

**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE  
DE BOBO-DIOULASSO**

INSTITUT DU DÉVELOPPEMENT RURAL



N° d'ordre 0011.

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE POLYTECHNIQUE  
DE BOBO-DIOULASSO  
(DOCTORAT UNIQUE)**

*Doctorat Unique en Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques*

Par

**KABORE Jacques**

**Épidémiologie moléculaire de la maladie du  
sommeil en Afrique de l'Ouest**

soutenue publiquement le 1<sup>er</sup> Octobre 2011 devant

le jury composé de :

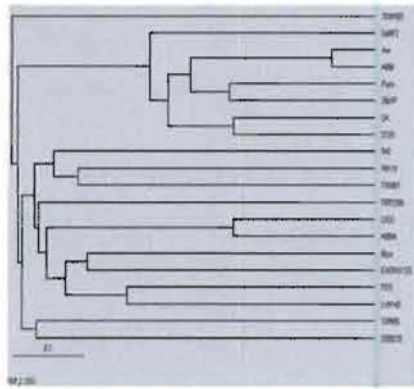
**Président :** Pr. Laya SAWADOGO, Université de Ouagadougou

**Membres :** Pr. Georges Anicet OUEDRAOGO, Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

Pr. Adrien Marie Gaston BELEM, Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

Dr. Vincent JAMONNEAU, Institut de Recherche pour le Développement

Dr. Karine MOULINE, Institut de Recherche pour le Développement



*Un sincère remerciement à toutes les personnes qui ont accepté de participer à cette étude. Je vous souhaite à tous une bonne santé.*

## DÉDICACE

---

*Cette thèse est dédiée :*

♠ *A mon très cher regretté père, Gabriel T. KABORE ;*

♣ *A ma très chère mère, Rosalie ILBOUDO ;*

♦ *A mes frères, sœurs et amis (es) ;*

♦ *A toute la famille KABORE ;*

♥ *A ma chérie Edwige SANON ;*

♦ *A toute la famille SANON ;*

*Recevez ici mes sincères remerciements pour vos prières et multiples soutiens.*

---

*Merci Seigneur Jesus pour tous tes bienfaits !*

## REMERCIEMENTS

Cette thèse a été financée par le projet Fonds de Solidarité Prioritaire « Recherches en Entomologie, Formation et Stratégies de prévention, le cas du Paludisme et de la Trypanosomose Humaine Africaine » (FSP/REFS) du Ministère français des Affaires Etrangères, l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et le Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology (WTCMP, Glasgow). Elle a été menée en partenariat avec plusieurs centres et institutions de recherche dont le Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES), l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso (UPB) et l'Université de Glasgow.

➤ Je tiens ainsi à remercier :

- **Pr. Hamidou BOLY**, Président de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso ;
- **Pr. Adrien Marie Gaston BELEM**, Responsable des enseignements de troisième cycle à l'UPB, mon directeur de thèse. Merci pour votre disponibilité, et vos précieux conseils qui ont orienté mes choix de carrière ;
- **Pr. Abdoulaye Soumana GOURO** et **Dr. Hamidou Hamadou TAMBOURA**, respectivement Directeur Général sortant et Directeur Général par intérim du CIRDES qui ont bien voulu m'accueillir au sein de cette institution qui m'a offert un cadre idéal tant humain que logistique pour mener cette étude ;
- **Dr. Jean Marc LEBLANC**, Représentant de l'IRD au Burkina Faso ;
- **Dr. Gérard CUNY**, Responsable de l'UMR IRD 177 « Interaction Hôte/Vecteur/Parasite dans les maladies dues aux trypanosomatides » ;
- **Pr. Dave BARRY**, Directeur du Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology;
- **Dr. Pere SIMARRO** et **Dr. Abdoulaye DIARRA**, respectivement responsables de la THA à l'OMS Genève (siège) et OMS Afrique.

➤ Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude, pour leur présence à ce jury au :

- **Pr. Laya SAWADO**GO de l'Université de Ouagadougou ;
- **Pr. Georges Anicet OUEDRAOGO** de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso ;
- **Pr. Adrien Marie Gaston BELEM** de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso ;
- **Pr. Gustave KABRE** de l'Université de Ouagadougou ;
- **Pr. Frédéric SIMARD** de l'Institut de Recherche pour le Développement ;
- **Dr. Vincent JAMONNEAU** de l'Institut de Recherche pour le Développement ;
- **Dr. Karine MOULINE**, de l'Institut de Recherche pour le Développement.

➤ **A L'IRD/CIRDES** où j'ai eu à effectuer mon stage de DEA et mon Doctorat, je tiens à remercier vivement :

- **Le Dr. Issa SIDIBE**, Directeur scientifique du CIRDES, pour m'avoir ouvert les portes de la recherche. Merci Dr, je vous en suis infiniment reconnaissant ;

- **Le Dr. Zakaria BENGALY**, Chef de l'Unité de Recherche sur les Bases biologiques de la lutte Intégrée (URBIO), pour vos conseils, encouragements et aussi pour votre disponibilité à mon égard ;

- **Le Dr. Vincent JAMONNEAU**, Chercheur IRD basé au CIRDES, mon directeur de thèse, pour tous les efforts et sacrifices consentis à mon égard. Tu as dirigé cette thèse de bout en bout. Merci pour la formation de qualité reçue, en témoignent les cours en anglais et les formations aux logiciels d'analyse de données. Merci Vincent pour tes qualités humaines, ton sens de l'écoute et de la compréhension et la grandeur de tes connaissances qui m'ont permis d'avancer et de voir enfin le bout du tunnel. Enfin un « Ouf » de soulagement ;

- **Le Dr. Bruno BUCHETON**, Chercheur IRD basé au CIRDES, qui a largement contribué à cette thèse par son encadrement et les divers précieux conseils. Tu as été disponible pour co-encadrer scientifiquement ce travail depuis mes manipulations à l'animalerie jusqu'au génotypage des microsatellites à Glasgow. Merci Bruno pour ton aide

dans le codage des allèles, les analyses de données, la correction de mon document et enfin dans la collaboration initiée avec l'Université de Glasgow ;

- **Le Dr. Thierry DE MEEÛS**, Chercheur CNRS-IRD basé au CIRDES qui, en tant que maître en la matière m'a patiemment initié à cette science incontournable pour l'étude de l'épidémiologie des maladies à transmission vectorielle qu'est la génétique des populations. Merci pour ces nombreuses et longues heures passées à m'apprendre à utiliser les logiciels d'analyse. Merci Thierry pour ton immense contribution dans ce document et ta disponibilité pour toutes les fois que j'ai eu à te solliciter. Il me reste encore beaucoup à apprendre mais je sais compter sur cette disponibilité à partager tes connaissances ;

- **Le Pr. Philippe SOLANO**, Chercheur IRD basé au CIRDES ; **le Pr. Aboubacar TOGUYENI**, Chercheur au CIRDES ; **le Dr. Fabrice COURTIN**, Chercheur IRD basé au CIRDES ; **le Dr Jean-Baptiste RAYAISSE**, Chercheur au CIRDES ; **le Dr. El Adj Hassane ADAKAL**, Responsable de la section Tiques et Maladies Associées au CIRDES ; **le Dr. Charles DAYO**, Chercheur au CIRDES ; **le Dr. Augustin Ziro BANCE**, Responsable de la cellule de formation au CIRDES ; pour vos soutiens, conseils, et encouragements et votre disponibilité à mon égard ;

- **Toute l'équipe « Trypano humaine » du CIRDES : René SANON dit « Doyen », Hassane SAKANDE, Kalo Joseph SANOU dit « SKJ », Stéphanie LAPEYRE, Moïse ZOUNGRANA** pour les bons moments passés ensemble tant sur le terrain qu'au laboratoire ;

- Les techniciens **Maurice KONKOBO, Victor BAZEMO, Sébastien ZOUNGRANA, Guy SANOU, Mathias ZERBO, Souleymane SYLLA, Léopold MILLOGO, Wilfried YONI, Adrien ZOUNGRANA, Céné BILA** ainsi que tous les autres techniciens du CIRDES pour leur contribution dans la réalisation de mes travaux. Merci pour la bonne collaboration ;

- Tout le personnel de la Direction Administrative et Financière du CIRDES (et son chef en particulier, **Mr. Abdel Rachid OROU-GUIDOU**) pour la sympathie et la confiance que vous m'avez témoignées pendant ma thèse ;

- Tous les étudiants stagiaires du CIRDES (en particulier **Akoudjin MASSOUROUDINI, Aristide SEMPORE, Bienvenu SOMDA, Emilie DAMA, Ernest SALOU, Hamidou ILBOUDO, Modou SERE, Moctar MOUICHE ...**), mes collègues, camarades et amis (**Christian ZAGUE, Jean-Paul OUEDRAOGO, Lazare**

**BELEMNABA, Noufou OUEDRAOGO, Séverin N'DO, ...**), retrouvez ici ma profonde amitié.

➤ **En Guinée** où j'ai eu à effectuer une partie des études de terrain de ma thèse, je tiens à remercier :

- **Le Dr. Mamadou CAMARA**, Coordinateur du Programme National de Lutte contre la Trypanosomose Humaine Africaine (PNLTHA) de Guinée, pour m'avoir accueilli dans son équipe et contribué à l'encadrement de ce travail. Je vous remercie surtout de m'avoir fait partager vos connaissances sur la maladie du sommeil et de m'avoir donné goût aux expériences de terrain ;

- **A Toute l'équipe « Trypano » du PNLTHA de Guinée**, en commençant par le Coordinateur adjoint **Dr. Abdoulaye DIABY**, les deux mamans trypano **Bintou DIAKITE** et **Diane DOSSOU**, **Dr. Frédéric OUENDENO**, **Oumou CAMARA**, **Moïse KAGBADOUNO**, **Mamadou LENO** dit « Blo », **Don Farace**, **Doyen Kasterman**, **Alpha DIASSY**, **Karifa CAMARA**, **Emile LELANO**, **Dr. Souleymane SYLLA**, **Ousmane CAMARA** dit « OC », **DANI**, **Dr. KANDE**, **Abdoulaye SOUMAH** et **Ibrahima SORRY**.

➤ **En Côte d'Ivoire**, où les foyers de Sinfra et Bonon ont aussi fait partie de mes zones d'étude, je tiens à remercier aussi :

- **Le Dr. Mathurin KOFFI**, Chercheur à l'Université d'Abobo-Adjamé, pour la bonne collaboration et les conseils dont j'ai bénéficiés. Merci Grand frère Mathurin pour tes encouragements, toutes les fois que nous nous sommes rencontrés. J'espère qu'une paix durable est en train de s'installer en Côte d'Ivoire et qu'elle se concrétisera rapidement par une collaboration sur des projets communs ;

- **Le Dr. Kouakou LINGUE**, Coordinateur du Programme National d'Elimination de la Trypanosomose Humaine Africaine (PNETHA) de Côte d'Ivoire ;

- **A Toute l'équipe « Trypano » de l'Institut Pierre Richet (IPR) de Côte d'Ivoire**, son chef, **le Dr. Dramane KABA**, **Louis N'DRI**, **Bamoro COULIBALY**, **Alain KOFFI**, **Fabien DOFINI**, **Gboko OUATTARA**, **Alexis ZOHOURI** de Sinfra, **Fabien KOUAKOU**

de Bouaflé, **Benjamin MIEZAN**, **Léopold BLE**, **Gabin** et **Dion** du Projet de Recherches Cliniques sur la Trypanosomose (PRCT).

➤ **A l'Université de Glasgow** où j'ai eu à effectuer mes travaux de génotypage de microsatellites, je tiens à saluer l'excellente collaboration entre cette université et l'IRD/CIRDES. Je remercie :

- **Le Dr. Annette MACLEOD**, pour m'avoir permis de réaliser le génotypage des souches de trypanosomes et de m'avoir perfectionné dans les bonnes pratiques de laboratoire dans le domaine de la biologie moléculaire. Merci à toi et ton mari, **Dr. Darren MOCKTON**, pour les bons moments passés ensemble. Vous n'avez pas hésité à me faire visiter le Royaume-Uni, de porter la jupe écossaise « le kilt », de faire du ski et de suivre des matchs de rugby. Merci à vous ;

- **A toute l'équipe de l'Université de Glasgow : Pr. Andy TAIT, Dr. Liam MORRISON, Dr. Craig DUFFY, Dr. Paul CAPEWELL, Dr. Annelie COOPER et Alexandra MACKAY** (administratrice) pour la bonne collaboration et les bons moments passés au laboratoire ;

→ **A Romain SOLON** pour son accueil et son aide à Accra au Ghana pour l'obtention de mes VISA pour le Royaume Uni ;

→ **A tous les enseignants de l'Institut du Développement Rural (IDR) de l'Université Polytechnique de Bobo (UPB) et de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre (UFR/SVT) de l'Université de Ouagadougou, en particulier le Pr. Jean Bosco OUEDRAOGO**, Directeur du Centre Muraz. Merci à vous pour les formations reçues et les encouragements ;

→ **A tous mes promotionnaires et étudiants de l'IRSS**, merci à vous pour la bonne collaboration ;

→ **A tous ceux dont les noms n'ont pu être cités ici**, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

