosomes. Ces deux sous-espèces, allopatriques et dont le statut spécifique est toujours en discussion (Challier et al., 1983 ; Ravel et al., 2006b ; Bouyer, communication personnelle) pourraient donc tout à fait transmettre des trypanosomes différents, et l'étude simultanée de la génétique des populations des trypanosomes et de leurs vecteurs pourrait apporter des nouvelles informations sur la distribution et la circulation des souches de *T. b. gambiense* en Afrique de l'Ouest.

Ce travail s'est plus particulièrement intéressé au rôle du parasite dans la diversité de réponse à l'infection. Il est clair que cette diversité est un phénomène complexe, et au rôle du parasite se rajoute le rôle du polymorphisme de l'hôte et des interactions entre les deux génomes. Des résultats récents montrent que l'étude des interactions hôtes-parasites est primordiale pour une meilleure compréhension de l'épidémiologie d'une maladie et devrait être considérée dans toute stratégie d'éradication de cette maladie. Une meilleure compréhension des mécanismes de l'hôte et du parasite qui influencent la pathogénèse et l'expression de la THA. pourrait aider au développement de nouveaux outils diagnostiques et de nouveaux médicaments ainsi qu'à une meilleure compréhension de la ré-émergence de la maladie.

Une étude conjointe des rôles respectifs du parasite et de l'hôte est initiée dans le contexte actuel d'éradication de la THA. Cette étude devrait permettre d'optimiser les stratégies de dépistage et de traitement, et associée à des études sur les vecteurs et leurs relations avec l'homme (lieux de transmission), d'identifier la combinaison de facteurs

favorisant le développement de la maladie pour prédire l'émergence, l'épidémisation ou l'extinction des foyers de THA.

Bibliographie

Aerts D., Truc P., Penchenier L., Claes Y. & Le Ray D. (1992). A kit for *in vitro* isolation of trypanosomes in the field: First trial with sleeping sickness patients in the Congo. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **86**, 394-395.

Agbo E. C., Majiwa P. A., Claassen N. J. & Te Pas M. F. (2002). Molecular variation of *Trypanosoma brucei* subspecies as revealed by AFLP fingerprinting. *Parasitology*, **124**, 349-358.

Agbo E. C., Duim B., Majiwa P. A., Büscher P., Claassen E. & Te Pas M. F. (2003). Multiplex endonuclease genotyping approach (MEGA): a tool for the fine-scale detection of unlinked polymorphic DNA markers. *Chromosoma*, **111**, 518-524.

Ajzenberg D., Banuls A. L., Tibayrenc M. & Dardé M. L. (2002). Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International Journal for Parasitology*, **32**, 27-38.

Anez N. (1982). Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV-a. A reconsideration of its systematic position. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **77**, 405-415.

Babiker E. A. & Le Ray D. (1981). Adaptation of low virulence stocks of *Trypanosoma brucei gambiense* to rat and mouse. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **61**(1), 15-29.

Bailey, J. W. & Smith, D. H. (1992). The use of acridine orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **86**, 630.

Barnabé C., Brisse S. & Tibayrenc M. (2000). Population structure and genetic typing of *T. cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology*, **120**, 513-526.

Barry J. D., Ginger M. L. Burton P. & McCulloch R. (2003). Why are parasite contingency genes often associated with telomers? *International Journal for Parasitology*, **33** (1), 29-45.

Bisser S., Bouteille B., Sarda J., Stanghellini A., Ricard D., Jauberteau M.O., Marchan F., Dumas M. & Breton J.C. (1997). Apport des examens biochimiques dans le diagnostic de la phase nerveuse de la Trypanosomose Humaine Africaine. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **90**, 321-326.

Biteau N., Bringaud F., Gibson W. C., Truc P. & Baltz T. (2000). Characterisation of *Trypanozoon* isolates using repeated coding sequence and microsatellite markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **105**, 185-201.

Borst P., Van der Ploeg M., Van Hock J.F.M., Tas J. & James J. (1982). On the DNA content and ploidy of trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **6**, 13-23.

Bouteille B., Ouken O., Bisser S. & Dumas M. (2003). Treatment perspectives for human African trypanosomiasis. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, **17** (2) 171-181.

Bowcock A. M., Ruiz-Linares A., Tomforde J., Minch E., Kidd J. R. & Cavalli-Sforza L. L. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, **368**, 455-457.

Brault J. & Lapin J. (1898). Notes sur l'étiologie de la pathogénie de la maladie du sommeil. *Archives of Parasitology*, **1**, 369.

Breidbach T., Ngazoa E. & Sterverding D. (2002). *Trypanosoma brucei*: *in vitro* slender to stumpy differentiation of culture – adapted, monomorphic bloodstream forms. *Experimental Parasitology*, **101** (4), 223-230.

Brénière S. F., Bosseno M. F., Revollo S., Rivera M. T., Carlier Y. & Tibayrenc M. (1992). Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **46** (3), 335-341.

Bruce D. & Nabarro D. (1903). Progress report on sleeping sickness in Uganda. *Sleeping Sickness Commission of the Royal Society*, **2**, 39p.

Bruce D., Hamerton A.E., Bateman H.R. & Machie F.P. (1909). The development of *Trypanosoma gambiense* in *Glossina palpalis*. *Proceedings of the Royal Society of London*, **81**, 405-414.

Bruce D., Hamerton A.E., Bateman H.R. & Machie F.P. (1911). Further researches on the development of *Trypanosoma gambiense* in *Glossina palpalis*. *Proceedings of the Royal Society of London*, **83**, 513-527.

Bruford M. W. & Wayne R. K. (1993). Microsatellites and their application to population genetics studies. *Current Opinion in Genetics and Development*, **3**, 939-943.

Brun R. & Balmer O. (2006). New developments in human african trypanosomiasis. *Current Opinion in Infectious Disease*, **19** (5), 415-420.

Buguet A., Bisser S., Josenando T., Chapot F. & Cespuglio R. (2005). Sleep structure: a new diagnostic tool for stage determination in sleeping sickness. *Acta Tropica*, **93** (1), 107-117.

Bulle B., Millon L., Bart J. M., Gallego M., Gambarelli F., Portus M., Schmur L., Jaffe C. L., Fernandez-Barredo S., Alunda J. M. & Piarroux R. (2002). Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **40** (9), 3391-3397.

Büscher P., Draelants E., Magnus E., Vervoort T. & Van Meirvenne N. (1991). An experimental latex agglutination test for antibody detection in human African trypanosomiasis. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **71**, 267-273.

Büscher P., Magnus E., & Van Meirvenne N. (1994). A latex agglutination test using a mixture of variable antigens of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Bulletin de Liaison et de Documentation de l' OCEAC*, **27**, 226.

Camara M., Kaba D., Douno M. K., Sanon J. R., Ouendeno F. I. & Solano P. (2005). La trypanosomose humaine africaine en zone de mangrove en Guinée: caractéristiques épidémiologiques et cliniques de deux foyers voisins. *Médecine Tropicale*, **65**, 155-161.

Camara M., Caro-Riano H., Ravel S., Dujardin J.P., Hervouet J.P., de Meeus T., Kagbadouno M. S., Bouyer J. & Solano P. (2006). Genetic and morphometric evidence for population isolation of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) on the Loos islands, Guinea. *Journal of Medical Entomology*, **43** (5), 853-860.

Cattand P., Miezán B. T. & De Raadt P. (1988). Human African Trypanosomiasis: use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *Bulletin of the World Health Organization*, **66**, 83-86.

Cattand P. (2001). L'épidémiologie de la trypanosomiase humaine africaine: une histoire multifactorielle complexe. *Médecine Tropicale*, **61**, 313-322.

Challier A., Gouteux J. P. & Coosemans M. (1983). La limite géographique entre les sous-espèces *Glossina palpalis palpalis* (Rob.-Desv.) et *Glossina palpalis gambiensis* Vanderplank en Afrique Occidentale. *Cahiers O.R.S.T.O.M. série Entomologie Médicale et Parasitologie*, **21**, 207-220.

Chappuis F., Loutan L., Simarro P., Lejon V. & Büscher P. (2005). Options for field diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, **18** (1), 133-146.

Chen, K. K. & Donelson, J. E. (1980). Sequences of two kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **77**, 2445-2449.

Cibuslakis (1988) R. E.. Origins and organization of genetic diversity in natural population of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*. **96**, 303-322.

Claes F., Büscher P., Touratier L. & Goddeeris B. M. (2005). *Trypanosoma equiperdum*: master of disguise or historical mistake? *TRENDS in Parasitology*, **21** (7), 316-321.

Claes F., Dujardin J. C., Touratier L., Büscher P. & Goddeeris M. (2006). Response to Li et al., and Shaw: Return of the ring-opportunities to challenge a hypothesis. *TRENDS in Parasitology*, **22** (2), 58-59.

Courtin F., Jamonneau V., Oké E., Oswald Y., Coulibaly B., Dupont S., Doumenge J.P., Cuny G. & Solano P. (2005). Towards understanding the presence/absence of Human African Trypanosomiasis in a focus of Côte d'Ivoire: a spatial analysis of the pathogenic system. *International Journal of Health Geographics*, **4**:27, 9p.

Degen R., Pospichal H., Enyaru J. & Jenni L. (1995). Sexual compatibility among *Trypanosoma brucei* isolates from an epidemic area in southeastern Uganda. *Parasitology Research*, **81** (3), 253-257.

De Greef C., Imberechts H., Matthyssongs G., Van Meirvenne N. & Hamers R (1989). A gene expressed only in serum-resistant variants of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **36**, 169-176.

De Greef C., Chimfwembe E., Kihang'a Wabacha J., Bajyana Songa E. & Hamers R (1992). Only the serum-resistant bloodstream forms of *Trypanosoma brucei rhodesiense* express the serum resistance associated (SRA) protein. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **72**, 13-21.

De Meeûs T. & Balloux F. (2005): F-statistics of clonal diploids structured in numerous demes. *Molecular Ecology*, **14**, 2695-2702.

De Meeûs T., Lehmann L. & Balloux F. (2006a). Molecular epidemiology of clonal diploids: a quick overview and a short DIY (Do It Yourself) notice. *Infection Genetics and Evolution*, **6**, 163-170.

De Meeûs T., McCoy, K.D., Prugnolle F., Chevillon C., Durand P., Hurtrez-Boussès S. & Renaud F. (2006b). Population genetics and molecular epidemiology or how to "débusquer la bête". *Infection Genetics and Evolution* (sous presse).

Desquesnes, M. (1997). Les trypanosomoses du bétail en Amérique Latine, étude spéciale dans le Plateau des Guyanes. *Thèse de Doctorat*, Université de Lille, France, 409p.

Dey T., Afrin F. Anam K. & Ali N. (2002). Infectivity and virulence of *Leishmania donovani* promastigotes: a role for media, source, and strain of parasite. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **49** (4), 270-274.

Diallo P. B., Truc P., Meda H. A & Kamenan A. (1996). Diagnostic sérologique de la trypanosomiase humaine africaine à *T. brucei gambiense*: obtention et utilisation d'antigènes bruts dans les tests ELISA et d'agglutination au latex. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **89**, 262-268.

Donelson J. E. & Turner M. (1985). Les métamorphoses du trypanosome. *Pour la Science*, **4**, 14-23.

Donelson J. E. (2003). Antigenic variation and the african trypanosome genome. *Acta Tropica*, **85** (3), 391-404.

Dukes P., Rickman L. R., Killick-Ke,drick R., Kakoma I., Wurapa F. K., de Raadt P. & Morrow R. (1984). A field comparison of seven diagnostic techniques for human trypanosomiasis in the Luangwa valley, Zambia. *Tropen Medizin und Parasitologie*, **35** (3), 141-147.

Dukes P., Gibson W. C., Gashumba J. K., Hudson K. M., Bromidge T. J., Kaukus A., Asonganyi T. & Magnus E. (1992). Absence of the LiTat 1.3 (CATT antigen) gene in *Trypanosoma brucei gambiense* stocks from Cameroon. *Acta Tropica*, **51**, 123-124.

Dutton J. E. (1902). Preliminary note upon a trypanosoma occurring in the blood of man. *Thompson Yates and Johnston Laboratories, Report IV*, 455-467.

Dutton J.E. (1903). Notes sur un trypanosome trouvé dans le sang de l'homme. *Annales d'Hygiène et de Médecine Coloniale*, **6**, 355-363.

Dutton J.E. & Todd J.L. (1906). The distribution and spread of sleeping sickness in the Congo Free State with suggestions on prophylaxis. Reports of the expedition the Congo, 1903-1905. *Liverpool School of Tropical Medicine, Mem XVIII*, 25-38.

El-Sayed N. M., Hegde P., Quackenbush J., Melville S. E. & Donelson J. E. (2000). The African trypanosome genome. *International Journal for Parasitology*, **30** (4), 329-345.

El-Sayed N. M., Ghedi E., Song J. MacLeod A., Bringaud F., Larkin C., Wanless D., Peterson J., Hou L., Taylor S., Tweedie A., Biteau N., Khalak H. G., Lin X, Mason T., Hannick L., Caler E., Blandin G., Bartholomeu D., Simpson A. J., Kaul S., Zhao H., Pai G., Van Aken S., Utterback T., Haas B., Koo H. L., Umayam L., Suh B., Gerrard C., Leech V., Qi R., Zhou S., Schwartz D., Felblyum T., Salzberg S., Tait A, Turner C. M., Ullu E., White O., Melville S., Adams M. S., Fraser C. M. & Donelson J. E. (2003). The sequence and analysis of *Trypanosoma brucei* chromosome II. *Nucleic Acids Research*, **31**, 4856-4863.

Enanga B., Keita M., Chauvière G., Dumas M. & Bouteille B. (1998). Megazol combined with suramin: a chemotherapy regimen which reversed the CNS pathology in a model of human African trypanosomiasis in mice. *Tropical Medicine and International Health*, **3**, 736-741.

Fairlamb A. H., Weislogel P. O., Hoeijmakers J. H. J. & Borst P. (1978). Isolation and characterization of kinetoplast DNA from bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Biology*, **76**, 293-309.

Felsenstein, J. (1993). PHYLIP: Phylogenetic inference Package, version 3.5 p. *Joseph Felsenstein and the University of Washington, Seattle*.

Fevre E. M., Picozzi K., Fyfe J., Waiswa C., Odiit M., Coleman P. G. & Welburn S.C. (2005). A burgeoning epidemic of sleeping sickness in Uganda. *Lancet*, **366** (9487), 745-747.

Fevre E. M., Picozzi K., Jannin J., Welburn S.C. & Maudlin I. (2006). Human African trypanosomiasis: Epidemiology and control. *Advances in Parasitology*, **61**, 167-221.

- Force-Barge, P. (1991). La trypanosomiase humaine au Congo en 1990. *Thèse de Médecine*, Université Montpellier I, France.
- Frézil J. L., Samba F., Bosseno M. F., Molinier M. (1979). Entretien des souches de *Trypanosoma brucei gambiense* en République Populaire du Congo. Etude de la virulence et relation avec l'épidémiologie. *Cahiers O.R.S.T.O.M. Série Entomologie médicale et Parasitologie*, vol. **XVII**, N°2, 107-118.
- Frézil, J. L. (1983). La trypanosomiase humaine en République populaire du Congo. *Travaux Documents O.R.S.T.O.M.*, 155p.
- Garcia A., Jamonneau V., Magnus E., Laveissière C., Lejon V., N'guessan P., N'dri L., Van Meirvenne N. & Büscher P. (2000). Longitudinal survey of positive Card Agglutination Trypanosomiasis test (CATT) but apparently aparasitemic individuals in Côte d'Ivoire: evidence for complex and heterogeneous population. *Tropical Medicine and International Health*, **5**, 786-793.
- Garcia A., Courtin D., Solano P., Koffi M. & Jamonneau V. (2006). Human African Trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics. *TRENDS in Parasitology*, **22** (9), 405-409.
- Gashumba J. K., Baker R. D. & Godfrey D. G. (1988). *Trypanosoma congolense*: the distribution of enzymic variants in East and West Africa. *Parasitology*, **96**, 475-486.
- Gentilini M. (1993). Médecine Tropicale. Cinquième édition. *Flammarion médecine-sciences*.
- Gibson W. C. & Wellde B. T. (1985). Characterisation of *Trypanozoon* stocks from the south Nyanza sleeping sickness focus in western Kenya. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**, 671-676.
- Gibson W. C., Osinga K. A., Michels P. A. M. & Borst P. (1985). Trypanosomes of subgenus *Trypanozoon* are diploid for housekeeping genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **16**, 231-242.

Gibson W. C. & Borst, P. (1986). Size-fractionation of the small chromosomes of *Trypanozoon* and *Nannomonas* trypanosomes by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **18**, 127-140.

Gibson W.C. (1986). Will the real *Trypanosoma brucei gambiense* please stand up. *Parasitology Today*, **2**, 255-257.

Gibson W.C. (1989). Analysis of a genetic cross between *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitology*, **99**, 391-402.

Gibson W.C. & Whittington H. (1993). Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*: selection of hybrid trypanosomes by introduction of genes conferring drug resistance. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **60**, 19-26.

Gibson W.C. (1995). The significance of genetic exchange in trypanosomes. *Parasitology Today*, **11**, 465-468.

Gibson W.C., Stevens J. & Truc P. (1999). Identification of trypanosomes: from morphology to molecular biology. In: *Progress in Human African Trypanosomiasis*, Ed. Springer, Paris, 7-29.

Gibson W. C., Backhouse T. & Griffiths A. (2002). The human serum resistance associated gene is ubiquitous and conserved in *Trypanosoma brucei rhodesiense* throughout East Africa. *Infection Genetics and Evolution*, **1**, 207-214.

Gibson W.C., Peacock L., Ferris V., Williams K. & Bailey M. (2006). Analysis of a cross between green and red fluorescent trypanosomes. *Biochemical Society Transactions*, **34** (4), 557-559.

Ginoux P. Y. & Frezil J. L. (1981). Recherche sur la latence clinique et la trypanotolérance humaine dans le foyer du couloir du fleuve Congo. *Cahiers O.R.S.T.O.M., série Entomologie médicale et Parasitologie*, **XIX**, **1**, 33-40.

- Godfrey D. G., Baker R. D., Rickman L.R. & Mehlitz D. (1990). The distribution, relationships and identification of enzymatic variants within the subgenus *Trypanozoon*. *Advances in Parasitology*, **29**, 1-39.
- Goudet J. (1995). F-stat version 1.2. A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485-486.
- Gruby D. (1943). Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, **17**, 1134.
- Herbert W. J. & Lumsden W. H. R. (1976). *Trypanosoma brucei*: a rapid matching method for estimating the host's and parasitemia. *Experimental Parasitology*, **40**, 427-431.
- Hide G., Cattand P., Le Ray D., Barry J. D. & Tait A. (1990). The identification of *T. brucei* subspecies using repetitive DNA sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **39**, 213-226.
- Hide G., Tait A., Maudlin I. & Welburn S.C. (1996). The origins, dynamics and generation of *Trypanosoma brucei rhodesiense* epidemics in East Africa. *Parasitology Today*, **12**, 50-55.
- Hide G. (1999). History of Sleeping Sickness in East Africa. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 112-125.
- Hide G. & Tilley A. (2001). Use of mobile genetic elements as tools for molecular epidemiology. *International Journal for Parasitology*, **31**, 599-602.
- Hoare C.A. (1972). The trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph. *Blackwell Scientific Publications, Oxford*, 749p.
- Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florales. *Bulletin de la Société Vaudoise de Sciences Naturelles*, **44**, 223-270.

Jamjoom M. B., Ashford R. W., Bates P. A., Kemp S. J. & Noyes H. A. (2002). Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **96** (3), 265-270.

Jamonneau V., N'guessan P., N'dri L., Simaro P. & Truc P. (2000a). Exploration of the distribution of *Trypanosoma brucei* ssp. In West Africa, by multilocus enzyme electrophoresis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **94**, 643-649.

Jamonneau V., Garcia A., N'guessan P., N'dri L., Sanon R., Laveissière C., Frezil J. L. & Truc P. (2000b). Clinical and biological evolution of Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **94**, 831-835.

Jamonneau V., Garcia A., Oury B., Ravel S., Cuny G., Solano P., N'dri L., Sanon R., Frezil J. L., & Truc P. (2002). Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei* ssp. and clinical evolution of Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Tropical Medicine and International Health*, **7**, 610-621.

Jamonneau V., Barnabé C., Koffi M., Sané B., Cuny G. & Solano P. (2003). Identification of *Trypanosoma brucei* circulating in a sleeping sickness focus in Côte d'Ivoire: assessment of genotype selection by isolation method. *Infection Genetics and Evolution*. **3**, 143-149.

Jamonneau V., Ravel S., Garcia A., Koffi M., Truc P., Laveissière C., Herder S., Grébaud P., Cuny G. & Solano P. (2004a). Characterization of *Trypanosoma brucei* s.l. infecting asymptomatic sleeping-sickness patients in Côte d'Ivoire: a new genetic group? *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **98** (4), 329-337.

Jamonneau V., Ravel S., Koffi M., Kaba D., Zeze D. G., N'dri L., Sane B., Coulibaly B., Cuny G. & Solano P. (2004b). Mixed infections of trypanosomes in tsetse and pigs and their epidemiological significance in a sleeping sickness focus of Côte d'Ivoire. *Parasitology*, **129**, 693-702.

Jamonneau V., Koffi M., Solano P., Courtin D., Cuny G. & Garcia A. (2004c). Trypanosomose humaine africaine: interaction parasite/hôte et diversité clinique. *Bulletin de l'Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur*, **46** (180) 105-110.

Jamonneau V., Solano P., Koffi M., Denizot M. & Cuny G. (2004d). Apport et limites du diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine. *Medecine/Sciences*, **20**, 871-875.

Jamot E. (1926). La maladie du sommeil dans le Nord-Cameroun. *Annales de Médecine et de Pharmacie Coloniale*.

Jamot E. (1929). La maladie du sommeil au Cameroun. Comment nous la combattons? *Revue Pratique des Maladies des Pays chauds*, **9**, 326-337.

Jamot E. (1932). La maladie du sommeil au Cameroun en Janvier 1929. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **6**, 473-496.

Jannin J., Moulia-Pelat J. P., Chanfreau B., Penchenier L., Louis J. P., Nzaba P., Elfassi de la Baume F., Eozenou P. & Cattand P. (1993). Trypanosomiase humaine africaine : étude d'un score de présomption de diagnostic au Congo. *Bulletin of the World Health Organization*, **71**, 215-222.

Jenni L., Marti J., Schweizer J., Betschart B., Le Page R.W.F., Wells J.M., Tait A., Paindavoine P., Pays E. & Steinert M. (1986). Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature*, **322**, 173-175.

Joshi P. P., Shegokar; V. R., Powar R. M., Herder S., Katti R., Salkar H. R., Dani V. S., Bhargava A., Jannin J. & Truc P. (2005). Human Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **73** (3), 491-495.

Kaba D., Dje N. N., Courtin F., Oke E., Koffi M., Garcia A., Jamonneau V. & Solano P. (2006). L'impact de la guerre sur l'évolution de la THA dans le Centre – Ouest de la Côte d'Ivoire. *Tropical Medicine and International Health*, **11**, 136-143.

Kabiri M., Franco J. R., Simarro P. P., Ruiz J. A., Sarsa M. & Steverding D. (1999). Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression – site- associated genes 6 and 7. *Tropical Medicine and International Health*, **10**, 658-661.

- Kanmogne G. D., Asonganyi T. & Gibson W. C. (1996). Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in serologically positive but aparastaemic sleeping sickness suspects in Cameroon, by PCR. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **90**, (5), 475-483.
- Kaukas A., Gashumba J. K., Lanham S. M. & Dukes P. (1990). The substitution of procyclic for bloodstream form *Trypanosoma brucei gambiense* in isoenzymes studies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **84**, 242-245.
- Kennedy P. G. (2006). Diagnostic and neuropathogenesis issues in Human African Trypanosomiasis. *International Journal for Parasitology*, **36** (5), 505-512.
- Kidane G., Huges, D. & Simpson L. (1984). Sequence heterogeneity and anomalous electrophoretic mobility of kinetoplast minicircle DNA in *Leishmania tarentolae*. *Gene*, **27**, 265-277.
- Koffi M., Solano P., Denizot M., Courtin D., Garcia A., Lejon V., Bücher P., Cuny G. & Jamonneau V. (2006). Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: A potential human reservoir of parasites? *Acta Tropica*, **98**, 183-188.
- Kyambadde J. W., Enyaru J. C., Matovu E., Odiit M. & Carasco J. F. (2000). Detection of Trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using the polymerase chain reaction. *Bulletin of the World Health Organization*, **78**, 119-124.
- Lanham, S. M. & Godfrey, D. G. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology*, **28**, 521-534.
- Lapeyssonnie L. (1960). Deuxième note concernant un cas exceptionnel de trypanosomiase, parasitémie observée pendant 21 ans sans signes cliniques appréciables chez une malade traitée inefficacement pendant les 10 premières années. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **57**, 28-32.

Legros D., Ollivier G., Gastellu-Etchegorry M., Paquet C., Burri C., Jannin J. & Buscher P. (2002). Treatment of human African trypanosomiasis-present situation and needs for research and development. *Lancet Infectious Disease*, **2** (7), 393.

Lejon V., Rosengren L.E., Büscher P., Karlsson J.E. & Sema P. (1999). Detection of light subunit neurofilament and glial fibrillary acidic protein in cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense* - infected patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **60**, 94-98.

Lejon V., Jamonneau V., Solano P., Atchade P., Mumba D., Nkoy N., Bebronne N., Kibonja T., Balharbi F., Wierckx A., Boelaert M. & Buscher P. (2006). Detection of trypanosome-specific antibodies in saliva, towards non-invasive serological diagnosis of sleeping sickness. *Tropical Medicine and International Health*, **11** (5), 620-627

Levine N. D., Corliss J. O.; Cox F. E. Deroux G., Grain, J., Hönigberg B., Lom J., Lynn D., Loeblich A. R., Merinfeld E. G., Page F. C., Poljansky G., Sprague Vavra, J. & Wallace F. G. (1980). A newly revised classification of the *Protozoa*. *Journal of Protozoology*, **27**, 37-58.

Li F. J., Gasser R. B., Zheng J. Y., Claes F., Zhu X. Q. & Lun Z. R. (2005). Application of multiple DNA fingerprinting techniques to study the genetic relationships among three members of the subgenus *Trypanozoon* (Protozoa: Trypanosomatidae). *Molecular and Cellular Probes*, **19**, 400-407.

Li F. J., Gasser R. B., De-Hua L., Claes F., Zhu X. Q., Lun Z. R. (2006). PCR approach for the detection of *Trypanosoma brucei* and *T. equiperdum* and their differentiation from *T. evansi* based on maxicircle kinetoplast DNA. *Molecular and Cellular Probes* (sous presse).

Luckins A. G., Dwinger R. H. (2004). Non-tsetse transmitted animal trypanosomiasis. In: Holmes, P. H., Miles M. A. (Eds.), *the Trypanosomiases*. CABI Publishing, 269-282.

Lumsden W.H.R., Kimber C.D. & Strange M. (1977). *Trypanosoma brucei*: detection of low parasitaemias in mice by a miniature anion-exchanger/centrifugation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **71**, 421-424.

Lumsden W. H. R., Kimber C. D., Evans D. A. & Doig S. J. (1979). *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitemias; adaptation for field use. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**, 312-317.

Lumsden W. H. R., Kimber C. D., Dukes P., Haller L., Stanghellini A. & Duvallet G. (1981). Field diagnosis of sleeping sickness in the Ivory Coast: Comparison of the miniature anion-exchange/centrifugation technique with other protozoological methods. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **75**, 242-250.

MacCulloch R. (2004). Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. *TRENDS in Parasitology*, **20** (3), 117-121.

Macedo A. M., Pimenta J. R., de Aguiar R. S., Melo A. I. R., Chiari E., Zingales B., Pena S. D. & Oliveira R. P. (2001). Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96** (3), 407-413.

MacLean L., Chisi J. E., Odiit M., Gibson W. C., Ferris V., Picozzi K. & Sternberg J. M. (2004). Severity of Human African Trypanosomiasis in East Africa is associated with geographic location, parasite genotype, and host inflammatory cytokine response profile. *Infection and Immunity*, **72**, 7040-7044.

MacLean L., Odiit M. & Sternberg J. M. (2006). Intrathecal cytokine responses in *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **100**, 270-275.

MacLeod A., Turner C. M. R. & Tait A. (1999). A high level of *Trypanosoma brucei* infections in tsetse flies by three hypervariable minisatellites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **102**, 237-248.

MacLeod A., Tweedie A., Wellburn S. C., Maudlin I, Turner C. M. R., & Tait A. (2000). Minisatellite marker analysis of *Trypanosoma brucei*: reconciliation of clonal, panmictic and epidemic population genetic structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97** (24), 13442-13447.

MacLeod A., Turner C. M. R. & Tait A. (2001). The detection of geographical substructuring of *Trypanosoma brucei* populations by the analysis of minisatellite polymorphisms. *Parasitology*, **123**, 475-482.

MacLeod A., Tweedie A., McLellan S., Hope M., Taylor S., Cooper A., Sweeney L., Turner C. M. & Tait A. (2005). Allelic segregation and independent assortment in *T. brucei* crosses: proof that the genetic system is Mendelian and involves meiosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **143** (1), 12-19.

MacNamara J.J., Bailey J., Smith D.H., Wakholi S. & Godfrey D.G. (1995). Isolation of *Trypanosoma brucei gambiense* from Northern Uganda: Evaluation of the Kit for in vitro isolation (KIVI) in an epidemic focus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**, 388-389.

Magnus E., Vervoot & Van Meirvenne N. (1978). A card agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **58** (3), 169-176.

Martin G., Leboeuf A. & Roubaud E. (1909). Rapport de la mission d'étude de la maladie du sommeil au Congo français, 1906-1908. *Masson Compagnie*, Paris, 721p.

Masiga D. K. & Turner C. M. R. (2004). Amplified restriction fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *In: Melville, S. E. (Ed.), Methods in molecular Biology, Parasite Genomics Protocols Humana Press Inc*, **270** 173-185.

Mathieu-Daudé F. (1991). Mode de reproduction de *Trypanosoma brucei* dans ses populations naturelles: implications taxonomiques et épidémiologiques. *Thèse de doctorat*. Université Montpellier II, France.

Mathieu-Daudé F. & Tibayrenc M. (1994). Isoenzyme variability of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 by a specific kinetoplast DNA probe. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **50**, 13-19.

Mathieu-Daudé F., Stevens J., Welsh J., Tibayrenc M. & McClelland M. (1995). Genetic diversity and population structure of *Trypanosoma brucei*: clonality versus sexuality. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **72**, 89-101.

Mehlitz D. (1978). Investigations on the susceptibility of *Mastomys natalensis* to *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei gambiense*. *Tropen Medizin und Parasitologie*, **29**(1):101-107.

Mehlitz D., Zilmann U., Scott C. M. & Godfrey D. G. (1982). Epidemiological studies on the animal reservoir of gambiense sleeping sickness. Part III. Characterization of *Trypanozoon* stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Tropen Medizin und Parasitologie*, **33**, 113-118.

Mehlitz, D. (1986). Le réservoir animal de la maladie du sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense*. *Etudes et Synthèses de l'Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 156p.

Michels P. A. M., Hannaert V., Ernest I. & Albert S. (1991). Organisation, structure and evolutionary aspect of genes in trypanosomes. *Biochemical Society Transactions*, **18**, 727-729.

Miezan T.W., Meda H.A., Doua F., Djé N.N., Lejon V. & Büscher P. (2000). Simple centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed Pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **94**, 293.

Mihok S., Otieno L. H. & Darji N. (1990). Population genetics of *Trypanosoma brucei* and the epidemiology of human sleeping sickness in the Lambwe Valley, Kenya. *Parasitology*, **100**, 219-233.

Milner J. D. & Hajduk S. L. (1999). Expression and localization of serum resistance associated protein in *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **104** (2), 271-283.

Moser D. R., Cook G. A., Diane E. O., Bailey C. P., McKane M. R. & Donelson J. E. (1989). Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*, **99**, 57-66.

Mowatt M. R. & Clayton C. E. (1988). Polymorphism in the procyclic acidic repetitive protein gene family of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology*, **8**, 4055-4062.

Njiokou F., Nkinin S. W., Grebaut P., Penchenier L., Barnabe C., Tibayrenc M. & Herder S. (2004a). An isoenzyme survey of *Trypanosoma brucei* s.l. from the Central African subregion: population structure, taxonomic and epidemiological considerations. *Parasitology*. **128** (6), 645-653.

Njiokou F., Simo G., Nkinin S. W., Laveissière C. & Herder S. (2004b). Infection rate of *Trypanosoma brucei* s.l., *T. vivax*, *T. congolense* "forest type", and *T. simiae* in small wild vertebrates in south Cameroon. *Acta Tropica*, **92** (2), 139-146.

Njiokou F., Laveissière C., Simo G., Nkinin S., Grebaut P., Cuny G. & Herder S. (2006). Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. *Infection Genetics and Evolution*, **6** (2), 147-153.

Noireau F., Gouteux J.P. & Frézil J.L. (1986a). Sensibilité du test d'agglutination sur carte (Testryp CATT) dans les infections porcines à *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* en République du Congo. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **66**, 63-68.

Noireau F., Gouteux J. P., Toudic A., Samba F. & Frézil J. L. (1986b). Importance épidémiologique du réservoir animal à *Trypanosoma brucei gambiense* au Congo : Prévalence des trypanosomiasés animales dans les foyers de la maladie du sommeil. *Tropical Medicine and Parasitology*, **37**, 393-398.

Noireau F., Gouteux J. P. & Duteurtre J. P. (1987). Diagnostic value of a card agglutination test (Testryp CATT) in the mass screening of human trypanosomiasis in the Congo. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **80**(5), 797-803.

N'tambi J. & Englund P. (1985). A gap at a unique location in newly replicated kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma equiperdum*. *Journal of Biological Chemistry*, **260**, 5574-5579.

Odongo D., Oura C. A. L., Spooner P., Kiara H., Mburu D., Hanotte O. & Bishop R. (2006). Linkage disequilibrium between alleles at highly polymorphic mini and microsatellite loci of *Theileria parva* isolated from cattle in three regions of Kenya. *International Journal for Parasitology*, **36** (8), 937-946.

Oliveira R. P., Broude N. E., Macedo A. M., Cantor C. R., Smith C. L. & Pena S. D. J (1998). Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 3776-3780.