# SOMMAIRE

DÉDICACE -----	i
REMERCIEMENTS -----	ii
SOMMAIRE -----	vii
LISTE DES FIGURES -----	xi
LISTE DES TABLEAUX -----	xiii
RÉSUMÉ -----	xiv
ABSTRACT -----	xv
INTRODUCTION -----	1
PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE, PROBLÉMATIQUE -----	
CHAPITRE I : LA TRYPANOSOMOSE HUMAINE AFRICAINE OU MALADIE DU SOMMEIL -----	5
1.1. Les premières descriptions de la maladie -----	5
1.2. Identification de l'agent pathogène -----	6
1.3. Des grandes épidémies du 20 <sup>ème</sup> siècle à la situation actuelle -----	7
1.4. Le diagnostic et le traitement de la THA -----	13
1.4.1. Le diagnostic clinique -----	13
1.4.2. Méthodes de diagnostic indirect -----	16
1.4.3. Méthodes de diagnostic direct -----	19
1.4.4. Diagnostic de phase et traitement de la THA -----	21
1.4.5. Le problème des sujets séropositifs sans confirmation parasitologique -----	23
CHAPITRE II : LES TRYPANOSOMES -----	27
2.1. Définition -----	27
2.2. Classification ou Taxonomie -----	27
2.3. Morphologie et cycle biologique du parasite -----	30
2.3.1. Morphologie -----	30
2.3.2. Cycle biologique du parasite -----	31
2.3.2.1. Chez l'insecte vecteur (Glossine) -----	31
2.3.2.2. Chez l'hôte mammifère -----	32
2.4. Variation antigénique -----	34
2.5. Résistance de <i>T. brucei</i> au sérum humain -----	35
2.6. Structure du génome du trypanosome -----	36
2.6.1. Génome nucléaire -----	36
2.6.2. Génome mitochondrial ou kinétoplastique -----	38
2.6.3. Reproduction de <i>T. brucei</i> -----	39

<b>CHAPITRE III : APPORT DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DANS L'ÉTUDE DE L'ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA THA</b> -----	<b>40</b>
3.1. Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la THA -----	40
3.2. Diversité génétique des trypanosomes et diversité de réponses à l'infection-----	44
3.3. Génétique des populations de trypanosomes, structuration temporelle et géographique et lutte contre la THA -----	47
3.3.1. Définition -----	47
3.3.2. Fréquences génotypiques et alléliques -----	47
3.3.3. Equilibre de Hardy-Weinberg-----	48
3.3.4. Estimateurs non biaisés de F-Statistiques -----	49
3.3.5. Déséquilibre de liaison -----	50
3.3.6. Apport de la génétique des populations à l'étude de l'épidémiologie de la trypanosomose-----	51
3.4. Le choix du marqueur -----	54
<b>DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE</b> -----	
<b>SURVEILLANCE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE LA THA EN AFRIQUE DE L'OUEST ET PRÉSENTATION DES ZONES D'ÉTUDE</b> -----	<b>57</b>
1. Prospections médicales -----	57
2. Zones d'étude-----	59
2.1. Foyers de Boffa, Dubréka et Forécariah (Guinée) -----	59
2.2. Foyer de Bonon (Côte d'Ivoire)-----	62
3. Considérations éthiques -----	64
<b>ACTIVITÉ DE RECHERCHE 1 : PREMIÈRE MISE EN ÉVIDENCE QUE LES SUSPECTS SEROLOGIQUES (APPAREMMENT APARASITEMIQUES) DANS LA MALADIE DU SOMMEIL SONT PORTEURS DES MÊMES PARASITES (<i>TRYPANOSOMA BRUCEI GAMBIENSE</i>) QUE CEUX INFECTANT LES TRYPANOSOMÉS CONFIRMÉS EN PARASITOLOGIE.</b> -----	<b>65</b>
1. Introduction-----	66
2. Matériels et méthodes-----	67
2.1. Zone d'étude et échantillonnage -----	67
2.2. Sujets de l'étude -----	67
2.3. PCR diagnostic-----	68
2.4. Génotypage de microsatellites-----	69
2.5. Souches de référence-----	71
2.6. Analyses des données -----	71
3. Résultats -----	71
3.1. PCR diagnostic-----	71
3.2. Génotypage des échantillons de Côte d'Ivoire-----	72
3.3. Génotypage des échantillons de Guinée -----	74
4. Discussion -----	76

**ACTIVITÉ DE RECHERCHE 2 : STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE *TRYPANOSOMA BRUCEI GAMBIESE* EN GUINÉE SELON LES FACTEURS DE L'HÔTE. ----- 80**

<b>1. Introduction-----</b>	<b>81</b>
<b>2. Matériels et méthodes-----</b>	<b>83</b>
2.1. Zone d'étude et échantillonnage -----	83
2.2. PCR Diagnostic -----	83
2.3. Génotypage par les marqueurs microsatellites-----	83
2.3.1. Nested PCR-----	83
2.3.2. Préparation des plaques de génotypage-----	85
2.3.3. Génotypage -----	85
2.3.4. Détermination de la taille des allèles-----	85
2.4. Analyses des données-----	87
2.4.1. Indice de fixation de Wright-----	88
2.4.2. Mesure du déséquilibre de liaison -----	89
2.4.3. Tests de différenciation par paire -----	90
<b>3. Résultats -----</b>	<b>91</b>
3.1. Génotypage de microsatellites-----	91
3.2. Déséquilibre de liaison-----	94
3.3. Différenciation entre les fluides biologiques-----	95
3.4. Différenciation entre les statuts du patient -----	96
3.5. Différenciation temporelle -----	97
<b>4. Discussion -----</b>	<b>101</b>
<b>5. Structuration géographique -----</b>	<b>103</b>

**ACTIVITÉ DE RECHERCHE 3: AMÉLIORATION DE L'AMPLIFICATION DE LOCI MICROSATELLITES DE *TRYPANOSOMA BRUCEI GAMBIESE* À PARTIR DE FLUIDES BIOLOGIQUES. ----- 106**

<b>1. Introduction-----</b>	<b>107</b>
<b>2. Matériels et méthodes-----</b>	<b>107</b>
2.1. Echantillonnage : -----	108
2.2. Conditions d'amplification : -----	108
2.3. Préparation des plaques de génotypage-----	109
2.4. Génotypage -----	109
2.5. Détermination de la taille des allèles -----	109
2.6. Analyses des données -----	109
<b>3. Résultats -----</b>	<b>110</b>
3.1. Effets du sang et du buffy-coat -----	110
3.2. Effets des fluides biologiques, des protocoles et des loci-----	111
<b>4. Discussion -----</b>	<b>113</b>

<b>DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>115</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>124</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>I</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Nombre de cas de THA signalés et population dépistée, 1939-2004 (Steverding, 2008). .....	8
Figure 2 : Evolution du nombre de cas rapportés des deux formes de la THA (1998-2009) (Simarro <i>et al.</i> , 2010) .....	10
Figure 3 : Quelques signes cliniques de la THA (source : IRD/CIRDES) .....	15
Figure 4 : Illustration du CATT effectué sur sang total (CATT/sg) (source IRD/CIRDES)...	17
Figure 5: Illustration du CATT effectué sur plasma (CATT/pl) (source IRD/CIRDES) .....	18
Figure 6 : Dépistage de la trypanosomose humaine africaine, arbre décisionnel utilisé dans le cadre de ce travail.....	20
Figure 7 : Arbre phylogénétique des Eucaryotes (Keeling <i>et al.</i> , 2009).....	29
Figure 8 : Morphologie de <i>T. brucei</i> (Laveissière <i>et al.</i> , 2000).....	31
Figure 9 : Cycle de vie des trypanosomes africains (Brun <i>et al.</i> , 2010).....	33
Figure 10 : Evolution de la parasitémie dans le sang de l'hôte en fonction du temps, illustration du phénomène de la variation antigénique. ....	35
Figure 11 : Caryotype de <i>T. brucei</i> évalué par électrophorèse en champs pulsés (Wickstead <i>et al.</i> , 2004) .....	38
Figure 12 : Carte de la Guinée et localisation des zones d'étude .....	61
Figure 13 : Exemples d'activités et de zones à risque en mangrove guinéenne .....	62
Figure 14 : Carte de la Côte d'Ivoire et localisation de la zone d'étude (Bonon) (Courtin <i>et al.</i> , 2005) .....	63
Figure 15 : Exemple de révélation d'une PCR TBR 1/2 sur gel d'agarose .....	72
Figure 16 : Dendrogramme basé sur la matrice de Cavalli-Sforza et Edwards des profils microsatellites des échantillons de Côte d'Ivoire.....	73
Figure 17 : Profils électrophorétiques d'un SERO (a) et d'un T+ (b) présentant des allèles identiques. ....	74

Figure 18 : Dendrogramme basé sur la matrice de Cavalli-Sforza et Edwards des profils microsatellites obtenus des échantillons de Guinée. ....	75
Figure 19 : Profil bi-allélique (allèles 1 et 2) représentant un profil d'un hétérozygote.....	87
Figure 20 : Profil mono-allélique représentant un homozygote ou un profil dû à l'allèle dropout. ....	87
Figure 21 : Profils de migration obtenus sur du nusieve gel avec le locus M6C8 mettant en évidence des profils différents entre souches isolées en Guinée.....	92
Figure 22 : Régression entre la proportion de sites trouvés hétérozygotes en fonction du nombre de génotypes blancs (données manquantes). ....	93
Figure 23 : Dendrogramme non raciné décrivant la répartition génétique entre les différents sous-échantillons de <i>T. brucei gambiense</i> dans les foyers de la Guinée.....	99
Figure 24 : Moyennes $F_{IS}$ obtenues pour les sous-échantillons de <i>T. b. gambiense</i> dans les trois foyers de Guinée. ....	100
Figure 25 : Structuration géographique des souches de <i>T. b. gambiense</i> entre trois foyers situés sur le littoral guinéen (Boffa, Dubréka et Forécariah).....	105
Figure 26 : Nombre d'allèles amplifiés en fonction des fluides biologiques par protocole et en fonction des protocoles par fluide biologique. ....	112

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Maladie du sommeil à <i>T. b. gambiense</i> : nouveaux cas rapportés entre 2000 et 2009 (Simarro <i>et al.</i> , 2010) .....	12
Tableau II : Limites de détection rapportées des différents tests moléculaires de diagnostic de la maladie du sommeil (Deborggraeve et Buscher, 2010) .....	41
Tableau III : Résultats des prospections médicales menées en collaboration avec le PNLTHA de Guinée et l'équipe IRD/CIRDES dans le cadre de cette étude .....	58
Tableau IV : Séquences des amorces TBR 1/2 spécifiques au groupe <i>Trypanozoon</i> .....	69
Tableau V : Liste des marqueurs microsatellites .....	86
Tableau VI : Nombre et taille des allèles obtenus avec les six marqueurs .....	92
Tableau VII : Résultats des tests de déséquilibre de liaison des paires de loci significatives selon les conditions d'analyse et la correction de Bonferroni.....	95
Tableau VIII : Tests de différenciation par paire entre les souches de trypanosomes de patients de différents fluides biologiques. ....	96
Tableau IX: Tests de différenciation par paire entre les souches de trypanosomes de patients de différents statuts : S1 phase précoce, S2 phase intermédiaire, S3 phase avancée de différents foyers et dates.....	97
Tableau X : Résultats des tests de différenciation temporelle pour chaque combinaison (foyer x statut).....	98
Tableau XI : Estimation de l'effectif clonal $N_{cl}$ de la population des trois foyers et les proportions de migrants entre chaque paire de foyer ( $m$ ) selon les estimations des équations (1) et (2) en utilisant deux taux de mutation probables. ....	104
Tableau XII : Régression du nombre d'allèles amplifiés entre le sang et le buffy-coat.....	111
Tableau XIII : Régression du nombre d'allèles amplifiés entre le sang, le LCR et le suc ganglionnaire.....	112

## RÉSUMÉ

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil est une affection parasitaire à transmission vectorielle due à un euglénozoaire kinétoplastidé de l'espèce *Trypanosoma brucei*. La complexité de l'évolution clinique de la maladie est fréquemment évoquée allant de formes asymptomatiques à des formes aiguës. D'autre part, une diversité de réponses aux tests de dépistage (sains, trypanosomés, séropositifs) est rencontrée sur le terrain. Cette diversité de réponses à l'infection pourrait être due à la diversité génétique du parasite, qui est rencontré dans les différents fluides biologiques humains (sang, liquide céphalo-rachidien et suc ganglionnaire) et qui est responsable des différents stades de la maladie (phase précoce, phase intermédiaire et phase avancée). L'analyse de la biologie des populations de ce parasite peut être envisagée à l'aide de marqueurs moléculaires tels que les ADN microsatellites. Nous avons ainsi, à partir de prospections médicales menées en Côte d'Ivoire et en Guinée, caractérisé les trypanosomes directement à partir des différents fluides biologiques de sujets séropositifs et de sujets trypanosomés à différentes phases de la maladie. Il ressort de cette étude que certains sujets séropositifs sont porteurs de *T. b. gambiense* groupe 1 et pourraient agir comme réservoir de parasites et participer à la transmission et au maintien de la maladie en zone d'endémie. Ces sujets séropositifs requièrent donc une attention particulière dans les stratégies de lutte contre la maladie. En dépit de la mise en évidence d'infections mixtes, les résultats obtenus avec les microsatellites montrent, malgré de nombreux échecs d'amplification par PCR dus à la faible quantité d'ADN de trypanosomes présents dans les fluides biologiques, qu'il n'y a pas de différenciation génétique entre les souches trouvées dans différents fluides biologiques. Une différenciation génétique existe cependant entre souches de patients à des stades différents ou entre souches prélevées à des dates différentes. Cela montre que les trypanosomes présents dans chaque fluide biologique sont représentatifs du foyer et à ce titre, le suc ganglionnaire, où les échecs d'amplification sont les moins nombreux en Guinée, doit être préféré dans cette région d'Afrique. Cela implique aussi que les aspects spatio-temporels ainsi que le stade de la maladie doivent être contrôlés pour étudier la structure fine des populations de trypanosomes, ainsi que les techniques d'amplification par PCR, dont le succès à partir de souches amplifiés directement des liquides biologiques est aléatoire.

**Mots-clés :** Génétique des populations, *Trypanosoma brucei gambiense*, Afrique de l'Ouest, marqueurs microsatellites, séropositifs, épidémiologie, Maladie du sommeil.

## ABSTRACT

Human African trypanosomiasis (HAT) is a parasitic disease caused by the kinetoplastid euglenozoa *Trypanosoma brucei*. The complexity of the clinical evolution of the disease is frequently mentioned ranging from asymptomatic to acute forms with a diversity of responses to the diagnostic tests (healthy subjects, HAT cases and seropositive subjects) encountered in the field. This diversity of responses to infection is partly due to the genetic diversity of the parasites that can be found in different biological fluids (blood, cerebrospinal fluid and lymph node). The population biology of such a parasite can be assessed through the study of molecular markers as microsatellite loci. From medical survey conducted in Côte d'Ivoire and Guinea, we have characterized the trypanosomes present in the different biological fluids of seropositive subjects and HAT patients from different stages of the disease (earlier stage, intermediate stage and late stage). It appears from this study that seropositive subjects are carriers of *T. b. gambiense* group 1 and may thus act as a reservoir of parasites. These seropositive subjects therefore require special attention in control campaign. The results obtained with microsatellites markers showed no genetic differentiation between trypanosomes found in the different biological fluids. However, we were able to show that a genetic differentiation exists between the strains from patients at different phase of the disease and between strains sampled at different dates. Consequently, the trypanosomes found in any of the three body fluids is representative of those circulating in the focus, the strains found in the lymph nodes proving, in Guinean foci, the most successful DNA amplifications due to a higher parasite concentration in that fluid in that part of Africa. Our results also show that the spatio-temporal scales and the stage of the disease are parameters that will have to be taken into account if precise population genetic studies are in order. We have also demonstrated the unstable nature of DNA amplification directly from body fluids, which will require to be improved by further studies.

**Key-words:** Population genetic, *Trypanosoma brucei gambiense*, West Africa, Microsatellites markers, Seropositives, epidemiology, Sleeping sickness.

[jacqueskabore@yahoo.fr](mailto:jacqueskabore@yahoo.fr)

# INTRODUCTION

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil est une maladie parasitaire à transmission vectorielle. L'agent pathogène est un trypanosome de l'espèce *Trypanosoma brucei*. Classiquement, cette espèce est subdivisée en trois sous-espèces sur la base de critères extrinsèques (hôte, distribution géographique et aspect clinique); *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) est responsable de la forme chronique de la THA en Afrique de l'Ouest et Centrale, *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*) est responsable de la forme aiguë de la THA en Afrique de l'Est et *Trypanosoma brucei brucei* (*T. b. brucei*), non pathogène pour l'homme, est responsable du nagana chez les animaux (Hoare, 1972). 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 un développement plus ou moins complexe avant d'être à nouveau transmis.

La THA reste un problème majeur de santé publique en Afrique Subsaharienne où elle se place en terme de " Disability Adjusted Life Years lost " (DALYs, somme de la perte d'années de vie par mortalité prématurée et d'années de vie productive par incapacité) au troisième rang des maladies parasitaires, derrière le paludisme et la schistosomiase (Cattand, 2001; Fevre *et al.*, 2008). Elle existe sous forme épidémique ou endémique dans plus de 260 foyers répartis dans 36 pays en Afrique Subsaharienne. En 1998, 40 000 cas de THA ont été rapportés mais le nombre de personnes infectées est estimé à 300 000 et celui des personnes à risque à 56 millions (WHO, 1998). En 2009, après des efforts de lutte, le nombre de cas rapportés est passé en dessous de 10 000 (9689) pour la première fois depuis 50 ans et le nombre réel de cas est estimé à 30 000 (WHO, 2010; Simarro *et al.*, 2011). C'est dans ce contexte encourageant que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Union Africaine (UA) viennent de lancer d'importantes campagnes d'élimination de la THA et des glossines à l'échelle du continent (Kabayo, 2002; Simarro *et al.*, 2008; Simarro *et al.*, 2010).

La Guinée fait partie de ces pays endémiques touchés par la réémergence de la THA à la fin du 20<sup>ième</sup> siècle. On estime à 2,5 millions, le nombre de personnes exposées au risque de la maladie, soit plus du tiers de la population totale estimée à 6,5 millions en 1994. Il y a une transmission particulièrement active du parasite en Basse Guinée qui comprend les foyers de

Boffa, Dubréka et Forécariah. La Guinée est actuellement le pays le plus touché par la maladie en Afrique de l'Ouest avec 620 trypanosomés dépistés de 2002 à 2008 principalement sur le littoral en zone de mangrove (Camara *et al.*, 2005; Simarro *et al.*, 2008). C'est donc dans ce pays de la sous-région que doivent se concentrer les recherches et les efforts de lutte.

La THA évolue chez l'homme en deux phases : la première, lymphatico-sanguine (première phase) durant laquelle le parasite se multiplie dans le sang et dans la lymphe, et la deuxième, méningo-encéphalitique (deuxième phase) qui correspond au passage du parasite dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Au cours de la phase lymphatico-sanguine, le trypanosomé 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 (Jannin *et al.*, 1993; Dumas et Bouteille, 1996; Brun *et al.*, 2010). Dans le cas de la forme chronique à *T. b. gambiense*, la première phase peut durer plusieurs années, la parasitémie fluctuante reste faible et a tendance à décroître, les symptômes sont peu prononcés. L'apparition des troubles neurologiques lors de la deuxième phase est souvent très progressive. Dans le cas de la forme aiguë à *T. b. rhodesiense*, la phase lymphatico-sanguine 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. Cependant, cette description classique de la maladie ne reflète qu'une vision partielle de la réalité. Par exemple, une importante diversité clinique a été observée en Afrique de l'Ouest et Centrale (Jamonneau *et al.*, 2002; Jamonneau *et al.*, 2004a), allant de formes asymptomatiques (Jamonneau *et al.*, 2004a; Checchi *et al.*, 2008) à des formes aiguës (Truc *et al.*, 1997; 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 trypanosomés. 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 fluides biologiques (sang, suc ganglionnaire et liquide céphalo-rachidien) ou des tests sérologiques qui cherchent à mettre en évidence de façon indirecte (diagnostic indirect) l'infection parasitaire ont été développés. Lors du dépistage sur le 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 (WHO, 1998). Cependant les techniques actuellement utilisées manquent souvent de sensibilité et/ou de spécificité : les équipes de dépistage doivent donc faire face à une situation plus complexe que la dichotomie trypanosomé/non-trypanosomé et notamment à des individus positifs en sérologie sans confirmation parasitologique (Garcia *et al.*, 2000) que l'on nomme classiquement « sujets séropositifs ». Dans la majorité des cas, ces individus ne reçoivent pas de traitement. Ces sujets séropositifs sont suspectés de constituer un réservoir humain de parasites et de contribuer au maintien de l'endémie dans un foyer (Garcia *et al.*, 2006).

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. 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). Les trypanosomes peuvent être rencontrés chez l'hôte dans trois fluides biologiques différents tels que le sang, le suc ganglionnaire et le LCR. La présence de génotypes différents de trypanosomes dans le sang et dans le LCR d'un même patient a déjà été évoquée (Truc *et al.*, 2002). L'existence d'un tropisme tissulaire par différents génotypes de trypanosomes est suspectée comme c'est le cas pour *T. cruzi* agent pathogène de la maladie de Chagas (Valadares *et al.*, 2008). Ce tropisme tissulaire pourrait être impliqué dans la diversité de réponses à l'infection.

Les marqueurs microsatellites se sont récemment montrés très prometteurs pour étudier la variabilité génétique des microorganismes (Tibayrenc, 1998; De Meeûs *et al.*, 2007) dont les trypanosomes morphologiquement non distinguables de l'espèce *T. brucei* (Biteau *et al.*, 2000; Balmer *et al.*, 2006; Koffi *et al.*, 2007). En effet, ils se sont montrés suffisamment polymorphes pour mettre en évidence une diversité génétique au sein de *T. b. gambiense* groupe 1 (Koffi *et al.*, 2007; Koffi *et al.*, 2009) qui est le seul taxon monophylétique du groupe (Gibson, 2007). Ils ont notamment permis pour la première fois de mettre en évidence une structuration géographique et temporelle parmi les populations de *T. b. gambiense* circulant en Guinée et en Côte d'Ivoire (Koffi *et al.*, 2009). Ils ont aussi permis de confirmer l'existence d'infections multiples chez un même patient (Jamonneau *et al.*, 2003; Koffi *et al.*, 2007), potentiellement impliquées dans la diversité clinique (Jamonneau *et al.*, 2004b). D'autre part, des résultats préliminaires ont montré que ces marqueurs semblaient être assez

sensibles pour caractériser les trypanosomes directement à partir d'échantillons biologiques sans passer par l'isolement et la mise en culture des trypanosomes qui sont des protocoles extrêmement lourds et onéreux (Koffi *et al.*, 2007).

Les travaux présentés dans cette thèse se sont focalisés sur l'étude de la diversité génétique des trypanosomes du sang, du suc ganglionnaire et du LCR, circulant dans les trois foyers de THA (Boffa, Dubréka, Forécariah) du littoral guinéen ainsi que dans le foyer de Bonon en Côte d'Ivoire, en utilisant les marqueurs microsatellites afin de répondre aux questions suivantes :

(i) Les sujets séropositifs apparemment aparasitémiés sont-ils porteurs de *T. b. gambiense*, et si oui, les trypanosomes détectés sont-ils identiques à ceux trouvés chez les trypanosomés positifs aux tests parasitologiques ?

(ii) Les trypanosomes circulant dans les différents fluides biologiques de l'homme sont-ils identiques ? Quelle est la fréquence des infections mixtes chez l'hôte ? Existe-t-il des corrélations entre diversités génétique et clinique ?

(iii) Existe-t-il une structuration génétique dans l'espace et dans le temps dans les zones d'étude géographiquement proches les unes des autres, et si oui, quelles sont les conséquences pour la mise en place d'un projet d'élimination de la THA en perspective dans ces zones ?

(iv) D'un point de vue technique, les marqueurs microsatellites sont-ils l'outil de choix pour étudier les trypanosomes directement à partir des échantillons biologiques ?

Dans ce document, nous présenterons d'abord une synthèse bibliographique, de la problématique. Suivra une partie expérimentale, qui traitera d'une part de la surveillance épidémiologique de la THA en Afrique de l'Ouest et présentera les zones d'étude ; et qui d'autre part traitera de trois activités de recherche. Enfin, une discussion générale sur l'ensemble des résultats obtenus conclura ce mémoire.

**PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE,  
PROBLÉMATIQUE**

# CHAPITRE I : LA TRYPANOSOMOSE HUMAINE AFRICAINE OU MALADIE DU SOMMEIL

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil est une maladie parasitaire qui sévit dans 36 pays du continent africain dans une zone géographiquement située entre 15° de latitude nord et 23° de latitude sud, correspondant à la zone de répartition des glossines ou mouches tsé-tsé. Ces vecteurs transmettent à l'homme, *T. b. gambiense* responsable de la forme "chronique" de la maladie en Afrique de l'Ouest et Centrale et *T. b. rhodesiense* responsable de la forme "aiguë" en Afrique de l'Est (Courtioux *et al.*, 2008).

## 1.1. Les premières descriptions de la maladie

Les manifestations de la maladie du sommeil sont décrites depuis longtemps. Le premier écrit connu sur cette maladie remonte au 14<sup>ème</sup> siècle. Il est attribué à l'historien arabe Ibn Khaldoun, qui rapporte le décès du Sultan Maariy Djazaa au Mali, après une longue maladie se terminant dans un état de sommeil continu. En 1734, dans son ouvrage « *the Navy Surgeon* » John Atkins, chirurgien de la marine anglaise, décrit pour la première fois cette affection qu'il appelle alors "*sleeping distemper*" ou "perturbation du sommeil". Ce dernier a observé en 1721, l'existence de la maladie sur la Côte de Guinée, en particulier chez des individus jeunes. Ce même syndrome est décrit sous le nom de "*lethargus*" en 1803 par Winterbottom, qui attire l'attention sur l'importance de l'hypertrophie des chaînes ganglionnaires cervicales. Ce signe porte désormais son nom, mais il était déjà connu des marchands d'esclaves, qui rejetaient ceux qui portaient de tels ganglions (Louis *et al.*, 2002). Par la suite et jusqu'au début du 19<sup>ème</sup> siècle, la maladie est signalée dans diverses parties de l'Afrique. Elle est bien connue des populations autochtones, qui la craignent et l'ont souvent individualisée des autres pathologies. En témoignent les nombreux noms vernaculaires que l'on a pu retrouver : *márree*, *nluoi*, *nagónlôe*, *kadeera*, *kee kôllee kondee*, *seenoyúncaree* en Afrique de l'Ouest, mais aussi *meki abe*, *meze 'e*, *matsèguè* en Afrique Centrale (Louis *et al.*, 2002).

## 1.2. Identification de l'agent pathogène

Les premières descriptions remontent au début des années 1840. C'est en 1841 que Gabriel Gustav Valentin, en Suisse, décrit pour la première fois un trypanosome, dans une truite saumonée du lac de Berne. En 1843, David Gruby trouve à son tour un trypanosome dans une grenouille, et entreprend la première classification de ce nouveau genre parasitaire. Puis en 1861, David Evans trouve des trypanosomes dans des chevaux et des chameaux atteints de surra en Inde : c'est la première relation entre un trypanosome et une maladie. En 1891, au Zululand, Gustave Nepveu est le premier à identifier des trypanosomes dans le sang humain. En 1895, au Zululand, David Bruce établit la relation entre les trypanosomes et les glossines dans le nagana du bétail. En 1898, pour Brault et Lapin, « l'agent pathogène pourrait être un protozoaire sanguicole dans le genre du trypanosome ». En 1901, Aldo Castellani trouve des trypanosomes dans le LCR humain de même que Joseph Averett Dutton. A cette même date, Michael Forde observe des " vermicules mobiles " à l'examen du sang et du LCR d'un patient 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 1901 toujours, Emile Brumpt, qui traverse l'Afrique d'Est en Ouest, établit le rôle de la glossine dans la transmission de la maladie humaine. De 1841 à 1901, la maladie et son épidémiologie ont été définies (Louis *et al.*, 2002). Il y'aura par la suite de nombreuses améliorations à cette connaissance. En 1903, Dutton et Todd retrouvent plusieurs fois le même trypanosome chez des africains en Gambie, et la même année, Castellani trouve en Ouganda des trypanosomes dans le LCR des trypanosomés 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 sommeiluse et fournit la preuve expérimentale que les glossines de l'espèce *Glossina palpalis* sont le vecteur de la maladie.