OMS (1986). La trypanosomiase africaine: épidémiologie et lutte. *Rapport d'un comité d'experts*. Série de Rapports techniques, 739.

OMS (1998). Contrôle et surveillance de la trypanosomiase africaine. *Rapport d'un comité d'experts*. Série de Rapports techniques, 881.

OMS (2002). Rapport OMS 2002, Geneva.

Ormerod W. E. (1967). Taxonomy of the sleeping sickness trypanosomes. *Journal of Parasitology*, **53** (4), 824-830.

Oura C. A. L., Odongo D. O., Lubega G. W., Spooner P. R., Tait A. & Bishop R. P. (2003). A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterization of field isolates of *Theileria parva*. *International Journal for Parasitology*, **33**, 1641-1653.

Oura C. A. L., Asiimiwe B. B., Weir W., Lubega G. W. & Tait A. S. (2005). Population genetic analysis and substructuring of *Theileria parva* in Uganda. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **140** (2), 229-239.

- Page R. D. (1996). Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**, 357-358.
- Pays E. (2005). Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*. *TRENDS in Parasitology*, **21** (11), 517-520.
- Pays (2006). The variant surface glycoprotein as a tool for adaptation in African trypanosomes. *Microbes and Infection*, **8** (3), 930-937.
- Penchenier L., Grebaut P., Njiokou F., Eboo Eyenga V. & Büscher P. (2003). Evaluation of LATEX/*T. b. gambiense* for mass screening of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Central Africa. *Acta Tropica*, **85** (1), 31-37.
- Pepin J. & Mpia B. (2005). Trypanosomiasis relapse after melarsoprol therapy, Democratic Republic of Congo, 1982-2001. *Emerging Infectious Diseases*, **11** (6), 921-927.
- Picozzi K., Fevre E. M., Odiit M., Carrington M., Eisler M. C., Maudlin I. & Welburn S. C. (2005). Sleeping sickness in Uganda: a thin line between two fatal diseases. *BMJ*, **331** (7527), 1238-1241.
- Plimmer H. G. & Bradford J. R. (1899). A preliminary note on the morphology and the distribution of the organism found in the tsetse fly disease. *Proceedings of the Royal Society of London*, B **65**, 274.
- Pollard V. M., Roher, S. P., Michelotti, E. F., Hancock, K. & Hadjuk, S. L. (1990). Organisation of minicircle genes for guide RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Cell*, **63**, 783-790.
- Pollard, V. M. & Hadjuk S. L. (1991). *Trypanosoma equiperdum* minicircles encode three distinct primary transcripts which exhibit guide RNA characteristics. *Molecular and Cellular Biology*, **9**, 1365-1367.
- Radwanska M., Chamekh M., Vanhamme L., Claes F., Magez S., Magnus E., De Baetselier P., Buscher P. & Pays E. (2002). The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **67**, 684-690.

Ravel S., Patrel D., Koffi M., Jamonneau V. & Cuny G. (2006a). Cyclical transmission of *Trypanosoma brucei gambiense* displays great differences among field isolates. *Acta Tropica* (sous presse).

Ravel S., de Meeus T., Dujardin J. P., Zeze D.G., Gooding R. H., Sane B., Cuny G. . & Solano P. (2006b); The tsetse fly *Glossina palpalis palpalis* is composed of several genetically differentiated small populations in the sleeping sickness focus of Bonon, Côte d'Ivoire. *Infection Genetics and Evolution* (sous presse).

Razandrainibe F. G., Durand P., Koella J. C., de Meeüs T., Rousset F., Ayala F. J. & Renaud F. (2005). « Clonal » population structure of the malaria agent *Plasmodium falciparum* in high-infection regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** (48), 17388-17393.

Roditi I., Schwarz H., Pearson T. W., Beecroft R. P., Liu M. K., Richardson J. P., Buhring H. J., Pleiss J., Bulow R. & Williams R. O. (1989). Procyclin gene expression and loss of the variant surface glycoprotein during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Biology*, **108**, 737-746.

Russel R., Iribar M. P., Lambson B., Brewster S., Blackwell J. M., Dye C. & Ajioka J. W. (1999). Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **103**, 71-77.

Schwenkenbecher J. M., Fröhlich C., Gehre F., Schnur L. F. & Schönian G. (2004). Evolution and conservation of microsatellite markers for *Leishmania tropica*. *Infection Genetics and Evolution*, **4**, 99-105.

Schwenkenbecher J. M., Wirth T., Schnur L. F., Jaffe C. L., Schallig H., Al-Jawabreh A., Hamarsheh O., Kifaya A., Pralong F. & Schönian G. (2006). Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *International Journal for Parasitology*, **36**, 237-246.

Scott C. M. (1981). Mixed populations of *Trypanosoma brucei* in a naturally infected pig. *Tropen Medizin und Parasitologie*, **32** (4), 221-222.

Seed J.R. (1978). Competition among serologically different clones of *Trypanosoma brucei gambiense* in vivo. *Journal of Protozoology*, **25**, 526-529.

Seed J. R. & Wenck M. A. (2003). Role of the long slender to short stumpy transition in the life cycle of the African trypanosomes. *Kinetoplastid Biology and Disease*, **2**:3.

Sidibé I. (1997). Variabilité génétique de *Trypanosoma congolense* agent de la trypanosomose animale: implications taxonomiques et épidémiologiques. *Thèse de doctorat*, Université Montpellier II, France.

Simo G., Herder S., Njiokou F., Asonganyi T., Tilley A. & Cuny G. (2005). *Trypanosoma brucei* s. l.: Characterisation of stocks from Central Africa by PCR analysis of mobile genetic elements. *Experimental Parasitology*, **110**, 353-362.

Simpson L. (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Annual Review of Microbiology*, **41**, 363-382.

Smith D. H. & Bailey J. W. (1997). Human African Trypanosomiasis in South-eastern Uganda: clinical diversity and isoenzymes profiles. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **7**, 851-856.

Sneath P. H. A. & Sokal R. R. (1973). Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification. *W.H. Freeman and Co*, San Francisco, D. Kennedy & R.B. Park Eds., pp 573.

Solano (1998). Implications épidémiologiques de la variabilité génétique des populations de glossines. Cas de *Glossina palpalis* en Afrique de l'Ouest. *Thèse de doctorat*, Université Montpellier II, France. 205p.

Solano P., Jamonneau V., N'guessan P., Ndri L., Dje N. N., Miezán T. W., Lejon V., Büscher P. & Garcia A. (2002). Comparison of different DNA preparation protocols for PCR diagnosis of Human African Trypanosomiasis in Cote d'Ivoire. *Acta Tropica*, **82** (3), 349-356.

- Stephens J. W. W. & Fantham H. B. (1910). On the peculiar morphology of a trypanosome from a case of sleeping sickness and the possibility of its being a new species (*T. rhodesiense*). *Proceedings of the Royal Society of London*, **86**, 187.
- Sternberg J., Tait A., Haley S., Wells J. M., Le Page R. W., F Schweizer J. & Jenni L. (1988). Gene exchange in African trypanosomes: characterisation of a new hybrid genotype. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **27**, 191-200.
- Sternberg J. M. (2004). Human African Trypanosomiasis: clinical presentation and immune response. *Parasite Immunology*, **26**, 469-476.
- Stevens J. R., Nunes V. L. B., Lanham S. M. & Oshiro E. T. (1989). Isoenzyme characterization of *Trypanosoma evansi* isolated from capybaras and dogs in Brazil. *Acta Tropica*, **46**, 213-222.
- Stevens J. R., Lanham S. M., Allingham R. & Gashumba J. K. (1992). A simplified method for identifying subspecies and strain groups in *Trypanozoon* by isoenzymes. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **86**, 9-28.
- Stevens J. R. & Godfrey D. G. (1992). Numerical taxonomy of *Trypanozoon* based on polymorphisms in a reduced range of enzymes. *Parasitology*, **104**, 75-86.
- Stevens J. R., Mathieu-Daude F., McNamara J. J., Mizen V. H. & Nzila A. (1994). Mixed populations of *Trypanosoma brucei* in wild *Glossina palpalis palpalis*. *Tropical Medicine and Parasitology*, **45** (4), 313-318.
- Stuart, K. (1979). Kinetoplast DNA of *Trypanosoma brucei*: physical map of maxicircle. *Plasmid*, **2**, 520-528.
- Stuart K. (1991). RNA editing in *Trypanosomatid* mitochondria. *Annual Review of Microbiology*, **45**, 327-344.

Sugisaki H. & Le Ray D. (1987). Kinetoplast DNA minicircles of the insect Trypanosomatid *Crithidia fasciculata* contain two nearly identical 173 bp and 177 bp sequences involved in DNA replication. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **23**, 253-264.

Tait A. (1980). Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. *Nature*, **287**, 536-538.

Tait A., Babiker E. A. & Le Ray D. (1984). Enzyme variation in *Trypanosoma brucei* spp. Evidence for the sub-speciation of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Parasitology*, **89** (2), 311-326.

Tait A., Barry J. D., Wink R., Sanderson A. & Crowe J. S. (1985). Enzyme variation in *Trypanosoma brucei* ssp. Evidence for *T. b. rhodesiense* being a subset variant of *T. b. brucei*. *Parasitology*, **90**, 89-100.

Tait A., Buchanan G., Hide G. & Turner C. M. R. (1996). Evidence for self-fertilisation in *T. brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **76**, 31-42.

Taylor J. W., Geiser D. M., Burt A. & Koufopanou V. (1999). The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 126-146.

Tibayrenc M., Kjellberg F. & Ayala F. J. (1990). A clonal theory of parasitic Protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 2414-2418.

Tibayrenc M. & Ayala F.J. (1991). Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitology Today*, **7**, 228-232.

Tibayrenc M., Kjellberg F., Arnaud J., Oury B., Brenière S. F., Dardé M. L. & Ayala F. J. (1991). Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 5129-5133.

Tibayrenc M., Neubauer K., Barnabe C., Guerrini F., Skarecky D. & Ayala F. J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 1335-1339.

Tibayrenc M. (1995). Population genetics and strain typing of microorganisms: how to detect departures from panmixia without individualizing alleles and loci. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences III Paris*, **318**, 135-139.

Tibayrenc M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic Protozoan and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International Journal for Parasitology*, **28**, 85-104.

Tibayrenc M. (1999). Towards an integrated genetic epidemiology of parasitic Protozoa and other pathogens. *Annual Review of Genetics*, **33**, 449-477.

Tilley A., Hide G., Fevre E. & Welburn S. C. (2003). Strain typing of *Trypanosoma brucei* using PCR analysis of mobile genetic elements (MGE-PCR). *Newsletter on Integrated Control of Pathogenic Trypanosomes and their Vectors*, **8**, 27-29.

Truc P., Mathieu-Daudé F. & Tibayrenc M. (1991). Multilocus isozyme identification of *Trypanosoma brucei* stocks isolated in Central Africa: evidence for an animal reservoir of sleeping sickness in Congo. *Acta Tropica*, **49**, 127-135.

Truc P., Aerts D., McNamara J. J., Claes J. J., Allingham R., Le Ray D. & Godfrey D. G. (1992). The direct *in vitro* isolation of *Trypanosoma brucei* from man and animals, and its potential value for the diagnosis of Gambian trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **86**, 627-629.

Truc P. & Tibayrenc M. (1993). Population genetics of *Trypanosoma brucei* in Central Africa: taxonomic and epidemiological significance. *Parasitology* **106**, 137-149.

Truc P., Bailey J. W., Doua F., Laveissière C. & Godfrey D. G., (1994). A comparison of parasitological methods for the diagnosis of gambian trypanosomiasis in an area of low endemicity in Cote d'Ivoire. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **88** (4), 419-421.

Truc P., Formenty P., Diallo P. B., Komoin-Oka C. & Lauginie F. (1997a). Confirmation of two distinct classes of zymodemes of *Trypanosoma brucei* infecting patients and wild mammals in Côte d'Ivoire: suspected difference in pathogenicity. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **91**, 951-956.

Truc P., Formenty P., Duvallet G., Komoin-Oka C., Diallo P. B. & Lauginie F. (1997b). Identification of trypanosomes isolated by KIVI from wild mammals in Côte d'Ivoire: diagnostic, taxonomic and epidemiological considerations. *Acta Tropica*, **67**, 187-196.

Truc P., Jamonneau V., N'Guessan P., Diallo P. B. & Garcia A. (1998a). Parasitological diagnosis of African trypanosomiasis: a comparison of the QBC® and miniature anion-exchange centrifugation techniques. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **92**, 288-289.

Truc P., Jamonneau V., N'Guessan P., N'Dri L., Diallo P. B. & Butigieg X. (1998b). Simplification of the miniature anion-exchange centrifugation technique for the parasitological diagnosis of human African trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **92**, 512.

Truc P., Jamonneau V., Cuny G. & Frezil J. L. (1999). Polymerase Chain Reaction in African Trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bulletin of the World Health Organization*, **77**, 745-749.

Truc P., Ravel S., Jamonneau V., N'Guessan P. & Cuny G. (2002). Genetic variability within *Trypanosoma brucei gambiense*: evidence of the circulation of different genotypes in human African trypanosomiasis patients in Côte d'Ivoire. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **96**, 52-55.

- Truc P., Gibson W. C. & Herder S. (2006). Genetic characterization of *Trypanosoma evansi* isolated from a patient in India. *Infection Genetics and Evolution* (sous presse).
- Van der Ploeg, L. H. T., Cornelissen, A. W. C. A., Barry J. D. & Borst P. (1984). Chromosomes of Kinetoplastida. *EMBO Journal*, **3**, 3109-3115.
- Van Meirvenne N., Janssens P. G. & Magnus E. (1975). Antigenic variation in syringe passaged population of *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei*. Rationalization of the experimental approach. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale.*, **55**, 1-23.
- Vickerman K. & Luckins A. G. (1969). Localization of variable antigens in the surface coat of *Trypanosoma brucei* using ferritin-conjugate antibody. *Nature*, **224**, 1125-1126.
- Vickerman K. & Preston T. M. (1970). Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *Journal of Cell Science*, **6**, 365-383.
- Vickerman K. (1989). Trypanosome sociology and antigenic variation. *Parasitology*, **99**, S37-S47.
- Wagner W. H. (1961). Problems in the classification of ferns. In: *Recent advances in Botany*, University Toronto Press, Montréal, 841-844.
- Welburn S. C., Picozzi K., Fevre M., Coleman P. G., Odiit M., Carrington M. & Maudlin I. (2001). Identification of human-infective trypanosomes in animal reservoir of sleeping sickness in Uganda by means of serum-resistance-associated (SRA) gene. *Lancet*, **358** (9298), 2017-2019.
- Wells J. M., Prospero D., Jenni L. & Le Page R. W. F. (1987). DNA contents and molecular karyotypes of hybrid *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **24**, 103-116.
- Welsh J. & McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary Primers. *Nucleic Acids Research*, **18**, (24), 7213-7218.

Wery M., Weyn J., J.Mpela N. N. & Colaert (1977). Isolement de souches de *T. gambiense* au Zaïre et leur adaptation aux animaux de laboratoire. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **57** (4-5), 425-437.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A. & Tingey S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18** (22), 6531-6535.

Woo P. T. K. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. *Acta Tropica*, **27**, 613-634.

Wright S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, **19**, 395-420.

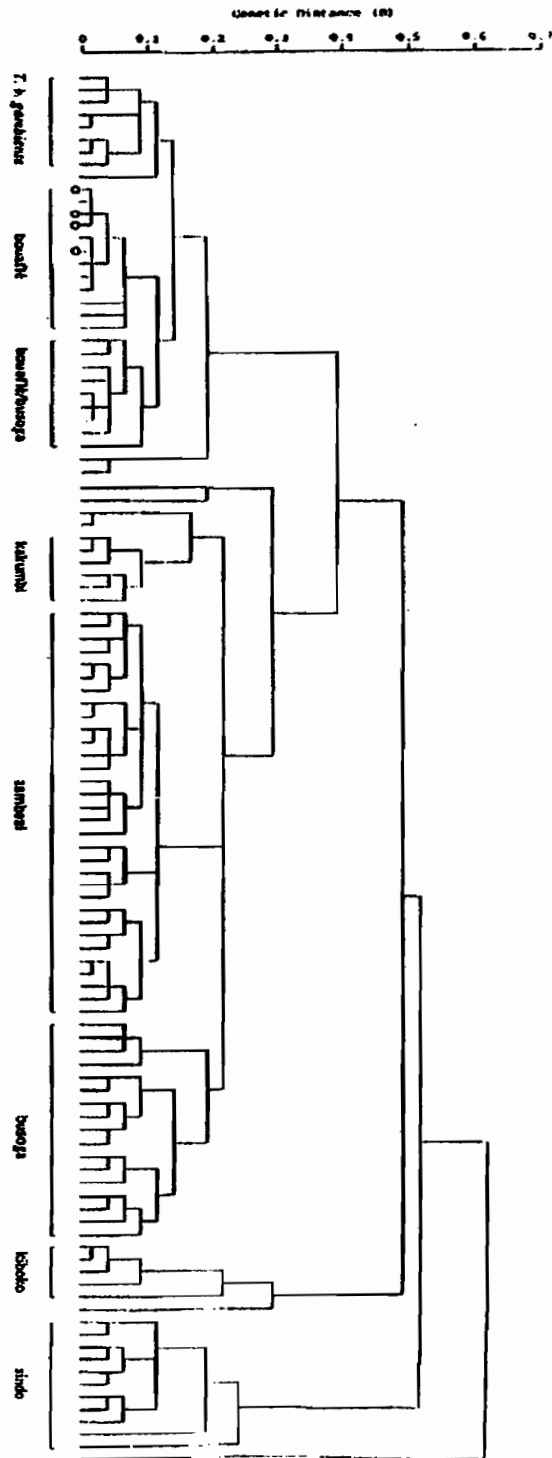
Xong V. H., Vanhamme L., Chamekh M., Chimfwembe C. E., Van den Abbeele J., Pays A, Van Meirvenne N., Hamers R., De Baetselier P. & Pays E. (1998). A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. *Cell*, **95**, 839-846.

Zilman U., Mehlitz D. & Sachs R. (1984). Identify of *Trypanozoon* stocks and domestic dogs in Liberia. *Tropen Medizin und Parasitologie*, **35**, 105-108.

Annexes

Annexe 1

Dendrogramme résumant la taxonomie intraspécifique de *Trypanosoma brucei* ssp. (d'après Gibson *et al.*, 1999)



Annexe 2. Illustration du déroulement d'une prospection médicale



Photo 1. Recensement/Enregistrement

Recensement des sujets présents le jour de la prospection. Seuls les sujets enregistrés peuvent entrer dans la chaîne de dépistage



Photo 2. Prélèvement

Prélèvement de toute la population par ponction digitale. Le sang prélevé dans les capillaires héparinés est destiné aux tests sérologiques



Photo 3. Sérologie

Le test sérologique (CATT) est effectué pour tous les sujets prélevés. Les sujets séronégatifs sont libérés, les séropositifs sont maintenus pour la recherche des trypanosomes par les tests parasitologiques.



Photos 4 et 5. Parasitologie

Du sang total hépariné est prélevé au pli du coude de chaque sujet séropositif (Photo 4) pour effectuer la mAECT. Les éventuels ganglions cervicaux sont ponctionnés pour la recherche des trypanosomes dans le suc ganglionnaire étalé à l'état frais entre lame et lamelle (Photo 5).



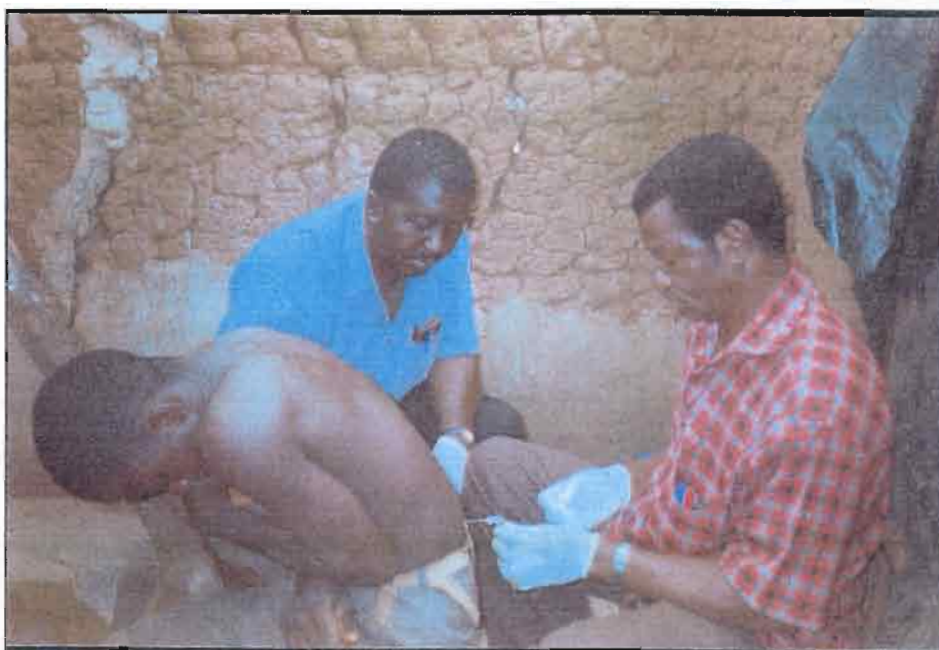


Photo 6. **Parasitologie** (suite)

Une ponction lombaire peut être effectuée au moment de la prospection pour les sujets négatifs en parasitologie mais présentant des signes d'atteinte neurologique (en accord avec le sujet).



Photo 7. **Convocation pour le traitement**

Les sujets positifs en parasitologie sont instantanément convoqués au centre de traitement le plus proche. Un dossier comprenant une fiche d'identification ainsi qu'un questionnaire épidémiologique et clinique est constitué pour chaque trypanosomé par un infirmier spécialiste de la THA.

Annexe 3. Liste des Publications

Characterization of *Trypanosoma brucei* s.l. infecting asymptomatic sleeping-sickness patients in Côte d'Ivoire: a new genetic group?

V. JAMONNEAU*†, S. RAVEL*, A. GARCIA‡, M. KOFFI†, P. TRUC*§, C. LAVEISSIÈRE*, S. HERDER*, P. GRÉBAUT*, G. CUNY* and P. SOLANO*†

*Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR 035, Laboratoire de Recherche et de Coordination sur les Trypanosomoses, Programme Santé Animale/CIRAD, TA 207/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

†Centre Pierre Richet, B.P. 1500, Bouaké, Côte d'Ivoire

‡Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR 010, B.P. 1386 Dakar, Senegal

§Organisation de Coopération pour la Lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), B.P. 288, Yaoundé, Cameroon

Received 12 November 2003, Revised 13 January 2004,

Accepted 15 January 2004

Six villagers in the Sinfra focus of sleeping sickness in Côte d'Ivoire who in 1995 were asymptomatic and refusing treatment, despite then being serologically and parasitologically positive for trypanosomes, were followed-up, while still refusing treatment, until 2002. In 2002, five of the six cases remained serologically positive but no trypanosomes could be found in any of them by use of the classical parasitological methods. A PCR-based assay, however, revealed that all six had the DNA of *Trypanosoma brucei* s.l. in their blood, so confirming the low sensitivity of the classical parasitological tests. The analysis of satellite, minisatellite and microsatellite markers indicated that, in 2002, all six cases were infected with a 'new' distinct genetic group of *T. brucei* s.l. and four were co-infected with *T. b. gambiense* group 1. The epidemiological consequences of such co-infections are discussed. The 'new' group of *T. brucei* had a molecular pattern that differed from those of the classical *T. b. gambiense* group 1 and the 'bouafilé' group.

Human African trypanosomiasis (HAT), or sleeping sickness, remains a major problem in much of sub-Saharan Africa. The causative agent is a trypanosome in the taxon known as *Trypanosoma brucei sensu lato* (*T. brucei* s.l.). Classically, *T. brucei* s.l. is subdivided into three subspecies: *T. brucei gambiense*, responsible for the chronic form of HAT in West and Central Africa; *T. brucei rhodesiense*, the agent of the acute form of HAT in East Africa; and *T. b. brucei*, which is non-pathogenic to humans.

The clinical evolution of classical HAT has two main phases: a haemato-lymphatic stage, usually with no specific clinical signs

(Jannin *et al.*, 1993; Dumas and Bouteille, 1996), leading to a meningo-encephalitic stage, characterized by neurological disorders. Left untreated, the disease is usually lethal.

In the chronic form of the disease attributed to *T. b. gambiense*, the haemato-lymphatic phase may last for several years and the subsequent neurological disorders may appear only slowly. The 'chronic' disease in West and Central Africa does, however, appear to show a broad spectrum of clinical manifestations, from a truly chronic form (Marding and Hutchinson, 1948; Gallais *et al.*, 1953; Lapeyssonnie, 1960) to asymptomatic infection (Ginoux and Frézil, 1981; Woodruff *et al.*, 1982) and even, possibly, in some patients in Côte d'Ivoire,

Reprint requests to: V. Jamonneau.
E-mail: vincent.jamonneau@mpl.ird.fr; fax: +33 4 6759 3919.

acute disease (Truc *et al.*, 1997) or a natural disappearance of the parasites (Jamonneau *et al.*, 2000). At the moment it remains unclear if this clinical diversity is related to the genetic characteristics of the parasites and/or to variability in the human host's susceptibility to HAT.

The results of several genetic studies indicate that the distinction between the different sub-species of *T. brucei* s.l. remains difficult and often unrealistic (Gibson, 1986; Mathieu-Daudé and Tibayrenc, 1994). In West Africa, only one group could be clearly identified as a distinct genetic entity: *T. b. gambiense* group 1, which contained 80% of the human stocks investigated (Gibson, 1986). The other human isolates, which form a rather heterogeneous group, have been named '*T. b. gambiense* group 2', the 'non-gambiense' stocks, or the 'bouaflé' group (Godfrey *et al.*, 1990; Baker, 1995).

Within humans, individual variability in susceptibility to HAT is strongly suspected although never demonstrated (Garcia *et al.*, 2000). Kemp *et al.* (1997) localized genes in mice that were involved in the rodents' resistance to *T. congolense*, and the concept of trypanotolerance in livestock has been widely accepted (Authié, 1994; Trail *et al.*, 1994).

In a recent study in Côte d'Ivoire, Jamonneau *et al.* (2002) compared clinical patterns in those infected with trypanosomes and investigated the genetic diversity of the parasites involved. Although the clinical patterns were very variable, the trypanosome stocks isolated from the patients showed surprisingly little genetic variation. This observation seemed to indicate that the variation seen in the clinical evolution of the trypanosome infections was attributable to host factors (i.e. to differences in susceptibility to symptomatic trypanosomiasis following infection). It seems possible, however, that the selective impact of the isolation technique employed — the Kit for *In Vitro* Isolation of Trypanosomes (KIVI; Aerts *et al.*, 1992) — may have resulted in an under-estimate of the genetic variation of the parasites present in the patients.

The subjects of the present study were six villagers from the Sinfra focus in Côte d'Ivoire who have consistently refused treatment with a trypanocide despite being found trypanosome-positive when first examined in 1995. During the 7 years of follow-up, these six villagers were regularly checked clinically, serologically for trypanosomes, by the Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT), and parasitologically for trypanosomes, by miniature anion-exchange centrifugation (MAEC), microscopy and KIVI. At the final follow-up, in June 2002, each of the subjects was also tested for trypanosome infection by rodent inoculation and, avoiding any selective effect of the isolation techniques, by a direct, PCR-based assay. Molecular analysis of the amplicons produced in the PCR allowed the identities of any trypanosomes to be investigated.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

In 1995, during a survey in the Sinfra focus of HAT in western-central Côte d'Ivoire, many villagers infected with trypanosomes were detected, by the microscopical examination of blood samples (Laveissière *et al.*, 2003). Although all those found infected were offered treatment, some of the trypanosome-positives (mostly asymptomatic individuals) refused to take any trypanocidal drugs, in 1995 or later. This refusal allowed the clinical, serological and parasitological evolution of untreated infections to be followed for several years (Jamonneau *et al.*, 2000). The six asymptomatic villagers who, despite repeated encouragement and advice, continued to refuse treatment until at least June 2002 are the subjects of the present study. These six individuals — recorded as subjects 5, 7, 8, 10, 13 and 14 by Jamonneau *et al.* (2000) — were checked, clinically, serologically and parasitologically (see below), in June 1997, January 1999, March 1999 and June 2002. At the final follow-up, in June 2002, they were also checked for trypanosomes by mouse inoculation and use

of a PCR-based assay for detecting *T. brucei* DNA (see below).

Serological and Parasitological

Follow-up

For each subject, the CATT/*T. b. gambiense* (Magnus *et al.*, 1978) was performed on samples of whole blood (CATT bl) and plasma (CATT pl), according to the instructions provided by the test's manufacturer (Institute of Tropical Medicine, Antwerpen, Belgium). Samples of whole blood were also checked using the MAEC technique (Lumsden *et al.*, 1979). Exudates were collected from any swollen lymph nodes and checked for trypanosomes, as wet smears, under a light microscope.

Isolation and Identification of Trypanosomes

At each follow-up examination, KIVI (Aerts *et al.*, 1992) were used in attempts to isolate any trypanosomes in the peripheral blood of the subjects. In June 2002, each subject was also tested for trypanosomes by mouse inoculation, two BALB/c mice (that had been previously immunosuppressed using cyclophosphamide) per subject each receiving 0.5 ml blood by intraperitoneal injection. Any trypanosomes successfully isolated by KIVI or the combination of mouse inoculation and culture were characterized by multi-locus enzyme electrophoresis (MLEE), as detailed by Jamonneau *et al.* (2000).

In addition, in June 2002, whole blood samples were collected from the six subjects by venepuncture, into heparinized tubes. These samples were dispensed into 1.5-ml Eppendorf tubes and stored at -20°C until the DNA in them could be extracted. For the DNA extraction, the protocol of Penchenier *et al.* (1996), modified by the use of Chelex resin (Bio-Rad, Hercules, CA), was followed. Briefly, blood was incubated with 1% Chelex for 1 h at 56°C and then 30 min at 95°C before being centrifuged for 2 min at $10,000 \times g$. The supernatant solutions so produced were stored at -20°C until they could be tested in the PCR-based assay. This

assay was used to check each DNA sample for the satellite marker TBR1/2 (giving a 177-bp product with *T. brucei* s.l.; Moser *et al.*, 1989), the minisatellite marker 292 G/H (which enables *T. b. rhodesiense* or *T. b. brucei* to be detected; MacLeod *et al.*, 1999), and two microsatellite markers for which some alleles are specific for *T. b. gambiense* group 1 — M6C8-CA F/R (giving an amplicon of 83 or 85 bp with *T. b. gambiense* group 1; Biteau *et al.*, 2000) and TRBPA 1/2 (giving an amplicon of 149 bp with *T. b. gambiense* group 1; Truc *et al.*, 2002). Each PCR was performed using a 50- μl reaction mixture containing 20 pmol of each primer, 0.2 mM of each deoxyribonucleotide, $1 \times$ incubation buffer with 1.5 mM MgCl_2 , and 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Qbiogene, Illkirch, France). The TBR1/2, 292 G/H, M6C8-CA F/R and TRBPA 1/2 amplifications were performed as described by Penchenier *et al.* (1996), MacLeod *et al.* (1999), Biteau *et al.* (2000) and Truc *et al.* (2002), respectively. The products were resolved by electrophoresis in 2% agarose and visualized by staining with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and trans-illumination with ultra-violet light. The alleles amplified using the microsatellite markers were resolved in a non-denaturing acrylamide gel (10%) and revealed by ethidium-bromide staining. Reference stocks of *T. b. rhodesiense*, *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* group 1 and the 'bouaflé' group (see Table 1) were used as positive controls. Each time DNA was extracted from a blood sample, a sample of distilled water was subjected to the same extraction procedure (and subsequently tested for trypanosome DNA in the PCR-based assays), as a negative control. Every sample of DNA was tested twice for each marker.

RESULTS

All six subjects were serologically and parasitologically positive for trypanosomes in 1995. Although all six remained serologically positive in 1999, all but one (number 8)

TABLE 1. The reference stocks of *Trypanosoma brucei* s.l. used in the PCR-based characterization of the trypanosomes from the Sinfra focus

Stock	Host	Year isolated	Country	Taxon	Reference
Jua	Human	1979	Cameroon	<i>T. b. gambiense</i> group 1	Truc <i>et al.</i> (1991)
Peya	Human	1980	Congo	<i>T. b. gambiense</i> group 1	Truc <i>et al.</i> (1991)
KP465	Pig	1991	Côte d'Ivoire	<i>T. brucei</i> 'bouaflé' group	Truc <i>et al.</i> (1997)
TSW65	Pig	1982	Côte d'Ivoire	<i>T. brucei</i> 'bouaflé' group	Stevens <i>et al.</i> (1992)
058clA3	Human	1974	Zambia	<i>T. b. rhodesiense</i>	Gibson <i>et al.</i> (1980)
Stib 215	Lion	1971	Tanzania	<i>T. b. brucei</i>	Gibson <i>et al.</i> (1980)

appeared sero-negative in 2002. None of the six had any clear signs or symptoms of the meningo-encephalitic phase of HAT in 1999 or 2002, although subjects 7, 8, 13 and 14 had fever and/or recurrent headache in 1999 and subjects 7, 8 and 13 had the same symptoms in 2002.

No trypanosomes were detected in subjects 5, 7 and 8 after the initial survey in 1995 but subjects 10, 13 and 14 were found trypanosome-positive in 1997 and/or 1998. With the exception of subject 14, who was positive by KIVI in 1999, all the subjects appeared parasitologically negative, by KIVI, MAEC and (in the last follow-up) mouse inoculation, in 1999 and 2002, and none had swollen lymph nodes in these years. Testing in the PCR-based assay revealed, however, that all six subjects were positive for the TBR1/2 marker, and therefore had the DNA of *T. brucei* s.l. in their blood, in 2002 (see Table 2).

In 2002, no amplicons were produced in the PCR with the 292 G/H primer pair when the DNA template from any of the six subjects was tested, although, as expected, amplification products were obtained with the *T. b. rhodesiense* and *T. b. brucei* reference stocks. It should be noted that amplification products were also obtained with the 'bouaflé' reference stock.

When the PCR-based assays were run with the M6C8-CA F/R or TRBPA1/2 primer pairs, the banding patterns observed with the DNA from the six subjects differed from those obtained with the *T. b. rhodesiense*, *T. b. brucei* and 'bouaflé' reference stocks. With the M6C8-CA F/R primers, the

83-bp allele indicative of *T. b. gambiense* group 1 was amplified when DNA from subjects 5, 8, 10 and 13 (but not that from subjects 7 and 14) was run (see Table 2). Two additional and distinct amplification products, of 120 and 126 bp, were also obtained when the samples from all six subjects were run with the M6C8-CA F/R primers. With TRBPA1/2, the 149-bp specific allele of *T. b. gambiense* group 1 was amplified for only one sample (that from subject 8) out of the six; five additional distinct bands (that were sequenced and found to be specific) were also amplified from all six samples (four of these five bands were also observed in the two 'bouaflé' reference stocks).

All the trypanosomes stocks isolated, by KIVI, from subjects 10, 13 and 14 between 1997 and 1999 were identified as *T. b. gambiense* group 1 by MLEE. Although MLEE could not be performed in 2002 (because no stocks were successfully isolated by KIVI or mouse inoculation in that year), the results of the PCR-based assays, using the TRBPA1/2 and M6C8-CA F/R primers, indicated that subjects 10 and 13 (but not subject 14) were still infected with *T. b. gambiense* group 1 in 2002.

In the PCR-based assays, no amplicons were ever produced from the negative controls.

DISCUSSION

Although the six subjects of the present study repeatedly ignored recommendations

TABLE 2. The satellite markers detected, by PCR, in the six reference stocks of *Trypanosoma brucei* s.l. (see Table 1) and the blood samples from the six subjects

Source of DNA	Amplicons detected (bp) using primers for:				Identification
	TBR1/2	292G/H*	M6C8-CA F/R	TRBPA1/2	
BLOOD OF SUBJECT:					
5	177	—	83, 120, 126	179, 185, 191, 220, 223	<i>T. b. gambiense</i> group 1 and <i>T. brucei</i> 'new' group
7	177	—	120, 126	179, 185, 191, 220, 223	<i>T. brucei</i> 'new' group
8	177	—	83, 120, 126	149, 179, 185, 191, 220, 223	<i>T. b. gambiense</i> group 1 and <i>T. brucei</i> 'new' group
10	177	—	83, 120, 126	179, 185, 191, 220, 223	<i>T. b. gambiense</i> group 1 and <i>T. brucei</i> 'new' group
13	177	—	83, 120, 126	179, 185, 191, 220, 223	<i>T. b. gambiense</i> group 1 and <i>T. brucei</i> 'new' group
14	177	—	120, 126	179, 185, 191, 220, 223	<i>T. brucei</i> 'new' group
REFERENCE STOCK:					
Jua	177	—	83, 87	149, 203	<i>T. b. gambiense</i> group 1
Peya	177	—	85, 89	149, 185	<i>T. b. gambiense</i> group 1
KP 465	177	+	>126	179, 185, 191, 220, 226	<i>T. brucei</i> 'bouaflé' group
TSW 65	177	+	>126	179, 185, 191, 223, 226	<i>T. brucei</i> 'bouaflé' group
058clA3	177	+	>126	223, 226, 230	<i>T. b. rhodesiense</i>
Stib 215	177	+	>126	179, 207, 220	<i>T. b. brucei</i>

*The results for 292 G/H are simply shown as + (indicating the presence of the amplification products revealing the presence of *T. b. rhodesiense* or *T. b. brucei*; MacLeod *et al.*, 1999) or —.

that they take trypanocidal drugs, they consented to all the follow-up investigations and took an interest in the results. There have been surprisingly few studies in which untreated individuals infected with *T. brucei* s.l. have been followed-up over several years, even with such a small sample size as investigated here.

Without the results of the PCR-based assays, it would have appeared that all six subjects, who were found infected with trypanosomes in 1995, had naturally lost their infections by 2002. Jamonneau *et al.* (2000) suspected that trypanosome-positives from Côte d'Ivoire could lose their infections without treatment. The present serological results indicated either a seroconversion from CATT-positivity to CATT-negativity (one subject) or a reduction in the agglutination score (five subjects) between 1995 and 2002 (data not shown). Such slow seroconversions appear to be inconsistent with a transient infection with a non-human parasite, such as *T. b. brucei* or *T. congolense*.

Despite the concurrent, negative results of the more classical parasitological tests, the results of the PCR-based tests indicated that all six villagers still had the DNA of *T. brucei* s.l. in their blood in 2002. The PCR results almost certainly show that the six subjects were still infected with trypanosomes in 2002, albeit with parasitaemias that were lower than the detection limits of the other parasitological tests. The possibility that the trypanosomes detected in 2002 were the result of re-infections during the period of follow-up is slight, since intensive control activities in the Sinfra focus between 1995 and 2001 reduced the prevalence of HAT in the area to only 0.1% (Laveissière *et al.*, 2003). It is therefore probable that the infections detected, by PCR, in 2002 had been acquired by the time of the initial surveys in 1995.

The trypanosomes infecting the six subjects in 2002 were identified directly from blood (without isolation and culture), using specific molecular markers, in order to avoid the suspected selective effect of the various

isolation techniques (Jamonneau *et al.*, 2003). The results for the two microsatellite markers (M6C8-CA F/R and TRBPA 1/2) indicated that four of the subjects were infected with *T. b. gambiense* group 1. All six subjects were found to be infected, however, with trypanosomes that were *T. brucei* s.l. but — according to the results of the PCR-based assays — distinct from parasites of the 'bouaflé' group [or non-gambiense group 1; Godfrey *et al.*, 1990] and not *T. b. gambiense* group 1, *T. b. rhodesiense* or *T. b. brucei*. These parasites may represent a distinct and previously unrecognized genetic group of human trypanosomes. In 2002, four of the present cases were co-infected with *T. b. gambiense* group 1 and the 'new' group of *T. brucei*. The reason why subject 14 was found positive for *T. b. gambiense* group 1 in 1999 but negative, even by PCR, for the same group in 2002 remains unclear. A natural clearance of the parasites of group 1 (at least from the peripheral blood) remains a possibility, especially as all the parasitaemias observed in 1995 seemed to decrease with time, to the point when, in 2002, they were only detectable by PCR, if at all. The loss or reduction in the level of CATT-positivity over the same period may reflect the fall in parasitaemia and/or the immunosuppression that is often associated with HAT (Dumas and Bouteille, 1996).

When the trypanosomes isolated from subjects in Côte d'Ivoire between 1997 and 1999 were genetically characterized by Jamonneau *et al.* (2002), they were found to be remarkably homogeneous and all of *T. b. gambiense* group 1. Given the present observations from the Sinfra focus, of common co-infection with two groups of trypanosome, it now seems likely that the KIVI used by Jamonneau *et al.* (2002) was only successful for one of the two or more groups of parasite present in the human population of Côte d'Ivoire (Jamonneau *et al.*, 2003). Jamonneau *et al.* (2002) only managed to isolate trypanosomes from 33%–50% of the subjects they knew to be infected. The isolation of trypanosomes

by mouse inoculation is also probably genotype-selective, as trypanosomes can only be isolated using this method from about 10% of humans infected with *T. b. gambiense* (Dukes *et al.*, 1991).

The present results indicate that, as recommended by Jamonneau *et al.* (2003), wherever and whenever possible, trypanosomes should be characterized directly from the blood, cerebrospinal fluid or lymph-node exudate of the infected individual. Although PCR based on the mini- and micro-satellite markers investigated in the present study appear to be promising tools in the characterization of trypanosomes in humans, all the primer sets currently available are sub-optimal because of their limited specificities. New, more informative primers need to be developed in order to confirm the present, preliminary results.

Co-infection with *T. b. gambiense* group 1 and the 'new' group of *T. brucei* may be characterized by particularly low parasitemias (which are not detectable by KIVI or mouse inoculation) and may be responsible for a particular form of chronic HAT with a very slow and gradual development of morbidity after a very long pre-patent period. When 64 strongly seropositive (CATT) but asymptomatic subjects from the Fontem focus of western Cameroon were followed-up for 6 months, they constantly appeared trypanosome-negative when tested by the quantitative buffy coat (QBC) technique (Bailey and Smith, 1992) and KIVI but were always found trypanosome-positive in PCR-based assays using the TBR1/2 primer set (S. Herder, F. Njiokou and L. Penchenier, unpubl. obs.). It is possible that these Cameroonian subjects, like four of the subjects of the present study, were co-infected with the 'new' group of *T. brucei* and *T. b. gambiense* group 1, with the former reducing the morbidity (or slowing the development of the morbidity) caused by the latter. Human co-infection with several genotypes of trypanosome has been observed before (Godfrey *et al.*, 1990; Truc *et al.*, 2002), may be more frequent than previously suspected,

and may have some unsuspected consequences in terms of the control of HAT. If co-infected individuals remain asymptomatic for very long periods, they may go undetected and remain as important reservoirs of infection for even longer periods. Further investigations are required to determine the epidemiological significance of co-infection and whether human infection with one group of trypanosome can modulate the clinical evolution of infection with another group. The possibility that certain humans, like certain breeds of cattle, are simply more tolerant of *T. brucei* infection (Garcia *et al.*, 2000) has yet to be confirmed.

ACKNOWLEDGEMENTS. The authors would like to express their sincere thanks to those working at the *Centre Pierre Richet/OCCGE* at Bouaké (Côte d'Ivoire) for their excellent technical help, especially to A. Zohouri, P. N'Guessan, L. N'Dri, A. Koffi and R. Sanon. The research described was supported financially by the *Institut de Recherche pour le Développement (IRD)*, the *Ministère français de la Recherche et des Nouvelles Technologies*, and the *Service de Coopération et d'Action Culturelle* in Abidjan.

REFERENCES

- Aerts, D., Truc, P., Penchenier, L., Claes, Y. & Le Ray, D. (1992). A kit for *in vitro* isolation of trypanosomes in the field: first trial with sleeping sickness patients in the Congo. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **86**, 394–395.
- Authié, E. (1994). Bovine trypanosomosis and trypanotolerance: a role for 'congopain'? *Parasitology Today*, **10**, 360–364.
- Bailey, J. W. & Smith, D. H. (1992). The use of Acridine Orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **86**, 630.
- Baker, J. R. (1995). The subspecific taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *Parasite*, **2**, 3–12.
- Biteau, N., Bringaud, F., Gibson, W. C., Truc, P. & Baltz, T. (2000). Characterisation of *Trypanozoon* isolates using micro- and minisatellite markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **105**, 185–201.
- Dukes, P., McNamara, J. J. & Godfrey, D. G. (1991). Elusive trypanosomes. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **85**, 21–32.

- Dumas, M. & Bouteille, B. (1996). Human African trypanosomiasis. *Comptes Rendus de la Société de Biologie et de ses Filiales*, **190**, 395–408.
- Gallais, P., Cros, R. & Arquié, E. (1953). Contribution à l'étude des périodes cliniques et parasitologiques de la trypanosomiase humaine africaine. *Médecine Tropicale*, **13**, 844–856.
- Garcia, A., Jamonneau, V., Magnus, E., Laveissière, C., Lejon, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., van Meirvenne, N. & Büscher, P. (2000). Longitudinal survey of positive Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) but apparently aparasitemic individuals in Côte d'Ivoire: evidence for complex and heterogeneous population. *Tropical Medicine and International Health*, **5**, 786–793.
- Gibson, W. C. (1986). Will the real *Trypanosoma brucei gambiense* please stand up? *Parasitology Today*, **2**, 255–257.
- Gibson, W. C., Marshall, T. F. & Godfrey, D. G. (1980). Numerical analysis of enzyme polymorphism: a new approach to the epidemiology and taxonomy of trypanosomes of the subgenus *Trypanozoon*. *Advances in Parasitology*, **18**, 175–246.
- Ginoux, P. Y. & Frézil, J. L. (1981). Recherches sur la latence clinique et la trypanotolérance humaine dans le foyer du couloir du fleuve Congo. *Cahiers O.R.S.T.O.M., Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, **19**, 33–40.
- Godfrey, D. G., Baker, R. D., Rickman, L. R. & Mehlitz, D. (1990). The distribution, relationships and identification of enzymatic variants within the subgenus *Trypanozoon*. *Advances in Parasitology*, **29**, 1–39.
- Jamonneau, V., Garcia, A., N'Guessan, P., N'Dri, L., Sanon, R., Laveissière, C., Frézil, J. L. & Truc, P. (2000). Clinical and biological evolution of human African trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **94**, 831–835.
- Jamonneau, V., Garcia, A., Ravel, S., Cuny, G., Oury, B., Solano, P., N'Guessan, P., N'Dri, L., Sanon, R., Frézil, J. L. & Truc, P. (2002). Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei* ssp. and clinical evolution of human African trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Tropical Medicine and International Health*, **7**, 610–621.
- Jamonneau, V., Barnabe, C., Koffi, M., Sané, B., Cuny, G. & Solano, P. (2003). Identification of *Trypanosoma brucei* circulating in a sleeping sickness focus in Côte d'Ivoire: assessment of genotype selection by the isolation method. *Infection, Genetic and Evolution*, **3**, 143–149.
- Jannin, J., Moulia-Pelat, J. P., Chanfreau, B., Penchenier, L., Louis, J. P., Nzaba, P., Elfassi de la Baume, F., Eozenou, P. & Cattand, P. (1993). Trypanosomiase humaine africaine: étude d'un score de présomption de diagnostic au Congo. *Bulletin of the World Health Organization*, **71**, 215–222.
- Kemp, S. J., Iraqi, F., Darvasi, A., Soller, M. & Teale, A. J. (1997). Localisation of genes controlling resistance to trypanosomiasis in mice. *Nature Genetics*, **16**, 194–196.
- Lapeyssonnie, L. (1960). Deuxième note concernant un cas exceptionnel de trypanosomiase, parasitémie observée pendant 21 ans sans signes cliniques appréciables chez une malade traitée inefficacement pendant les 10 premières années. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **57**, 28–32.
- Laveissière, C., Garcia, A. & Sané, B. (2003). *Lutte contre la Maladie du Sommeil et Soins de Santé Primaires*. Paris, France: Institut de Recherche pour le Développement.
- Lumsden, W. H. R., Kimber, C. D., Evans, D. A. & Doig, S. J. (1979). *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitemia; adapted for field use. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**, 312–317.
- MacLeod, A., Turner, C. M. R. & Tait, A. (1999). A high level of mixed *Trypanosoma brucei* infections in tsetse flies detected by three hypervariable minisatellites. *Molecular Biochemical and Parasitology*, **102**, 237–248.
- Magnus, E., Vervoort, T. & van Meirvenne, N. (1978). A card-agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *T. gambiense* trypanosomiasis. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **59**, 169–176.
- Marding, R. D. & Hutchinson, M. P. (1948). Sleeping sickness of an unusual type in Sierra Leone and its attempted control. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **41**, 481–512.
- Mathieu-Daudé, F. & Tibayrenc, M. (1994). Isoenzyme variability of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 by a specific kinetoplast DNA probe. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **50**, 13–19.
- Moser, D. R., Cook, G. A., Ochs, D. E., Bailey, C. P., McKane, M. R. & Donelson, J. E. (1989). Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*, **99**, 57–66.
- Penchenier, L., Dumas, V., Grébaud, P., Reifenberg, J. M. & Cuny, G. (1996). Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomiasis. *Parasite*, **4**, 387–389.
- Stevens, J. R., Lanham, S. M., Allingham, R. & Gashumba, J. K. (1992). A simplified method for identifying subspecies and strain groups in *Trypanozoon* by isoenzymes. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **86**, 9–28.
- Trail, J. C. M., Wissocq, N., d'Ieteren, G. D. M., Kakiese, O. & Murray, M. (1994). Quantitative phenotyping of N'Dama cattle for aspects of trypanotolerance under field tsetse challenge. *Veterinary Parasitology*, **55**, 185–195.
- Truc, P., Mathieu Daudé, F. & Tibayrenc, M. (1991). Multilocus isoenzyme identification of *Trypanosoma*

- brucei* stocks isolated in Central Africa: evidence for an animal reservoir of sleeping sickness in Congo. *Acta Tropica*, **49**, 127–135.
- Truc, P., Formenty, P., Diallo, P. B., Komoin-Oka, C. & Lauginie, F. (1997). Confirmation of two distinct classes of zymodemes of *Trypanosoma brucei* infecting patients and wild mammals in Côte d'Ivoire: suspected difference in pathogenicity. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **91**, 951–956.
- Truc, P., Ravel, S., Jamonneau, V., N'Guessan, P. & Cuny, G. (2002). Genetic variability within *Trypanosoma brucei gambiense*: evidence of the circulation of different genotypes in human African trypanosomiasis patients in Côte d'Ivoire. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **96**, 52–55.
- Woodruff, A. W., Evans, D. A. & Owino, N. O. (1982). A 'healthy' carrier of African trypanosomiasis. *Journal of Infection*, **5**, 89–92.

Mixed infections of trypanosomes in tsetse and pigs and their epidemiological significance in a sleeping sickness focus of Côte d'Ivoire

V. JAMONNEAU^{1,2}, S. RAVEL², M. KOFFI^{1,2}, D. KABA¹, D. G. ZEZE¹, L. NDRI¹, B. SANE¹, B. COULIBALY¹, G. CUNY² and P. SOLANO^{1,2*}

¹Institut Pierre Richet, BP 1500, Bouake, Côte d'Ivoire, France

²IRD UR 035, LRCT IRD/CIRAD, Montpellier, France

(Received 18 February 2004; revised 2 April 2004; accepted 2 April 2004)

SUMMARY

In a sleeping sickness focus of Côte d'Ivoire, trypanosomes were characterized in humans, pigs and tsetse using various techniques. Out of 74 patients, all the 43 stocks isolated by KIVI (Kit for In Vitro Isolation) appeared to belong to only one zymodeme of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 (the major zymodeme Z3). The only stock isolated on rodents belonged to a different, new, zymodeme (Z50), of *T. b. gambiense* group 1. From 18 pigs sampled in the same locations as the patients, PCR showed a high proportion of mixed infections of *T. brucei s. l.* and *T. congolense* riverine-forest. Zymodemes of *T. brucei s. l.* from these pigs were different from those found in humans. From a total of 16 260 captured tsetse (*Glossina palpalis palpalis*), 1701 were dissected and 28% were found to be infected by trypanosomes. The most prevalent trypanosome was *T. congolense* riverine-forest type, followed by *T. vivax*, *T. brucei s. l.* and *T. congolense* savannah type, this latter being associated to the forest type of *T. congolense* in most cases. Mixed infections by 2 or 3 of these trypanosomes were also found. Use of a microsatellite marker allowed us to distinguish *T. b. gambiense* group 1 in some of the mature infections in tsetse. Differences in infection rates and in trypanosome genotypes according to the host might indicate that the pig may not be an active animal reservoir for humans in this focus.

Key words: sleeping sickness, Côte d'Ivoire, *Trypanosoma*, tsetse, microsatellite, animal reservoir, mixed infection.

INTRODUCTION

The protozoan parasite *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *brucei* is the aetiological agent of Human African Trypanosomiasis (HAT, or sleeping sickness) in man, and nagana in animals. The human disease is a major public health problem in Africa (WHO, 1998), and the economic impact of the animal disease is a severe constraint for the development of this region. In addition to *Trypanozoon*, 2 other subgenera are involved in nagana, *Nannomonas* (*T. congolense*) and *Duttonella* (*T. vivax*), all being transmitted to the mammalian host by an infected tsetse during its bloodmeal.

In West Africa, the main vector is *Glossina palpalis*, and the pathogenic trypanosome for humans is *T. b. gambiense*. A major problem in the epidemiology of human disease is that *T. b. gambiense* is hardly differentiable from the 'animal' trypanosome *T. b. brucei*. Moreover *T. b. gambiense* has been found so scarcely in tsetse that our knowledge of transmission still suffers many gaps (Frezil & Cuisance,

1994), including the importance of an animal reservoir for the gambiense disease (Van Hoof, Henrard & Peel, 1937; Gibson *et al.* 1978; Mehlitz *et al.* 1982). In addition, controversy has occurred on the subspecies classification of *T. brucei s. l.* The only group which can be considered as a taxonomic unit is the one defined as *T. b. gambiense* group 1 (Gibson, 1986), which represents 80% of all West and Central African human isolates. Other trypanosome strains isolated from humans in West and Central Africa which did not belong to this group were classified in a heterogeneous *T. b. gambiense* group 2, or Bouafle group (Godfrey *et al.* 1990).

The development of molecular techniques applied to trypanosomiasis, like DNA probes or PCR (Kukla *et al.* 1987; Moser *et al.* 1989; Majiwa *et al.* 1993) brought new insights on the epidemiology of the disease, first on animal trypanosomes with the discovery of many more multiple infections of different trypanosome groups in tsetse than previously suspected (Majiwa *et al.* 1994; Solano *et al.* 1995; Masiga *et al.* 1996). In the human disease, molecular studies to identify trypanosomes in tsetse and mammalian host remain scarce (but see McNamara *et al.* 1995; Morlais *et al.* 1998), certainly due to the lack of molecular markers able to distinguish 'human' and 'non human' trypanosomes within

* Corresponding author: Institut Pierre Richet, s/c représentation IRD, rue Chevalier de Clieu, 15 BP 917 Abidjan 15, France. Tel: +225 21 24 37 79. Fax: +225 21 75 47 26. E-mail: solano@ird.ci

T. brucei s. l., although markers have been found in *T. b. rhodesiense* that can do this differentiation (Welburn *et al.* 2001; Radwanska *et al.* 2002). Here, in order to better understand tsetse/trypanosomes relations, we tried to characterize, by parasitological techniques and recently developed molecular markers, the trypanosomes found in the same place at the same time in tsetse, human host (patients), and one of the most suspected of potential animal reservoirs, the pig.

MATERIALS AND METHODS

The HAT focus of Bonon is located in Central West Côte d'Ivoire (6°55'N–6°W). Between 2000 and 2001, a medical survey was done on humans, followed by a survey on pigs located where the patients had been diagnosed. An entomological survey was also implemented at each season of the year in the area (see below).

Survey on humans and pigs; trypanosome isolation and molecular techniques

An exhaustive medical survey was implemented by the National Control Program of HAT to detect HAT cases, preceded by an exhaustive individual census of the entire population of the area (Solano *et al.* 2003). Sleeping sickness cases were detected by a classical procedure involving CATT test on blood and plasma (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis, Magnus *et al.* 1978), followed by mini-Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT, Lumsden *et al.* 1979), or lymph node examination when adenopathy was present. From each patient, 5 ml of blood were inoculated in a KIVI kit for trypanosome isolation (Aerts *et al.* 1992), followed by multiplication in axenic culture medium (Cunningham, 1977) according to the protocol described by Truc *et al.* (1992). The pellets of parasites were conserved in liquid nitrogen until use.

From a subsample of 16 of these patients (the first 16 who gave their consent), the blood was also inoculated in mice for another procedure of trypanosome isolation (mice isolation, MI). In detail, 0.5 ml of blood, from a heparinized tube, was injected intraperitoneally into 2 mice. The mice were inoculated with cyclophosphamide (Endoxan, 300 mg/kg) 2 days after blood injection, and then every 5 days. The mice were followed up every 3 days, from the 6th day after inoculation for a period of 2 months, by microscopical examination of tail blood. When parasitaemia became high (10^8 trypanosomes/ml), blood from the mouse was inoculated in rats. When the parasitaemia in the rat reached 10^8 trypanosomes/ml, a cardiac puncture was performed, and trypanosomes from the blood were filtered by using a macro-anion exchange column.

The pellets of parasites were conserved into liquid nitrogen until required.

Blood was also taken from 18 pigs from the medical survey area. For each pig blood sample, parasitological diagnosis was performed by microscopical examination of the buffy coat (HCT, Murray *et al.* 1977), and each blood sample was inoculated both to KIVI and to mice for trypanosome isolation as described above.

MultiLocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) was implemented to identify trypanosome zymodemes in humans and pigs. Proteins were extracted from the pellets of parasites previously grown by KIVI and MI according to the method of Truc, Mathieu-Daude & Tibayrenc (1991). Stocks were characterized by MLEE on cellulose acetate plates (Helena®) and 10 enzymatic systems representing 13 loci were revealed: ALAT (EC 2.6.1.2), GOT (EC 2.6.1.1), Nhd (EC 3.2.2.1), ME (EC 1.1.1.40), PEP-2 (EC 3.4.11), MDH (EC 1.1.1.37), IDH (1.1.1.42), PGM (EC 2.7.5.1), SOD (EC 1.15.1.1) (see Jamonneau *et al.* 2002 for details). For the analysis procedure, a UPGMA dendrogram was built starting with the Jaccard genetic distances (d, Jaccard, 1908) calculated from MLEE results to determine the relationships between stocks (Sneath & Sokal, 1973). Reference stocks of *T. b. gambiense* group 1 and Bouafle group were included, as well as stocks of *T. congolense*-like groups for the UPGMA comparison.

PCR with satellite and microsatellite markers was implemented on a subsample of 10 pigs to identify the trypanosome species/group which had been detected. A simple 1% Chelex treatment derived from the method of Walsh, Metzger & Higuchi (1991) was used to obtain DNA for PCR reactions (see Solano *et al.* 1999 for details). The following primers were used: TBR1-2 (Moser *et al.* 1989), specific for *T. brucei s. l.*, TCF 1-2 (Masiga *et al.* 1992), specific for *T. congolense* West African Riverine Forest (*T. congolense* F), TCS 1-2 (Majiwa *et al.* 1993), specific for *T. congolense* Savannah (*T. congolense* S). *T. vivax* primers were not used in pigs because of known refractoriness of the pig for this trypanosome (Kageruka, 1987). In addition, on all the trypanosome pellets (from humans and pigs grown by KIVI and MI), another primer pair was used: TRBPA 1-2, the product of which, a 149 bp fragment, has been reported to be specific for *T. b. gambiense* group 1 (Herder *et al.* 2002; Truc *et al.* 2002). A negative control was included at each chelex procedure and within each PCR reaction.

Entomological survey, tsetse dissection, sample collection

Following the medical survey, the key sites (home, water supply points, working places) of the dwellings of each patient was recorded by use of a Global

Positioning System (GPS) and subsequently 320 Vavoua traps (Laveissière & Grébaut, 1990) were settled in the area frequented by the patients. The captures were done in November 2000 (end of rainy season), January 2001 (cold dry season), April 2001 (end of hot dry season), and July 2001 (beginning of rainy season). Each trap remained for 4 days, with cages changed daily, and tsetse count, sex ratio, and dissection done daily. For the dissection, the mouthparts were first removed to prevent contamination from the midgut, and dissecting instruments were cleaned between each organ dissection with sodium hypochlorite, followed by rinsing in sterile water. Each organ (mouthparts, salivary glands, midgut) was put into a separate Eppendorf tube containing 30 μ l of sterile distilled water.

For the PCR, we used the same 1% Chelex procedure as described above, and the same PCR primers as for the pigs (TBR 1-2, TCS1-2, TCF 1-2, TRBPA 1-2). In addition, primers specific for *T. vivax* were also used (TV1-2, Masiga *et al.* 1992).

RESULTS

Humans

Out of 15 227 people who came to the survey, 74 patients were found to have HAT, which gave a prevalence of 0.48% (0.47-CI₉₅-0.49).

From each of the 74 KIVI inoculated, 43 (58.1%) were successfully grown and trypanosomes were isolated. They all were shown to belong to the major zymodeme 3 of *T. b. gambiense* group 1 by MLEE (as Sique reference stock, see Fig. 1). From the 16 human stocks inoculated in mice, only 1 was successfully isolated (1 Human/MI). It was shown to have a different genotype (zymodeme 50) from all those isolated by KIVI. Using the diagnostic microsatellite marker TRBPA 1-2, the 149 bp band specific for *T. b. gambiense* group 1 was observed in all these samples, whatever the isolation method.

Pigs

By HCT, 4 pigs were found to be infected with trypanosomes. Out of 18 pigs, 13 *T. brucei* stocks were isolated by KIVI (72%), from which 8 were also isolated by MI (see Table 1). By PCR using satellite sequences on a subsample of 10 pigs, mixed infections involving *T. brucei s. l.* and *T. congolense* F were found in 9 pigs. In the 10th pig only *T. brucei s. l.* was found. No *T. congolense* S was detected in any of the pigs. All the *T. congolense* F which were identified by PCR were no longer present after isolation by KIVI or MI.

By MLEE, all the stocks isolated from pigs by KIVI and MI were different (but very close) to those isolated from humans and belonged to distinct *T. brucei s. l.* zymodemes, namely Z44 to Z49 (see

Fig. 1). Details concerning the reference stocks have been reported by Jamonneau *et al.* (2003), from which Fig. 1 was modified by adding the human stock isolated by MI (1 Human/MI). When a stock was isolated simultaneously by the two techniques from each single pig, 2 different zymodemes of *T. brucei* were observed (already published by Jamonneau *et al.* 2003). Using TRBPA1-2, the 149 bp band specific for *T. b. gambiense* group 1 was detected in 9 trypanosome stocks isolated by KIVI (see Table 1) and in 1 stock isolated by MI (sample no. 6).

Tsetse

Parasitological results. During the 4 tsetse surveys between 2000 and 2001, a total of 16260 tsetse belonging to *G. p. palpalis* were caught, giving an apparent density of 3.19 flies/trap/day. From these, 1701 flies could be dissected. The parasitological infection rate obtained by dissection followed by microscopical examination was 28.1% [26.1-CI₉₅-30.1] (i.e. 478 flies were seen harbouring trypanosomes in either the midgut, the salivary glands, or the mouthparts).

Only 1 tsetse individual was found to be infected by trypanosomes in the salivary glands, which gives a *T. brucei s. l.* infection rate of 0.06% as determined by dissection. From the infected tsetse, 52.9% were infected in the midgut only, 27% in the mouthparts only (presumably *T. vivax*), and 19.6% had a concomitant infection of the midgut and the mouthparts (presumably *T. congolense*).

PCR results on infected tsetse. Because of logistical constraints, only 382 out of the 478 infected flies could be analysed by PCR. For each infected tsetse, PCR was implemented on mouthparts, salivary glands, and midgut. From these, 143 infections were due to *T. congolense* F (37.4%) which was the most prevalent, followed by *T. vivax* (95 occurrences, 24.9%), *T. brucei s. l.* (52 occurrences, 13.6%), and *T. congolense* S (16 occurrences, 4.2%). A total of 143 tsetse (37.4%) positive for trypanosomes by microscopy did not give any PCR signal (note that the total number of infections is more than 382 because of mixed infections).

Extended to all the dissected flies, the infection rates by species or groups of trypanosomes would give the following: 10.5% for *T. congolense* F, 6.9% for *T. vivax*, 3.8% for *T. brucei s. l.*, 1.1% for *T. congolense* S as determined by PCR (see Fig. 2).

From the 382 dissected tsetse analysed by PCR, 59 were infected by more than one trypanosome. The more frequent associations were: *T. congolense* F and *T. brucei s. l.* (16), and *T. congolense* F and *T. vivax* (16), followed by *T. congolense* F and *T. congolense* S (11), and *T. brucei s. l.* and *T. vivax* (8). *T. congolense* S and *T. vivax* was the less common association (1 case). In some tsetse, 3 different trypanosomes were observed (6 cases), even 4 (in 1 tsetse).

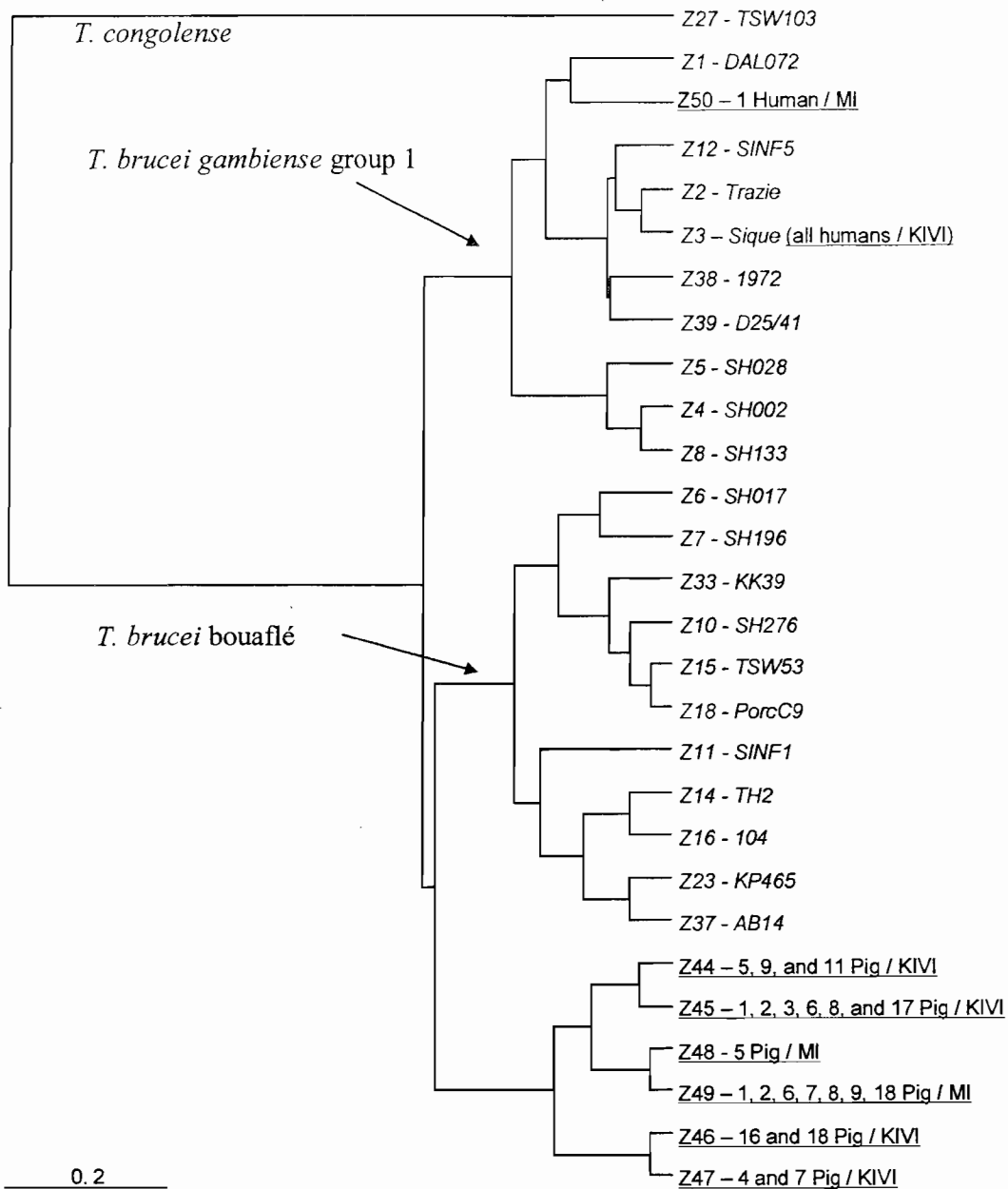


Fig. 1. Dendrogram showing genotypes obtained by MLEE on trypanosomes isolated from humans and pigs by mice inoculation and KIVI. The reference stocks are in italics and are preceded by their zymodeme number. The stocks obtained in the present study are underlined, are also preceded by their zymodeme number, and are followed by the host of origin (ex: sample Z48 19 MI/pig, is sample number 19, isolated from pig by mice inoculation, and belongs to zymodeme 48).