De 1895 à 1910, une épidémie s'est déclenchée et va ravager tout le bassin du Congo, de l'Atlantique au lac Victoria, causant 200 000 à 300 000 décès. La rive du lac Victoria est particulièrement touchée et la décision est prise en 1902, de déplacer les populations de 5 à

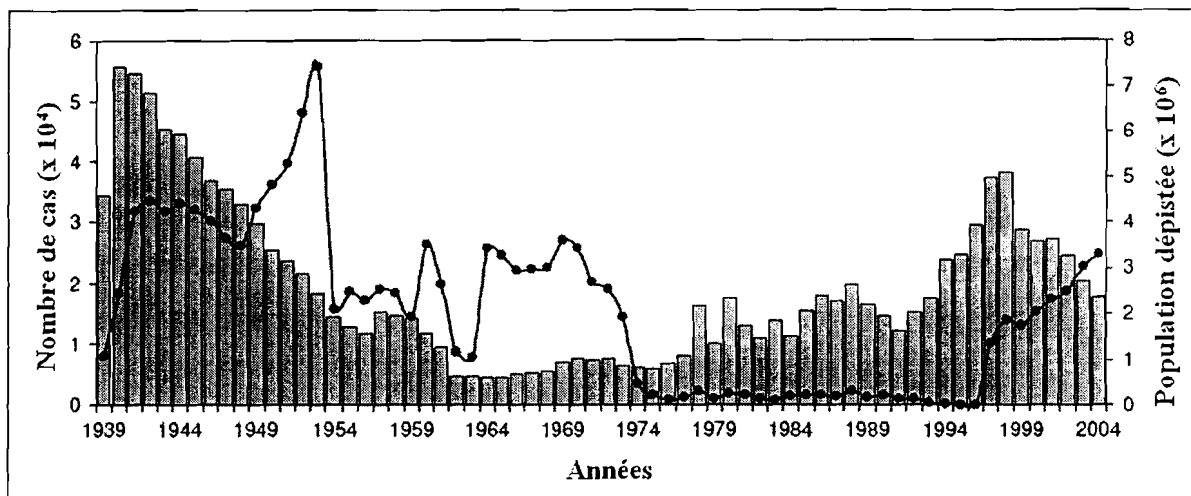
35km à l'intérieur des terres pour rompre le contact homme-mouche. C'est le premier exemple de lutte à grande échelle (Louis *et al.*, 2002).

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 et Fantham en 1910 étudient une souche isolée sur un des premiers cas reconnus 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 en 1913, montrent que le cycle du trypanosome chez la glossine varie en fonction des espèces de parasites.

### **1.3. Des grandes épidémies du 20<sup>ième</sup> siècle à la situation actuelle**

L'Afrique a connu au siècle dernier plusieurs grandes épidémies : la première de 1896 à 1906 a affecté l'Afrique Equatoriale, principalement en Ouganda et dans le Bassin du Congo avec 800 000 décès (Louis et Simarro, 2005). La deuxième épidémie a débuté dans les années 1920 et a touché de nombreux pays en Afrique Centrale et de l'Ouest. Cette épidémie a été efficacement combattue au Burkina Faso et au Cameroun par des équipes mobiles qui ont organisé le dépistage chez des millions de personnes à risque (Jamot, 1935). Vers le milieu des années 1960, la maladie avait presque entièrement disparu. Après ce succès, la surveillance s'est relâchée et on a assisté à une résurgence de la maladie (**Figure 1**).



**Figure 1: Nombre de cas de THA signalés et population dépistée, 1939-2004 (Steverding, 2008).**

Colonnes grises: nombre de cas de THA signalés ; cercles noirs : population dépistée.

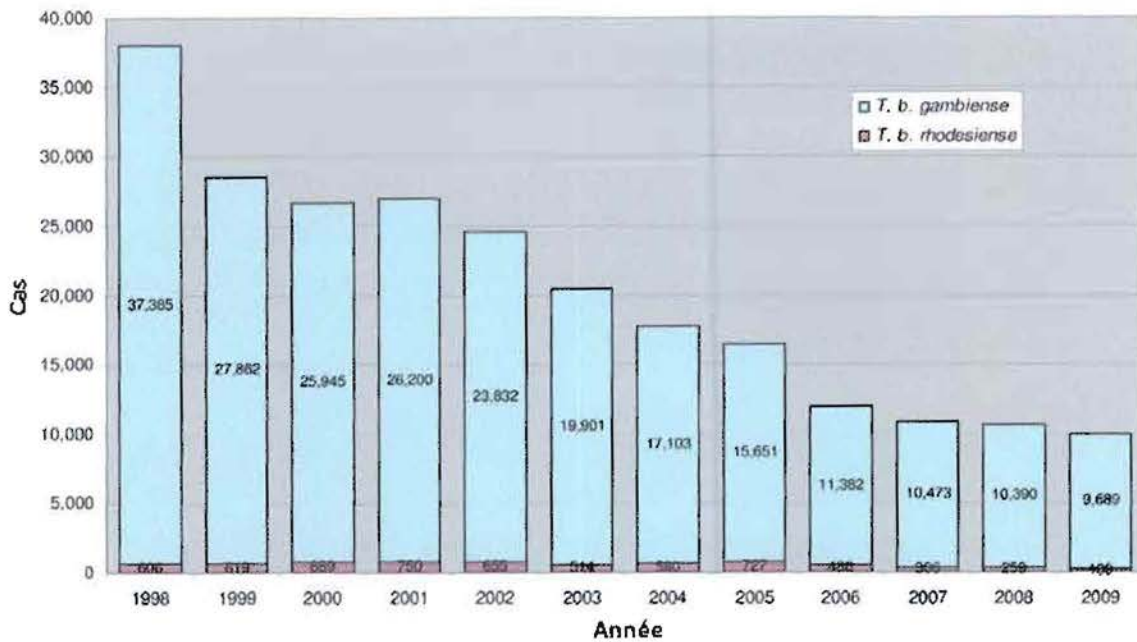
En 1986, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estimait que 70 millions de personnes étaient exposées au risque de la maladie dans 36 pays d'Afrique subsaharienne (WHO, 1986). En 1998, presque 40 000 cas de THA ont été rapportés mais le nombre réel de personnes infectées était estimé à 300 000 (WHO, 1998). Il faut savoir qu'en règle générale, les chiffres de surveillance épidémiologique ne représentent que la partie visible de l'iceberg car, seules environ 10% des personnes exposées bénéficient d'une surveillance active dans les zones à risque par manque de moyens des services sanitaires des pays concernés (WHO, 1998). Face à cette situation alarmante, les pays concernés, avec le soutien financier de plusieurs partenaires et le soutien financier et logistique de l'OMS et d'organisations non-gouvernementales (ONG), ont réorganisé la lutte contre la THA, notamment par la création de programmes nationaux de lutte. Les activités de recherche et de lutte contre la THA menées par ces programmes en collaboration avec des institutions de recherche ont progressivement permis d'endiguer cette nouvelle épidémie.

Entre 2000 et 2009, sur 36 pays considérés comme endémiques, 24 ont reçu la prise en charge exclusive de l'OMS pour évaluer la situation épidémiologique de la THA ou établir des activités de contrôle et de surveillance (Bénin, Burkina Faso, Cameroun, Tchad, Côte d'Ivoire, Gabon, Ghana, Guinée, Guinée Bissau, Kenya, Libéria, Malawi, Mali, Mozambique, Nigeria, Rwanda, Sénégal, Sierra Leone, Swaziland, Togo, Ouganda, Tanzanie, Zambie et

Zimbabwe); six pays ont reçu le soutien de l’OMS ainsi que des ONG ou par le biais de la coopération bilatérale (Angola, République Centrafricaine, Congo, République Démocratique du Congo, Guinée Equatoriale et Soudan) et enfin six pays (Botswana, Burundi, Ethiopie, Gambie, Namibie et Niger) qui n’ont pas signalé de cas au cours des 20 dernières années, n’ont pas reçu de soutien de l’OMS (Simarro *et al.*, 2011). Le nombre de nouveaux cas rapportés sur le continent a été réduit : entre 1998 et 2004, le nombre des deux formes de THA (*T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*) a baissé de 37 991 à 17 616. Le nombre réel de personnes infectées était estimé entre 50 000 et 70 000 (WHO, 2010). En 2009, après des efforts de lutte, le nombre de cas rapportés a chuté en dessous de 10 000 (9878) pour la première fois depuis 50 ans. Il représente une baisse de 63% depuis 2000 (**Figure 2**) (Simarro *et al.*, 2010). Le nombre réel de cas est aujourd’hui estimé à 30 000 (WHO, 2010). En 2009, seuls deux pays ont signalé plus de 1000 nouveaux cas, à savoir la République Centrafricaine et la République Démocratique du Congo représentant respectivement, 11% et 73% de l’ensemble des cas signalés. Le Tchad a rapporté plus de 500 cas. Trois pays (Angola, Soudan, Ouganda) ont rapporté plus de 100 cas. Onze pays ont déclaré moins de 100 cas : Cameroun, Congo, Côte d’Ivoire, Gabon, Guinée, Guinée Equatoriale, Kenya, Malawi, Tanzanie, Zimbabwe. Enfin, 19 pays répertoriés comme étant endémiques n’ont signalé aucun cas en 2009. Sept d’entre eux ont bénéficié d’activités de surveillance : Bénin, Burkina Faso, Ghana, Mali, Nigeria, Sierra Leone et Togo. Neuf n’ont pas d’activités de surveillance régulière mais n’ont signalé aucun cas depuis des décennies : Burundi, Ethiopie, Gambie, Guinée-Bissau, Libéria, Mozambique, Niger, Rwanda, Sénégal. Cependant, ces derniers pays méritent une surveillance épidémiologique afin de clarifier leur situation. Deux pays, à savoir le Botswana et la Namibie sont considérés comme indemnes de la maladie due à la récente mise en œuvre avec succès des campagnes d’élimination des glossines.

De manière générale, on remarque sur la **Figure 2** une décroissance rapide du nombre de cas dépistés de 1998 à 2006, puis une décroissance plus lente et l’apparition d’un plateau à partir de 2006. Ce plateau pourrait être dû à une augmentation de la population visitée (et donc une augmentation du nombre de cas dépistés même en cas de baisse des prévalences), ou à la diminution de l’efficacité des efforts de lutte déployés, principalement médicaux. Cette question est d’autant plus importante dans le contexte actuel des vastes campagnes d’élimination des trypanosomoses lancées par l’OMS (Simarro *et al.*, 2008; Simarro *et al.*, 2011) et l’Union Africaine via le PATTEC (Pan African Tsetse Eradication Campaign)

(Kabayo, 2002), campagnes lors desquelles il sera impératif d'optimiser les efforts de lutte surtout si le support financier revenait à décroître comme ce fût le cas dans les années 1970.



**Figure 2 : Evolution du nombre de cas rapportés des deux formes de la THA (1998-2009) (Simarro *et al.*, 2010)**

En Afrique de l'Ouest, la THA sévit actuellement en Guinée et en Côte d'Ivoire (**Tableau I**). En Guinée, la THA était déjà fortement prévalente dans les années 1930-1940 (Bregues *et al.*, 1964). On estime actuellement à 2,5 millions le nombre de personnes exposées au risque de la maladie (aire de répartition des glossines), soit plus du tiers de la population totale du pays estimée à 6,5 millions en 1994 (Camara *et al.*, 2005). La Guinée est classée dans le groupe des pays à niveau d'endémicité élevé (WHO, 2010) et la prévalence y est probablement la plus forte parmi les pays de la sous-région d'Afrique de l'Ouest (Courtin *et al.*, 2008). Peu d'études ont concerné la THA en Guinée et peu de données sont disponibles malgré les efforts réalisés par le Ministère de la santé et le programme national de lutte contre la THA (PNLTHA). En Guinée, l'endémie s'exprime à travers un faciès épidémiologique particulier en rapport avec l'écosystème de mangrove, dont la topographie s'étend sur la zone côtière depuis la frontière de la Sierra Leone à celle de la Guinée Bissau. Cette zone concerne principalement les préfectures de Boffa, Dubréka et Forécariah (Vanhecke *et al.*, 2010). Les

cas de THA sont originaires de la mangrove où les gens s'exposent au risque d'infection lors de la pêche, la culture du riz, la collecte du bois de chauffage et du sel (Courtin *et al.*, 2010a). Moins de 100 nouveaux cas de THA sont rapportés par an (Simarro *et al.*, 2010; WHO, 2010). En Afrique de l'Ouest, les efforts de lutte se concentrent sur la Guinée qui est le pays le plus touché par la THA. C'est ainsi qu'une initiative d'élimination de la maladie dans les foyers de mangrove qui sont particulièrement concernés est en cours de mise en œuvre.

En Côte d'Ivoire, la transmission est signalée chez les travailleurs des plantations de cacao et de café dans le Centre-ouest du pays qui comprend les foyers de Daloa (région du Haut-Sassandra), Sinfra et Bonon (région de la Marahoué) et Oumé (région Fromager). Des cas sporadiques sont également signalés dans le Sud-est (Aboisso, région Sud de la Comoé) et de l'Ouest (région du Moyen Cavally) (Simarro *et al.*, 2010). La plupart des cas de THA sont regroupés dans le foyer de Bonon en Côte d'Ivoire (**Tableau I**) (Simarro *et al.*, 2010).