It has to be noted that of 16 infections with *T. congolense* S, it was found 15 times with another trypanosome. From 52 tsetse infected with *T. brucei s. l.*, 31 (59.6%) also harboured another trypanosome group.

Mature infections

For *T. congolense*, an infection was scored as mature if trypanosomes were found by PCR in either the proboscis and midgut concomitantly, or in the proboscis alone. In the latter case, we assume a disappearance of old *T. congolense* infections in the midgut, as previously described (Jordan, 1964).

For *T. congolense* F, 93 out of the 143 infections (65%) were mature. For *T. congolense* S, 12 out of 16 (75%) were mature. Hence, the mature infection rates for these trypanosomes in this study are: 6.8% for *T. congolense* F, and 0.8% for *T. congolense* S (see Fig. 2). Among the 12 mature infections of *T. congolense* S, all were mixed with other trypanosomes: in 10 tsetse, it was associated with mature infections of *T. congolense* F (among which, one also with *T. brucei s. l.*, and one with *T. brucei s. l.* and *T. vivax*), in one tsetse it was with *T. vivax*, and in the latter with *T. brucei s. l.* and *T. vivax*.

For *T. brucei s. l.*, an infection was considered as mature if both salivary glands and another organ

Table 1. Results of trypanosome detection and isolation in pigs by various techniques

(From 18 pigs, the search for trypanosomes was done first on the field using a parasitological technique (HCT, 2nd column). Blood was taken and returned to the lab, PCR was implemented for various species/groups of trypanosomes (3rd column) on some of the pigs (N.D.: not done). Mice and KIVI (4th and 5th columns) were also inoculated on the field and culture performed in the lab for trypanosome stocks which grew (see text for details). PCR/TRBP was then implemented on isolated stocks to check for the 149 bp allele specific for *T. b. gambiense* group 1 (6th column).)

Sample no.	HCT on the field	PCR result on blood	mice isolation	KIVI isolation	(PCR/TRBPA) on KIVI stocks
1	N.D.	Tb; Tcf	yes	yes	Tbg1
2	Neg.	Tb; Tcf	yes	yes	Neg.
3	T+	Tb; Tcf	no	yes	Tbg1
4	Neg.	Tb; Tcf	no	yes	Tbg1
5	T+	Tb	yes	yes	Tbg1
6	T+	Tb; Tcf	yes	yes	Tbg1
7	Neg.	Tb; Tcf	yes	yes	Neg.
8	Neg.	Tb; Tcf	yes	yes	Tbg1
9	T+	Tb; Tcf	yes	yes	Tbg1
10	Neg.	Tb; Tcf	no	no	N.D.
11	Neg.	N.D.	no	yes	Neg.
12	Neg.	N.D.	no	no	N.D.
13	Neg.	N.D.	no	no	N.D.
14	Neg.	N.D.	no	no	N.D.
15	Neg.	N.D.	no	no	N.D.
16	Neg.	N.D.	no	yes	Tbg1
17	Neg.	N.D.	no	yes	Tbg1
18	Neg.	N.D.	yes	yes	Neg.

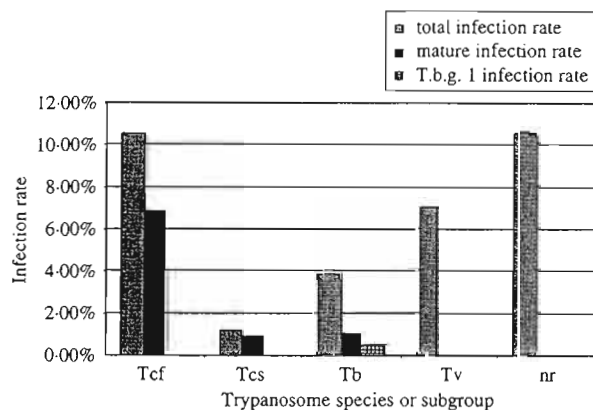


Fig. 2. PCR infection rates by species or groups of trypanosomes. Results obtained by PCR on the infected tsetse, extended to all dissected tsetse. Tcf: *Trypanosoma congolense* 'West African riverine forest' type; Tcs: *T. congolense* 'Savannah' type; Tb: *T. brucei s. l.*; Tv: *T. vivax*; nr: 'not recognized', i.e. infections detected by microscopy which did not give any amplification signal by PCR with the primers used. Tbg: *T. brucei gambiense* group 1. See text for the definition of 'mature infection rate', according to trypanosome species.

(proboscis and/or midgut) were found simultaneously positive by PCR. Of the 52 tsetse found infected with *T. brucei s. l.*, 14 had such mature infections. This would give a total mature infection rate of *T. brucei s. l.* of 1% (see Fig. 2). On these 14 tsetse having mature *T. brucei s. l.* infections, we used the *T. b. gambiense* group 1 specific primer set (TRBPA1-2, see Fig. 3). Seven of them showed the

specific 149 bp band of *T. b. gambiense* group 1 at least in the salivary glands (Table 2). This would give a 0.5% infection rate of mature *T. b. gambiense* group 1 as determined by PCR.

Out of these 7 *T. b. gambiense* group 1 infections in the salivary glands, only one was a mixed infection involving another trypanosome (*T. congolense* F). Whereas of the 7 *T. brucei s. l.* infections that were not recognized as *gambiense*, 5 were mixed with other trypanosomes (see Table 2).

DISCUSSION

This study carried out in the HAT focus of Bonon in Côte d'Ivoire was performed to more clearly understand trypanosomes/tsetse/human and animal relations by characterizing trypanosomes found in the same place at the same time in these various potential or actual components in HAT epidemiology.

First, in humans, as expected using KIVI, only 1 zymodeme of *T. b. gambiense* group 1 was observed by MLEE, the predominant zymodeme Z3. Jamonneau *et al.* (2002) already reported this strong monomorphism, which was subsequently attributed to the selective nature of KIVI (Jamonneau *et al.* 2003). Here indeed, the only stock isolated from a patient by MI (Z50) was found to be genetically different by MLEE from all those isolated by KIVI (Z3), although both were shown to belong to *T. b. gambiense* group 1 by the TRBPA 1-2 marker. As isolation and culture stages probably select genotypes, the real genetic diversity of *T. b. gambiense* in

Table 2. PCR results on tsetse having mature *Trypanosoma brucei* infections

(See text for definition of mature *T. brucei* infections; + positive; - negative. For PCR results, i.e. with PCR using TBR1-2, TCF1-2, TCS1-2, TV1-2 primer pairs, positive = presence of the band at the expected size. For TRBPA1-2 primer pair, positive = presence of the 149 bp fragment specific for *T. b. gambiense* group 1. *T.c.f.*: *T. congolense* 'West African riverine forest' type; *T.c.s.*: *T. congolense* 'Savannah' type; *T.b.*: *T. brucei s. l.*; *T.v.*: *T. vivax*. *T.b.g.* group 1: *T. brucei gambiense* group 1. For instance, tsetse no. 3 is infected by *T. brucei s. l.*, *T. congolense* F and *T. vivax*. Tsetse no.6 is infected by *T. b. gambiense* group 1.)

Sample no.	Sex	PCR TBR1-2	PCR TCF1-2	PCR TCS1-2	PCR TV1-2	PCR TRBPA	Interpretation
1	F	+	-	-	-	-	<i>T.b.</i>
2	F	+	-	-	-	-	<i>T.b.</i>
3	F	+	+	-	+	-	<i>T.b./T.c.f./T.v.</i>
4	M	+	+	-	-	-	<i>T.b./T.c.f.</i>
5	F	+	+	-	-	-	<i>T.b./T.c.f.</i>
6	F	+	-	-	-	+	<i>T.b.g.</i> group 1
7	F	+	-	-	-	+	<i>T.b.g.</i> group 1
8	F	+	-	-	-	+	<i>T.b.g.</i> group 1
9	F	+	-	-	-	+	<i>T.b.g.</i> group 1
10	F	+	-	-	-	+	<i>T.b.g.</i> group 1
11	F	+	+	-	-	+	<i>T.b.g.</i> group 1/ <i>T.c.f.</i>
12	F	+	-	-	-	+	<i>T.b.g.</i> group 1
13	F	+	-	-	-	-	<i>T.b.</i>
14	F	+	-	+	+	-	<i>T.b./T.c.s./T.v.</i>

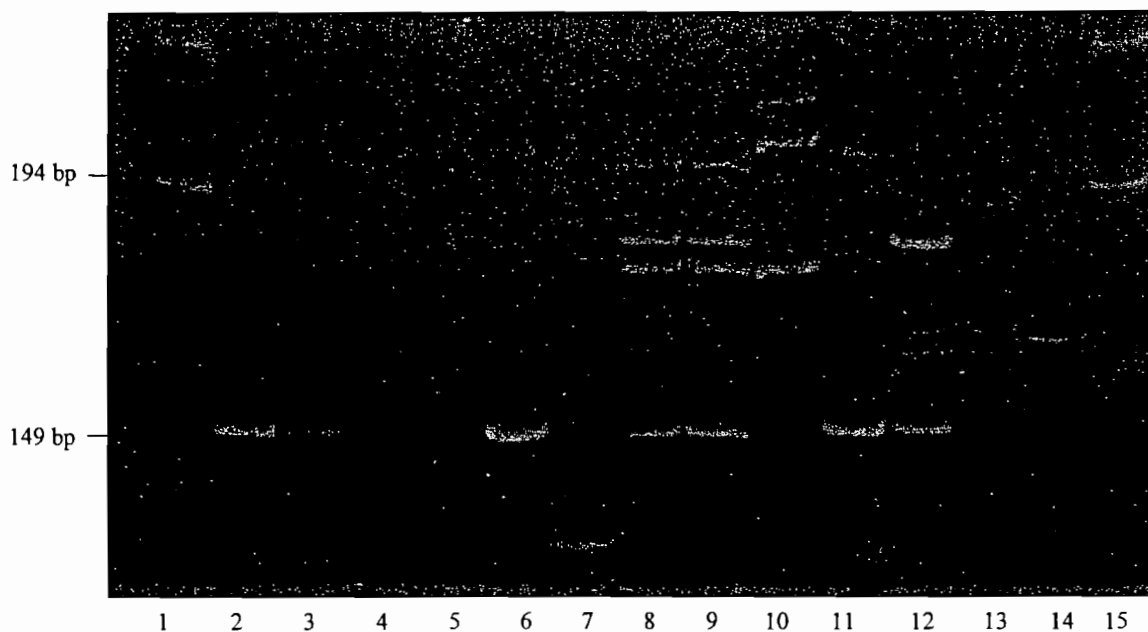


Fig. 3. Acrylamide gel with TRBPA showing the 149 bp fragment diagnostic of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 in reference stocks and in salivary glands and midguts from field-caught tsetse. Lanes 1 and 15: molecular marker (M4, Eurogentec), Lane 4: negative control, Lane 8: *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 reference stock (Jua, Truc *et al.* 1991). Lane 9: *T. b. gambiense* group 1 reference stock (Peya, Truc *et al.* 1991). Lane 10: *T. b. brucei* reference stock (Stib215, Gibson *et al.* 1978). Lanes 2 and 3: salivary gland and midgut of a tsetse infected by *T. b. gambiense* group 1 in these two organs, Lanes 5, 6 and 7: salivary gland, midgut, and proboscis of a tsetse infected by *T. b. gambiense* group 1 in the midgut only, Lanes 11, 12 and 13: salivary gland, midgut, and proboscis of a tsetse infected by *T. b. gambiense* group 1 in the salivary glands and midgut, Lane 14: midgut of a tsetse in which *T. b. gambiense* group 1 was not found.

humans must be higher than previously observed. For instance, multiple infections by different genotypes of *T. brucei s. l.* have recently been reported in patients (Truc *et al.* 2002; Jamonneau *et al.* 2004), as well as in tsetse (Letch, 1984). This strongly suggests that direct identification of trypanosomes within

blood, without involving isolation and culture stages should be used in the future, provided that sensitive and specific molecular markers are available.

In our sample of 18 pigs, a high trypanosome prevalence was observed (72.2%), in accordance with previous studies (Mehlitz, 1986). The high

prevalence of mixed infections of *T. congolense* F and *T. brucei s. l.* in pigs also confirms previous results (Mehlitz, 1986; Noireau *et al.* 1986), with additional information here on the *T. congolense* molecular group. We also noted that on pigs infected with these two trypanosome species, following a culture step (with both KIVI and MI) *T. brucei s. l.* always outcompeted *T. congolense* F which systematically disappeared.

Jamonneau *et al.* (2003) recently showed by MLEE that zymodemes of *T. brucei s. l.* on a single pig were different according to the isolation method used (KIVI and MI). In the present work, in contrast to other studies (Gibson *et al.* 1978; Mehlitz *et al.* 1982), zymodemes found in pig by MLEE were all different (albeit very close) to those found in humans whatever the isolation method used. By PCR with TRBPA 1-2, the specific 149 bp fragment of *T. b. gambiense* group 1 appeared in some of the stocks, confirming the close relationship between stocks from pigs and from humans.

These results suggest a very high diversity of genotypes of trypanosomes at the intra- (e.g. within *T. brucei s. l.*) and inter-specific level (e.g. *T. brucei s. l.* and *T. congolense*) circulating in pigs in this HAT focus, the majority of them remaining uncharacterized. It appears also that various genotypes circulate in humans, but that the ones which were characterized differ from those found in pigs, although again many genotypes of *T. brucei s. l.* in humans are still unknown (all those not isolated by MI nor by KIVI).

In tsetse, trypanosome infection rates observed using microscopical examination were higher than generally reported in West Africa (Squire, 1954; Lefrançois *et al.* 1998), even in Côte d'Ivoire (Croft *et al.* 1984; Nekpeni *et al.* 1991). An important number of infections seen by microscopical examination could not be characterized by PCR, as already reported (Solano *et al.* 1995; Lefrançois *et al.* 1998; Morlais *et al.* 1998). This may be attributed to the fact that the range of primers used in this study could not identify all the trypanosomes known to develop in the tsetse gut, e.g. *T. simiae*, *T. varani*, Tsavo *T. congolense* (Hoare, 1972; Majiwa *et al.* 1993), and also to PCR inhibition due to elements present in the midgut (Ravel *et al.* 2004).

T. congolense F was the most prevalent trypanosome in *G. p. palpalis*, as expected in this transitional forest-savannah area around a peridomestic habitat (see also Morlais *et al.* 1998) where pigs are abundant, and also small ruminants in which *T. congolense* F can develop. The higher prevalence of *T. congolense* F in *G. p. palpalis*, and its common association with *T. brucei s. l.* in mixed infections strengthens the idea that there may be a predominant pig/tsetse/pig cycle in this area, also suggested by the reported bloodmeal preferences of *G. p. palpalis* for the pig (Sané, Laveissière & Meda, 2000).

T. congolense S was weakly present in *G. p. palpalis* and, when present, was in most of the cases, associated to its closely related *T. congolense* F. In Toumodi, which is located in the same country at the same latitude as Bonon but in a savannah area, the reverse was observed in *G. longipalpis*, i.e. few *T. congolense* F, but always associated with *T. congolense* S which was the most prevalent (Solano *et al.* 1995). It may be that some evolutive mechanisms of association between these 2 trypanosome groups exist that help them to succeed in their transmission cycle in adverse ecological conditions (Solano *et al.* 2001).

Looking at mature infections, with parasitological detection only 1 salivary gland was found infected with trypanosomes out of 1701 dissected tsetse, which has been classically reported (Hoare, 1972). The use of PCR permitted a higher detection rate for *T. brucei s. l.* mature infections (in 14 tsetse) (see also Ravel *et al.* 2003). In addition, using a primer pair specific for the detection of *T. b. gambiense* group 1, this latter was found in 7 of the 14 mature infections. Eventually, the mature *T. b. gambiense* group 1 infection rate in tsetse was 0.5%, which is very close to the human prevalence of the disease in this focus (0.48%).

The great number of mixed infections involving 2, 3 or even 4 trypanosome groups in a single tsetse confirms previous results (Masiga *et al.* 1996; Woolhouse *et al.* 1996; Lehane *et al.* 2000), and supports the idea that tsetse can be sequentially infected on the field, at least for *T. congolense* and *T. vivax* (Squire, 1954). This might be different for trypanosomes infecting humans, which would infect tsetse mostly at their first bloodmeal (Van Hoof, 1937; Maudlin & Welburn, 1994), thus explaining a lower infection rate in tsetse for these trypanosomes. In addition, we observed in the present study that from the 7 tsetse harbouring a mature infection with *T. b. gambiense* group 1, only one was infected with another trypanosome, which might mean that either an established *T. b. gambiense* infection will prevent, in most cases, other trypanosomes from reaching a mature stage (when the first bloodmeal is on an animal), or that a tsetse infected by *T. b. gambiense* on a human (which occurs not frequently) will feed afterwards more readily on a human. In both cases, it can be assumed that a man/tsetse/man cycle, although occurring much less frequently than a pig/tsetse/pig cycle in this area, can mostly explain by itself the close and low prevalences of *T. b. gambiense* in tsetse and humans in this focus. Then, looking at the high infection rate of *T. brucei s. l.* in pigs, it has to be deduced that most of these trypanosomes will probably not be transmitted to humans. In this study, this is strengthened by the fact that zymodemes found in pigs were all found to be different from those found in humans, although some of them belonged to *T. b. gambiense* group 1. However, this latter point has to be taken with caution, given that most of the

genotypes circulating were not identified because of selection by culture.

Although being quite speculative, these scenarios would suggest that in the field in this area, there are few chances that a human could be infected by trypanosomes originating from pigs via a tsetse.

An interesting outcome of this study is the ability to identify *T. b. gambiense* group 1 trypanosomes in tsetse, although it is not known if the *T. b. gambiense* group 1 identified by TRBPA 1-2 in tsetse and in pigs are infective for humans. Another outcome is that the study was conducted in the different hosts of the pathogenic system at the same place and at the same time, and it shows a very high diversity and intense circulation of multiple different trypanosome genotypes of different species and subspecies among the different hosts. It also appears important to study the circulation of animal trypanosomes from which interactions with 'human' trypanosomes may help to understand the transmission of the human disease. We are aware that these results only involve this focus and might not be extended to others, and also that our sample of pigs was not sufficient to reach definitive conclusions. In the future, higher numbers and different species of animals should be used. Direct identification of trypanosomes will hopefully be performed without culture steps to avoid sampling bias, because many genotypes of *T. brucei* have never been isolated and could change the conclusions drawn so far.

Special acknowledgments to all the technicians from HAT team of the Institut Pierre Richet who, despite the war occurring in Côte d'Ivoire, saved all the samples and continued to work under hard conditions. We thank IRD and Service de Coopération et d'Action Culturelle d'Abidjan (SCAC) for their support, and M. Lehane for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

- AERTS, D., TRUC, P., PENCHENIER, L., CLAES, Y. & LERAY, D. (1992). A kit for *in vitro* isolation of trypanosomes in the field: first trial with sleeping sickness patients in the Congo republic. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **86**, 394–395.
- CROFT, S. L., KUZOE, F. A. S., RYAN, L. & MOLYNEUX, D. H. (1984). Trypanosome infection rates of *Glossina* spp. in transitional forest-savannah near Bouffé, Ivory Coast. *Tropical Medicine and Parasitology* **35**, 247–250.
- CUNNINGHAM, I. (1977). New culture medium for maintenance of tsetse tissues and growth of trypanosomatids. *Journal of Protozoology* **21**, 325–329.
- FRÉZIL, J. L. & CUISANCE, D. (1994). Trypanosomiases, maladies d'avenir: leurs perspectives et leurs inconnues. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* **87**, 391–393.
- GIBSON, W. C. (1986). Will the real *Trypanosoma brucei gambiense* please stand up? *Parasitology today* **2**, 255–257.
- GIBSON, W. C., MEHLITZ, D., LANHAM, S. & GODFREY, D. G. (1978). The identification of *Trypanosoma brucei gambiense* in liberian pigs and dogs by resistance to human plasma. *Tropical Medicine and Parasitology* **29**, 335–345.
- GODFREY, D. G., BAKER, R. D., RICKMAN, L. R. & MEHLITZ, D. (1990). The distribution, relationships and identification of enzymatic variants within the subgenus *Trypanozoon*. *Advances in Parasitology* **29**, 1–74.
- HERDER, S., SIMO, G., NKININ, S. & NJIOKOU, F. (2002). Identification of trypanosomes in wild animals from Southern Cameroon using the PCR. *Parasite* **9**, 345–349.
- HOARE, C. A. (1972). *The Trypanosomes of Mammals – a Zoological Monograph*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- JACCARD, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise de Sciences Naturelles* **44**, 223–270.
- JAMONNEAU, V., BARNABE, C., KOFFI, M., N'GUESSAN, P., KOFFI, A., SANE, B., CUNY, G. & SOLANO, P. (2003). Identification of *Trypanosoma brucei* circulating in a sleeping sickness focus in Côte d'Ivoire: assessment of genotype selection by the isolation method. *Infection, Genetics and Evolution* **3**, 143–149.
- JAMONNEAU, V., GARCIA, A., RAVEL, S., CUNY, G., OURY, B., SOLANO, P., N'GUESSAN, P., N'DRI, L., SANON, R., FREZIL, J. L. & TRUC, P. (2002). Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei* ssp. and clinical evolution of Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Tropical Medicine and International Health* **7**, 610–621.
- JAMONNEAU, V., RAVEL, S., GARCIA, A., KOFFI, M., LAVEISSIERE, C., HERDER, S., GREBAUT, P., CUNY, G. & SOLANO, P. (2004). Genetic characterization of trypanosomes infecting untreated but asymptomatic sleeping sickness patients in Côte d'Ivoire: a new genetic group? *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **98**, 329–337.
- JORDAN, A. M. (1964). Trypanosome infection rates in *Glossina morsitans submorsitans* newst. in Northern Nigeria. *Bulletin of Entomological Research* **55**, 219–231.
- KAGERUKA, P. (1987). Trypanosomose dans les élevages porcins du Bas-Zaïre. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* **40**, 49–53.
- KUKLA, B. A., MAJIWA, P. A. O., YOUNG, J. R., MOLOO, S. K. & OLE-MOIYOI, O. (1987). Use of species-specific DNA probes for detection and identification of trypanosome infections in tsetse flies. *Parasitology* **95**, 1–16.
- LAVEISSIERE, C. & GREBAUT, P. (1990). Recherches sur les pièges à glossines. Mise au point d'un modèle économique: le piège «Vavoua». *Tropical Medicine and Parasitology* **41**, 185–192.
- LEFRANÇOIS, T., SOLANO, P., DE LA ROCQUE, S., BENGALY, Z., REIFENBERG, J. M., KABORE, I. & CUISANCE, D. (1998). New epidemiological features on animal trypanosomiasis by molecular analysis in the pastoral zone of Sédaradougou, Burkina Faso. *Molecular Ecology* **7**, 897–904.
- LEHANE, M. J., MSANGI, A. R., WHITACKER, C. J. & LEHANE, S. M. (2000). Grouping of trypanosome species in mixed infections in *Glossina pallidipes*. *Parasitology* **120**, 583–592.
- LETCH, C. A. (1984). A mixed population of *Trypanozoon* in *Glossina palpalis palpalis* from Ivory Coast. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **78**, 627–630.

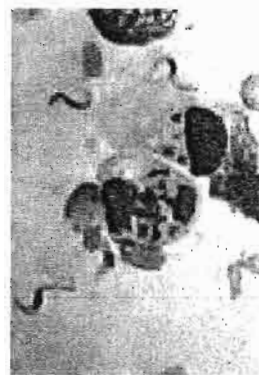
- LUMSDEN, W. H. R., KIMBER, C. D., EVANS, D. A. & DOIG, S. J. (1979). *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: adaptation for field-use. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **73**, 312–317.
- MAGNUS, E., VERVOORT, T. & VAN MEIRVENNE, N. (1978). A Card-Agglutination Test with stained *Trypanosomes* (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale* **58**, 169–176.
- MAJIWA, P. A. O., MAINA, M., WAITUMBI, J. N., MIHOK, S. & ZWEYGARTH, E. (1993). *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense*: molecular characterization of a new genotype from Tsavo, Kenya. *Parasitology* **106**, 151–162.
- MAJIWA, P. A. O. & OTIENO, L. H. (1990). Recombinant DNA probes reveal simultaneous infection of tsetse flies with different species. *Molecular and Biochemical Parasitology* **40**, 245–254.
- MAJIWA, P. A. O., THATTHI, R., MOLOO, S. K., NYEKO, J. H. P., OTIENO, L. H. & MALOO, S. (1994). Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy-coat samples from antigenemic but aparasitaemic cattle. *Parasitology* **108**, 313–322.
- MASIGA, D. K., McNAMARA, J. J., LAVEISSIÈRE, C., TRUC, P. & GIBSON, W. C. (1996). A high prevalence of mixed trypanosome infections in tsetse flies in Sinfra, Côte d'Ivoire, detected by DNA amplification. *Parasitology* **112**, 75–80.
- MASIGA, D. K., SMYTH, A. J., HAYES, P., BROMIDGE, T. J. & GIBSON, W. C. (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *International Journal of Parasitology* **22**, 909–918.
- MAUDLIN, I. & WELBURN, S. C. (1994). Maturation of trypanosome infections in tsetse. *Experimental Parasitology* **79**, 202–205.
- McNAMARA, J. J., LAVEISSIÈRE, C. & MASIGA, D. K. (1995). Multiple trypanosome infections in wild tsetse in Côte d'Ivoire detected by PCR analysis and DNA probes. *Acta Tropica* **59**, 85–92.
- MEHLITZ, D. (1986). *Le réservoir animal de la maladie du sommeil à Trypanosoma brucei gambiense*. Etudes et synthèses de l'ITEMVT, N°18.
- MEHLITZ, D., ZILLMANN, U., SCOTT, C. M. & GODFREY, D. G. (1982). Epidemiological studies on the animal reservoir of *gambiense* sleeping sickness. Part III. Characterization of *Trypanozoon* stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Tropical and Medicine Parasitology* **33**, 113–118.
- MORLAIS, I., GREBAUT, P., BODO, J. M., DJOHA, S., CUNY, G. & HERDER, S. (1998). Detection and amplification of trypanosomes by PCR in wild tsetse flies in Cameroon. *Acta Tropica* **70**, 109–117.
- MOSER, D. R., COOK, G. A., OCHS, D. E., BAILEY, C. P., McKANE, M. R. & DONELSON, J. E. (1989). Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies by DNA amplification using the Polymerase Chain Reaction. *Parasitology* **99**, 57–66.
- MURRAY, M., MURRAY, P. K. & McINTYRE, W. I. M. (1977). An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **71**, 325–326.
- NEKPENI, E. B., EOZAN, J. P. & DAGNOGO, M. (1991). Infection de *Glossina palpalis palpalis* par les trypanosomes en zone forestière de Gagnoa en Côte d'Ivoire. *Tropical Medicine and Parasitology* **42**, 399–403.
- NOIREAU, F., GOUTEUX, J. P., TOUDIC, A., SAMBA, F. & FREZIL, J. L. (1986). Importance épidémiologique du réservoir animal à *Trypanosoma brucei gambiense* au Congo. I. Prévalence des trypanosomoses animales dans les foyers de maladie du sommeil. *Tropical Medicine and Parasitology* **37**, 393–398.
- RADWANSKA, M., CHAMEKH, M., VANHAMME, L., CLAES, F., MAGEZ, S., MAGNUS, E., DE BAETSELIER, P., BUSCHER, P. & PAYS, E. (2002). The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **67**, 684–690.
- RAVEL, S., GREBAUT, P., CUISANCE, D. & CUNY, G. (2003). Monitoring the developmental status of *Trypanosoma brucei gambiense* in the tsetse fly by means of PCR analysis of anal and saliva drops. *Acta Tropica* **88**, 161–165.
- RAVEL, S., MARIANI, C., GREBAUT, P., JAMONNEAU, V., CUISANCE, D. & CUNY, G. (2004). Inhibition of the DNA amplification of trypanosomes present in tsetse flies midguts: implications for the identification of trypanosome species in wild tsetse flies. *Parasite* **11**, (in the Press).
- SANE, B., LAVEISSIÈRE, C. & MEDA, H. A. (2000). Répartition spatiale et préférences trophiques de *Glossina palpalis palpalis* dans le foyer forestier de Zoukougbeu (Côte d'Ivoire). Implications épidémiologiques. *Parasite* **7**, 241–244.
- SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. R. (1973). Numerical taxonomy. In *The Principles and Practice of Numerical Classification* (ed. Kennedy, D. & Park, R. B.), p. 573. W.H. Freeman and Co, San Francisco.
- SOLANO, P., ARGIRO, L., YAO, Y., REIFENBERG, J. M. & DUVALLET, G. (1995). Field application of the Polymerase Chain Reaction to the detection and characterization of trypanosomes in *Glossina longipalpis* (Diptera: Glossinidae) in Côte d'Ivoire. *Molecular Ecology* **4**, 781–785.
- SOLANO, P., GUÉGAN, J. F., REIFENBERG, J. M. & THOMAS, F. (2001). Trying to identify, predict and explain the presence of african trypanosomes in tsetse flies. *Journal of Parasitology* **87**, 1058–1063.
- SOLANO, P., KONE, A., GARCIA, A., SANE, B., MICHEL, V., MICHEL, J. F., COULIBALY, B., JAMONNEAU, V., KABA, D., DUPONT, S. & FOURNET, F. (2003). Rôle des déplacements des malades dans l'épidémiologie de la Trypanosomose Humaine Africaine dans le foyer de Bonon, Côte d'Ivoire. *Médecine Tropicale* **63**, 577–582.
- SOLANO, P., MICHEL, J. F., LEFRANÇOIS, T., DE LA ROCQUE, S., SIDIBÉ, I., ZOUNGRANA, A. & CUISANCE, D. (1999). Polymerase Chain Reaction as a diagnosis tool for detecting trypanosomes in naturally infected cattle in Burkina Faso. *Veterinary Parasitology* **86**, 95–103.
- SQUIRE, F. A. (1954). Observations on the incidence of trypanosomes in *Glossina palpalis* in Sierra Leone. *Bulletin of Entomological Research* **45**, 797–801.
- TRUC, P., AERTS, D., McNAMARA, J. J., CLAES, Y., ALLINGHAM, R., LE RAY, D. & GODFREY, D. G. (1992). Direct isolation *in vitro* of *Trypanosoma brucei* from man and other animals, and its potential value for the diagnosis

- of gambian trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **86**, 627–629.
- TRUC, P., FORMENTY, P., DIALLO, P. B., KOMOIN-OKA, C. & LAUGINIÉ, F. (1997). Confirmation of two distinct classes of zymodemes of *Trypanosoma brucei* infecting man and wild mammals in Côte d'Ivoire: suspected difference in pathogenicity. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **91**, 951–956.
- TRUC, P., MATHIEU-DAUDE, F. & TIBAYRENC, M. (1991). Multilocus isoenzyme identification of *Trypanosoma brucei* stocks isolated in Central Africa: evidence for an animal reservoir of sleeping sickness in Congo. *Acta Tropica* **49**, 127–135.
- TRUC, P., RAVEL, S., JAMONNEAU, V., N'GUESSAN, P. & CUNY, G. (2002). Genetic variability within *Trypanosoma brucei gambiense*: evidence for the circulation of different genotypes in human African trypanosomiasis patients in Côte d'Ivoire. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **96**, 1–4.
- VAN HOOF, L., HENRARD, C. & PEEL, E. (1937). Rôle du porc comme réservoir de *Trypanosoma gambiense*. *Comptes Rendus de la Société de Biologie* **126**, 72–75.
- WALSH, P. S., METZGER, D. A. & HIGUCHI, R. (1991). Chelex[®] 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**, 506–513.
- WELBURN, S. C., PICOZZI, K., FEVRE, E. M., COLEMAN, P. G., ODIIT, M., CARRINGTON, M. & MAUDLIN, I. (2001). Identification of human-infective trypanosomes in animal reservoir of sleeping sickness in Uganda by means of serum-resistance-associated (SRA) gene. *Lancet* **358**, 2017–2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1998). *La Trypanosomiase Africaine: Lutte et Surveillance*. WHO Technical Report Series, No. 881. WHO, Geneva.
- WOOLHOUSE, M. E. J., McNAMARA, J. J., HARGROVE, J. W. & BEALBY, K. A. (1996). Distribution and abundance of trypanosome (subgenus *Nannomonas*) infections of the tsetse fly *Glossina pallidipes* in Southern Africa. *Molecular Ecology* **5**, 11–18.

Apports et limites du diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine

Vincent Jamonneau, Philippe Solano,
Mathurin Koffi, Mélanie Denizot, Gérard Cuny

> La trypanosomiase humaine africaine, ou maladie du sommeil, demeure un problème préoccupant en Afrique intertropicale. Cette maladie nécessite une surveillance systématique des populations, particulièrement pour la trypanosomiase à *Trypanosoma brucei gambiense*, qui présente une longue période asymptomatique. En l'absence de signes cliniques spécifiques, le dépistage exhaustif des populations demeure l'unique moyen de contrôler cette maladie et d'éviter sa propagation. Le manque de sensibilité et de spécificité des tests diagnostiques classiques a conduit, ces dernières années, à l'utilisation des outils moléculaires. L'amplification par PCR de séquences spécifiques des parasites a considérablement amélioré le diagnostic de l'infection, le diagnostic de phase de la maladie, ainsi que le suivi post-thérapeutique. Cependant, des limitations à une application en routine existent et des recherches sont encore nécessaires pour faire de cette technique un réel outil de contrôle et de lutte contre la maladie du sommeil. <



Dans le cas de la forme gambienne, le cycle de transmission homme-mouche-homme semble prédominer. L'existence d'un réservoir animal a

été mise en évidence [2]. Son importance épidémiologique dans la transmission et la persistance de la maladie est toutefois encore mal connue. La forme rhodésienne est une zoonose typique. La transmission à l'homme (souvent considéré comme hôte accidentel) se fait suivant le cycle animal sauvage ou domestique-mouche-homme. Cette différence entre les deux formes de la maladie conditionne les stratégies de lutte : dans la forme gambienne, le traitement de tous les malades, associé à une lutte antivectorielle, devrait théoriquement permettre une éradication de la maladie. Cependant le traitement de tous les malades nécessite un dépistage exhaustif.

La THA évolue en deux phases, une première période, lymphatico-sanguine, durant laquelle le parasite se multiplie dans le sang et dans la lymphe, et une deuxième période, méningo-encéphalitique qui correspond au passage du parasite dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Au cours de la première période (qui peut durer plusieurs années dans la forme gambienne,

Institut de recherche pour le développement (IRD), UR 035, Laboratoire de recherche et de coordination sur les trypanosomiasés (LRCT), IRD/CIRAD, Campus international de Baillarguet, TA 207G, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

Vincent.Jamonneau@mpl.ird.fr

La trypanosomiase humaine africaine (THA) - ou maladie du sommeil - reste un problème majeur de santé publique en Afrique intertropicale. La prévalence, très souvent sous-estimée en raison de la faible proportion de population à risque sous surveillance, oscillerait entre 300 000 et 500 000 [1]. Cette parasitose, transmise par les glossines ou mouches tsé-tsé, est causée par des protozoaires du genre *Trypanosoma* : *Trypanosoma brucei gambiense* (*Tb gambiense*), responsable d'une forme chronique (forme gambienne) de la maladie en Afrique de l'Ouest et Centrale, et *Tb rhodésienne*, responsable d'une forme plus aiguë en Afrique de l'Est (forme rhodésienne).

mais seulement quelques semaines dans la forme rhodésienne), le malade présente des signes cliniques non spécifiques tels que des accès de fièvre fréquents, des céphalées ou des signes cutanés [3]. La phase méningo-encéphalitique se caractérise habituellement par l'apparition de troubles neurologiques (troubles du comportement, de la conscience, de la motricité), qui, sans traitement, conduisent au décès du malade. Les médicaments utilisés en première période (pentamidine, suramine) sont considérés comme peu toxiques, alors que le mélasoprol, utilisé dans la seconde période, est un dérivé arsenical ayant des effets secondaires importants, responsable d'environ 10% d'encéphalopathies réactives chez les patients traités.

Le diagnostic clinique de THA étant difficile [3, 4], des méthodes de diagnostic direct ou indirect sont nécessaires. Le diagnostic direct vise à rechercher la présence du parasite dans les liquides biologiques, alors que les méthodes indirectes mettent en évidence l'infection parasitaire à l'aide de tests sérologiques. Le diagnostic indirect est utilisé pour déterminer les sujets sur lesquels porteront les examens du diagnostic direct.

Les méthodes de diagnostic indirect utilisées en dépistage de routine se fondent sur la détection d'anticorps spécifiques par les tests CATT (*card agglutination test for trypanosomiasis*) *Tb gambiense* [5] et Latex *Tb gambiense* [6]. En cas de positivité de l'un de ces tests, le parasite devra être mis en évidence par une méthode directe pour permettre le traitement du malade [1]. Le diagnostic direct consiste en l'observation microscopique de la lymphé et du sang. Si des adénopathies cervicales sont présentes, l'observation de la lymphé se fait simplement par examen direct du suc ganglionnaire. En raison des parasitemies souvent très faibles, l'observation du sang nécessite l'utilisation de techniques de concentration comme la centrifugation en tubes capillaires (CTC) [7], la colonne échangeuse d'anions (mAEct) [8], ou le QBC (*quantitative buffy-coat*) [9] (Figure 1).

L'examen du LCR permet de diagnostiquer la phase de la maladie. La recherche de trypanosomes se fait clas-

siquement par simple (SC) ou double (DC) centrifugation du LCR [10, 11]. Ces techniques étant peu sensibles, des critères indirects d'altération du LCR sont aussi utilisés, comme l'augmentation de la protéinorachie (dosage des protéines) et de la cytorachie (comptage des leucocytes). Les valeurs préconisées par l'Organisation Mondiale de la Santé [1] pour établir le diagnostic de phase sont indiquées dans la Figure 1.

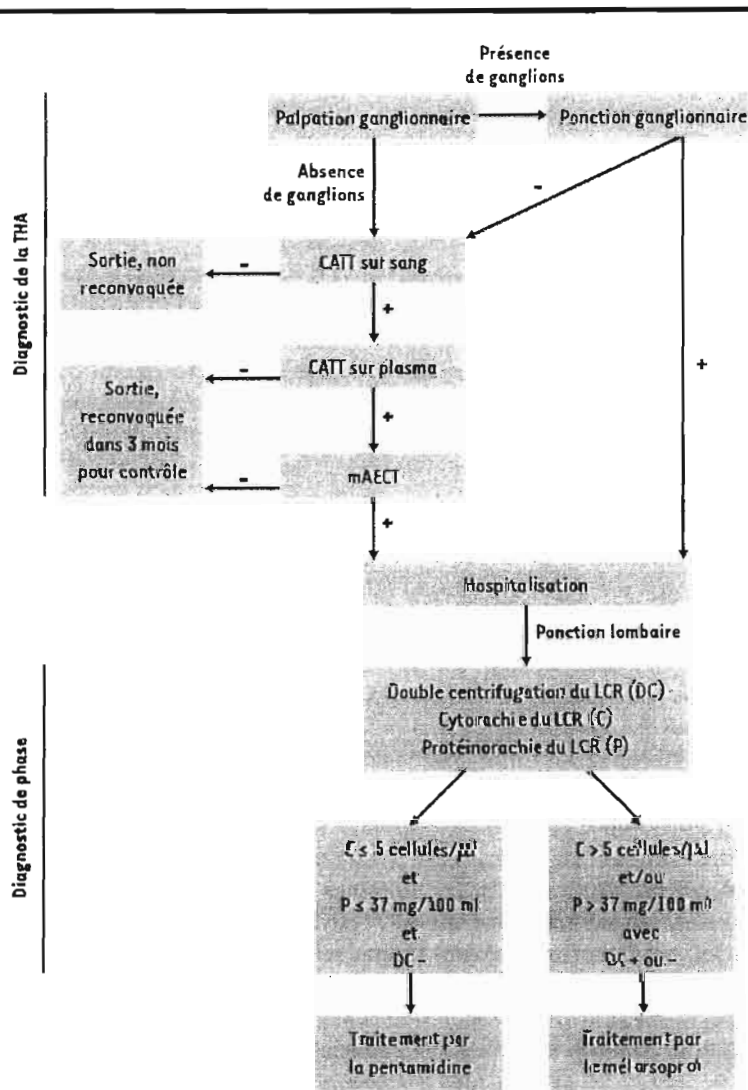


Figure 1. Dépistage et diagnostic de phase de la trypanosomiose humaine africaine. Le sujet est hospitalisé si la recherche de trypanosomes dans les adénopathies est positive ou si un test CATT (*card agglutination test for trypanosomiasis*) sanguin et plasmatique ainsi qu'une recherche de parasites après concentration sur colonne échangeuse d'anions (mAEct) sont positifs. Le diagnostic de phase de la maladie repose sur l'analyse du liquide céphalorachidien (LCR), après double centrifugation (DC), à la recherche de trypanosomes et d'une protéinorachie ou d'une cytorachie anormales. Le passage du parasite dans le LCR signe l'atteinte méningo-encéphalitique qui impliquerait un traitement par le mélasoprol.

Améliorer le diagnostic et la détermination du stade de la maladie

Le diagnostic et la détermination de la phase de la maladie sont d'une importance primordiale: (1) au niveau individuel, car ils permettent d'assigner un statut de «malade» à la personne examinée et de décider du traitement selon la phase de la maladie; (2) au niveau de la population, car les stratégies de lutte contre cette maladie, qui touchent des populations rurales dans des régions souvent difficiles d'accès, reposent en partie sur la détection précoce et le traitement des malades. Chaque méthode de diagnostic est évaluée en fonction de sa sensibilité (vrais positifs/vrais positifs + faux négatifs) et de sa spécificité (vrais négatifs/vrais négatifs + faux positifs) [12]. Les techniques actuellement utilisées manquent souvent de sensibilité et/ou de spécificité: défaut de sensibilité des examens parasitologiques du fait de parasitémies faibles [13]; défaut de sensibilité des méthodes indirectes dans le cas d'infections précoces (les anticorps ou antigènes recherchés ne circulent pas encore dans le sang) ou d'infections ne produisant pas les anticorps ou antigènes recherchés [14]; défaut de spécificité des méthodes sérologiques souvent attribué à des réactions croisées avec d'autres trypanosomes ou d'autres parasites humains, à la persistance d'anticorps ou d'antigènes durant plusieurs mois, voire plusieurs années après traitement [15].

Apports de l'outil moléculaire

Depuis ces dernières années, la détection de l'ADN de trypanosomes par PCR (*polymerase chain reaction*) est évaluée pour améliorer le diagnostic et la détermination du stade de la THA. Plusieurs amorces oligonucléotidiques ont été testées sur le sang ou sur LCR [16-23]. Quel que soit le protocole utilisé, la PCR semble être généralement beaucoup plus sensible que les techniques parasitologiques classiques, avec une limite de détection allant de 1 à 40 trypanosomes par ml de sang. En comparaison, la mAECT, considérée actuellement comme l'examen parasitologique le plus sensible, donne une limite de détection de 100 trypanosomes par ml de sang [1, 8]. À la différence des techniques sérologiques, la PCR permet de détecter précocement les infections trypanosomiennes [24]. Appliquée au LCR, la PCR s'est avérée plus sensible que la double centrifugation et semble également permettre de diagnostiquer très précocement les rechutes, à la différence des techniques classiquement utilisées [19].

Les amorces oligonucléotidiques couramment utilisées, spécifiques de *T. brucei* s1, permettent d'éviter les fausses positivités dues à d'autres parasitoses (filarioses, paludisme) ou à la présence transitoire d'autres trypanosomes (trypanosomes animaux). Ces avantages feraient de la PCR un test spécifique. À la différence des techniques indirectes qui peuvent rester positives plusieurs années après le traitement (persistance

des anticorps ou des antigènes dans le sang), l'observation d'une PCR positive représenterait réellement une infection active, la persistance de l'ADN de trypanosomes morts dans le sang n'excédant pas un à deux jours [24].

Limites rencontrées

Plusieurs auteurs ont rapporté des discordances entre les résultats des tests sérologiques et ceux obtenus par PCR. Le CATT, utilisé pour le dépistage de masse, manque de spécificité; un examen parasitologique est donc réalisé sur les sujets positifs pour rechercher les trypanosomes dans les liquides biologiques. Des études menées en Ouganda rapportent une absence significative de corrélation entre le CATT sur sang et la PCR [20]. Des problèmes de reproductibilité de la PCR à partir de sang ont été mis en évidence en Côte d'Ivoire [25]. Chez des sujets séropositifs ayant un examen parasitologique négatif, deux PCR successives ne donnent pas le même résultat. Le suivi longitudinal de ces cas montre que des résultats PCR positifs apparaissent moins souvent dans une population de séropositifs (définis comme positifs en sérologie à chacune des six visites du suivi) que dans une population de séronégatifs (définis comme négatifs en sérologie à au moins l'une des six visites) [26]. Enfin, sur des échantillons de sang de sujets séropositifs non confirmés à l'examen parasitologique, des discordances sont trouvées en fonction des méthodes d'extraction de l'ADN [17].

La spécificité de la technique a également été remise en cause car les amorces les plus utilisées amplifient les souches du groupe de *T. brucei* s1 comprenant, outre *Tb gambiense* et *Tb rhodesiense*, *Trypanosoma brucei brucei* qui n'est pas pathogène pour l'homme. Ces trypanosomes non pathogènes pourraient induire des faux positifs [26]. La spécificité des amorces oligonucléotidiques conventionnelles à *T. brucei* s1 [16] a même été contestée, des réactions croisées avec *T. vivax* et *T. congolense* ayant été décrites [22]. Une observation récente pourrait également expliquer en partie l'existence de faux-positifs: des PCR *in situ* ont montré que des séquences de trypanosomes étaient insérées dans les tissus (macrophages) d'un rat infecté par *T. brucei brucei*, traité à la pentamidine [22]. Si elle était confirmée, cette observation pourrait avoir des implications très importantes en termes de diagnostic par PCR et d'interactions hôte-parasite.

Concernant le diagnostic de phase de la maladie, la positivité de la PCR dans le LCR signe la présence du parasite dans le LCR et impliquerait de traiter au méfarsoprol tous les sujets positifs. Or, dans une étude récente menée en Côte d'Ivoire, plusieurs sujets dont la PCR du LCR était positive, mais la DC négative et le nombre de cellules compris entre 0 et 5, ont été traités efficacement par la pentamidine (*voir Figure 1*) [27]. De plus, des sujets ayant entre 0 et 20 cellules/ μ l ou positifs en DC ont pu être traités efficacement par la pentamidine, ce qui laisse penser que

même la présence de trypanosomes dans le LCR ne semble pas justifier l'emploi du méfarsoprol [28]. Même si la PCR/LCR permet d'améliorer le diagnostic de phase de la maladie, son intérêt n'apparaît pas toujours évident dans la décision thérapeutique.

Conclusions et perspectives

L'utilisation de la PCR dans le dépistage et le diagnostic de phase de la THA pourrait apporter des avancées importantes. Dans le cadre du dépistage actif, la PCR utilisée en aval des tests sérologiques permettrait d'établir si un sujet est infecté, avec une sensibilité apparemment supérieure aux méthodes classiquement utilisées. Mais tant que l'on ne pourra pas affirmer avec certitude qu'une PCR positive est le signe d'une infection active, l'utilisation de cette méthode dans le cadre du dépistage restera marginale. La PCR offre une sensibilité apparemment inégale et une spécificité correcte, mais les résultats obtenus chez des sujets ayant un test CATT positif non confirmé par l'examen parasitologique sont controversés. Cependant, le problème du diagnostic chez ces sujets ne concerne pas seulement la PCR, mais toutes les techniques de diagnostic.

En termes d'application sur le LCR, la PCR peut permettre de déterminer si un malade est en première ou seconde phase, ce qui conditionnera son traitement. Mais a-t-on réellement intérêt à utiliser le test le plus sensible pour le diagnostic de phase, alors que plusieurs travaux rapportent que l'on peut traiter avec succès des malades en seconde phase par la pentamidine [28]. En revanche, la PCR présente un intérêt certain dans le suivi du traitement et le diagnostic précoce des rechutes, la mise en évidence d'ADN trypanosomien dans le LCR pouvant être considérée comme la signature d'une réapparition de la maladie. Dans toutes ces applications, un pas décisif aura été franchi lorsque des amorces spécifiques de l'ADN de trypanosomes pathogènes pour l'homme seront disponibles. Des candidats potentiels sont actuellement à l'étude pour le diagnostic moléculaire de la THA : SRA (*serum resistant associated gene*) pour *Tb rhodesiense* [29] ; TgsGP (*T gambiense specific glycoprotein*) pour *Tb gambiense* [23] ; des séquences d'ADN microsatellites spécifiques de *Tb gambiense* qui différencient apparemment les trypanosomes pathogènes de l'homme des autres *T. brucei* [30]. Ces marqueurs pourraient résoudre les problèmes de spécificité de la PCR, à condition de conserver des sensibilités équivalentes à celles obtenues avec les amorces oligonucléotidiques utilisées actuellement.

La complexité des processus mis en jeu lors du passage du trypanosome dans le sang et dans le LCR est due à des phénomènes liés au parasite (variabilité génétique, différence de virulence) ou à l'hôte (sensibilité individuelle à l'infection, processus d'altération du système nerveux central). Cette complexité peut affecter la fiabilité des tests de dépistage et de diagnostic de phase de la THA et rendre difficile la décision thérapeutique (doit-on traiter un sujet ? Avec quel médica-

ment ?). Même si la PCR peut contribuer au dépistage et au diagnostic de phase, la mise au point d'un outil fiable, applicable à tous les sujets atteints de THA, et permettant de prendre la meilleure décision thérapeutique nécessite une meilleure connaissance de ces phénomènes. L'élaboration d'outils novateurs et de stratégies thérapeutiques nouvelles non toxiques aidera à lutter efficacement contre cette maladie, surtout à l'heure où les échecs thérapeutiques par résistance au traitement se multiplient [1]. ♦

SUMMARY

Contributions and limits of the diagnosis of human African trypanosomiasis

Human African trypanosomiasis, or sleeping sickness, is still a worrying problem in Africa. Sleeping sickness is a disease for which a systematic monitoring is necessary, particularly for the trypanosomiasis caused by *Trypanosoma brucei gambiense*, which is characterized by a long asymptomatic stage. In the absence of specific clinical signs, mass screening of populations remains the only way to control the disease and to avoid its spreading. The lack of sensitivity and specificity of the diagnosis tests classically used led to the development of molecular tools. PCR amplification of parasite specific sequences has considerably improved the diagnostic of the parasitic infection, the stage diagnosis as well as the post-therapeutic follow-up. But there are limits with a use in routine and research is still necessary to make PCR a real tool for control of sleeping sickness. ♦

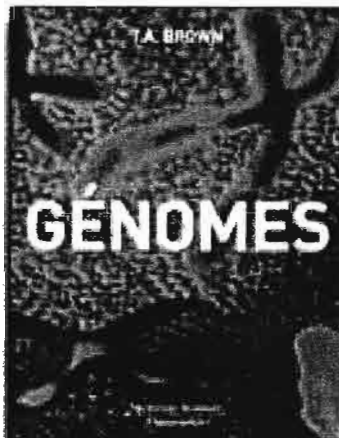
RÉFÉRENCES

1. Anonymous. Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO expert committee. *World Health Org Tech Rep Ser* 1998 ; 881 : 1-114.
2. Mehlitz D, Zillmann U, Scott C, et al. Epidemiological studies on the animal reservoir of Gambiense sleeping sickness. Part III. Characterization of trypanozoon stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Tropen Med Parasitol* 1982 ; 33 : 113-8.
3. Jannin J, Moulia-Pelat JP, Chanfreau B, et al. Trypanosomiase humaine africaine : étude d'un score de présomption de diagnostic au Congo. *B World Health Org* 1993 ; 71 : 215-22.
4. Jamonneau V, Garcia A, N'Guessan P, et al. Clinical and biological evolution of human African trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol* 2000 ; 94 : 831-5.
5. Magnus E, Vervoort T, Van Meirvenne N. A card-agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *T. gambiense* trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* 1978 ; 59 : 169-76.
6. Buscher P, Draelants E, Magnus E, et al. An experimental latex agglutination test for antibody detection in human African trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* 1991 ; 71 : 267-73.
7. Woo PTK. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop* 1970 ; 27 : 384-6.
8. Lumsden WHR, Kimber CD, Strange M. *Trypanosoma brucei* : a miniature anion-exchange/centrifugation technique for the detection of low parasitemias in mice. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1977 ; 71 : 421-4.
9. Bailey JW, Smith DH. The use of the acridine orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1992 ; 86 : 630.
10. Miezian TW, Meda HA, Doua F, et al. Simple centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed Pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2000 ; 94 : 293.

11. Cattand P, Miezán TH, de Raadt P. Human African trypanosomiasis : use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *B World Health Org* 1988 ; 66 : 83-6.
12. Dukes P, Rickman LR, Killick-Kendrick R, et al. A field comparison of seven diagnostic techniques for human African trypanosomiasis in the Luangwa valley, Zambia. *Tropen Med Parasitol* 1984 ; 35 : 141-7.
13. Truc P, Jamonneau V, N'Guessan P, et al. Parasitological diagnosis of African trypanosomiasis : a comparison of the QBC[®] and miniature anion-exchange centrifugation techniques. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1998 ; 92 : 288-9.
14. Dukes P, Gibson WC, Gashumba JK, et al. Absence of the LiTat 1.3 (CATT antigen) gene in *Trypanosoma brucei gambiense* stocks from Cameroon. *Acta Trop* 1992 ; 51 : 123-4.
15. Diallo PB, Truc P, Média HA, Kamenan A. Diagnostic sérologique de la trypanosomiase humaine africaine à *Trypanosoma brucei gambiense*. 1. Obtention et utilisation d'antigènes bruts dans les tests ELISA et d'agglutination au latex. *Bull Soc Pathol Exot* 1996 ; 89 : 262-8.
16. Moser DR, Cook GA, Ochs DE, et al. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology* 1989 ; 99 : 57-66.
17. Kamogne GD, Stevens JR, Asonganyi T, Gibson WC. Genetic heterogeneity in the *Trypanosoma brucei gambiense* genome analysed by random amplification of polymorphic DNA. *Parasitol Res* 1996 ; 82 : 535-41.
18. Penchenier I, Dumas V, Grébaud P, et al. Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomiasis. *Parasite* 1996 ; 4 : 387-9.
19. Truc P, Jamonneau V, Cuny G, Frezil JL. Use of polymerase chain reaction in human African trypanosomiasis stage determination and follow-up. *B World Health Org* 1999 ; 77 : 745-9.
20. Kyambadde JW, Enyaru JCK, Matovu E, et al. Detection of trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using the polymerase chain reaction. *B World Health Org* 2000 ; 78 : 119-24.
21. Kabiri M, Franco JR, Simarro PP, et al. Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7. *Trop Med Int Health* 1999 ; 10 : 658-61.
22. De Almeida PP, Ndao M, Van Meirvenne N, Geerts S. Diagnostic evaluation of PCR on dried blood samples from goats experimentally infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Trop* 1998 ; 70 : 269-76.
23. Radwanska M, Chamekh M, Vanhamme L, et al. The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Am J Trop Med Hyg* 2002 ; 67 : 684-90.
24. Bengaly Z, Kasbari M, Desquesnes M, Sidibé I. Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. *Vet Parasitol* 2001 ; 96 : 101-13.
25. Solano P, Jamonneau V, N'Guessan P, et al. Comparison of different DNA preparation protocols for PCR diagnosis of human trypanosomiasis. *Acta Trop* 2002 ; 82 : 349-56.
26. Garcia A, Jamonneau V, Magnus E, et al. Longitudinal survey of positive card agglutination trypanosomiasis test (CATT) but apparently aparasitemic individuals in Côte d'Ivoire : evidence for complex and heterogeneous population. *Trop Med Int Health* 2000 ; 5 : 786-93.
27. Jamonneau V, Solano P, Garcia A, et al. Stage determination and therapeutic decision in human African trypanosomiasis : value of PCR and IgM quantification on the cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients in Côte d'Ivoire. *Trop Med Int Health* 2003 ; 8 : 1-6.
28. Doua F, Miezán TH, Sano JR, et al. The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1996 ; 55 : 586-8.
29. Gibson W. Will the real *Trypanosoma brucei rhodesiense* please step forward ? *Trends Parasitol* 2002 ; 18 : 486-90.
30. Biteau N, Bringaud F, Gibson WC, et al. Characterisation of *trypanozoon* isolates using micro and minisatellite markers. *Mol Biochem Parasitol* 2000 ; 105 : 185-201.

TIRÉS À PART
V. Jamonneau

UN OUVRAGE EXCEPTIONNEL QUI REND COMPTE DES PROGRÈS LES PLUS RÉCENTS RÉALISÉS EN GÉNÉTIQUE



2004 - Collection Sciences, un volume broché,
585 pages, 450 illustrations.

GÉNOMES

Terry A. BROWN

traduction française d'Irène Mowszowicz, Service de biochimie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris.

D'extraordinaires progrès ont été réalisés en génétique ces toutes dernières années, en particulier le séquençage complet du génome de certains d'organismes, des bactéries à l'homme, qui a révolutionné notre compréhension des êtres vivants et de leurs interrelations. Cet ouvrage exceptionnel en rend compte. Il est divisé en 4 parties • le génome humain et les transcriptions • l'étude du génome, cartographie et séquençage • le fonctionnement du génome, la synthèse du arn • la régulation et l'activité du génome • les modalités de réplication du génome, le clonage et les applications notamment médicales. L'auteur s'appuie sur une pédagogie efficace et propose des listes de notions importantes, des encadrés avec les points-clés, des notes techniques, de nombreuses figures en 5 couleurs très clairement commentées, un bilan sur l'état de la recherche dans le cadre de la question traitée, etc. Des séries de questions et problèmes à la fin de chaque chapitre permettent de s'auto-évaluer. L'ouvrage se termine par un glossaire de 1200 termes.

Au total un livre unique de 585 pages et 450 illustrations en couleurs, indispensable à l'étudiant comme à l'enseignant pour apprendre et comprendre la génétique moderne, et au chercheur pour disposer d'un outil actuel.

En vente chez votre libraire spécialisé, sur notre site www.medicine.flammarion.com au par correspondance.

BON DE COMMANDE à retourner à

FLAMMARION MÉDECINE - 4, rue Casimir Delavigne - 75006 PARIS

NOM : Prénom : Adresse :

Code postal : Ville :

Je commande et je règle ci-joint par chèque bancaire à l'ordre de Flammarion (une facture acquittée sera jointe au colis) :

GÉNOMES - Terry A. BROWN au prix unitaire TTC de 85,00 € + 5 €. (participation aux frais de port) soit 90,00 €

MED. SCIENCES 1004

TRYPANOSOMOSE HUMAINE AFRICAINE : INTERACTIONS PARASITE / HÔTE ET DIVERSITÉ CLINIQUE

Vincent JAMONNEAU^{1*},

Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier

Mathurin KOFFI^{1,2}, Philippe SOLANO²

IRD, Centre Pierre Richet, Bouaké/Abidjan, Côte d'Ivoire

David COURTIN^{1,3}.

IRD, Montpellier et IRD, Dakar, Sénégal

Gérard CUNY¹

IRD, Montpellier

André GARCIA³

IRD, Dakar, Sénégal

RÉSUMÉ

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) est l'une des manifestations de la présence et du développement de protozoaires de l'espèce *Trypanosoma brucei* transmis par les glossines ou mouches tsé-tsé en Afrique intertropicale. Il existe des interactions complexes entre la population parasitaire et l'hôte humain se traduisant notamment par une diversité clinique importante. Dans cet article, l'objectif principal est de présenter un ensemble de travaux, menés dans les foyers de THA en Côte d'Ivoire, sur le rôle respectif du Parasite et de l'Homme dans le phénomène de diversité des manifestations des interactions que *T. b. gambiense* établit chez ses hôtes humains. Concernant le Parasite, même si des relations entre génétique parasitaire et diversité clinique ont pu être mises en évidence, une meilleure identification des souches parasitaires s'avère nécessaire pour approfondir cette étude. Des arguments indirects sont en faveur d'une susceptibilité individuelle à l'infection, mais cette dernière reste à prouver. Ainsi, ces travaux montrent bien que l'origine de la diversité clinique, mais aussi l'origine de la diversité de réponses aux tests de dépistage doit être recherchée à la fois chez le parasite, par l'étude précise de sa diversité génétique, ainsi que chez l'homme, en précisant les phénomènes impliqués dans la susceptibilité individuelle.

I. INTRODUCTION

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil reste un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne. Le nombre réel de cas, très souvent sous-estimé à cause de la faible proportion de population à risque sous surveillance (4 millions de personnes sous surveillance sur 60 millions de personnes exposées au risque de la délivrance du parasite agent étiologique, donc au risque de développement de la maladie), oscillerait entre 300.000 et 500.000 [36]. Cette parasitose est l'une des manifestations de la présence et du développement de protozoaires de l'espèce *Trypanosoma brucei* transmis par les glossines ou mouches tsé-tsé.

Cette espèce a été subdivisée en 3 sous-espèces [17] en se basant sur des caractères des trypanosomes communément qualifiés d'extrinsèques (aspects cliniques, hôtes et répartition géographique) : (a) *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*), sous-espèce classiquement reconnue comme responsable d'une forme "chronique" (ou forme gambienne)

de THA en Afrique de l'Ouest et Centrale, (b) *T. b. rhodesiense*, sous-espèce considérée responsable d'une forme plus aiguë de THA en Afrique de l'Est (forme rhodésienne) et (c) *Trypanosoma brucei brucei* (*T. b. brucei*), non pathogène pour l'homme, responsable de la nagana (trypanosomose animale) chez les animaux. Ce complexe d'espèces est classiquement nommé *T. brucei s. l.*⁴.

La maladie du sommeil évolue chez l'homme en deux phases : la première période, lymphatico-sanguine, durant laquelle le parasite se multiplie dans la lymphe et dans le sang, et la deuxième période, méningo-encéphalitique, qui correspond au passage du parasite dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Au cours de la phase lymphatico-sanguine, le malade présente des signes cliniques non spécifiques tels que des accès de fièvre fréquents, des céphalées ou des signes cutanés [7, 25]. La phase méningo-encéphalitique se caractérise habituellement par des troubles neurologiques (troubles du comportement, de la conscience, de la motricité) et, sans traitement, conduit à la mort du malade. Dans le cas de la forme chronique, la première pério-

¹ Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Unité de Recherche 035, Laboratoire de Recherche et de Coordination sur les Trypanosomoses, Montpellier.

² IRD, UR 035, Centre Pierre Richet, Bouaké/Abidjan, Côte d'Ivoire.

³ IRD, UR 010, Dakar, Sénégal.

⁴ s.l. pour sensu lato.

* Correspondance : Vincent JAMONNEAU, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Unité de Recherche 035, Laboratoire de Recherche et de Coordination sur les Trypanosomoses, Programme Santé Animale, TA 207/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France, tél et fax: 33 4 67 59 39 19, courriel : vincent.jamonneau@mpl.ird.fr

de peut durer plusieurs années, les symptômes sont généralement peu prononcés, et le déploiement des troubles neurologiques lors de la deuxième période est progressif. Dans le cas de la forme aiguë, la phase lymphatico-sanguine ne dure que quelques mois, les symptômes sont plus marqués et les manifestations de l'atteinte du système nerveux sont brutales.

Il est cependant actuellement de plus en plus admis que la dichotomie : forme chronique à *T. b. gambiense* versus forme aiguë à *T. b. rhodesiense* ne reflète qu'une vision partielle de la réalité. Concernant la forme gambienne, les tableaux cliniques sont en fait très divers. Certains auteurs ont rapporté l'existence de formes à caractère chronique très prononcé [10, 31, 38], l'exemple le plus connu étant celui de Féo au Togo [29], porteuse de *T. b. gambiense* pendant 21 ans sans atteinte neurologique. D'autres auteurs parlent de formes asymptomatiques [15, 19, 44, 46]. A l'inverse, des patients dépistés en Côte d'Ivoire ont présenté des tableaux cliniques plutôt caractéristiques d'une forme aiguë de la maladie (évolution rapide vers un état très altéré dès le passage en deuxième période) [12, 41]. En Afrique de l'Est, on remarque aussi une diversité des formes cliniques de THA à *T. b. rhodesiense*, des cas de formes chroniques ayant été observés [4, 8].

En résumé, nous sommes confrontés à une maladie dont la gravité potentielle est telle que l'étude de son évolution spontanée n'est éthiquement absolument pas défendable et pour laquelle il existe des interactions complexes entre la population parasitaire et l'hôte. Nos recherches visent à comprendre les mécanismes impliqués dans ces interactions et qui pourraient expliquer certaines observations. Dans cet article, l'objectif principal est de présenter un ensemble de travaux, menés dans les foyers de THA en Côte d'Ivoire (Fig. 1), sur le rôle respectif du Parasite et de l'Homme dans le phénomène de diversité des manifestations des interactions que *T. b. gambiense* établit chez ses hôtes humains. Nous nous sommes intéressés à la diversité de présentation et d'évolution cliniques des patients et à leur lien éventuel avec la variabilité génétique des souches de trypanosomes. Sur l'hôte humain, nos travaux ont porté sur l'étude du polymorphisme génétique qui pourrait rendre compte de l'initiation et du développement des processus pathogènes et de leur gravité.

II. SUBDIVISION DE *T. BRUCEI* sensu lato - PROBLEMES RENCONTRES

Le problème principal réside dans le fait que les trypanosomes de l'espèce *T. brucei* s.l sont indistinguables morphologiquement. Nous avons vu que la différenciation sub-spécifique de *T. brucei* s.l. basée sur les seuls critères extrinsèques du parasite semble insuffisante. Si l'on se réfère à des caractères plus "intrinsèques" des trypanosomes, les mêmes difficultés émergent. Par exemple, plusieurs auteurs ont observé que *T. b. rhodesiense* et *T. b. brucei* étaient plus "virulents" que *T. b. gambiense* après inoculation chez le rongeur de laboratoire [9, 45] mais des souches de *T. b. brucei* se sont avérées faiblement virulentes chez ces mêmes animaux [33]. L'utilisation de nouvelles techniques d'identification de signatures moléculaires a

permis des avancées importantes sans toutefois résoudre totalement la question. L'individualisation des différentes espèces en tant qu'entités génétiques distinctes reste douteuse. La technique d'électrophorèse des iso-enzymes (MLEE), utilisée pour analyser la structure génétique des populations, a permis de mettre en évidence la possibilité de discriminer et de séparer des individus appartenant à une même espèce, ce qui a permis d'individualiser un groupe génétiquement homogène, correspondant à 80 % des isolats humains d'Afrique de l'Ouest et Centrale. Ce groupe est communément appelé le "groupe de *T. b. gambiense*" [14]. Les 20% restants ont été étiquetés par les auteurs comme "gambiense groupe 2", "non gambiense" ou encore groupe "bouaflé", ce groupe étant génétiquement hétérogène [16].

D'autres méthodes reposant sur l'ADN parasitaire sont actuellement utilisées afin d'identifier des marqueurs génétiques spécifiques des entités déjà mises en évidence (groupes 1 et 2 de *T. b. gambiense*) ou spécifiques de celles qui ne seront identifiées par ces mêmes techniques. Grâce à la technique d'amplification de séquences d'ADN microsatellites, des résultats prometteurs ont déjà été obtenus [5, 23, 42].

III. DIVERSITE CLINIQUE DE LA THA

A) LA TRADUCTION DE LA VARIABILITE GENETIQUE DE *T. BRUCEI* S.

Pierre RICHET écrivait en 1961 [37] : "il existe une corrélation de virulence des trypanosomes chez l'homme en Côte d'Ivoire qui peut être attribuée à des différences au sein des souches de parasites".