**Tableau 1 : Maladie du sommeil à *T. b. gambiense*: nouveaux cas rapportés entre 2000 et 2009 (Simarro *et al.*, 2010)**

Pays	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	Total
Angola	4546	4577	3621	3115	2280	1727	1105	648	517	247	22383
Benin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Burkina Faso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cameroun	27	14	32	33	17	3	15	7	13	24	185
République Centrafricaine	988	718	572	539	738	666	460	654	1194	1054	7583
Tchad	153	138	715	222	483	190	276	97	196	510	2980
Congo	111	894	1005	717	873	398	300	189	182	87	4756
<b>Côte d'Ivoire</b>	<b>188</b>	<b>92</b>	<b>97</b>	<b>68</b>	<b>74</b>	<b>42</b>	<b>29</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>8</b>	<b>625</b>
République Démocratique du Congo	16975	17322	13853	11481	10369	10269	8023	8162	7326	7183	110963
Guinée équatoriale	16	17	32	23	22	17	13	15	11	7	173
Gabon	45	30	26	26	49	53	31	30	24	14	328
Gambie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Ghana	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Guinée</b>	<b>52</b>	<b>72</b>	<b>132</b>	<b>130</b>	<b>95</b>	<b>94</b>	<b>48</b>	<b>69</b>	<b>90</b>	<b>79</b>	<b>861</b>
Guinée-Bissau	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Liberia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Mali	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Niger	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Nigeria	14	14	26	31	10	21	3	0	0	0	119
Senegal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Sierra Leone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Soudan	1801	1919	3121	3061	1742	1853	789	469	623	376	15754
Togo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ouganda	948	310	604	517	378	311	290	120	198	99	3775
<b>Total des cas rapportés</b>	<b>25865</b>	<b>26117</b>	<b>23836</b>	<b>19963</b>	<b>17130</b>	<b>15644</b>	<b>11382</b>	<b>10473</b>	<b>10388</b>	<b>9688</b>	<b>170486</b>

La lutte contre cette maladie repose sur deux principales stratégies, l'une médicale basée sur le diagnostic et le traitement des trypanosomés afin de réduire le réservoir humain de parasites, l'autre basée sur la lutte contre les glossines visant à réduire le réservoir de vecteurs de parasites mais aussi les densités de mouches tsé-tsé pour réduire les chances de transmission du parasite. Malheureusement, la lutte anti-vectorielle (LAV) principalement chimique est souvent peu utilisée dans le cadre de la lutte contre la THA, surtout pour des raisons logistiques et financières. Des projets sont en cours pour réduire le coût et optimiser cette stratégie de lutte (Rayaisse *et al.*, 2010) qui a déjà prouvé son efficacité (Laveissiere et Méda, 1993). Actuellement, la lutte contre la THA repose donc essentiellement sur la lutte médicale et la surveillance épidémiologique. La partie suivante décrit les méthodes utilisées pour diagnostiquer et traiter les trypanosomés.

## **1.4. Le diagnostic et le traitement de la THA**

La démarche médicale du diagnostic repose souvent sur un diagnostic clinique. Le prochain paragraphe décrit les manifestations cliniques de la THA.

### **1.4.1. Le diagnostic clinique**

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. La maladie évolue chez l'homme en deux phases : la première phase ou phase lymphatico-sanguine durant laquelle le parasite se multiplie dans le sang et la lymphe, et la deuxième phase ou phase méningo-encéphalitique qui correspond au passage du parasite dans le LCR puis à l'envahissement du système nerveux central (SNC) (Kristensson *et al.*, 2010).

Chez l'homme, on observe un chancre d'inoculation (trypanome) qui apparaît dans les quelques jours suivant la piqûre d'une glossine infectée. Il se caractérise par un érythème, une élévation de la température, un œdème et une hyperesthésie. Tout autour de la zone œdématisée, on observe généralement une zone circulaire desquamée (furoncle non purulent). Cette lésion est le témoin de la multiplication du trypanosome *in situ*, qui envahit ensuite le système lymphatique puis sanguin. Il est fréquemment observé dans l'infection à *T. b.*

*rhodesiense* mais rare dans l'infection à *T. b. gambiense*. Ensuite, au cours de la première phase, les symptômes les plus couramment observés sont la fièvre, les céphalées, l'asthénie et des douleurs musculaires et articulaires (Louis *et al.*, 2001). 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. Des signes plus spécifiques traduisent l'envahissement des différents viscères tels que le foie, la rate et le cœur. Une hépatosplénomégalie ainsi que des troubles cardio-vasculaires sont aussi parfois rencontrés. Des signes cutanés, spécifiques ou non, sont très fréquents (prurit, éruptions cutanées et trypanides). Les adénopathies cervicales (signes de Winterbottom) (**Figure 3**) apparaissent pendant cette période, en réponse à l'envahissement du système lymphatique, et témoignent de l'activité intense du système immunitaire. D'autres signes cliniques comme des œdèmes (des membres ou de la face) ou des troubles endocriniens (aménorrhée, impuissance) apparaissent aussi au cours de la première phase et s'aggravent au cours de la deuxième phase.

La plupart des signes cliniques décrits pour la première phase persistent lors de la deuxième phase : certains 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 et cutanés), les troubles neuroendocriniens (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 phase (**Figure 3**). Cette énumération n'est pas exhaustive et tout signe neurologique insolite doit alerter sur un risque de THA. En l'absence de traitement, l'état général du trypanosomé 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 (Checchi *et al.*, 2008).



Figure a: Adénopathies cervicales



Figure b: Trypanides



Figure c: Troubles du sommeil



Figure d: Confusion mentale, désorientation

**Figure 3 : Quelques signes cliniques de la THA (source : IRD/CIRDES)**

Dans le cas de la forme chronique de la THA, la première phase peut durer de plusieurs mois à plusieurs années, la parasitémie fluctuante restant souvent faible. Au cours de cette phase, les symptômes sont peu prononcés et le trypanosomé n'éprouve souvent pas le besoin de consulter un médecin. Il reste donc dans le foyer et constitue une source de contamination. L'apparition des troubles neurologiques lors de la deuxième phase est souvent très progressive. Dans le cas de la forme aiguë rhodésienne, la première phase 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 (Garcia *et al.*, 2006). Concernant la forme gambienne, on observe une grande diversité d'évolutions « cliniques » allant de formes totalement asymptomatiques (Jamonneau *et al.*, 2000a) à des formes aiguës (Truc *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 2000).

L'existence de formes asymptomatiques dues à *T. b. rhodesiense* est de plus en plus fréquemment mentionnée (Tshimungu *et al.*, 2010). Un nombre 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 (Smith et Bailey, 1997; MacLean *et al.*, 2004).

Les signes cliniques de la THA 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, surtout dans le cas de la forme chronique gambienne pour laquelle la phase lymphatico-sanguine est parfois totalement asymptomatique. De plus, il semble exister une importante diversité d'évolutions cliniques. On a donc recours à des méthodes de diagnostic direct ou tests parasitologiques qui cherchent à mettre en évidence la présence du parasite dans les fluides biologiques (sang, suc ganglionnaire et LCR) et à des méthodes de diagnostic indirect ou tests sérologiques qui recherchent des traces de passage du parasite dans les mêmes fluides biologiques. En pratique et pour des raisons logistiques et financières, les tests sérologiques peu onéreux et simple d'emploi sont utilisés préalablement (diagnostic de masse) pour déterminer les sujets sur lesquels porteront les tests parasitologiques. De nombreuses méthodes de diagnostic direct ou indirect existent pour confirmer le diagnostic de la THA (Chappuis *et al.*, 2005). Nous ne décrivons ici que les méthodes actuellement utilisées en pratique courante et notamment celles qui l'ont été dans le cadre de cette thèse.

#### ***1.4.2. Méthodes de diagnostic indirect***

De nombreux tests sérologiques ont été développés pour la détection indirecte du parasite par la mise en évidence d'anticorps ou d'antigènes spécifiques dans le sang, le plasma ou le sérum.

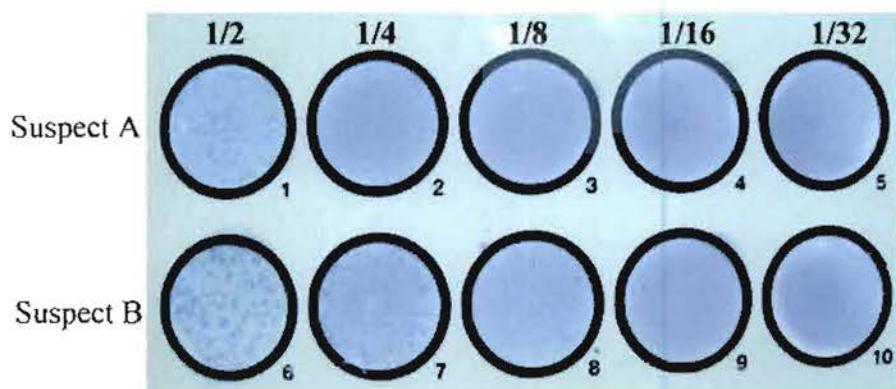
Le CATT/*T. b. gambiense*, *Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*, (Magnus *et al.*, 1978) est actuellement le plus utilisé en matière de dépistage de masse. Il répond à toutes les exigences d'un test de terrain : très simple d'emploi, bon marché et de lecture immédiate (Noireau *et al.*, 1986). 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 prélevé

à la pulpe du doigt sur microcapillaire. En présence d'anticorps spécifiques, se forment des agglutinats macroscopiques colorés et visibles à l'œil nu (**Figure 4**). Afin d'augmenter la spécificité du test, un CATT sur dilutions successives de plasma (CATT/pl) (**Figure 5**) est effectué sur tous les individus positifs au CATT sur sang total (CATT/sg). Néanmoins, le test CATT recommandé par l'OMS (WHO, 1998) pour le dépistage de masse présente comme tous les tests sérologiques, des inconvénients. Des études ont montré qu'il manquait 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 recherchés (anti LiTat 1.3) (Dukes *et al.*, 1992). Un manque de spécificité souvent attribué à des réactions croisées avec d'autres trypanosomes ou d'autres parasites humains (Noireau *et al.*, 1986) ou à la persistance d'anticorps durant plusieurs mois, voire plusieurs années après traitement (Simarro *et al.*, 1999; Chappuis *et al.*, 2004) a aussi été évoqué.



**Figure 4 : Illustration du CATT effectué sur sang total (CATT/sg) (source IRD/CIRDES)**

Sur la figure 4, 10 patients ont été testés correspondant aux 10 cercles numérotés de 1 à 10. Le cercle 8 montre une agglutination qui signe un test CATT/sg positif pour le patient N°8.



**Figure 5: Illustration du CATT effectué sur plasma (CATT/pl) (source IRD/CIRDES)**

Les cercles 1 à 5 correspondent au CATT/pl effectué sur dilutions successives du plasma (cercle 1 = dilution 1/2, 2 = dilution 1/4 ; 3 = 1/8, 4 = 1/16 et 5 = 1/32) d'un sujet précédemment positif au CATT/sg (suspect sérologique A). On voit que pour ce sujet, la dernière dilution montrant une agglutination est la dilution 1/4 (cercle 2), le résultat est noté CATT/pl = 1/4.

Les cercles 6 à 10 correspondent aux mêmes dilutions d'un deuxième suspect sérologique B. Pour ce sujet, la dernière dilution montrant une agglutination est la dilution 1/8 (cercle 8), le résultat est noté CATT/pl = 1/8.

De nouvelles techniques, comme le Latex/*T. b. gambiense* (Buscher *et al.*, 1991; Buscher *et al.*, 1999), ont été développées ces dernières années pour améliorer les performances du diagnostic sérologique. Cependant les résultats de l'évaluation (Jamonneau *et al.*, 2000b; Penchenier *et al.*, 2003) montrent que les problèmes de sensibilité et de spécificité demeurent. Actuellement, des résultats prometteurs ont été obtenus par une méthode 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). Cette technique est encore en cours d'évaluation.

Cependant, et de manière générale, en cas de positivité de l'un de ces tests, le parasite doit être mis en évidence par une méthode directe pour décider du traitement (WHO, 1998).

### 1.4.3. Méthodes de diagnostic direct

Le traitement de la THA nécessite au préalable la mise en évidence directe du parasite dans la lymphe, le sang ou le LCR du patient (WHO, 1986). La recherche du parasite dans la lymphe se fait en cas de présence d'adénopathies cervicales, par examen direct au microscope optique du suc ganglionnaire ponctionné et étalé entre lame et lamelle. 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 des infections à *T. b. gambiense*, la parasitémie est souvent très faible et pour obtenir une meilleure sensibilité, on utilise souvent des méthodes de concentration comme la centrifugation en tubes capillaires CTC, (Woo, 1970), le Quantitative Buffy-Coat QBC, (Bailey et Smith, 1992) ou la filtration sur mini-colonne échangeuse d'ions (miniature Anion Exchange Centrifugation Technique, mAECT), (Lanham et Godfrey, 1970; Lumsden *et al.*, 1977).