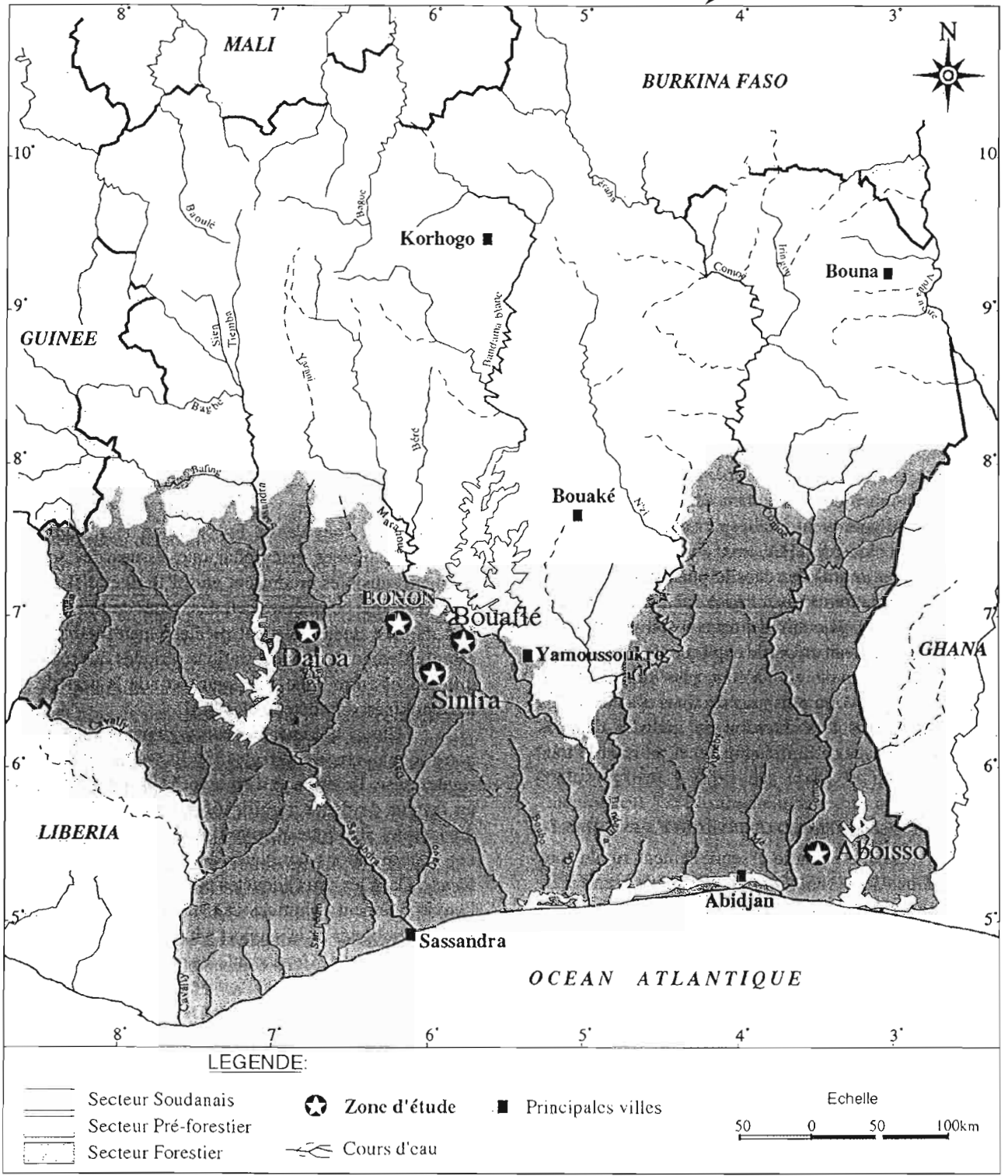
Si elle semble insuffisante, la caractérisation isoenzymatique de souches de trypanosomes a permis de confirmer l'hypothèse d'une relation entre génétique parasitaire et diversité clinique. En effet, la caractérisation des souches isolées durant les récentes épidémies dans le sud-est de l'Ouganda a montré que certains "types de tableaux cliniques" pouvaient être associés à un zymodème particulier [39]. Aux souches du zymodème B17 du groupe "busoga" sont associées des formes cliniques plutôt graves à évolution rapide avec présence de chancre d'inoculation. A l'inverse, les souches des zymodèmes du groupe "Zambezi" sont associées à des formes cliniques plus chroniques à évolution lente, à atteinte progressive du système nerveux, et une absence de chancre d'inoculation.

Lors d'une première étude menée entre 1996 et 1998 sur 139 patients dans l'ensemble des foyers de THA de Côte d'Ivoire (Aboisso au Sud-Est et Sinfra, Daloa, Bouaflé, Bonon au Centre-Ouest, Fig. 1), les techniques de caractérisation des trypanosomes (MLEE, Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) et Amplification en Chaîne de Polymérase de séquences microsatellites (PCR/Microsatellites)) ont mis en évidence un important monomorphisme génétique au sein des souches isolées [20] alors que l'étude a confirmé une grande diversité de tableaux et d'évolutions cliniques [21]. L'hypothèse du rôle primordial de l'hôte dans la diversité de présentation clinique se dégageait donc comme une hypothèse plausible. Cependant, lors de cette étude, seules 46% des souches ont pu être isolées et caractérisées, soulignant un risque

Figure 1. Localisation des zones d'étude en Afrique de l'Ouest



Côte d'Ivoire



important de biais de sélection. Ainsi, ce monomorphisme ne pourrait être " qu'apparent " et lié à la technique d'isolement utilisée, le Kit for In Vitro Isolation (KIVI) [1]. Il faut d'ailleurs souligner que la détection de ce monomorphisme parmi les souches isolées en Côte d'Ivoire coïncide avec le début de l'utilisation du KIVI, au début des années 1990.

Ainsi, nous avons récemment mis en évidence des biais de sélection associés au caractère cultivable ou non des parasites dans des milieux de culture [22]. En effet, des souches de trypanosomes ont été isolées simultanément à partir de malades atteints de THA et de porcs porteurs de trypanosomes (foyer de Bonon, Fig. 1) en utilisant deux techniques d'isolement différentes : le KIVI et l'Inoculation aux Rongeurs de laboratoire (IR). Des différences génétiques (MLEE et PCR/Microsatellites) ont été mises en évidence entre les souches isolées par KIVI et celles isolées par IR provenant du même hôte. Par ailleurs, une différence de génotype a aussi été mise en évidence par des marqueurs microsatellites entre deux souches isolées d'un même malade (par le KIVI) à des phases différentes des processus morbides [42].

La mise au point d'un réactif basé sur la variabilité de séquences microsatellites et permettant de caractériser les trypanosomes directement dans les liquides biologiques des hôtes a confirmé dans le foyer de Bonon (cf. figure), outre le biais sélectif des techniques d'isolement, l'existence de nombreuses infections mixtes chez les différents acteurs de ce " système pathogène " [23, 24]. A ce sujet, nous suspectons actuellement dans le foyer de Sinfra, l'existence d'infections mixtes avec des trypanosomes du groupe 1 de *T. b. gambiense* et d'un nouveau groupe de trypanosomes circulant chez l'homme et le porc, infections mixtes qui pourraient être responsables d'une forme particulièrement chronique de THA, avec des parasitemies très faibles, et qui seraient impliquées dans le phénomène de séropositivité sans confirmation parasitologique, ainsi que dans le maintien d'un réservoir humain de trypanosomes dans les foyers [15, 23]. Ceci pourrait en partie expliquer les diagnostics de THA dans des zones où elle n'était plus diagnostiquée depuis plusieurs années, voire plusieurs dizaines d'années. Ces résultats ont été obtenus lors du suivi de malades dépistés depuis 1995 dans le foyer de Sinfra (Fig. 1) et refusant le traitement.

B) LA TRADUCTION DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DES HÔTES ?

La THA est une maladie essentiellement rurale touchant les populations qui vivent en forêt (culture de cacao et de café notamment) et qui sont régulièrement détournées comme sources de sang par l'insecte hôte et vecteur du trypanosome, la glossine. La prise en considération du facteur humain dans l'étude de la localisation et de la fréquence du contact homme/glossine en secteur forestier semble montrer que la THA est une maladie fortement liée au comportement des populations [32]. Cependant, certains auteurs ont récemment mis en évidence les interactions complexes existant entre la prévalence de la maladie, le risque environnemental et comportemental, la présence du vecteur et l'homme [34]. D'autre part, le temps qui s'écoule entre la délivrance des parasites et les pre-

miers signes de la maladie semble plus court pour les sujets natifs de régions où la THA est absente et qui sont venus s'installer en zone d'endémie que pour des sujets natifs de ces zones endémiques [13]. Le rôle complexe de l'âge, à la fois comme facteur de maturation du système immunitaire et comme marqueur de la durée d'exposition, a déjà été souligné dans d'autres pathologies parasitaires [3] pour lesquelles l'existence d'une composante génétique humaine est maintenant fortement suspectée [11].

Malgré l'importance des facteurs de risques environnementaux et comportementaux dans l'épidémiologie de la THA, l'hypothèse d'une sensibilité individuelle à la présence et au développement du parasite, qui se traduit par l'existence de processus pathogènes, est plausible et son caractère valide ou non doit faire l'objet d'une exploration. Un certain nombre de données, reposant sur l'inoculation de trypanosomes à des souris génétiquement différentes, indique l'existence d'une composante génétique dont témoignent les variations des charges parasitaires et la fréquence de la mortalité, bien que des résultats contradictoires concernant le type de modèle génétique sous-jacent aient été obtenus [18]. KEMP *et al.* [26] ont identifié chez la souris des gènes impliqués dans le phénotype résistance à *Trypanosoma congolense* (l'un des deux parasites majeurs de la trypanosomose animale en Afrique). D'autres auteurs ont récemment souligné le rôle de certaines cytokines, du contrôle de l'activité macrophagique et de la sécrétion de NO par les macrophages dans cette résistance [40]. Les souris sensibles produiraient de manière significativement plus importante de l'interleukine 10 (IL10), mais moins d'IL12 que des souris résistantes après l'inoculation de *Trypanosoma congolense*. En présence de *T. congolense*, des cellules de lignées macrophagiques issues des souris génétiquement sensibles produisent plus d'IL10 et d'IL6 mais moins de TNF- α que ces mêmes cellules issues de lignées résistantes. Ces mêmes auteurs avaient préalablement établi que ce sont essentiellement les concentrations sériques qui témoignent des différences entre lignées de souris et non la période à laquelle les cytokines sont détectables [43].

Chez l'homme, les seuls arguments disponibles sont, à notre connaissance, indirects [35]. Ils ont montré que, pour *T. b. rhodesiense*, l'existence d'un antécédent familial de THA était un facteur de risque significatif pour un sujet vivant en zone d'endémie, alors que KHONDE *et al.* [28] ont mis en évidence des concentrations familiales de cas de maladie à *T. b. gambiense*. Dans les deux enquêtes précédentes, le comportement et l'environnement communs aux membres d'une même famille ont été soulignés et le support génétique de ces ressemblances n'a pas été étudié. Cependant, les mêmes auteurs soulignent le fait que dans une zone de forte endémie, des poussées épidémiques cycliques ont été notées dans les années 70 et 80 aux mêmes endroits que celles qui existaient 50 ans auparavant [27]. Bien que les conditions écologiques favorisant le contact homme-vecteur se soient maintenues, les faibles taux de prévalence observés dans ces zones durant plusieurs décennies pourraient être dus à l'existence d'un niveau d'immunité suffisant dans les populations locales. La diminution progressive de l'ef-

fectif des sujets immuns se traduirait alors par l'émergence d'une nouvelle poussée épidémique et la " sélection " d'une nouvelle population immune. L'existence de cette éventuelle pression de sélection reste à démontrer. D'autres éléments indirects sont en faveur d'une variabilité individuelle de réponse à l'infection par *T. b. gambiense*. Du fait du coût et de la difficulté de la mise en évidence du parasite, la recherche active de cas sur le terrain nécessite un criblage sérologique préalable de la population qui permet de repérer des sujets porteurs d'anticorps se liant aux trypanosomes, sujets chez lesquels sera ensuite réalisée la recherche de parasite. Ce criblage sérologique est réalisé à partir d'un test de détection d'anticorps (CATT pour Card Agglutination Test for *Trypanosomiasis*, [30]). Trois types d'individus peuvent ainsi être distingués: des sujets sains (séronégatifs), des malades (séropositifs et confirmés parasitologiquement) et des sujets séropositifs sans confirmation parasitologique. Ces derniers, qui ne sont pas considérés comme malades, ne reçoivent aucun traitement. Il peut s'agir, pour certains d'entre eux, de fausses séropositivités en relation avec des souches de trypanosomes animaux par exemple, mais également de sujets porteurs de rares parasites sans signe clinique (tels que ceux décrits ci-dessus [23]) qui représentent le groupe le plus " dangereux " dans le contexte de la santé publique car susceptibles de maintenir l'endémie dans la population, et enfin de sujets infectés par *T. b. gambiense* mais n'hébergeant plus de parasite (l'existence de guérison spontanée a déjà été suspectée [15, 19]). Ces deux derniers groupes, capables de contrôler plus ou moins efficacement la population parasitaire, présentent un grand intérêt car ils permettent d'évoquer un phénomène de " trypanorésistance " dans la population humaine [46]. Un phénomène du même type existe chez l'animal et son support génétique a été clairement démontré [2].

Depuis 1996, des travaux concernant l'existence d'une sensibilité individuelle, dont témoignent les symptômes et la gravité de la THA sont menés en Côte d'Ivoire dans le foyer de Sinfra (cf. Fig. 1). L'existence d'un phénotype de " trypanorésistance " a pu être suspectée sur une cohorte d'individus sur lesquels a été pratiquée une batterie de tests séro-parasitologiques pendant plus de deux années de suivi. Dans cette cohorte, les trois types d'individus précédemment décrits ont été trouvés, et notamment des sujets pour lesquels le contact avec l'agent de la trypanosomose humaine africaine semble certain et chez qui la confirmation parasitologique n'a pu être obtenue malgré la recherche répétée de parasites par des techniques extrêmement sensibles [12]. Une première enquête d'épidémiologie génétique a été menée en Côte d'Ivoire dans une zone de relativement faible endémie (foyer de Sinfra). Au total, 191 malades et 382 témoins ont été inclus dans une étude d'association entre certains polymorphismes de 4 gènes candidats et le développement de la THA. Parmi les polymorphismes testés, l'un situé dans le promoteur du gène codant pour le TNF- α semble conférer un danger accru de développer la THA rapidement après l'exposition au risque que des parasites aient été délivrés lors du repas sanguin d'une glossine hébergeant des parasites infestants. Un second polymorphisme situé sur le promoteur du gène codant pour l'Interleukine 10 pourrait être associé à un risque diminué de maladie [6].

V. CONCLUSIONS

Cette revue sur des travaux menés dans les foyers de THA en Côte d'Ivoire montre bien que l'origine de la diversité clinique, mais aussi celle de la diversité de réponses aux tests de dépistage, doivent être recherchées, tant chez le parasite, par l'étude précise de sa diversité génétique, que chez l'homme, en précisant les phénomènes impliqués dans la sensibilité individuelle. Une meilleure identification des souches parasitaires circulant dans les foyers de THA s'avère donc être un élément primordial pour l'épidémiologie et pour la lutte contre la parasitose. Par exemple, si l'existence d'infections mixtes se confirme, celles-ci pourraient être constituées d'un génotype particulièrement pathogène car neurotrope, et d'un génotype " non pathogène " (i.e. un génotype qui ne confère pas la propriété de traverser la barrière méningée) : ce type d'infections mixtes a été plusieurs fois suspecté mais jamais démontré. Chez un sujet chez lequel se déploient deux génotypes parasitaires différents, le diagnostic d'une maladie dont l'évolution clinique est rapide pourrait se traduire par la mise en évidence du seul génotype " non pathogène ", dans la mesure où celui-ci s'isole plus facilement sur KIVI. Nous ne pouvons plus ignorer cette complexité et ses conséquences pour établir la procédure diagnostique optimale visant à détecter tous les génotypes parasitaires dans des zones données. Bien que les interactions parasites / glossines n'aient pas été introduites dans cette brève contribution, identifier chez elles la distribution des différents génotypes parasitaires pourrait être une source précieuse d'informations complémentaires. Enfin, en ce qui concerne le paramètre variabilité individuelle des êtres humains estimé par des phénotypes subtils (déploiement temporel des phases de la maladie, gravité des processus pathogènes), la confirmation ou non de son impact ne pourra être établie que par des études cas-témoins par exemple, dont les difficultés et les contraintes sont telles que leur mise en œuvre exige la mise en place de projets intégrés. Dans ce contexte difficile, il devrait être enfin évident que tous les traits de vie du parasite doivent être considérés. Des études menées parallèlement et dans une même zone d'étude sur les génotypes parasitaires, les deux populations hôtes, Homme et Glossine, contribueraient à rayer des textes et déclarations l'adjectif " négligé(e)s " arbitrairement introduit pour référer au trypanosome et aux maladies qui témoignent de son développement.

Titre en anglais : **Human African Trypanosomiasis : Parasite / Host relations and clinical diversity.**

MOTS-CLES

Trypanosomose Humaine Africaine, variabilité génétique, susceptibilité individuelle, diversité clinique, Côte d'Ivoire

KEY WORDS

Human African Trypanosomiasis, genetic variability, individual susceptibility, clinical diversity, Côte d'Ivoire

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES⁵

- 1- AERTS D, TRUC, PENCHENIER L, *et al. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1992, **86**, 394-395.
- 2- AUTHIE E. *Parasitol. today*, 1994, **10**, 360-364
- 3- BAIRD JK. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1998, **92**, 367-390.
- 4- BAJYANA-SONGA E, HAMERS R, RICKMAN LR *et al. Trop. Med. Parasitol.*, 1991, **42**, 389-393.
- 5- BITEAU N, BRINGAUD F, GIBSON WC *et al. Mol. Biochem. Parasitol.*, 2000, **105**, 185-201.
- 6- COURTIN D, ARGIRO L, JAMONNEAU V *et al. Proceeding 7^{ème} MEEGID*, 2004, Valencia, Espagne
- 7- DUMAS M & BOUTEILLE B. *C-R Soc. Biol.*, 1996, **190**, 395-408.
- 8- FOULKES J. *Med. J. Zambia*, 1970, **4**, 167-177.
- 9- FREZIL JL, SAMBA F, BOSSENO MF *et al. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 1979, **17**, 107-118.
- 10- GALLAIS P, CROS R & ARQUIE E. *Méd. Trop.*, 1953, **13**, 844-856.
- 11- GARCIA A, MARQUET S, BUCHETON B *et al. Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1998, **58**, 705-709.
- 12- GARCIA A, JAMONNEAU V, MAGNUS E *et al. Trop. Med. Int. Health*, 2000, **5**, 786-793.
- 13- GARCIA A, JAMONNEAU V, SANE B *et al. Trop. Med. Int. Health*, 2002, **7**, 429-434.
- 14- GIBSON WC. *Parasitol. Today*, 1986, **2**, 255-257.
- 15- GINOUX PY & FREZIL JL. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 1981, **XIX**, **1**, 33-40.
- 16- GODFREY DG, BAKER RD, RICKMAN LR *et al. Adv. in Parasitol.*, 1990, **29**, 1-39.
- 17- HOARE CA. The trypanosomes of mammals. A zoological Monograph. *Blackwell Scientific Publications, Oxford*, 1972
- 18- INOUE N, INOUE M, KURIKI K *et al. Vet. Parasitol.* 1999, **86**, 173-84.
- 19- JAMONNEAU V, GARCIA A, N'GUESSAN P *et al. Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 2000, **94**, 831-835.
- 20- JAMONNEAU V, N'GUESSAN P, N'DRI L *et al. Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 2000, **94**, 643-649.
- 21- JAMONNEAU V, GARCIA A, RAVEL S *et al. Trop. Med. Int. Health*, 2002, **7**, 610-621.
- 22- JAMONNEAU V, BARNABE C, KOFFI M *et al. Inf. Genet. Evol.*, 2003, **3**, 143-149.
- 23- JAMONNEAU V, RAVEL S., GARCIA A, *et al. Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 2004, **98**, 329-337.
- 24- JAMONNEAU V, RAVEL S, KOFFI M *et al. Parasitology*, sous presse.
- 25- JANNIN J, MOULIA-PELAT JP, CHANFREAU B *et al. Bull. OMS*, 1993, **71**, 215-222.
- 26- KEMP SJ, IRAQI F, DARVASI A *et al. Nature and Genetics*, 1997, **16**, 194-196.
- 27- KHONDE N, PEPIN J, NIYONSENGA T *et al. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1995, **89**, 607-611.
- 28- KHONDE N, PEPIN J, NIYONSENGA T *et al. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1997, **91**, 521-524.
- 29- LAPEYSSONNIE L. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1960, **57**, 28-32.
- 30- MAGNUS E, VERVOORT T & VAN MEIRVENNE N. *Ann. Soc. Belg. Méd. Trop.*, 1978, **59**, 169-176.
- 31- MARDING RD & HUTCHINSON MP. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1948, **41**, 481-512.
- 32- MEDA H, LAVEISSIERE C, DE MUYNCK A *et al. Méd. Trop.*, 1993, **53**, 83-92.
- 33- MELHITZ D. Etudes et Synthèses de l'IEMVT, 1986, **N. 18**.
- 34- MOORE A, RICHER M, ENRILE M *et al. Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1999, **61**, 315-318.
- 35- OKHIA M, MBULAMBERI DB & DE MUYMCK A. *Ann. Soc. Belg. Méd. Trop.*, 1994, **74**, 105-112.
- 36- OMS. Rapport d'un comité d'experts OMS, 1998, Séries des Rapports techniques, 881.
- 37- RICHEL P. Discours inaugural. *Proc. 21^{ème} CTRC*, 1961, Conakry, Guinée.
- 38- SARTORY A, LASSEUR P & BRISSAUD H. *Bull. Acad. Méd.*, 1915, **73**, 631-633.
- 39- SMITH DH & BAILEY JW. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1997, **7**, 851-856.
- 40- TABEL H, KAUSHIK RS & UZONNA J. *Pathobiology*, 2000, **67**, 273-276.
- 41- TRUC P, FORMENTY P, DIALLO PB *et al. Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1997, **91**, 951-956.
- 42- TRUC P, RAVEL S, JAMONNEAU V *et al. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2002, **96**, 52-55.
- 43- UZONNA JE, KAUSHIK RS, GORDON JR *et al. Parasite Immunol.*, 1999, **21**, 57-71.
- 44- WERY M & BURKE J. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1972, **66**, 332-333.
- 45- WERY M, WEYN J, NGIMBI NM *et al. Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 1977, **57**, 425-437.
- 46- WOODRUFF AW, EVANS DA & OWINO NO. *J. Infect.*, 1982, **5**, 89-92.

⁵ La bibliographie complète avec le nom de tous les auteurs et le titre de l'article est disponible sur demande au secrétariat de notre Association.

L'impact de la guerre sur l'évolution de la THA dans le centre-ouest de la cote d'ivoire

D. Kaba¹, N. N. Dje², F. Courtin^{1,3}, E. Oke¹, M. Koffi^{1,3}, A. Garcia⁴, V. Jamonneau³ et P. Solano¹

1 Institut Pierre Richet/IRD, Equipe «THA et glossines», Abidjan, Côte d'Ivoire

2 PRCT Daloa, Côte d'Ivoire

3 IRD UMR 177, LRCT IRD/CIRAD, Montpellier, France

4 IRD, Dakar, Sénégal

Résumé

OBJECTIF Evaluer la situation de la maladie du sommeil dans le centre-ouest de la Côte d'Ivoire de 2000 à 2003, en tenant compte des événements survenus depuis en septembre 2002.

MÉTHODES Enquête active réalisée par des équipes médicales et détection passive des cas.

RÉSULTATS Entre 2000 et 2003, 250 patients ont été diagnostiqués pour la maladie du sommeil. De prime abord la prévalence de la maladie du sommeil semblait avoir baissé depuis le début de la guerre. Mais cette baisse apparente était due à une faible couverture de la population. La participation dans l'enquête médicale était différente selon le groupe ethnique, reflétant les conflits entre les différentes communautés pour les terres. De tels conflits sont courants dans la zone mais ont été exacerbés par la guerre.

CONCLUSION L'évaluation de l'importance de la maladie du sommeil durant la guerre par enquête médicale seule est très difficile. Mais la détection de la maladie du sommeil par surveillance passive a augmenté.

mots clés Trypanosomiase Africaine Humaine, épidémiologie, côte d'Ivoire, guerre, troubles sociopolitiques

Introduction

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil transmise par la mouche tsé-tsé (ou glossine), est une maladie négligée car on la croyait éteinte depuis les années 1960. Ceci contribue probablement à expliquer en partie son actuelle résurgence, puisque l'OMS estime de 300000 à 500000 le nombre actuel de cas (WHO, 2001). Plus grave encore est la très faible proportion de personnes bénéficiant d'une surveillance (4 millions sur 55 millions exposées). Certains pays, notamment ceux où des troubles socio-politiques sont survenus, connaissent un dramatique retour à la situation qui prévalait dans les années 1920.

En Afrique de l'Ouest, c'est la forme dite chronique à *Trypanosoma brucei gambiense* qui prévaut, transmise principalement par l'espèce de tsé-tsé *Glossina palpalis*. En Côte d'Ivoire plus particulièrement, il est classiquement admis que c'est le développement des cultures de rente (café, cacao), permis par un apport massif de main d'œuvre immigrée qui a entraîné une transmission plus intense de la THA (Hervouët & Laveissière, 1987). La Côte d'Ivoire est classée comme pays hyper-endémique par l'OMS (OMS,

2001). Suite à un premier bilan fait sur la répartition géographique des trypanosomés en Côte d'Ivoire de 1993 à 2000 (Dje *et al.* 2002), l'objectif de ce travail est d'actualiser l'évolution de la THA dans le centre-ouest de la Côte d'Ivoire entre 2000 et 2003, en termes de nombre de malades dépistés et de personnes vues lors des prospections médicales actives, en mettant un accent particulier sur les événements survenus depuis le 19 septembre 2002 et leurs conséquences possibles sur la THA.

Matériel et méthodes

Zones d'étude

En Côte d'Ivoire, les 2 centres de traitement de la THA actuellement opérationnels sont situés dans le centre-ouest à Daloa (Projet de Recherches Cliniques sur la THA, PRCT) et Bouaflé (District Sanitaire, DS). Les prospections médicales menées par les équipes mobiles concernent en priorité cette zone du centre-ouest, et plus précisément les régions de la Marahoué et du Fromager (Figure 1).

Les foyers prospectés dans ces régions sont:

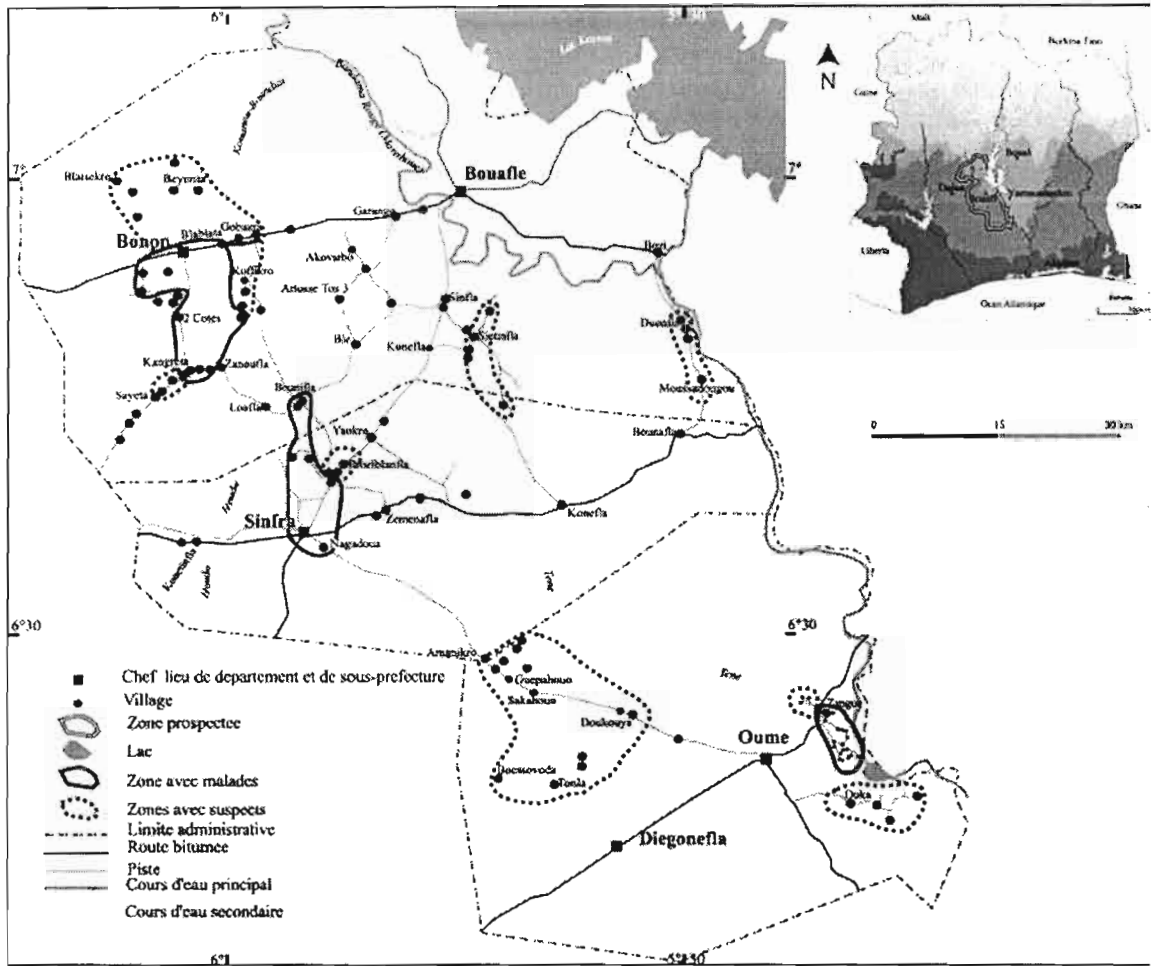


Figure 1 Situation de la THA dans le centre-ouest de la Côte d'Ivoire de 2000 à 2003.

- le foyer historique de Bouaflé, dont une zone a été vue en 2003.
- les foyers plus récents et actifs de Sinfra et Bonon. Ces deux foyers ont été régulièrement visités en totalité ou en partie en 2000 (Bonon seul), 2002 et 2003.
- la zone de Oumé, vue en 2001 et 2003.

De manière générale, la végétation dans ces zones est originellement la forêt mésophile qui ne subsiste qu'à l'état de quelques reliques forestières. Ces zones sont fortement anthropisées avec présence importante de cultures de rente (cacao, café principalement), et secondairement de cultures vivrières.

Populations d'étude

La population est hétérogène dans le centre-ouest avec une forte composante allogène ivoirienne et étrangère. Les autochtones sont Gouro et Gagou. La population allogène est importante composée d'Ivoiriens Baoulé, Sénoufo, Dioula, Lobi, et de ressortissants ouest africains, Burkinabés en majorité (Mossi, Lobi...), mais aussi Maliens, Guinéens, Béninois.

Ces populations vivent dans les villes, villages, hameaux et campements, et exercent essentiellement une activité agricole de rente ou des activités dérivées (commerce, etc.).

D. Kaba *et al.* Crise sociopolitique et THA en Côte d'Ivoire

Depuis le 19 septembre 2002, date du début des évènements sociopolitiques en Côte d'Ivoire, ces populations, particulièrement celles du centre-ouest, ont accueilli de nombreux déplacés venus majoritairement de l'Ouest et du Nord du pays, tandis qu'un retour massif de ressortissants ouest-africains a eu lieu vers leurs pays d'origine.

Le dépistage actif

Nous avons pris en compte les résultats de tous les dépistages actifs par prospections médicales entre 2000 et 2003.

Avant la prospection, un important travail de sensibilisation est fait au près des chefs de villages, de hameaux, et des différentes communautés ethniques, religieuses, politiques et sociales, les informant de notre passage.

Des séances d'explication portant sur la maladie (mode de transmission, manifestations cliniques, complications, etc.) sont proposées aux populations en présence des chefs de communautés, des organisations de jeunes, etc. Cette information est capitale pour être sûr que les populations comprennent bien pour quel motif l'équipe se déplace jusque chez eux, et ne puisse pas confondre avec d'autres évènements (politique, autre maladie, etc.), surtout en tenant compte de la situation actuelle en Côte d'Ivoire.

La méthode de diagnostic est celle classiquement utilisée en Afrique de l'Ouest, basée successivement sur le tri sérologique au CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis, Magnus *et al.* 1978) sur sang total, puis sur le plasma lorsque le premier CATT est positif. L'examen de confirmation parasitologique à la minicolonne (mAECT, Lumsden *et al.* 1979) est ensuite effectué chez les sujets positifs à ce dernier test. Par ailleurs, une ponction ganglionnaire avec recherche de trypanosomes entre lame et lamelle est effectuée chez tous les sujets porteurs d'adénopathies ayant un CATT positif au sang total.

Le dépistage passif dans les centres de traitement:

Nous avons pris en compte les résultats de tous les dépistages passifs effectués en consultation dans les centres de traitement (DS de Bouaflé et PRCT de Daloa). Une consultation des cahiers de registre des deux centres nous a permis de notifier tous ces cas.

La définition des cas et des séropositifs

La définition du cas est purement parasitologique par la mise en évidence du trypanosome dans le sang, le suc ganglionnaire ou le liquide céphalo-rachidien.

Les séropositifs sont ceux dont le CATT sur sang et sur plasma étaient positifs mais chez qui le parasite n'a pu être mis en évidence.

Analyse statistique des résultats:

L'analyse statistique des données a été effectuée sur Epi info version 6, 2000 et le test utilisé pour la comparaison des proportions et pourcentages est le Chi deux avec un risque α de première espèce de 5%.

Résultats

Prospections médicales actives

Au total, entre 2000 et 2003, 48 747 personnes ont été vues lors des prospections médicales actives (« équipes mobiles ») organisées conjointement par l'Institut Pierre Richet (IPR) de Bouaké et le PRCT de Daloa, sous la coordination du Programme National de Lutte contre la THA.

Sur le Tableau 1 figurent le nombre de personnes vues, le taux de présentation estimé, la prévalence et la séropréva-

Tableau 1 Résultats du nombre de personnes vues pendant les prospections médicales actives, des séropositifs, et malades dépistés selon la localisation géographique et l'année.