La mAECT est la méthode la plus sensible pour la détection des trypanosomes dans le sang (Chappuis *et al.*, 2005). Sur mini-colonne, les trypanosomes sont séparés à partir de 350µl de sang par chromatographie échangeuse d'anions sur du diethylaminoethyl (DEAE) cellulose. Les trypanosomes sont élués ensuite dans un tube collecteur transparent et concentrés par centrifugation. La recherche des parasites se fait par observation directe de l'éluât de trypanosomes au microscope optique. La quantité de sang examiné permet un seuil de détection de 50 trypanosomes/ml de sang (Buscher *et al.*, 2009). Des études expérimentales récentes auxquelles j'ai participé ont permis d'améliorer le protocole de la mini-colonne (Buscher *et al.*, 2009) et d'améliorer le seuil de détection à 10 tryp/ml en utilisant du buffy-coat en amont du test (Camara *et al.*, 2010). Cependant, il est toujours reproché à ces tests parasitologiques actuellement utilisés de manquer de sensibilité du fait des parasitémies faibles (Koffi *et al.*, 2006). Pour le dépistage de la THA, on utilise des arbres décisionnels qui font intervenir des tests sérologiques et parasitologiques. La **Figure 6** décrit un exemple d'arbre décisionnel qui est celui qui a été utilisé dans le cadre de ce travail et qui est souvent utilisé dans les zones de faibles prévalences rencontrées en Afrique de l'Ouest. La première étape consiste à recenser toutes les personnes présentes sur lesquelles est effectué le test de dépistage de masse, le CATT/sg. Les sujets positifs à ce test sont alors prélevés au pli du coude pour effectuer le CATT/pl. Les examens parasitologiques (mAECT et/ou observation microscopique du suc ganglionnaire) sont alors effectués sur tous les sujets positifs au CATT/pl ( $\text{CATT/pl} \geq 1/8$ ). Les sujets positifs à l'un de ces tests (parasite mis en

évidence) sont alors confirmés trypanosomés. Il faut alors effectuer un diagnostic de phase sur le LCR afin de déterminer le stade de la maladie qui conditionne le traitement.

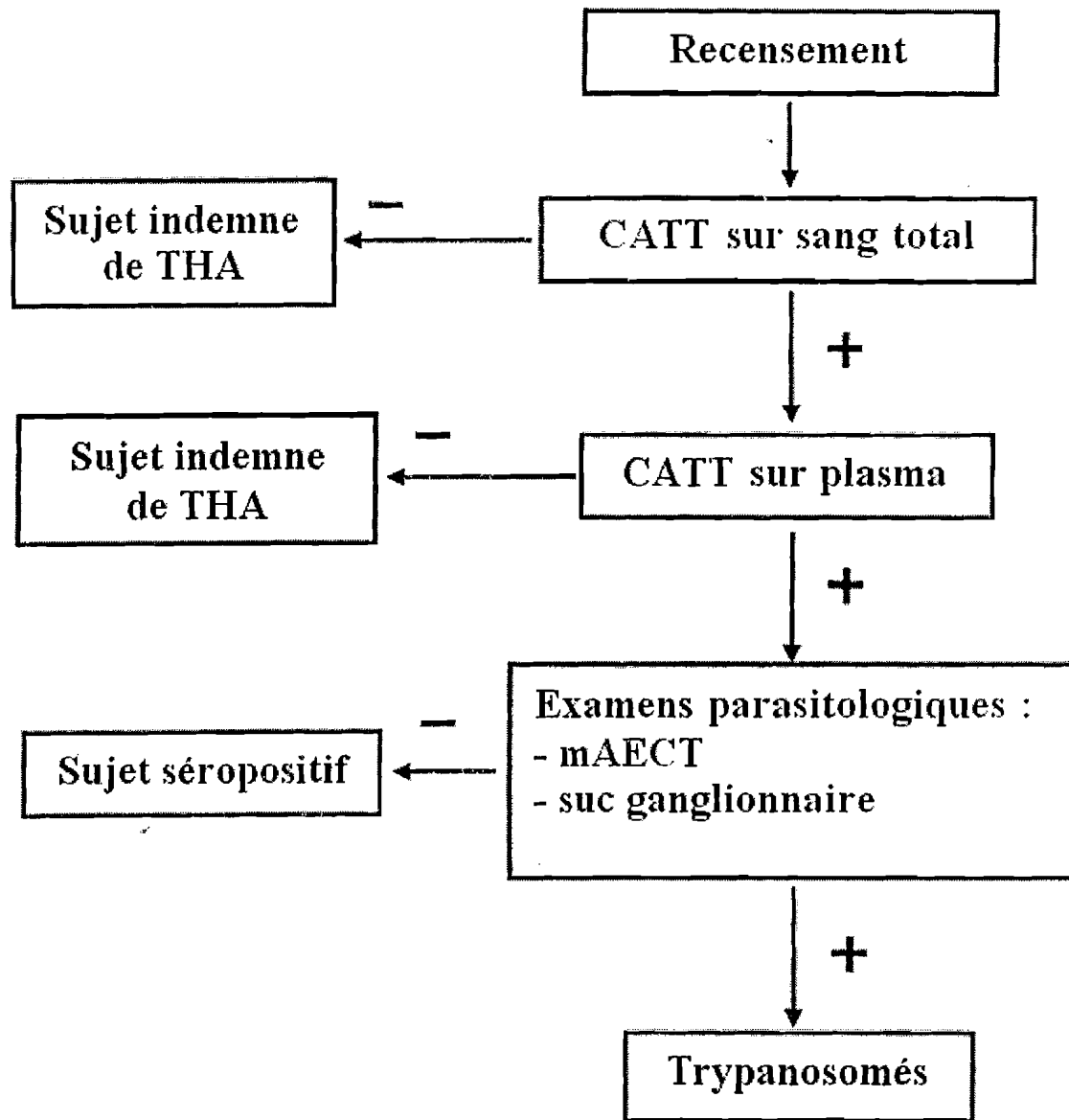


Figure 6 : Dépistage de la trypanosomose humaine africaine, arbre décisionnel utilisé dans le cadre de ce travail.

#### 1.4.4. Diagnostic de phase et traitement de la THA

L'examen du LCR permet de déterminer s'il y a atteinte du système nerveux central (diagnostic de phase) et donc le stade de la maladie qui conditionne la nature du traitement à administrer selon l'espèce de *T. brucei* considérée (Docampo et Moreno, 2003; Radwanska, 2010). Le diagnostic de phase peut se faire de façon directe par simple ou double centrifugation du LCR (Cattand *et al.*, 1988; Miezan *et al.*, 2000) ou de façon indirecte par comptage des leucocytes (cytorachie). L'OMS préconise, pour un diagnostic de deuxième phase, une cytorachie supérieure à 5 cellules/ $\mu$ l avec ou sans mise en évidence des trypanosomes dans le LCR (WHO, 1998).

De manière générale, un trypanosomé en première phase lymphatico-sanguine (stade 1, cytorachie  $\leq$  5 cellules/ $\mu$ l et absence de trypanosome dans le LCR) sera traité à la pentamidine (Sanderson *et al.*, 2009) utilisée pour les infections à *T. b. gambiense*, ou à la suramine sodique (Iten *et al.*, 1995) pour les infections à *T. b. rhodesiense*. Un trypanosomé en seconde phase neurologique (stade 2, cytorachie  $>$  5 cellules/ $\mu$ l avec ou sans trypanosomes dans le LCR) sera traité au mélarsoprol quelle que soit la forme de THA. La deuxième phase de la forme gambienne peut aussi être traitée à l'éflornithine (D, L- $\alpha$ -difluorométhylornithine [DFMO]) (Heby *et al.*, 2007). Il faut préciser que les médicaments utilisés pour les trypanosomés en première phase (pentamidine, suramine) sont considérés peu toxiques, alors que le mélarsoprol utilisé pour la seconde phase, est un dérivé arsenical hautement toxique avec d'importants effets secondaires. Il est entre autre responsable d'environ 10% d'encéphalopathies réactives parmi les trypanosomés traités, dont la moitié est mortelle (Blum *et al.*, 2001). L'éflornithine qui est une alternative moins toxique au mélarsoprol (Fevre *et al.*, 2006) est malheureusement très onéreuse (nécessite notamment des perfusions), ce qui limite sa distribution.

La toxicité du mélarsoprol fait que le seuil de la cytorachie défini par l'OMS est actuellement controversé car la présence de 5 cellules/ $\mu$ l de LCR ne traduit pas forcément une atteinte du système nerveux central. Il faut aussi garder en mémoire que le seuil de normalité de la cytorachie varie en fonction de l'âge : il est normal jusqu'à 30 cellules/ $\mu$ l pendant la première année de vie, normal jusqu'à 20 cellules/ $\mu$ l entre un et quatre ans, normal jusqu'à 10 cellules/ $\mu$ l de cinq ans à la puberté (Kjeldsberg et Knight, 1993). Dans certains pays comme l'Angola et la Côte d'Ivoire, des études ont montré que des sujets ayant jusqu'à 20 cellules/ $\mu$ l pouvaient être traités efficacement à la pentamidine même avec mise en évidence du

trypanosome dans le LCR (Doua *et al.*, 1996; Stanghellini et Josenando, 2001). Ces auteurs préconisent d'utiliser ce seuil pour la décision thérapeutique. C'est ainsi qu'en Guinée par exemple, on définit une phase intermédiaire « phase 2 précoce » appelée stade 2. Pour la prise en charge thérapeutique de notre étude, les trypanosomés au stade 1 (S1) ont bénéficié du protocole thérapeutique par la pentamidine en intramusculaire à la posologie de 4 mg/kg/jour pendant 7 jours (7 injections). Les trypanosomés au stade 2 (S2) correspondant à la phase 2 précoce ont bénéficié également d'un protocole à la pentamidine mais selon la posologie de 4 mg/kg/jour en intramusculaire un jour sur deux pendant 20 jours (10 injections). Les trypanosomés au stade 3 (S3) correspondant à la phase 2 avancée ont été traités au mélarsoprol (32 jours) en trois séries de quatre injections en intraveineuse, 1,2 mg/kg à J1, puis 2,4 mg/kg à J2, et enfin 3,6 mg/kg/jour à J3 et J4, séparées de dix jours.

Le diagnostic de phase est d'une importance capitale en l'absence d'un traitement non toxique et bon marché des phases neurologiques. Plusieurs études cherchent de nouvelles méthodes, plus sensibles et spécifiques et si possible non invasives afin d'éviter la ponction lombaire qui est traumatisante pour les sujets prélevés. Le degré d'altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE), corrélé avec la gravité de l'atteinte neurologique peut être évalué par plusieurs examens biochimiques (dosage d'immunoglobulines du LCR) et pourrait être un bon marqueur de seconde phase (Lejon *et al.*, 1999; Lejon *et al.*, 2007). Des marqueurs ont été développés permettant d'améliorer la détection du parasite (HAT-PCR-OC) et la spécificité de la détection protéique (dosage des IgM, IgG). Ils permettent aussi d'améliorer la spécificité de la détection humorale (dosage de cytokines) et cellulaire (Courtioux *et al.*, 2008). Il y a aussi des méthodes protéomiques qui ont donné des résultats prometteurs. Ces méthodes utilisent l'ostéopontine et la beta-2-microglobuline (Tiberti *et al.*, 2010), la molécule Matrix métalloprotéinase-9 et la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (Hainard *et al.*, 2011) comme marqueurs de stade de la THA. Mais ces méthodes sont toujours utilisées à titre expérimental et restent maintenant à être validées sur le terrain. Malgré son manque de spécificité et la difficulté de définir le seuil à partir duquel un individu doit être considéré comme étant en phase neurologique, le comptage des leucocytes reste encore actuellement un élément clé pour la détermination du stade et la décision thérapeutique.

Une solution pour éviter l'usage du mélarsoprol et généraliser celui de la pentamidine, serait de dépister les malades avant leur évolution en seconde période. Malheureusement, en absence de signes cliniques spécifiques de la maladie en première phase, le trypanosomé qui

attribuera son mal à une autre maladie comme le paludisme ne jugera pas nécessaire de se rendre dans une structure de santé. Il ne s'y rendra qu'après l'apparition des troubles neurologiques. La seule solution est alors de généraliser le dépistage actif dans les zones à risque, mais là encore, cette stratégie est très onéreuse.

Les traitements de la THA sont soit très onéreux, soit toxiques. De plus, des cas d'échecs au mélarsoprol se multiplient (WHO, 2002; Pepin et Mpia, 2005). Il est primordial de trouver des alternatives pour optimiser la prise en charge thérapeutique des trypanosomés (Burri, 2010). La conception d'un vaccin serait la solution idéale, mais elle se heurte entre autre à la variation antigénique du parasite (voir ci-dessous). Le développement de nouveaux médicaments contre la THA a subi un sérieux revers lorsque le nouveau médicament oral de la première phase, le maléate de pafuramidine (DB289) a échoué presque à la fin du programme de développement en raison de sa néphrotoxicité (Brun *et al.*, 2010). Actuellement, aucune autre molécule n'est au stade de développement clinique pour le traitement de la THA. Cependant, des études menées principalement en République Démocratique du Congo (Médecin Sans Frontière) et en Ouganda (Epicentre) ont permis de tester une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur une bithérapie « Nifurtimox-eflornithine combination therapy NECT » (Sokolova *et al.*, 2010; Yun *et al.*, 2010). Le NECT est la nouvelle stratégie actuelle de traitement préconisée par l'OMS (Simarro *et al.*, 2011). Cette stratégie efficace est moins toxique que le mélarsoprol et permet la réduction du coût du traitement. Par contre, il ne résout pas un autre problème très important du traitement de la THA : il demeure logistiquement compliqué à mettre en œuvre (Simarro *et al.*, 2011) et nécessite une longue hospitalisation ainsi que la présence d'un accompagnant pendant la durée du traitement entraînant ainsi une vulnérabilité de la famille concernée.

#### ***1.4.5. Le problème des sujets séropositifs sans confirmation parasitologique***

Nous avons vu que les techniques actuellement utilisées pour le diagnostic de la maladie du sommeil manquent souvent de sensibilité et/ou de spécificité : les équipes de dépistage doivent alors faire face à une situation plus complexe que la dichotomie trypanosomé/non-trypanosomé et notamment à des sujets positifs en sérologie sans confirmation parasitologique (Garcia *et al.*, 2000) que l'on nomme classiquement « sujets séropositifs » (SERO). Ce phénomène de sujets séropositifs sans confirmation parasitologique

peut être dû à des réactions croisées du test CATT avec des trypanosomes animaux (*T. b. brucei*, *T. congolense*) (Chappuis *et al.*, 2005) ou à d'autres maladies infectieuses (Diallo *et al.*, 1996), ou encore à la limite de détection des tests parasitologiques à cause de la parasitémie très faible ou fluctuante (Dukes *et al.*, 1984; Truc *et al.*, 1994).

Le test de trypanolyse (TL) est une technique immunologique qui utilise des trypanosomes vivants exprimant trois types de variants antigéniques, les plus fréquemment exprimés sont le LiTat 1.3, LiTat 1.5 et le LiTat 1.6. Comme contrôle de lyse non-spécifique dans le plasma testé, on utilise une souche de sérum résistant de *T. b. rhodésienne* Etat 1.2 R. 25 µl du sérum à tester est mélangé avec 25 µl du sérum de cobaye (source de complément). On ajoute 50 µl de suspension de trypanosomes vivants ( $10^7$  trypanosomes/ml) exprimant ces variants antigéniques connus. Après 90 mn d'incubation, la suspension est observée au microscope. Le principe est basé sur la capacité du complément à se fixer sur le complexe antigène-anticorps et provoquer la lyse cellulaire par clivage successif de ces composants. Le test est dit positif lorsque l'on a un pourcentage de lyse de plus de 50% pour au moins un des trois variants. Dans le cadre d'une étude visant à évaluer ce test (Van Meirvenne *et al.*, 1995) pour la surveillance épidémiologique de la THA, Jamonneau *et al.* (2010) ont utilisé du plasma recueilli chez des sujets CATT-positifs identifiés au cours des prospections médicales dans plusieurs foyers de THA en Afrique de l'Ouest (Guinée, Côte d'Ivoire et Burkina Faso) avec divers statuts épidémiologiques (foyers actifs, latents, ou historiques). Tous les cas de THA (trypanosomés) ont été positifs (TL+). Tous les sujets vivant dans une zone non endémique ont été négatifs (TL-). Une partie des sujets SERO ont été positifs (TL+). Mais le plus intéressant, c'est qu'une corrélation significative a été mise en évidence entre la proportion de SERO TL+ et le degré d'endémicité du foyer, ce qui n'était pas le cas avec les sujets CATT-positifs. La TL semble donc être un marqueur de contact avec *T. b. gambiense*. Dans cette étude, il a même été préconisé d'utiliser la TL pour identifier les sujets CATT-positifs non confirmés parasitologiquement qui devraient être suivis parce que potentiellement en contact avec *T. b. gambiense* (Jamonneau *et al.*, 2010). Cette étude confirme que parmi ces sujets identifiés SERO sur le terrain, certains (que l'on retrouve dans des zones non-endémiques) sont dûs au manque de spécificité du CATT (réactions croisées), mais que d'autres sont ou ont été en contact avec des trypanosomes.

Pour en savoir plus sur ce statut de SERO et sur leur rôle potentiel dans l'épidémiologie de la THA, des suivis de cohortes de ce type d'individus ont été menés. Le suivi de cohortes de sujets SERO en Angola (Simarro *et al.*, 1999) et au Sud-Soudan (Chappuis *et al.*, 2004) a montré qu'ils avaient un risque élevé de développer la maladie les années suivantes, en particulier ceux présentant des titres faibles de CATT/pl  $\geq 1/16$ . En Côte d'Ivoire, Garcia *et al.* (2000) ont effectué un suivi longitudinal de deux ans de 90 sujets SERO pour étudier l'évolution dans le temps de leur séropositivité. Cette étude a révélé une importante hétérogénéité allant de sujets se négativant totalement en sérologie à des sujets maintenant une forte séropositivité au cours du temps. Un seul individu a pu être confirmé en parasitologie pendant ce suivi. Les résultats obtenus semblent montrer que des facteurs individuels, tels que la réponse immunitaire à l'infection, pourraient être impliqués dans le phénomène de positivité au CATT sans confirmation parasitologique (Garcia *et al.*, 2000). En Guinée, Ilboudo *et al.* (2011) ont effectué un suivi de sujets trypanosomés et SERO pendant deux ans dans le foyer de Forécariah, en zone de mangrove. L'analyse des échantillons prélevés au cours du suivi de ces sujets a été réalisée avec le test sérologique trypanolyse (TL), afin de clarifier le rôle joué par ces sujets dans l'épidémiologie de la THA. Les résultats du suivi ont montré que les sujets trypanosomés traités et les SERO TL- ont leurs titres de CATT/pl qui ont diminué. Par contre, les sujets SERO TL+ ont maintenu de hauts titres de CATT/pl. Quatre des 17 SERO TL+ suivis se sont positivés en parasitologie durant l'étude (Ilboudo *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent fortement qu'au moins une partie des sujets SERO sont des porteurs asymptomatiques et que certains d'entre eux peuvent développer la maladie au cours de leur suivi. Ces résultats relancent le débat sur le traitement de ces sujets SERO positifs en TL dans un foyer où la prévalence devient faible, ceci afin de réduire au maximum le risque de transmission et d'éliminer durablement la maladie.

**Il est donc clair qu'en zone d'endémie, certains SERO sont ou ont été en contact avec *T. b. gambiense*. Ces sujets sont en général asymptomatiques et témoignent une fois de plus de l'importante diversité d'évolutions de la maladie et de réponses à l'infection. Ce phénomène peut être dû à des souches peu virulentes et pathogènes responsables d'une forme asymptomatique de THA avec des parasitémies très faibles (non détectables par les méthodes parasitologiques) ou à un phénomène de contrôle de l'infection au moyen d'une réponse immunitaire appropriée. Quoiqu'il en soit, ces sujets séropositifs**

sont suspectés de constituer un réservoir humain de parasites et de contribuer au maintien de l'endémie sommeilleuse dans un foyer (Garcia *et al.*, 2006).

Le traitement des sujets séropositifs sans confirmation parasitologique (SERO) reste une question controversée car l'OMS recommande uniquement le traitement des cas de parasitologies positives du fait de la toxicité et du coût des médicaments disponibles mais aussi et surtout des contraintes logistiques (longue hospitalisation du trypanosomé accompagné d'une personne, souvent un membre de la famille, souvent responsable de problème de vulnérabilité de la famille). Certains auteurs ont recommandé le traitement de ces sujets dans les populations où la prévalence de la maladie est élevée comme dans les foyers épidémiques ou de forte endémie, rencontrés en Afrique Centrale où une forte proportion de ces sujets développent la maladie dans les mois suivant leur identification (Simarro *et al.*, 1999). Dans ce contexte, il y a un risque moindre de traiter à tort un sujet faux positif. Pour Inojosa *et al.* (2006), cette stratégie ne devrait pas être appliquée lorsque la prévalence de la maladie est faible, comme c'est le cas en Afrique de l'Ouest mais aussi dans de nombreux foyers en Afrique Centrale (Inojosa *et al.*, 2006). En effet, dans ce contexte, peu de sujets développent la maladie et on risquerait de traiter à tort un grand nombre d'individus.

Ainsi le traitement des sujets séropositifs demeure une question ouverte jusqu'à ce que de nouveaux traitements tolérés et moins contraignants (administration orale) deviennent disponibles pour le traitement de la THA (Brun *et al.*, 2010). Des études sont toujours en cours pour améliorer nos connaissances sur ce statut et son réel rôle dans l'épidémiologie de la THA. L'utilisation d'outils moléculaires a permis des avancées dans ce domaine. Cet aspect qui fait l'objet de mon étude est développé dans le chapitre « apport de la biologie moléculaire dans l'étude de l'épidémiologie de la THA ».

# CHAPITRE II : LES TRYPANOSOMES

## 2.1. Définition

Les trypanosomes sont des unicellulaires microscopiques, de forme allongée, dont la locomotion est assurée par un unique flagelle et par des contractions pariétales. Ce sont des parasites obligatoires, intravasculaires et extracellulaires. Le trypanosome se nourrit essentiellement par endocytose.

## 2.2. Classification ou Taxonomie

La taxonomie subsécifique du complexe *Trypanosoma brucei ssp* a toujours été très discutée. Ces dernières années, des travaux basés sur des analyses phylogénétiques des séquences clonées d'ADNr, après amplification par PCR ont donné la classification suivante (Cavalier-Smith, 2004, 2009) de l'espèce *Trypanosoma brucei*. *Trypanosoma brucei* appartient au domaine des *Eukaryota*, au sous-domaine des *Bikonta* (avec les plantes et les algues brunes), au règne des *Excavata* ou *Excavabionta* (avec les *Metamonadina* dont *Giardia sp*), au super-embranchement des *Discicristata* (avec les *Percolozoa* dont *Naegleria sp*), à l'embranchement (phylum) des *Euglenozoa* (avec les euglènes) puis à la classe *Kinetoplastea*, à l'ordre *Trypanosomatida*, à la famille *Trypanosomatidae* et au genre *Trypanosoma* (Keeling *et al.*, 2009) (**Figure 7**). Le genre *Trypanosoma* comporte huit sous-genres regroupés en deux sections : *Stercoraria* et *Salivaria*.

- La section *Stercoraria* se caractérise par un mode de transmission "postérograde". Les formes métacycliques infectantes se trouvent dans la partie postérieure du tube digestif. La transmission chez l'hôte vertébré se fait après dépôt de fèces, par pénétration des trypanosomes dans la peau. Cette section comprend trois 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 infectants sont dans la partie antérieure du tube digestif. La transmission chez l'hôte vertébré se fait par inoculation, lorsque le vecteur (insecte) injecte sa salive au moment de la

piqûre qui précède immédiatement la prise d'un repas sanguin. Les trypanosomes pathogènes existant sur le continent africain appartiennent tous à la section des *Salivaria*. Elle se compose de cinq sous-genres : *Duttonella* (*T. vivax*, *T. uniforme*), *Nannomonas* (*T. congolense*, *T. simiae*, *T. godfreyi*), *Tejeraia*, *Pycnomonas* (*T. suis*) et *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi* et *T. equiperdum*).

Le sous-genre *Trypanozoon* regroupe trois espèces : *Trypanosoma equiperdum*, agent de la dourine des équidés d'Europe, d'Afrique du nord et d'Asie ; *Trypanosoma evansi*, responsable du surra des équidés ainsi que du débab des camélidés en Amérique latine, en Afrique et Asie, et enfin *Trypanosoma brucei* parasitant divers mammifères en Afrique.

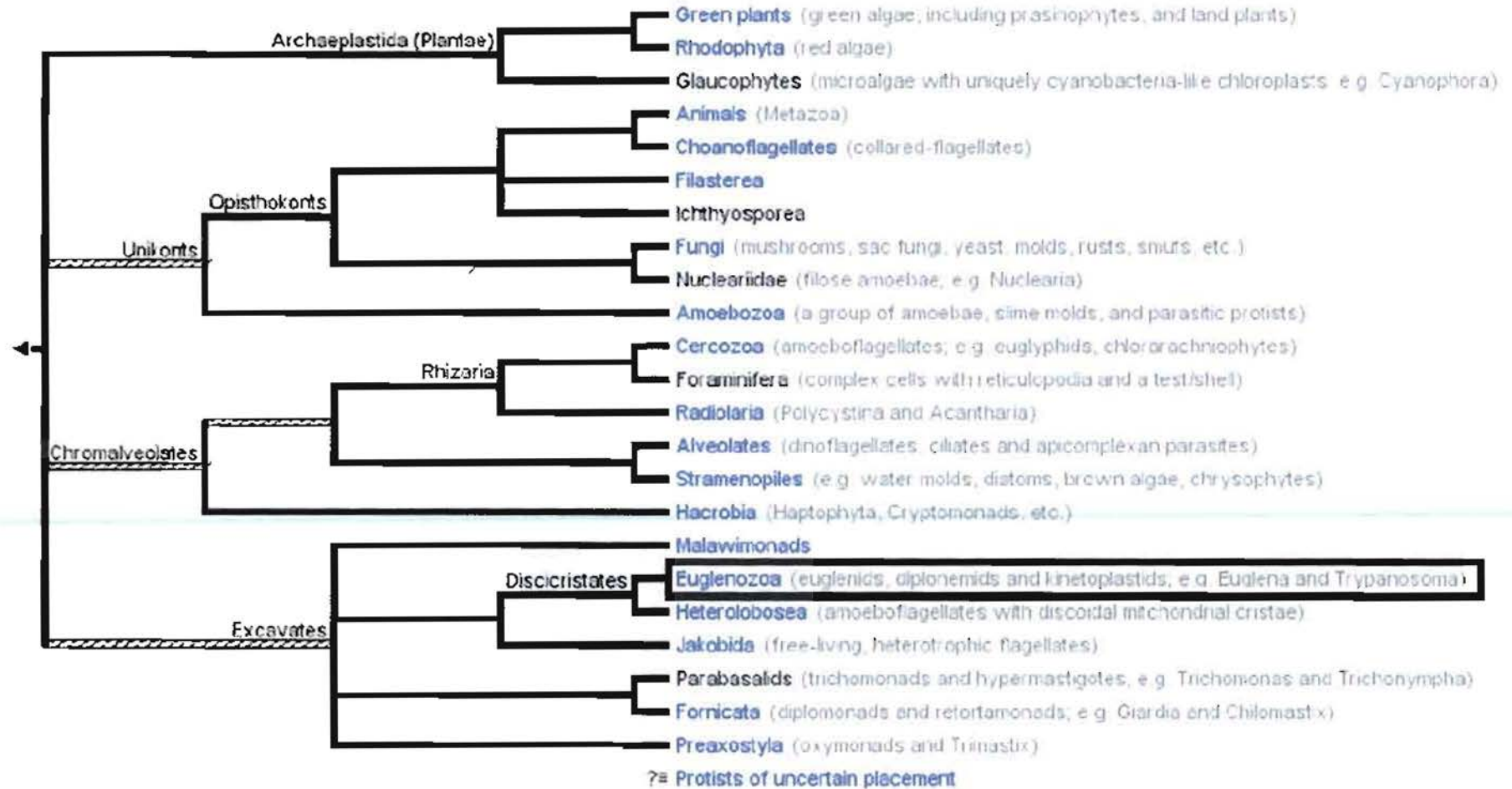
L'espèce *Trypanosoma brucei* est classiquement divisée en trois sous-espèces non distinguables morphologiquement (Hoare, 1972). Leur identification est classiquement basée sur des caractères extrinsèques du parasite, c'est-à-dire des critères d'hôtes, de vecteurs, de répartition géographique et d'aspects cliniques de la maladie.