Année	Localité	Nbre pers vues	Estimation du taux de présentation (%)	Nbre séropositifs	Séroprévalence (%)	Nbre de malades	Prévalence (%)
2000	Bonon	15 289	55	170	1,11	74	0,48
2001	Oumé	8071	40	46	0,57	7	0,09
2002	Bonon	8284	40	96	1,16	33	0,40
	Sinfra	3117	40	24	0,77	4	0,13
2003	Oumé	1011	30	16	1,58	1	0,1
	Doukouya, Guépahouo	2909	25	16	0,55	0	0
	Bonon	1369	27	25	1,83	2	0,15
	Bouaflé	1178	20	14	1,19	0	0
	Sinfra	7552	30	70	0,93	10	0,13
Total		48 747		477	0,98	131	0,27

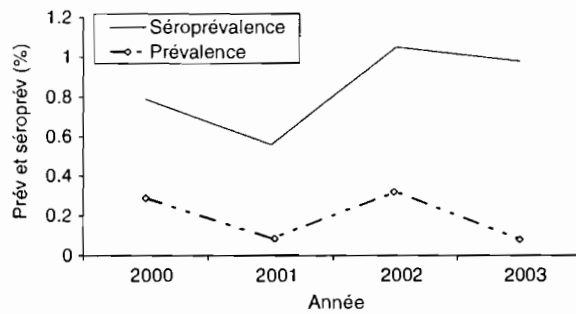
D. Kaba *et al.* Crise sociopolitique et THA en Côte d'Ivoire

Figure 2 Evolution de la prévalence et de la séroprévalence au centre ouest de 2000 à 2003.

lence observés selon les foyers et l'année. Le foyer de Bonon est le plus touché (0,44% sur 24 942 personnes vues entre 2000 et 2003), suivi de celui de Sinfra et de Oumé. Mais ces résultats reflètent mal une réalité plus complexe: en affinant l'échelle d'analyse, par exemple sur le foyer de Bonon, d'importantes variations spatiales de prévalence entre le nord et le sud de la ville ont été mises en évidence (Solano *et al.* 2003), allant de 0% au nord à plus de 3% dans certaines localités du sud. De même à Oumé, 3 zones différentes ont été prospectées, dont 2 où aucun malade n'a été trouvé. La prévalence de la maladie dans la seule zone du village de Zangué, où ont été dépistés 7 malades en 2001 sur 1011 personnes vues, est donc plus précisément de 0,7%.

Aucun malade n'a été trouvé sur les sondages faits dans les régions de Bouaflé (ancien foyer historique), ainsi que de Doukouya, Guépahouo (situés entre Oumé et Sinfra) mais des séropositifs ont été trouvés. Parmi ces séropositifs du centre-ouest, 7 étaient des déplacés de guerre venus de Bouaké, Duekoué et Toulepleu. Il s'agit de personnes vivant dans des familles hôtes où existent d'autres séropositifs et même 2 des malades dépistés.

La Figure 2 illustre la variation de prévalence d'une année à l'autre, sur les sondages effectués, en regroupant

les zones visitées. La prévalence varie généralement de 0,01 à 0,3%. Elle est similaire en 2000 et 2002, et en baisse apparente en 2001 et 2003. La baisse de 2001 est due au fait qu'une seule prospection ait eu lieu cette année là. En revanche, il apparaît plus difficile a priori d'expliquer la baisse apparente de 2003 alors que plusieurs prospections ont pu avoir lieu dans le centre-ouest. Il serait tentant de l'attribuer à une diminution réelle de la maladie suite aux prospections répétées dans ces régions. Mais d'autres facteurs peuvent jouer un rôle important, et nous allons tenter de les comprendre.

Taux de présentation des populations

Sur le Tableau 1, des variations de présence des populations aux prospections médicales sont visibles, avec notamment une diminution des taux de présentation pour l'année 2003. Nous avons cherché à voir s'il y avait des différences de taux de présentation des populations sur les centres dans lesquels nous sommes passés au moins 2 fois successivement. Par exemple, dans la ville de Bonon, un centre appelé « lisière Mady » a été visité en 2000, 2002, et 2003. On y constate une baisse progressive de la fréquentation globale (Tableau 2, $P < 0,0001$). Cette baisse est essentiellement due à une baisse du taux de présentation des populations Mossi de 2000 à 2003 ($P = 0,024374$).

Dans la région de Oumé, la variation de fréquentation est plus marquée entre 2001 et 2003 (Tableau 3, $P < 0,0001$), et la répartition par ethnie montre des taux remarquables: alors que les autochtones Gouro, mais aussi les Baoulé ont un taux de présentation globalement plus élevé, les Malinké, les Sénoufo et surtout les Mossi ne se sont pratiquement pas présentés.

En regroupant les résultats de quelques centres du foyer de Bonon avant septembre 2002 (soit les prospections de 2000 et de 2002), et après septembre 2002 (prospection de 2003) cette même tendance est confirmée: baisse significative de présentation des populations soudanaises aux

Tableau 2 Effectifs et proportions des populations vues au centre de « Lisière Mady » (Bonon) en 2000, 2002 et 2003

Ethnie	2000		2002		2003		Test de Chi-carré
	Eff	% de vus	Eff	% de vus	Eff	% de vus	
Mossi	356	42,33	265	32,22	184	43,44	$P = 0,024$
Malinké	249	29,61	213	31,87	182	34,92	N.S.
Sénoufo	88	10,46	70	10,51	60	11,48	N.S.
Baoulé	46	5,47	7	7,71	44	1,15	
Gouro	45	5,35	26	13,66	78	4,26	N.S.
Autres	57	6,75	25	4,03	23	4,10	N.S.
Total	841	100,00	610	100,00	571	100,00	

N.S., non significatif.

D. Kaba *et al.* Crise sociopolitique et THA en Côte d'Ivoire

Tableau 3 Effectifs et proportions des populations vues au centre de Zangué village (Oumé) en 2001 et 2003

Ethnie	2001		2003	
	Eff	%	Eff	%
Mossi	316	19,64	39	4,26
Malinké	41	2,55	8	0,87
Sénofo	42	2,61	10	1,09
Baoulé	835	51,90	655	71,58
Gouro	213	13,24	149	16,28
Autres	162	10,07	54	5,90
Total	1609	100,00	915	100,00

$\chi^2 = 166,91; P = 0,000001.$

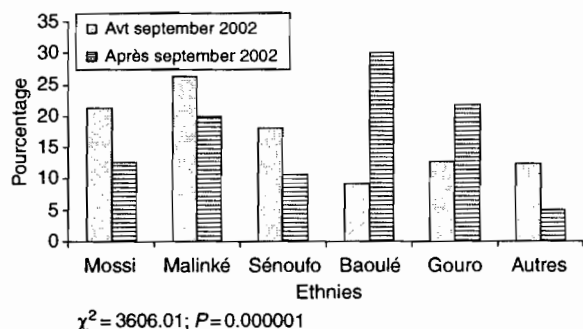


Figure 3 Evolution du pourcentage de personnes vues par ethnicité avant et après le début des événements sociopolitiques.

prospections post-septembre 2002 et augmentation significative de celle des Baoulé et Gouro (Figure 3).

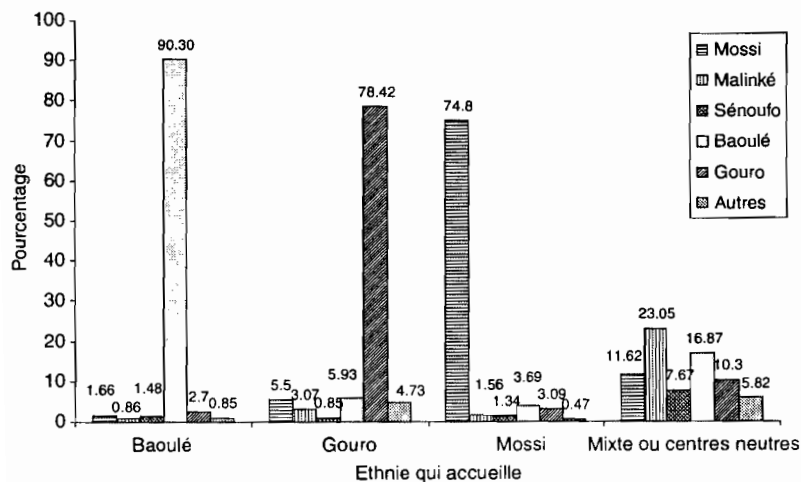


Figure 4 Proportion des ethnicités vues aux prospections médicales en fonction de l'ethnicité qui accueille l'équipe de prospection.

De cette analyse se dégage un constat: c'est l'observation de deux blocs formés d'une part par les populations soudanaises et d'autre part par les Gouro et Baoulé, et dont les proportions de présence aux prospections médicales évoluent en sens inverse. Or, il faut rappeler que ces populations soudanaises, en particulier les Mossi du Burkina Faso constituent une population particulièrement touchée par la THA (Hervouët & Laveissière, 1987; Meda *et al.* 1993).

On observe par ailleurs que la participation des différentes ethnies varie selon l'ethnicité du chef (de village, du quartier, d'une communauté donnée ou de famille) qui accueille l'équipe de prospection (Figure 4). Ainsi, dans l'ensemble des zones prospectées en 2003 après le début des événements, 90,5% (3045) des personnes présentes aux prospections 'organisées' par les Baoulé étaient des Baoulé, contre seulement 1,7% (56) de Mossi. Il en fut de même pour les prospections organisées en collaboration avec les Gouro ou les Gagou, ainsi qu'avec les Mossi. Ces derniers, en plus de leur faible présentation, ne se sont venus que lorsqu'ils avaient été impliqués dans l'organisation de la prospection. En revanche, on observe aussi que lorsque la prospection est conjointement organisée par plusieurs ethnies ou lorsque le centre de prospection est localisé sur un site neutre tel que le centre de santé ou l'école, toutes les ethnies se présentent dans des proportions équilibrées.

Dépistage passif

Entre 2000 et 2003, au total 250 cas ont été dépistés dont 131 (52.40%) au cours des prospections médicales actives et 119 (47.60%) de façon passive dans les centres. On note cependant qu'en 2003 le taux des cas dépistés passivement

D. Kaba *et al.* Crise sociopolitique et THA en Côte d'Ivoire

est significativement plus élevé qu'en 2002 malgré un sondage effectué dans tous les foyers actifs et étendu à de nouvelles zones (Guépaouo et Doukouya) et à des zones restées longtemps inexploitées (Bouaflé). Le regroupement des cas dépistés avant le début des événements sociopolitiques (en 2000, 2001 et 2002) et leur comparaison selon le mode de dépistage avec les cas dépistés en 2003, c'est à dire après le début des événements, montre, contrairement à ce qui est habituellement observé, qu'il y a eu significativement plus de cas dépistés passivement après le début des événements ($P = 0,000164$) (Tableau 4).

Discussion

La maladie du sommeil sévit toujours en Côte d'Ivoire, localisée essentiellement dans le centre-ouest avec des prévalences hétérogènes, variant d'un foyer à l'autre et d'une année à l'autre. Les résultats fournis dans ce travail ne reflètent pas la situation générale de la THA en Côte d'Ivoire, mais seulement celle de quelques foyers du centre-ouest irrégulièrement prospectés, et de manière non exhaustive d'une année à l'autre.

Dans ces foyers explorés, les taux de prévalence obtenus en 2003 sous-évaluent l'intensité de la maladie à cause du faible taux de présentation des populations à risque. En effet, cette étude montre que depuis les événements sociopolitiques en Côte d'Ivoire, les populations soudanaises, considérées comme étant les plus soumise au risque de cette maladie en Côte d'Ivoire (Meda *et al.* 1993), et habituellement plus présentes aux prospections médicales, ont significativement réduit leur présence. Malgré une participation plus importante des Baoulé et des Gouro, ethnies généralement moins touchées par la maladie que les Mossi, le taux de participation est resté globalement faible.

Il semble s'agir ici d'un impact réel négatif de la situation sociopolitique actuelle sur les sondages médicaux. En effet, depuis le début des événements sociopolitiques, la méfiance intercommunautaire, déjà existante souvent pour des raisons foncières (Chauveau & Bobo Koffi 2003), s'est accrue. Les différentes populations ne se sentent donc en

sécurité qu'au sein de leur communauté ethnique surtout lorsque celle-ci est, à travers l'un des leurs (chefs, personne influente, agent de santé communautaire) impliquée dans l'organisation de la prospection médicale. La présence de ce dernier constitue ainsi un gage de sécurité pour toute la communauté. C'est ainsi que les participations, non seulement faibles, étaient sélectives liées à l'ethnie.

Cette apparente baisse de prévalence de la THA, qui ne reflète en réalité qu'une baisse de présentation aux prospections médicales des populations les plus exposées, qui donc bénéficient d'une surveillance sanitaire encore moins importante qu'habituellement, pourrait constituer une partie de l'explication de l'idée classiquement admise, mais dont on ne connaît pas les mécanismes précis, selon laquelle l'épidémisation de la THA est liée aux troubles socio-politiques (Prothero 1963; Moore *et al.* 1999).

Une autre conséquence liée directement à la guerre est constituée des déplacements massifs de population, voire des retours (temporaires ou définitifs) de certains allogènes vers leur pays d'origine. Cela pourrait également expliquer le faible taux de présence des soudanais. Même s'il est encore tôt pour avoir une idée de leurs conséquences en matière de THA, une vigilance accrue s'impose dans les zones d'accueil de ces réfugiés (Burkina Faso, par exemple) où l'équilibre endémique pourrait s'en trouver bouleversé. Les quelques séropositifs trouvés ici qui étaient des sujets déplacés méritent par exemple d'être suivis.

En revanche, on note que, contrairement à ce qui est observé habituellement (en Côte d'Ivoire et en Guinée, Camara *et al.* 2005), les consultations passives en poste fixe ont permis de dépister significativement plus de cas en 2003 que les prospections médicales. Ces dépistages passifs ayant eu lieu après le passage des équipes mobiles, il s'agit possiblement d'une conséquence immédiate de la méfiance suscitée lors des prospections médicales. En effet, on peut penser que le surplus de personnes venues consulter dans les centres de traitement de la THA est constitué des personnes qui, se sentant malades, ont refusé de se présenter aux équipes mobiles pour les raisons évoquées plus haut. Ces personnes ont alors trouvé plus rassurant de consulter dans les centres de traitement de la THA.

Cela montre les limites des équipes mobiles pendant ces périodes de trouble: leur efficacité est moindre en terme de taux de présentation des populations les plus à risques et donc de nombre de cas dépistés. En revanche, dans ces périodes, la surveillance en poste fixe apparaît plus efficace et mériterait d'être renforcée.

Conclusion

Depuis le début des événements sociopolitiques de septembre 2002 en Côte d'Ivoire, l'évolution de la situation

Tableau 4 L'ensemble des cas selon le mode de dépistage avant et après les événements sociopolitiques

Période	Passif		Actif		Total (%)
	Effectif	%	Effectif	%	
Avant événements	85	41,87	118	58,13	203 (100)
Après événements	34	72,34	13	27,66	47 (100)
Total	119	47,6	131	52,4	250 (100)

$\chi^2 = 14,20$; $P = 0,000164$.

D. Kaba *et al.* Crise sociopolitique et THA en Côte d'Ivoire

de la THA devient difficilement appréciable par les équipes mobiles. Le taux de présentation des populations à risque est non seulement significativement réduit mais aussi très sélectif lié à l'ethnie, reflétant probablement la situation conflictuelle intercommunautaire due au problème du foncier rural et à la situation générale de guerre que connaît le pays. Cette situation est marquée dans le centre-ouest, proche de l'ancienne ligne de front dénommée « zone de confiance », qui est une zone de forte immigration mais aussi un lieu de concentration des foyers les plus actifs de THA. Les prospections médicales en période de trouble, même lorsqu'elles sont possibles, restent donc peu efficaces dans ce contexte. Elles ont toutefois un impact positif indirect, suscitant apparemment un plus grand nombre de consultations en poste fixe.

Remerciements

Nous remercions vivement le Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) Abidjan l'IRD, et l'OMS pour le financement des activités. Nos remerciements vont aussi aux personnels techniques des équipes médicales, aux personnels des districts sanitaires, et aux autorités administratives et sanitaires ivoiriennes des régions concernées pour leur aide.

Bibliographie

- Camara M, Kaba D, Kagbadouno M, Sanon JR, Ouendeno F & Solano P (2005) La Trypanosomose Humaine Africaine en zone de mangrove en Guinée: caractéristiques épidémiologiques et cliniques de deux foyers voisins. *Médecine Tropicale* 65, 155-161.
- Chauveau J-P & Bobo Koffi S (2003) La situation de Guerre dans l'arène villageoise: un exemple dans le centre-ouest ivoirien. In: La Côte d'Ivoire en guerre: dynamiques du dedans, dynamiques du dehors (ed. Banégas, R) *Politique Africaine (FRA)* 89, 12-32.
- Dje NN, Miezian TW, N'Guessan P, Brika P, Doua F & Boa F (2002) Distribution géographique des trypanosomés pris en charge en Côte d'Ivoire de 1993 à 2000. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 95(5), 359-361.
- Hervouët JP & Laveissière C (1987) Les grandes endémies: L'espace social coupasle. *Polit Afric* 28, 21-32.
- Lumsden WHR, Kimber CD, Evans DA & Doig J (1979) Trypanosoma brucei: miniature anion exchange centrifugation technique for detection of low parasitemis; adaptation for field use. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 312-317.
- Magnus E, Vervoort T & Van Meirvienne N (1978) A card-agglutination test with stained Trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *T. gambiense* Trypanosomiasis. *Annals Société Belge de Médecine Tropicale* 59, 169-176.
- Meda AH, Laveissiere C, De Muynck A, Doua F & Diallo PB (1993) Les facteurs de risque de la T.H.A. dans les foyers endémiques de côte d'Ivoire. *Médecine Tropicale* 53, 83-92.
- Moore A, Richer M, Enrile M, Losio E, Roberts J & Levy D (1999) Resurgence of sleeping sickness in Tambura county, Sudan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61, 315-318.
- Prothero RM (1963) Population Mobility and Trypanosomiasis in Africa. *Organisation Mondiale de la Santé* 28, 615-626.
- Solano P, Kone A, Garcia A *et al.* (2003) Rôle des déplacements dans l'épidémiologie de la Trypanosomose Humaine Africaine dans le Foyer de Bonon, Côte d'Ivoire. *Médecine Tropicale* 63(6), 577-582.
- WHO (2001) *African Trypanosomiasis or sleeping sickness*. World Health Organisation fact sheet 259, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en>.

Corresponding Author Philippe Solano, Institut Pierre Richet/IRD, Equipe « THA et glossines », s/c INSP, B.P. V 47, Abidjan, Côte d'Ivoire. e-mail: philippe.solano@mpl.ird.fr; solano@ird.ci

The impact of war on the evolution of sleeping sickness in west-central Côte d'Ivoire

OBJECTIVE To evaluate the situation of sleeping sickness in west-central Côte d'Ivoire from 2000 to 2003, in view of the war which broke out in September 2002.

METHODS Active surveys by medical teams and passive case detection.

RESULTS Between 2000 and 2003, 250 patients were diagnosed with sleeping sickness. At first it appeared that sleeping sickness prevalence had fallen since the beginning of political troubles. But this apparent drop was due to poor population coverage. Participation in medical surveys differed according to ethnic group, reflecting land use conflicts between ethnic communities. Such conflicts are common in this area, but have been exacerbated by the war.

CONCLUSION In war, assessing the importance of sleeping sickness by medical surveys only is very difficult. But detection of sleeping sickness cases by passive surveillance increased.

Keywords Human African trypanosomiasis, epidemiology, Côte d'Ivoire, war

D. Kaba *et al.* **Crise sociopolitique et THA en Côte d'Ivoire**

El impacto de la guerra en la evolución de la enfermedad del sueño en el centro-oeste de Costa de Marfil

OBJETIVO Evaluar la situación de la enfermedad del sueño en el centro-oeste de Costa de Marfil entre 2000 y 2003, en vista de la guerra que comenzó en Septiembre del 2002.

MÉTODO Búsqueda activa con equipos médicos y detección pasiva de casos

RESULTADOS Entre el 2000 y el 2003 se diagnosticaron 250 pacientes con la enfermedad del sueño. En un principio parecía que la prevalencia de la enfermedad había caído desde el comienzo de la guerra. Pero esta caída aparente fue debida a una mala cobertura de la población. La participación en las encuestas médicas fue diferente dependiendo del grupo étnico, lo cual refleja el conflicto en el uso de la tierra entre comunidades étnicas. Estos conflictos son comunes en esta área, pero la guerra los ha exacerbado

CONCLUSIONES Valorar durante la guerra la importancia de la enfermedad del sueño solamente mediante encuestas médicas es muy difícil. La detección de la enfermedad del sueño por detección pasiva de casos, sin embargo, ha aumentado.

Palabras clave tripanosomiasis humana africana, epidemiología, costa de marfil, guerra



Human African trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics

André Garcia¹, David Courtin^{1,2}, Philippe Solano^{2,3}, Mathurin Koffi^{2,3} and Vincent Jamonneau²

¹Institut de Recherche pour le Développement, Unité de Recherche 010, Faculté de Pharmacie, 4 Avenue de l'Observatoire, 75270 Paris, France

²Institut de Recherche pour le Développement, Unité Mixte de Recherche IRD-CIRAD 177, Laboratoire de Recherche et de Coordination sur les Trypanosomoses, TA 207/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

³Institut Pierre Richet, s/c INSP, Abidjan BP V47, Côte d'Ivoire

In West and Central Africa, the protozoan parasite *Trypanosoma brucei* (*T. b.*) *gambiense* causes a chronic form of Human African trypanosomiasis (HAT) that might last several years, whereas *T. b. rhodesiense* refers to an acute form in East Africa that lasts weeks to months. Without treatment, both forms can cause death. Diagnosis relies on detecting parasites in blood, lymph or cerebrospinal fluid. HAT was no longer considered a public health problem in the 1960s, but it returned to alarming levels in the 1990s. After intensifying case detection and treatment, WHO recently declared the situation is under control. However, research based on host and trypanosome interactions should be encouraged to help develop innovative tools for HAT diagnosis and treatment to prevent re-emergence.

Human African trypanosomiasis control: let the past be a lesson

Human African trypanosomiasis (HAT) is caused by protozoan parasites. Classically, infection with *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) gives rise to a chronic form in West and Central Africa that might last several years, whereas *T. b. rhodesiense* refers to an acute form in East Africa that might last from weeks to months. After a first hemolymphatic stage, with no specific clinical symptoms, the chronic form evolves progressively into a central nervous system syndrome (chronic encephalopathy, headache, mental changes and terminal somnolence state), whereas the acute form is characterized by an early severe infectious syndrome. Without treatment, both forms cause death.

After an epidemic from 1900 to 1940, HAT was largely eradicated in the 1960s [1]. However, in the past two decades the disease has re-emerged and returned to levels comparable with those in the early 20th century. In 1998 and 1999, some 45 000 new cases were reported every year [2], and in 2000 it was estimated that 300 000 individuals were infected. However, only 10–15% of the 60 million people living in risk areas were under surveillance [3]. Faced with this alarming situation, the National Control Programs of the more endemic countries, notably

in Central Africa, intensified active case detection and treatment with substantial financial support (from the French and Belgian governments and from WHO). The results seem promising. WHO have recently indicated a decline in the number of new reported cases and declared that we might now have returned to an elimination process, defined as the control of the disease by means of case detection and treatment, and by the development of epidemiologic surveillance systems [3,4].

Re-emergence in the past two decades can be explained partly by the relaxation of control and, to a lesser extent, by a decrease in the financial support for research. To avoid a new dramatic re-emergence, we remain convinced that the elimination process has to be linked with substantial research developments in various areas, such as the study of host–parasite interactions. The aim of the present paper is to report our opinion on the role of the interactions between host and parasite genetic polymorphisms on the variability of responses to infection. Programs focusing on these interactions will help clarify the mechanisms involved in the re-emergence phenomenon, and will participate in the development of innovative and better adapted control tools (for diagnosis, treatment and vaccine strategies) to prevent future re-emergence.

HAT diagnosis and the variability of responses to infection

Despite the classical dichotomy between the chronic form of HAT caused by *T. b. gambiense* and the acute form attributable to *T. b. rhodesiense*, a diversity of clinical progression has been observed for *T. b. gambiense*, from asymptomatic forms [5] to acute forms [6,7]. In East Africa, there is a longstanding belief that the disease is chronic in southern countries and increases in severity towards the north. Some chronic forms caused by *T. b. rhodesiense* have also been mentioned [8]. This diversity of clinical progression, together with the diversity of symptoms encountered in HAT, renders accurate clinical diagnosis of HAT impossible.

Nevertheless, control of HAT has been based principally on case detection and treatment, which are highly dependent on the strain and the stage of the disease. This strategy assumes that the population at risk can be easily divided into healthy subjects and HAT cases, although the

Corresponding author: Garcia, A. (andre.garcia@ird.fr)
Available online 11 July 2006.

Box 1. HAT diagnosis – a complex reality

T. b. gambiense HAT diagnosis is generally based on direct (parasitological) or indirect (serological) evidence of blood, lymph or cerebrospinal fluid (CSF) invasion by trypanosomes [11]. Because the drugs used for treatment might have potential side effects [40], demonstration of the parasite in the patient's tissue fluids is required before initiating chemotherapy [2]. Mass screening of the population at risk is currently performed using serological tests to select individuals showing antibodies against trypanosome antigens, on whom parasitological examinations are then carried out. The serological test most commonly used in the field is the Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT/*T. b. gambiense*, [41]). The parasitological tests are based on the detection of trypanosomes in lymph node aspirates, blood and CSF. Currently, the most sensitive parasitological technique is the miniature anion-exchange/centrifugation technique (mAECT, [42]) for the detection of trypanosomes in blood, but the microscopic examination (ME) of lymph fluid punctured from enlarged cervical lymph nodes can also diagnose many cases. In the *T. b. gambiense* disease, control program teams must deal with complex situations (Figure 1). Three categories of individuals are systematically encountered: (1) apparently healthy individuals with negative serological tests; (2) proven cases of sleeping sickness with positive parasitological tests; and (3) subjects with positive serology but negative parasitology, denoted as seropositives, for whom the question of whether to provide treatment remains. There is still no serological test available for the screening of *T. b. rhodesiense* HAT and field screening continues to rely on clinical symptoms. Diagnostic confirmation is based on the same methods as for *T. b. gambiense* disease.

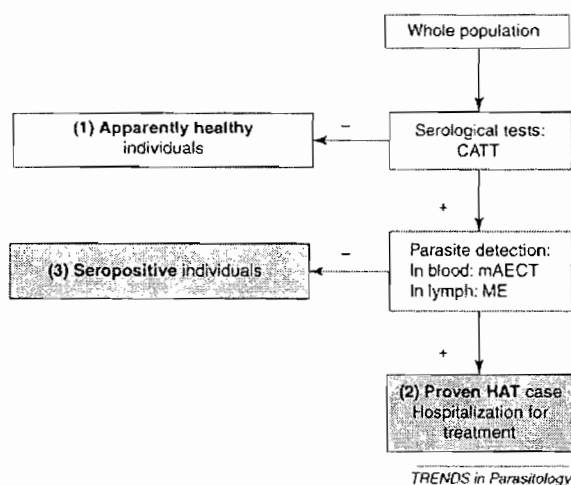


Figure 1. Example of a simplified field algorithm for the diagnosis of *T. b. gambiense* sleeping sickness according to the HAT control program in Côte d'Ivoire. See text for details.

reality is much more complex (see Box 1) [3]. Diagnosis is therefore of paramount importance. As no effective serological tools are available, *T. b. rhodesiense* HAT field screening of the population still relies on clinical symptoms (that must be followed by parasitological diagnosis), although chronic asymptomatic forms are also described. For *T. b. gambiense* HAT, serological tests are performed to select individuals with a positive response to trypanosome antigens and parasitological examinations are then carried out on these individuals (Box 1). This diagnostic procedure leads not only to sorting the population into HAT cases and healthy individuals, but also to detecting subjects with positive serology and negative parasitology, denoted

as seropositives. These seropositive subjects raise two important questions:

The first question concerns whether such individuals should be treated. Nowadays, the strategies for treatment differ depending on the countries or National Program teams. Most of the time, these individuals are not treated even though they might be infected and contain a potential reservoir of parasites.

The second question is what causes this seropositivity? Assuming that former HAT cases, already cured and still carrying antibodies, have been discarded, this feature can be explained by false seropositivity due to cross-reactivity with, for example, animal trypanosomes from *T. brucei brucei* or other parasites [9]. For such individuals, the serology will turn negative with time [7,10]. In other cases, this feature can also be explained by false negativity of parasitological tests due to weak or fluctuating parasitemia [11]. Indeed, parasite numbers in *T. b. gambiense* infection can vary between >10 000 trypanosomes/ml, which is easily detectable, and <100 trypanosomes/ml, which is below the detection limit of the most sensitive methods in use. Failure to demonstrate parasites, therefore, does not necessarily exclude infection [11]. In some of these individuals, parasitemia might remain subpatent for several months, but repeated searches for parasites might prove positive [7,12]. Finally, for some subjects, the search for parasites remains negative whereas serology remains positive, despite repeated examination over a very long period [7].

This phenomenon of seropositivity without parasitological confirmation could be attributable to particular strains (or association of strains) of trypanosomes of low virulence that could be associated, through an unknown mechanism, with a very low level of parasitemia and no symptoms. However, another explanation could be a phenomenon of infection control by individuals with a particularly robust and adapted acquired immunity against trypanosomes. In this latter case, subjects could be infected with 'classical' strains but the control of parasitemia by host immunity could lead to such low parasitemia that classical parasitological tests could remain negative. The complexity of immunity and its regulation during trypanosomiasis is discussed in a recent review in the context of host and parasite survival [13]. This hypothesis presents similarities with the phenomenon of trypanotolerance described in animal trypanosomiasis [14], where some taurine cattle breeds control parasitemia and limit anaemia. The exact nature of this phenomenon in cattle is unknown but certainly involves the immune system and its genetic control [15,16]. Furthermore, the control of infection in HAT could also be associated with a strong immune response leading to parasitological clearance, suggesting a phenomenon of human trypanoresistance [7].

It is of paramount importance to note that individuals harboring trypanosomes are systematically treated even in the absence of clinical symptoms. Although this is ethically difficult to debate, the consequence is that trypanotolerance and/or trypanoresistance phenomena in humans can only be studied by means of indirect observations, such as seropositivity, allowing working hypotheses to be theorized.

Taking these observations and hypotheses into account, the question arises: what are the respective roles of parasite and host, and their interactions, in the variability of responses to infection illustrated by the observed clinical diversity and the phenomenon of positive serology but negative parasitology?

Genetic variability of *T. brucei* s.l. and diversity of response to infection

In an 8-year follow-up study (from 1995, the year of parasitological diagnosis, to 2002) of six asymptomatic HAT patients who refused treatment but agreed to be examined, it was observed that although they all remained positive in serological tests, none of them showed any parasites from 1998 to 2002. However, in 2002, trypanosome DNA was consistently detected in their blood by PCR and, moreover, mixed infections with two different trypanosome stocks were observed [17]. These results are consistent with the existence of mixed infection that could be associated, by mechanisms remaining to be elucidated, with very low and even undetectable parasitemia. This pattern of observation has already been described during *Trypanosoma cruzi* infections [18].

During the past few decades, several studies using molecular typing of genetically distinct populations sought to investigate the relationships between the genetic variability of trypanosomes and the clinical diversity observed. Concerning *T. b. rhodesiense* in South-Eastern Uganda, it was suspected that clinical patterns of the disease in humans could be related to the genetic characterization of the parasite based on isoenzymes [19]. This suspicion was confirmed during experimental infections in mice. Furthermore, trypanosomes isolated from patients in Uganda (acute profile) or Malawi (chronic profile) were distinguished by a serum resistance-associated (SRA) gene polymorphism [8]. In West Africa, differences were noted between clinical presentations caused by group 1 and group 2 *T. b. gambiense* (Box 2). Patients infected with group 1 tended to show mild symptoms, whereas patients with group 2 infections seemed to present more severe symptoms [6].

However, such studies are hampered by two major limitations, described in Box 2. The molecular tools available are not informative enough and the accurate identification of trypanosomes remains a challenging problem [20]. Moreover, genetic studies of trypanosomes require isolation of large numbers of parasites and numerous culture steps, which were shown to be responsible for a selective bias among circulating strains [21]. This bias might have important implications in terms of population genetics (the iceberg effect, [22]) because mixed infections described in tsetse flies [23] and in animals [21,24] are increasingly suspected in humans [17,25]. The real population structure of trypanosomes and its potential effect on the epidemiology of HAT thus remains partly unknown.

Finally, direct and indirect arguments support associations between the genetic variability of the parasite and the diversity of responses to infection. Such associations exist for other parasitic infections, including Chagas disease, which is also caused by trypanosomes (*T. cruzi*) [26]. However, the exact nature of the role of the parasite in

Box 2. Accurate identification of trypanosomes remains a challenging problem

Studies investigating relationships between the genetic diversity in *T. brucei* sensu lato (*T. brucei* s.l.) and the diversity of responses to HAT are hampered in two ways:

First, several studies have shown that distinguishing between the different subspecies, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* and *T. b. brucei*, remains difficult [43]. In West and Central Africa, only one group could be clearly identified by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) as a genetic entity: *T. b. gambiense* group 1, grouping 80% of the human stocks. The remaining 20% were named *gambiense* group 2 or the bouaffle group; some animal stocks of *T. brucei* s.l. were shown to be closely related to this group. In East Africa, using the same technique, five strain groups containing human and animal stocks were identified [43]. Recently, in this area, tools such as PCR of mobile genetic elements (MGE-PCR, [44]), minisatellite markers [45] and absence/presence of the serum resistance-associated gene (SRA gene, [46]) were promising in distinguishing human infective (i.e. *T. b. rhodesiense*) and nonhuman infective (i.e. *T. b. brucei*) trypanosomes, and for tracking individual *T. brucei* genotypes.

Second, genetic studies are based on the need for large amounts of trypanosomes for isolation and culture. Until the 1990s, trypanosome stocks were isolated using rodents, but because *T. b. gambiense* differs from *T. b. brucei* and *T. b. rhodesiense* in its reputed low virulence, the techniques all suffered from low success rates (around 20%) and from the long adaptation periods needed to propagate the parasite in sufficient numbers for genetic characterization tools [47]. Since the beginning of the 1990s, *T. b. gambiense* stocks have mainly been isolated using the more convenient Kit for *In Vitro* Isolation (KIVI, [11]). This method, providing 50–80% isolating rates, has proved successful in Gambian HAT areas [48,49]. However, it has been suggested that the exhaustive use of KIVI might be responsible for the very low genetic diversity recently observed in various Côte d'Ivoire and Guinea foci [48]. A selective bias of this isolation technique, as well as of rodent inoculation, was then demonstrated [21]. The sampling problem might be partly resolved by using direct identification from the biological fluids without isolation and culture. Microsatellite markers [17] and MGE-PCR [44] appear to be promising tools for this purpose.

this variability is complicated by the role of the host polymorphism and obviously by the interactions between both genomes.

Host susceptibility: towards a genetic epidemiology of HAT

To study the role of the host in the phenomenon of seropositivity, we performed a 32-month follow-up of 77 seropositive individuals [7]. These subjects, selected from a control program conducted from 1995 to 1997, were seropositive at the beginning of the follow-up. This study showed that for some individuals, the seropositivity decreased and became negative. However, 17 subjects showed very strong positive results during the whole follow-up for specific serological tests from *T. b. gambiense*, such as trypanolysis [27] and ELISA [28]. Moreover, their serum IgM concentration, which is not specific but highly increased in HAT, remained highly positive. No trypanosome was found in blood samples or in cerebrospinal fluid during the follow-up and a search for parasites over five consecutive days remained negative. It seems likely that these individuals were infected by *T. b. gambiense*. Even though a chronic infection course is quite common, the complete absence of disease after 32 months of follow-up might require additional explanation.

Indeed, this pattern of results supports indirect arguments for the existence of infection control by means of a specific and efficient acquired immunity to HAT, which could be responsible for human trypanoresistance [7]. In this case, polymorphisms of genes involved in the control of immunity could have an important role in the variability of response to infection (susceptibility/resistance) and must be studied. Such susceptibility/resistance has already been described for other infectious diseases for which the influence of the host genetic background has been confirmed [29–31].

With HAT, this area of investigation has received little attention. However, inflammatory immune response, described from animal models and postmortem data, seems to play a key role in disease progression. Although this area has received only scant attention until recent years, the existence of a balance between inflammatory mediators and counter-inflammatory response, involving notably TNF- α , IFN- γ and IL-10, seems to be a determining factor (review in [5]). Immunogenetic variation in host populations could be an important factor that might influence disease progression. Indirect arguments exist from epidemiological observations [32–34], experimental studies [35] and from investigations of the human immune system [5,36]. We recently conducted a specific study of host genetic involvement in the control of *T. b. gambiense* infection. In this association study, we showed that an *IL-10*_{592-A} mutation confers a lower risk of disease, even after a long period of exposure to infective tsetse bites (>10 years), suggesting a protective effect. A weakly borderline significant association was also detected between a mutation located in the *TNF- α* ₃₀₈ promoter and a higher risk of developing the disease soon after exposure to infective tsetse bites (<10 years) [36]. Interestingly, the *IL10* and *TNF* genes are located, respectively, on chromosomes 1 and 17 of the mouse. These chromosomes have been described as being involved in variable levels of susceptibility to *Trypanosoma* infections in mice by means of a genome-wide scan study [37]. Our results confirm the interest of *TNF* and *IL10* genes as candidate genes involved in the genetic control of susceptibility and resistance in HAT. Another analysis, conducted by the same team, in a different population from the Democratic Republic of Congo where the prevalence of the disease is higher, has shown the involvement of polymorphisms located in the *IL-6* and *IL-1 α* genes. This result underlines the great genetic heterogeneity involved in disease control [38], and the fact that it is very important to develop more dynamic and complementary approaches involving functional genomics to lead to a greater understanding of host–parasite interactions.

Concluding remarks

Recent evidence suggests that host–parasite interactions, including genetic interactions, are important for understanding the epidemiology of a disease and should be considered in any disease eradication strategy. As an example, host and parasite genotype interactions have been shown to influence the resistance of mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in malaria [39]. Understanding the host and parasite mechanisms that influence the

pathogenesis and manifestation of HAT could help investigations aimed at the development of new drugs, diagnostic tools and vaccine strategies, as well as the investigation of the mechanisms involved in the re-emergence phenomenon. We emphasize that host and parasite polymorphisms have a role in the diversity of response to infection, and that the exploration of this diversity will probably contribute to the greater understanding needed. We hope to encourage studies that explore this area of research to assist in the development of new tools for effective elimination of this longstanding, neglected disease.

Acknowledgements

We particularly acknowledge the direction of Institut Pierre Richet (IPR) and the technical staff of the HAT team of IPR, Bouaké, Côte d'Ivoire, and the National Control Programs of West Africa for their help in the studies cited in this paper. We thank Dr G. Cuny (Head of UMR 177 IRD-CIRAD, Montpellier, France) and L. Northrup for critical reading of the manuscript. We thank Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Service de Coopération et d'Action Culturelle d'Abidjan (SCAC), World Health Organization (WHO), Centre National du Génotypage (CNG, Evry, France) and FAO/IAEA CRP n°11413 RBF for their support.

References

- Louis, F.J. *et al.* (2002) Maladie du sommeil: cent ans d'évolution des stratégies de lutte. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 95, 331–336
- WHO (1998) *Control and surveillance of African trypanosomiasis*. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series No. 881
- Cattand, P. *et al.* (2001) Sleeping sickness surveillance: an essential step towards elimination. *Trop. Med. Int. Health* 6, 348–361
- Jannin, J.G. (2005) Sleeping sickness—a growing problem? *Br. Med. J.* 331, 1242
- Sternberg, J.M. (2004) Human African trypanosomiasis: clinical presentation and immune response. *Parasite Immunol.* 26, 469–476
- Truc, P. *et al.* (1997) Confirmation of two distinct classes of zymodemes of *Trypanosoma brucei* infecting patients and wild mammals in Côte d'Ivoire: suspected difference in pathogenicity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91, 951–956
- Garcia, A. *et al.* (2000) Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Cote d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population. *Trop. Med. Int. Health* 5, 786–793
- MacLean, L. *et al.* (2004) Severity of Human African Trypanosomiasis in East Africa is associated with geographic location, parasite genotype and host inflammatory cytokine response profile. *Infect. Immun.* 72, 7040–7044
- Diallo, P.B. *et al.* (1996) Diagnostic sérologique de la Trypanosomiase Humaine Africaine à *Trypanosoma brucei gambiense*: 1 - obtention et utilisation d'antigènes bruts dans les tests ELISA et d'agglutination au latex. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 89, 262–268
- Simarro, P.P. *et al.* (1999) Attitude towards CATT-positive individuals without parasitological confirmation in the African Trypanosomiasis (*T. b. gambiense*) focus of Quicama (Angola). *Trop. Med. Int. Health* 4, 858–861
- Chappuis, F. *et al.* (2005) Options for field diagnosis of human African trypanosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 133–146
- Noireau, F. *et al.* (1988) Epidémiologie et aspects évolutifs de la trypanosomiase dans le foyer de la Sangha (Congo). *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 68, 331–341
- Mansfield, J.M. and Paulnock, D.M. (2005) Regulation of innate and acquired immunity in African trypanosomiasis. *Parasite Immunol.* 27, 361–371
- Naessens, J. (2006) Bovine trypanotolerance: a natural ability to prevent severe anaemia and haemophagocytic syndrome? *Int. J. Parasitol.* 36, 521–528
- Naessens, J. *et al.* (2002) Identification of mechanisms of natural resistance to African trypanosomiasis in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 187–194

- 16 Hill, E.W. *et al.* (2005) Understanding bovine trypanosomiasis and trypanotolerance: the promise of functional genomics. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105, 247–258
- 17 Jamonneau, V. *et al.* (2004) Characterization of *Trypanosoma brucei* s.l. infecting asymptomatic sleeping-sickness patients in Cote d'Ivoire: a new genetic group? *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 98, 329–337
- 18 Franco, D.J. *et al.* (2003) *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp. Parasitol.* 104, 54–61
- 19 Smith, D.H. and Bailey, J.W. (1997) Human African trypanosomiasis in south-eastern Uganda: clinical diversity and isoenzyme profiles. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91, 851–856
- 20 Gibson, W. (2001) Molecular characterization of field isolates of human pathogenic trypanosomes. *Trop. Med. Int. Health* 6, 401–406
- 21 Jamonneau, V. *et al.* (2003) Identification of *Trypanosoma brucei* circulating in a sleeping sickness focus in Cote d'Ivoire: assessment of genotype selection by the isolation method. *Infect. Genet. Evol.* 3, 143–149
- 22 Tibayrenc, M. (1999) Toward an integrated genetic epidemiology of parasitic protozoa and other pathogens. *Annu. Rev. Genet.* 33, 449–477
- 23 MacLeod, A. *et al.* (1999) A high level of mixed *Trypanosoma brucei* infections in tsetse flies detected by three hypervariable minisatellites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102, 237–248
- 24 MacLeod, A. *et al.* (2000) Minisatellite marker analysis of *Trypanosoma brucei*: reconciliation of clonal, panmictic, and epidemic population genetic structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13442–13447
- 25 Truc, P. *et al.* (2002) Genetic variability within *Trypanosoma brucei gambiense*: evidence for the circulation of different genotypes in human African trypanosomiasis patients in Cote d'Ivoire. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 52–55
- 26 Anez, N. *et al.* (2004) Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop. Med. Int. Health* 9, 1319–1326
- 27 Van Meirvenne, N. *et al.* (1995) Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop.* 60, 189–199
- 28 Lejon, V. *et al.* (1998) A semi-quantitative ELISA for detection of *Trypanosoma brucei gambiense* specific antibodies in serum and cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients. *Acta Trop.* 69, 151–164
- 29 Garcia, A. *et al.* (1998) Genetic control of blood infection levels in human malaria: evidence for a complex genetic model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 480–488
- 30 Alcais, A. *et al.* (1997) Evidence for a major gene controlling susceptibility to tegumentary leishmaniasis in a recently exposed Bolivian population. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 968–979
- 31 Mira, M.T. *et al.* (2004) Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 427, 636–640
- 32 Garcia, A. *et al.* (2002) Host age and time of exposure in *Trypanosoma brucei gambiense* Human African Trypanosomiasis. *Trop. Med. Int. Health* 7, 429–434
- 33 Khonde, N. *et al.* (1995) Epidemiological evidence for immunity following *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89, 607–611
- 34 Hide, G. *et al.* (1998) *Trypanosoma brucei*: comparison of circulating strains in an endemic and an epidemic area of a sleeping sickness focus. *Exp. Parasitol.* 89, 21–29
- 35 Kemp, S.J. *et al.* (1996) Genetic control of resistance to trypanosomiasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54, 239–243
- 36 Courtin, D. *et al.* (2006) Interest of tumor necrosis factor- α -308 G/A and interleukin-10-592 C/A polymorphisms in human African trypanosomiasis. *Infect. Genet. Evol.* 6, 123–129
- 37 Iraqi, F. *et al.* (2000) Fine mapping of trypanosomiasis resistance loci in murine advanced intercross lines. *Mamm. Genome* 11, 645–648
- 38 Courtin, D. *et al.* Association between human African trypanosomiasis and the *IL6* gene in a Congolese population. *Infect. Genet. Evol.* (in press)
- 39 Lambrechts, L. *et al.* (2006) Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends Parasitol.* 22, 12–16
- 40 Legros, D. *et al.* (2002) Treatment of human African trypanosomiasis – present situation and needs for research and development. *Lancet Infect. Dis.* 2, 437–440
- 41 Magnus, E. *et al.* (1978) A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of T. b. gambiense trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 58, 169–176
- 42 Lumsden, W.H. *et al.* (1979) *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: adaptation for field use. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 312–317
- 43 Gibson, W.C. *et al.* (1999) Identification of trypanosomes: from morphology to molecular biology. In *Progress in Human African Trypanosomiasis* (ed), pp. 7–29, Springer
- 44 Tilley, A. *et al.* (2003) *Trypanosoma brucei*: trypanosome strain typing using PCR analysis of mobile genetic elements (MGE-PCR). *Exp. Parasitol.* 104, 26–32
- 45 MacLeod, A. (2004) Minisatellites and MVR-PCR for the individual identification of parasite isolates. *Methods Mol. Biol.* 270, 187–202
- 46 Gibson, W. *et al.* (2002) The human serum resistance associated gene is ubiquitous and conserved in *Trypanosoma brucei rhodesiense* throughout East Africa. *Infect. Genet. Evol.* 1, 207–214
- 47 Dukes, P. *et al.* (1989) A new method for isolating *Trypanosoma brucei gambiense* from sleeping sickness patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83, 636–639
- 48 Jamonneau, V. *et al.* (2002) Genetic characterization of *Trypanosoma brucei gambiense* and clinical evolution of human African trypanosomiasis in Cote d'Ivoire. *Trop. Med. Int. Health* 7, 610–621
- 49 Njiokou, F. *et al.* Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. *Infect. Genet. Evol.* (in press)

Free journals for developing countries

In 2002, the WHO and six medical journal publishers launched the Health InterNetwork Access to Research Initiative, which enabled nearly 70 of the world's poorest countries to gain free or reduced-cost access to biomedical literature through the internet. Currently more than 70 publishers are participating in the program, providing access to over 2000 journals.

Gro Harlem Brundtland, former director-general for the WHO, said that this initiative was "perhaps the biggest step ever taken towards reducing the health information gap between rich and poor countries".

For more information, visit www.who.int/hinari



Short communication

Cyclical transmission of *Trypanosoma brucei gambiense* in *Glossina palpalis gambiense* displays great differences among field isolates

S. Ravel*, D. Patrel, M. Koffi, V. Jamonneau, G. Cuny

IRD, UR177, Laboratoire de Recherche et de Coordination sur les Trypanosomoses, IRD-CIRAD, TA 207/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Received 2 June 2006; received in revised form 19 September 2006; accepted 21 September 2006

Available online 27 October 2006

Abstract

Six sets of teneral *Glossina palpalis gambiense* (Diptera: Glossinidae) were fed on mice infected with six different isolates of *Trypanosoma brucei gambiense* (each mouse was infected with one of the isolates), previously isolated from patients in the sleeping sickness focus of Bonon, Côte d'Ivoire and in Makoua, Congo. All the tsetse flies were dissected 42 days post-infection and midgut and salivary glands were examined for trypanosomes by microscopical examination. No infection was observed with the reference stock whereas each of the five recently isolated trypanosome isolates was able to infect tsetse flies, with rates of infection varying between 9.7 and 18.2% depending on the isolate. Three isolates displayed only immature infections with 9.7, 17.3 and 18% of the flies showing trypanosomes in their midgut. One isolate gave both immature (12.1%) and mature infections (6.1%). Finally, the last isolate involved only mature infections in 9.7% of the *Glossina* species examined.

These substantial differences in the cyclical transmission of *T. b. gambiense* in the same fly species could have important implications for the epidemiology of the transmission of Human African Trypanosomiasis.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Trypanosoma brucei gambiense*; *Glossina palpalis gambiense*; Field isolates; Mature infections; Vectorial competence; HAT

1. Introduction

Human African trypanosomiasis (HAT), or sleeping sickness, is caused by trypanosomes belonging to *Trypanosoma brucei* species, transmitted to humans by tsetse flies. *Trypanosoma brucei gambiense* is responsible for the chronic form of HAT in West and Central Africa where the main vectors are *Glossina* species of the *palpalis* group (Hoare, 1972). The epidemiology of

HAT is determined to a large extent by the number of infected tsetse flies in a specific area. Surprisingly, very few flies infected with *T. b. gambiense* (1–5 per 1000) have been detected in areas where many human cases were nonetheless observed (Frézil and Cuisance, 1994; Jamonneau et al., 2004). This could be attributed to the chronic nature of the disease in humans and a particularly efficient vector competence of the tsetse flies.

The ability to transmit *T. b. gambiense* requires the completion of a complex life cycle by the parasite in the tsetse fly. The developmental cycle consists of two important steps, i.e., the establishment of the infection in the midgut followed by the maturation of the parasites into metacyclic forms in the salivary glands. However,

* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 59 39 20;

fax: +33 4 67 59 39 20.

E-mail address: ravel@mpl.ird.fr (S. Ravel).

progression from establishment to maturation is not automatic and maturation of *T. b. gambiense* in any species of tsetse is rare (Maudlin and Welburn, 1994). Only flies with a metacyclic infection in their salivary glands play a role in the transmission of the disease.

Very few studies have been undertaken on the cyclical transmission of *T. b. gambiense* in *Glossina palpalis* s.l. Because of the problems isolating *T. b. gambiense* blood-stream forms (the natural infective forms for glossina) (Dukes et al., 1991), only a few studies have been conducted with these forms. These investigations (Maudlin and Dukes, 1986; Moloo et al., 1986) used reference stocks resulting from long-term passage between laboratory animals, thus suspected of being less infective to glossina (Ashcroft, 1960).

Some studies have also been conducted using procyclic forms of *T. b. gambiense* (Richner et al., 1988; Ravel et al., 2003), although that this did not reflect the reality of the situation.

The aim of the present experiment was to compare the cyclical transmission of different *T. b. gambiense* isolates, one reference stock and five field isolates recently isolated from patients in the sleeping sickness focus of Bonon (Côte d'Ivoire), by *Glossina palpalis gambiense*.

2. Materials and methods

2.1. Tsetse flies

Male flies from the *G. p. gambiense* in vivo colony maintained at CIRAD-EMVT in Montpellier, France were used throughout the study. This colony originated from Burkina Faso. Only male flies were used because males infected with trypanosomes of the *Trypanozoon* subgenus develop a greater proportion of salivary gland infections than females of the same species (Maudlin et al., 1991; Dale et al., 1995; Milligan et al., 1995).

2.2. Trypanosomes

The OKITMAP 1841 *T. b. gambiense* reference stock was isolated from human in 1974 in Makoua, Congo (Tait et al., 1984; Paindavoine et al., 1986). It has been passaged frequently in laboratory animals.

The five field isolates of *T. b. gambiense* used in this study (741, S1/1/6, S7/2/2, S12/9/5 and S14/5/1) were isolated in 2002 by rodent inoculation from five HAT patients detected in the sleeping sickness focus of Bonon, Côte d'Ivoire. They all belong to the homogenous *T. b. gambiense* group 1. Cryostabilates were produced in the field and sent to our laboratory. Fewer than 10 passages were conducted in mice before this study.

2.3. Infection of tsetse flies

Each *T. b. gambiense* stabilate was thawed at room temperature and 0.2 ml was injected intraperitoneally into balb/cj mice (two mice for each trypanosome isolate) immune-suppressed with cyclophosphamide (Endoxan, 300 mg/kg). The infection was monitored by examining tail blood using a phase-contrast microscope at a 400× magnification. For each *T. b. gambiense* isolate, teneral flies were fed on the bellies of infected mice (on average 30 flies on each mouse) displaying levels of parasitaemia between 6 and 25×10^7 parasites/ml (determined using the matching method, Herbert and Lumsden, 1976). Then all the flies were maintained by feeding on uninfected rabbit, 3 days a week, until the end of the experiment. To avoid the chance of re-infection of the flies, before each meal, the rabbit was monitored for parasites by examination of the buffy-coat (Murray et al., 1977) prepared from a blood sample taken from the ear, by phase contrast microscopy at 400× magnification.

2.4. Dissection of tsetse flies

On the 42nd day after the infective feed, the flies which were still alive were dissected according to the method described by Penchenier and Itard (1981). The time lag between infection and dissection is sufficient for the completion of the *T. b. gambiense* developmental cycle in tsetse (Van Den Abbeele et al., 1999). Before dissection, flies were starved for 72 h to reduce partially digested blood, and thus facilitate observation of the trypanosomes in the midguts. Midgut and salivary glands were examined for trypanosomes by phase contrast microscopy at 400× magnification.

3. Results

Infections were scored as immature if trypanosomes were found in the midgut only. They were classified as mature if trypanosomes were found both in the midgut and salivary glands.

No trypanosomes could be detected in *G. p. gambiense* having received an infective feed with OK ITMAP 1841. On the contrary, each of the five trypanosome field isolates was able to infect tsetse flies with total infection rates varying between 9.7 and 18.2% (Table 1). Tsetse fed on mice infected with 741, S7/2/2 or S14/5/1 isolate displayed immature infections only, with an infection rate of 17.3, 9.7 and 18.0%, respectively. The S1/1/6 isolate gave both immature (12.1%) and mature infections (6.1%) whereas the S12/9/5 isolate only involved mature infections (9.7%). Moreover, four out of the six salivary

Table 1
Mature and immature infection rate of *G. p. gambiensis* infected with different *T. b. gambiense* isolates

<i>T. b. gambiense</i> stock	No. tsetse dissected	Immature infection rate %	Mature infection rate %	Total infection rate %
OK ITMAP 1841	60	0	0	0
741	52	17.3	0	17.3
S1/1/6	66	12.1	6.1	18.2
S7/2/2	41	9.7	0	9.7
S12/9/5	62	0	9.7	9.7
S14/5/1	61	18.0	0	18.0

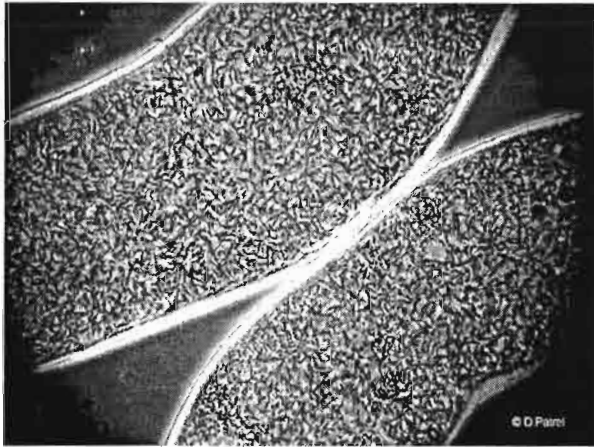


Fig. 1. Salivary glands from glossina infected with the S12/9/5 *Trypanosoma brucei gambiense* isolate.

glands positive with S12/9/5 contained an exceptionally high number of mature metacyclic trypanosomes (Fig. 1). On the contrary, only a few S1/1/6 trypanosomes were observed in the positive salivary glands.

4. Discussion

While *G. p. gambiensis* were successfully infected with the five field isolates of *T. b. gambiense*, they could not be infected with the reference stock. Because this reference stock was isolated 30 years ago, the stable we used resulted from long-term passage between laboratory animals, known to select trypanosome lines that no longer generate stumpy forms in rodent infections (Matthews et al., 2004). Because stumpy forms are preadapted for differentiation to procyclic forms when taken up in a tsetse bloodmeal (Seed and Wenck, 2003), a lack of these forms could explain the complete failure of OK IT MAP1841 to infect tsetse flies. On the contrary, the field isolates, with few passages in rodent, displayed infectivity for glossina.

The field isolates gave total infection rates varying from 9.7 to 18.2%. These are low infection rates compared to those displayed with animal trypanosomes (Reifenberg et al., 1997; Van Den Abbeele et al., 1999; Ravel et al., 2004; Kubi et al., 2005) but are within the range of those obtained from the very few attempts to infect tsetse flies with *T. b. gambiense* (Wijers, 1958; Richner et al., 1988; Ravel et al., 2003).

Interestingly, two field isolates led to mature infections following a single infective meal. Salivary glands infected with *T. b. gambiense* remain very rare in the field (Jamonneau et al., 2004) as well as in the laboratory (Maudlin and Dukes, 1986; Moloo et al., 1986; Richner et al., 1988; Ravel et al., 2003). Moreover, an exceptionally large number of trypanosomes was observed in the majority of the salivary glands infected with the *T. b. gambiense* isolate that produced only mature infections. This is quite surprising because *T. brucei* is generally present at low density in positive salivary glands (Van Den Abbeele et al., 1999; Ravel et al., 2003), as is the case in this study with the S1/1/6 isolate. Tsetse flies with highly loaded salivary glands are potentially very dangerous in the field because of their greater chance of injecting *T. b. gambiense* in humans during the bloodmeal.

Moreover, a surprising outcome is the difference in the cyclical transmission of the five *T. b. gambiense* field isolates. While two isolates achieved the completion of their developmental cycle, the three others failed, only succeeding in establishing in the midgut. These results have important implications for the epidemiology of HAT transmission and emphasise that complex mechanisms govern *T. b. gambiense* development in the tsetse fly. The trypanosome stock can play a role (Maudlin and Welburn, 1994) as well as numerous extrinsic factors.

The potential effect of the mouse should be examined. The number of trypanosomes ingested by tsetse flies should not play a role. Indeed, considering both the

blood volume absorbed by a fly (5–80 μ l) and the values of parasitaemia at the infective feed (between 6 and 25×10^7 parasites/ml), the number of parasites ingested is between 3 and 200×10^5 parasites, which is entirely sufficient since a single trypanosome is sufficient to infect a tsetse fly (Maudlin and Welburn, 1989). On the other hand, a previous study from Wijers and Willett (1960) showed that tsetse infection rate was influenced by the absolute numbers of short-stumpy forms in the infected bloodmeal. Further experiments should be conducted to compare the proportion of stumpy forms present in mice inoculated with the field isolates and to evaluate the impact on the development of infection.

The duration of fly starvation before the infective meal could also play a part. It has recently been reported by Van den Bossche et al. (oral communication at the 28th ISCTRC in Addis Ababa, Ethiopia, 2005) that starvation increases the susceptibility of teneral and adult tsetse flies for *Trypanosoma congolense* and *T. brucei*. Wijers (1958) indicated that to obtain the highest total and mature infection rates with *T. b. gambiense*, the flies should be induced to feed on the first day of life. In our investigation, sets of teneral flies starved for several days were used for two *T. b. gambiense* field isolates but no clear effect of starvation has been observed (data not shown). Further studies should be conducted to clarify the true role of this phenomenon.

Acknowledgement

We are particularly grateful to B. Tchicaya and J. Janelle for the maintenance and management of the tsetse colony.

References

- Ashcroft, M.T., 1960. A comparison between a syringe passaged and a tsetse fly transmitted line of a strain of *Trypanosoma rhodesiense*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 54, 44–70.
- Dale, C., Welburn, S.C., Maudlin, I., Milligan, P.J.M., 1995. The kinetics of maturation of trypanosome infections in tsetse. *Parasitology* 111, 187–191.
- Dukes, P., McNamara, J.J., Godfrey, D.G., 1991. Elusive trypanosomes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 85, 21–32.
- Frézil, J.L., Cuisance, D., 1994. Trypanosomiasis, diseases with future: prospects and uncertainty. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 87, 391–393.
- Herbert, W.J., Lumsden, W.H., 1976. *Trypanosoma brucei*: a rapid “matching” method for estimating the host’s parasitemia. *Exp. Parasitol.* 40 (3), 427–431.
- Hoare, C.A., 1972. *The Trypanosomes of Mammals*, A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Jamonneau, V., Ravel, S., Koffi, M., Kaba, D., Zeze, D.G., Ndri, L., Sane, B., Coulibaly, B., Cuny, G., Solano, P., 2004. Mixed infections of trypanosomes in tsetse and pigs and their epidemiological significance in a sleeping sickness focus of Côte d’Ivoire. *Parasitology* 129 (pt 6), 693–702.
- Kubi, C., Van den Abbeele, J., Dorny, P., Coosemans, M., Marcotty, T., Van den Bossche, P., 2005. Ability of trypanosome-infected tsetse flies (Diptera: Glossinidae) to acquire an infection with a second trypanosome species. *J. Med. Entomol.* 42 (6), 1035–1038.
- Matthews, K.R., Ellis, J.R., Paterou, A., 2004. Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. *Trends Parasitol.* 20, 40–47.
- Maudlin, I., Dukes, P., 1986. Extrachromosomal inheritance of susceptibility to trypanosome infection in tsetse flies. II. Susceptibility of selected lines of *Glossina morsitans morsitans* to different stocks and species of trypanosome. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 80, 97–105.
- Maudlin, I., Welburn, S.C., 1989. A single trypanosome is sufficient to infect a tsetse fly. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 83, 431–433.
- Maudlin, I., Welburn, S.C., Milligan, P., 1991. Salivary gland infection a sex-linked recessive character in tsetse? *Acta Trop.* 48, 9–15.
- Maudlin, I., Welburn, S.C., 1994. Maturation of trypanosome infections in tsetse. *Exp. Parasitol.* 79, 202–205.
- Milligan, P.J.M., Maudlin, I., Welburn, S.C., 1995. *Trypanozoon*: infectivity to humans is linked to reduced transmissibility in tsetse. II. Genetic mechanisms. *Exp. Parasitol.* 81, 409–415.
- Moloo, S.K., Asonganyi, T., Jenni, L., 1986. Cyclical development of *Trypanosoma brucei gambiense* from cattle and goats in Glossina. *Acta Trop.* 43, 407–408.
- Murray, M., Murray, P.K., McIntyre, W.I.M., 1977. An improved parasitological technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 325–326.
- Paindavoine, P., Pays, E., Laurent, M., Geltmeyer, Y., Le Ray, D., Mehlitz, D., Steinert, M., 1986. The use of DNA hybridization and numerical taxonomy in determining relationships between *Trypanosoma brucei* stocks and subspecies. *Parasitology* 92, 31–50.
- Penchenier, L., Itard, J., 1981. Une nouvelle technique de dissection rapide des glandes salivaires et de l’intestin de glossines. *Cah. O.R.S.T.O.M., Serie Ent. méd. et Parasitol.* XIX (1), 55–57.
- Ravel, S., Grebaut, P., Cuisance, D., Cuny, G., 2003. Monitoring the developmental status of *Trypanosoma brucei gambiense* in the tsetse fly by means of PCR analysis of anal and saliva drops. *Acta Trop.* 88/2, 161–165.
- Ravel, S., Grebaut, P., Mariani, C., Jamonneau, V., Cuisance, D., Gooding, R.H., Cuny, G., 2004. Monitoring the susceptibility of *Glossina palpalis gambiensis* and *G. morsitans morsitans* to experimental infection with savannah-type *Trypanosoma congolense*, using the polymerase chain reaction. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 98/1, 29–36.
- Reifenberg, J.M., Cuisance, D., Frezil, J.L., Cuny, G., Duvallet, G., 1997. Comparison of the susceptibility of different *Glossina* species to simple and mixed infections with *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* savannah and riverine forest types. *Med. Vet. Entomol.* 11, 246–252.
- Richner, D., Brun, R., Jenni, L., 1988. Production of metacyclic forms by cyclical transmission of West African *Trypanosoma (T.) brucei* isolates from man and animals. *Acta Trop.* 45, 309–319.
- Seed, R., Wenck, M.A., 2003. Role of the long slender to short stumpy transition in the life cycle of the African trypanosomes. *Kinetoplastid Biol. Dis.*, 2:3.
- Tait, A., Babiker, E.A., Le Ray, D., 1984. Enzyme variation in *Trypanosoma brucei* spp. I Evidence for the sub-speciation of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Parasitology* 89, 311–326.

- Van Den Abbeele, J., Claes, Y., Van Bockstaele, D., Le Ray, D., Coosemans, M., 1999. *Trypanosoma brucei* spp. Development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology* 11, 469–478.
- Wijers, D.J.B., 1958. Factors that may influence the infection rate of *Glossina palpalis* with *Trypanosoma gambiense*. I. The age of the fly at the time of the infected feed. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 52, 385–390.
- Wijers, D.J.B., Willett, K.C., 1960. Factors that may influence the infection rate of *Glossina palpalis* with *Trypanosoma gambiense*. II. The number and the morphology of the trypanosomes present in the blood of the host at the time of the infected feed. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 54, 341–350.

Caractérisation génétique de *Trypanosoma brucei* s. l. : implications épidémiologiques et nouvelles perspectives

Résumé : La structure génétique des trypanosomes du complexe brucei est toujours sujette à discussion. La définition classique des différentes sous espèces ne semble pas satisfaisante. Face à une diversité de formes cliniques (allant de formes asymptomatiques à des formes aiguës) et une diversité de réponses aux tests de dépistage (malades, séropositifs et suspects sérologiques), il est important de mieux cerner la structure génétique et le mode de reproduction du pathogène.

Nous avons, à partir de prospections médicales menées en Côte d'Ivoire et en Guinée, caractérisé les trypanosomes directement à partir des liquides biologiques en plus de la caractérisation des souches isolées par les différentes techniques d'isolement (KIVI et IR) et ceci avec des marqueurs microsatellites plus polymorphes que les isoenzymes.

Il ressort de cette étude que les isoenzymes sont inadaptées pour caractériser les pathogènes d'un groupe assez homogène comme celui du groupe 1 de *T. b. gambiense*. Les résultats obtenus avec les microsatellites montrent que le groupe 1 de *T. b. gambiense* présente bien une structure clonale, monophylétique avec un génome assez stable dans le temps. Les microsatellites utilisés ont montré une bonne spécificité, permettant de rendre compte d'une structuration géographique entre différents foyers de THA. Ils ont également montré que des trypanosomes infectants pour l'homme circulent chez des patients non confirmés en parasitologie (qui pourraient agir comme réservoir humain de la maladie) et une aptitude différentielles des trypanosomes à l'isolement. En revanche, ces microsatellites se sont montrés incapables de détecter des infections mixtes.

Ces résultats permettent d'envisager des études visant à corréler la diversité génétique observée chez les pathogènes et la diversité de réponses à l'infection mais également de cibler les gènes qui confèrent la résistances des pathogènes au sérum humain et aux médicaments par l'élaboration d'un plus grand échantillon de marqueurs microsatellites.

Mots clés : *Trypanosoma brucei gambiense*, variabilité génétique, structuration géographique, réservoir humain, microsatellites, isoenzymes.

Abstract: Genetic structure of *Trypanosoma brucei* complex is still under debate. Classical taxonomy of this parasite is far from relating actual situation in field. Indeed, regard to the diversity of response to diagnosis test, together with the diversity of symptoms encountered in HAT, it is important to elucidated population structure and mating system of this pathogen.

We characterised trypanosomes both from stocks isolated by two techniques (KIVI and RI) and biological fluid, using polymorphic microsatellite markers and isoenzymes (gold standard).

Isoenzymes were shown unsuitable to differentiate stocks from *T. b. gambiense* group 1 since it's homogeneous. Results from microsatellite markers are consistent with clonal structure, monophyletic and genome stability through time of *T. b. gambiense* group 1 pathogens. Microsatellite markers displayed a high specificity which allowed geographic clusters among HAT foci. They also point out that human infectious trypanosomes circulate in parasitological non confirmed patient (who could act as human reservoir of HAT) and fitness behaviour of trypanosome when face to isolation but could not detected multiple infections.

Our results allow us to further investigate correlation between genetic diversity seen in *Trypanosoma brucei* and diversity of response observed in patients and characterised human serum and drug resistance genes with more microsatellite markers.

Key words: *Trypanosoma brucei gambiense*, genetic diversity, geographic cluster, human reservoir, microsatellites, isoenzymes.