➤ *Trypanosoma brucei gambiense* Dutton 1902, est l'agent de la maladie du sommeil chez l'homme en Afrique Centrale et Occidentale. Ce parasite est transmis par les glossines du groupe *Glossina palpalis* (*G. palpalis*, *G. fuscipes* et *G. tachinoïdes*) dans les sous-bois, aux bords des eaux. Il provoque classiquement une maladie de type chronique.

➤ *Trypanosoma brucei rhodesiense* Stephens et Fantham 1910, est responsable de la forme aiguë de la maladie du sommeil chez l'homme en Afrique de l'Est. Ce parasite est transmis par les glossines du groupe *Glossina morsitans* (*G. morsitans*, *G. pallidipes* et *G. swynnertoni*). Il provoque typiquement une forme aiguë de la maladie.

➤ *Trypanosoma brucei brucei* Plimmer et Bradford 1899, non pathogène pour l'homme, est responsable du nagana des mammifères domestiques et sauvages. Le nagana sévit sur toute l'aire de répartition du parasite.

Figure 7 : Arbre phylogénétique des Eucaryotes (Keeling *et al.*, 2009)



## 2.3. Morphologie et cycle biologique du parasite

### 2.3.1. Morphologie

Les trypanosomes sont des parasites extracellulaires. Leur forme classique est celle d'une cellule fusiforme et aplatie, avec une membrane ondulante plus ou moins enroulée autour du corps et prolongée vers l'avant par un flagelle libre. Cependant, cette forme varie d'une espèce du parasite à une autre et aussi au cours du cycle biologique. Leur taille varie selon l'espèce, *T. brucei ssp* mesure de 12 à 42  $\mu\text{m}$  de long sur 2 à 3  $\mu\text{m}$  de large (**Figure 8**). Ils se multiplient essentiellement par division binaire longitudinale. Ils possèdent un noyau diploïde avec une membrane nucléaire et des organites : un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, un réseau endo et exocyttaire, une mitochondrie unique et un flagelle (Berriman *et al.*, 2005; Kohl et Bastin, 2005). Les trypanosomes se caractérisent par la présence d'un kinétoplaste (organite cytoplasmique). Plus précisément, en microscopie optique, outre les constituants fondamentaux de la cellule (noyau, cytoplasme et membrane), l'ultra-structure des trypanosomes montre (**Figure 8**) :

→ le noyau avec sa double membrane perforée, sa chromatine périphérique et son nucléole ;

→ l'appareil de Golgi, formé de membranes et vésicules aplaties ;

→ le réticulum endoplasmique, ici de type granulaire (avec des ribosomes) ;

→ la membrane cytoplasmique, sous laquelle se trouve une série de microtubules subpelliculaires qui joueraient un rôle de cytosquelette, et sur laquelle se trouve une couche épaisse de glycoprotéines (support de l'antigène variable). Cette membrane cytoplasmique montre la même structure que la membrane flagellaire ;

→ le kinétoplaste, qui est en fait une partie différenciée de l'énorme mitochondrie unique, occupe tout le corps du trypanosome ;

→ le flagelle, formé d'axonèmes avec neuf paires de microtubules périphériques entourant deux microtubules centraux, et d'un batonet (pseudo-chromosome) paraxial, formé d'un réseau de filaments. Le flagelle est issu d'un corps basal situé au fond de la poche flagellaire.

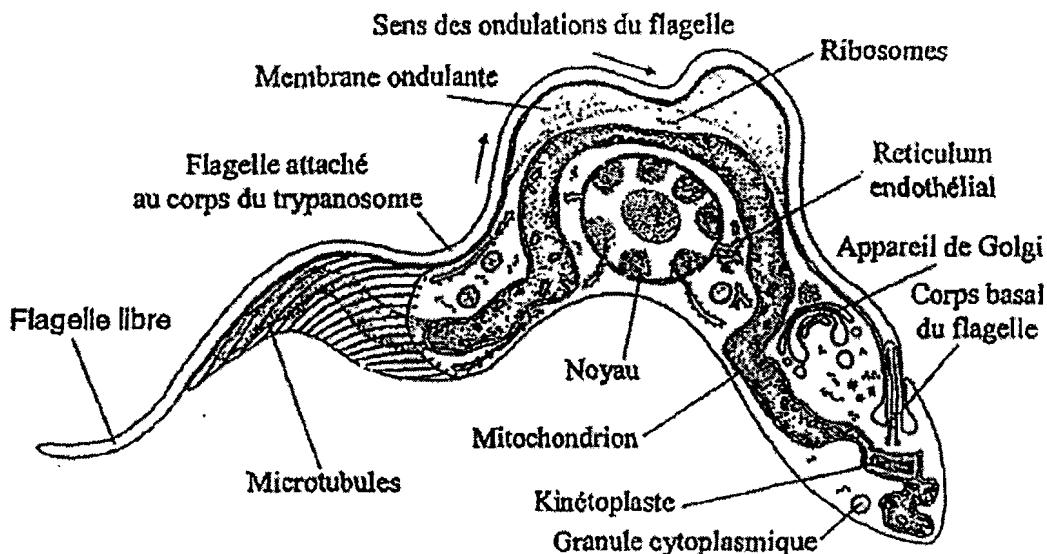


Figure 8 : Morphologie de *T. brucei* (Laveissière *et al.*, 2000)

### 2.3.2. Cycle biologique du parasite

Le cycle biologique de *T. brucei s.l.*, parasite dixène obligatoire, nécessite deux hôtes pour se développer et se reproduire (Figure 9).

#### 2.3.2.1. Chez l'insecte vecteur (*Glossine*)

Chez tous les trypanosomes de la section *Salivaria*, le développement chez la glossine s'effectue dans les portions antérieures ou moyennes du tube digestif. La durée de son développement au sein de la glossine est variable en fonction de l'espèce de trypanosome. Elle est d'environ 30 jours pour *T. brucei*. Lors du repas de sang sur un hôte infecté, la glossine ingère les formes trypomastigotes courtes ou "formes trapues". Après avoir traversé l'œsophage et le proventricule, les trypomastigotes se multiplient activement dans l'intestin moyen de la glossine et se transforment en trypomastigotes procycliques (formes grêles), puis contournent la membrane péritrophique à son extrémité postérieure pour passer dans l'espace ectopéritrophique. Dans cet espace, apparaissent des formes épimastigotes (migration du corps basal du flagelle en avant du noyau). Les parasites remontent vers la région antérieure de l'intestin, retraversent la membrane péritrophique au niveau du proventricule, gagnent alors l'hypopharynx et, enfin les glandes salivaires. Fixés à la paroi, les trypanosomes sous

forme épimastigote se multiplient puis donnent des formes trypomastigotes métacycliques. Celles-ci constituent les formes infectieuses pour l'hôte vertébré et sont entraînées par la salive de l'insecte lors de la piqûre (**Figure 9**). Ces formes trypomastigotes métacycliques se multiplient activement vers le 3<sup>ème</sup>-4<sup>ème</sup> jour pour *T. brucei* et se maintiennent environ deux mois dans les glandes salivaires.

#### 2.3.2.2. Chez l'hôte mammifère

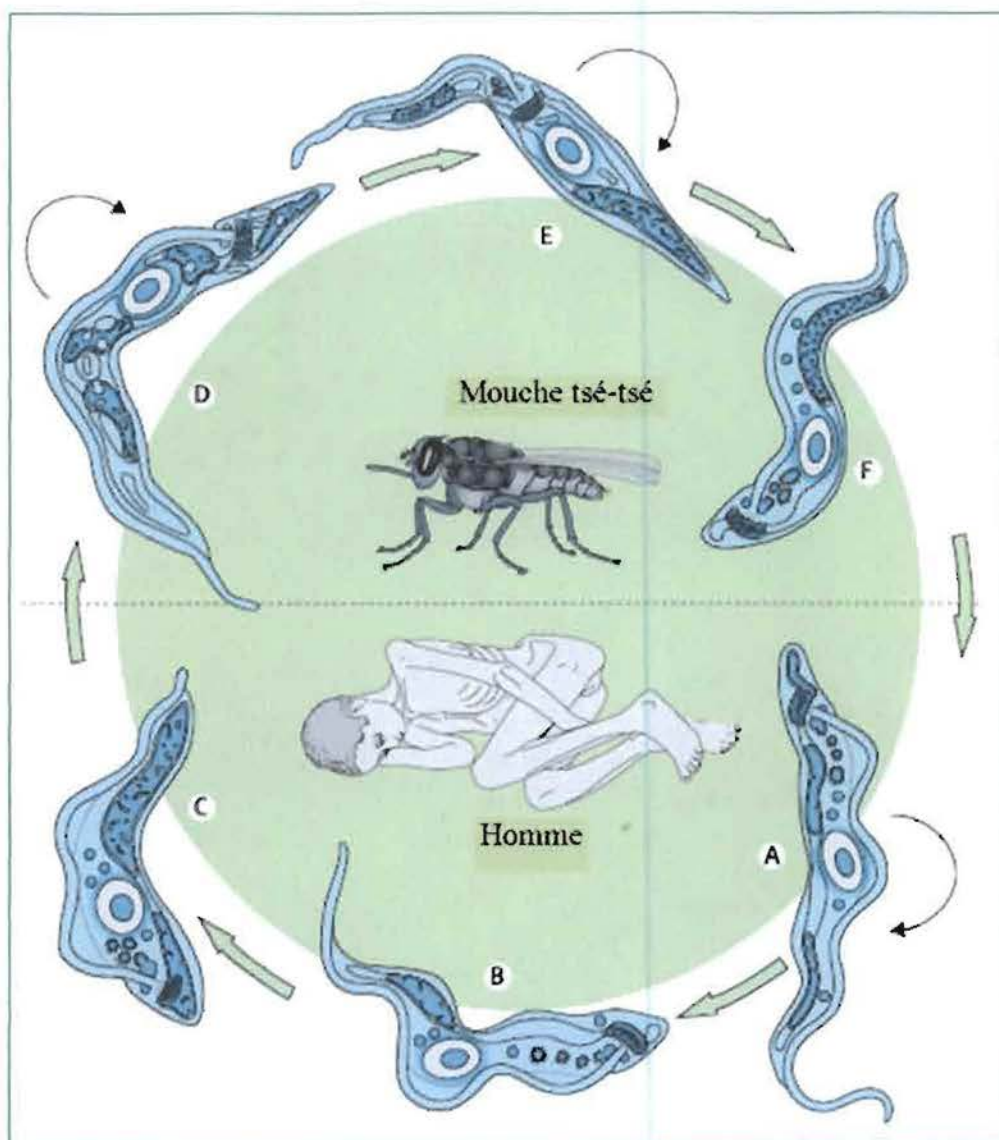
Les formes métacycliques infectieuses présentes dans les pièces buccales de la glossine, sont injectées dans le derme d'un mammifère lors d'un repas sanguin. Les métacycliques se multiplient au point d'inoculation pendant plusieurs jours en déterminant parfois une réaction inflammatoire appelée chancre. De là, les trypomastigotes envahissent la circulation générale par voie lymphatique et sanguine. Après cette phase lymphatico-sanguine plus ou moins longue, les trypanosomes finissent par envahir le liquide céphalo-rachidien et les centres nerveux. Comme tous les trypanosomes du sous-genre *Trypanozoon*, *T. b. gambiense* est caractérisé par un important polymorphisme (pléomorphisme). On distingue trois formes de trypomastigotes (Hoare, 1972) : formes longues, formes intermédiaires et formes courtes (**Figure 9**) (Brun *et al.*, 2010).

- Les formes longues ou formes grêles (type Slender) mesurent en moyenne 29  $\mu\text{m}$ , mais peuvent aller jusqu'à 42  $\mu\text{m}$  de longueur. Elles ont une extrémité postérieure allongée, parfois tronquée. Le noyau est ovale, le kinétoplaste subterminal (à plus de 4  $\mu\text{m}$  de l'extrémité postérieure). Le corps possède une membrane ondulante bien développée se terminant par un long flagelle libre ( $\approx 6 \mu\text{m}$ ). C'est sous cette forme que le trypanosome se divise activement.

- Les formes intermédiaires mesurent en moyenne 23  $\mu\text{m}$  de long. L'extrémité postérieure est émoussée ; le kinétoplaste est plus rapproché de cette extrémité que dans la forme grêle. Elles possèdent un court flagelle libre.

- Les formes courtes ou trapues (type Stumpy) mesurent de 12 à 26  $\mu\text{m}$  de long (18  $\mu\text{m}$  en moyenne). Le corps est épais et typiquement sans flagelle libre (bien qu'occasionnellement on puisse en observer un court). Le kinétoplaste est terminal et la membrane ondulante bien développée. L'extrémité postérieure est arrondie. Le noyau est rond et peut se déplacer vers l'extrémité postérieure en donnant naissance à une forme nucléo-postérieure. Cette forme qui ne se divise pas, semble correspondre aux formes infectieuses pour l'insecte (Baral, 2010).

Les trypanosomes évoluent dans le sang par « vagues parasitémiques » correspondant à des phénomènes « d'échappement » aux défenses immunitaires de l'hôte. Ces phénomènes d'échappement liés au pléomorphisme des trypanosomes sont contrôlés par la glycoprotéine variable de surface (ou VSG) (Baral, 2010). C'est le phénomène de la variation antigénique qui rend hypothétique la mise au point d'un vaccin contre la THA (Magez *et al.*, 2010).



**Figure 9 : Cycle de vie des trypanosomes africains (Brun *et al.*, 2010)**

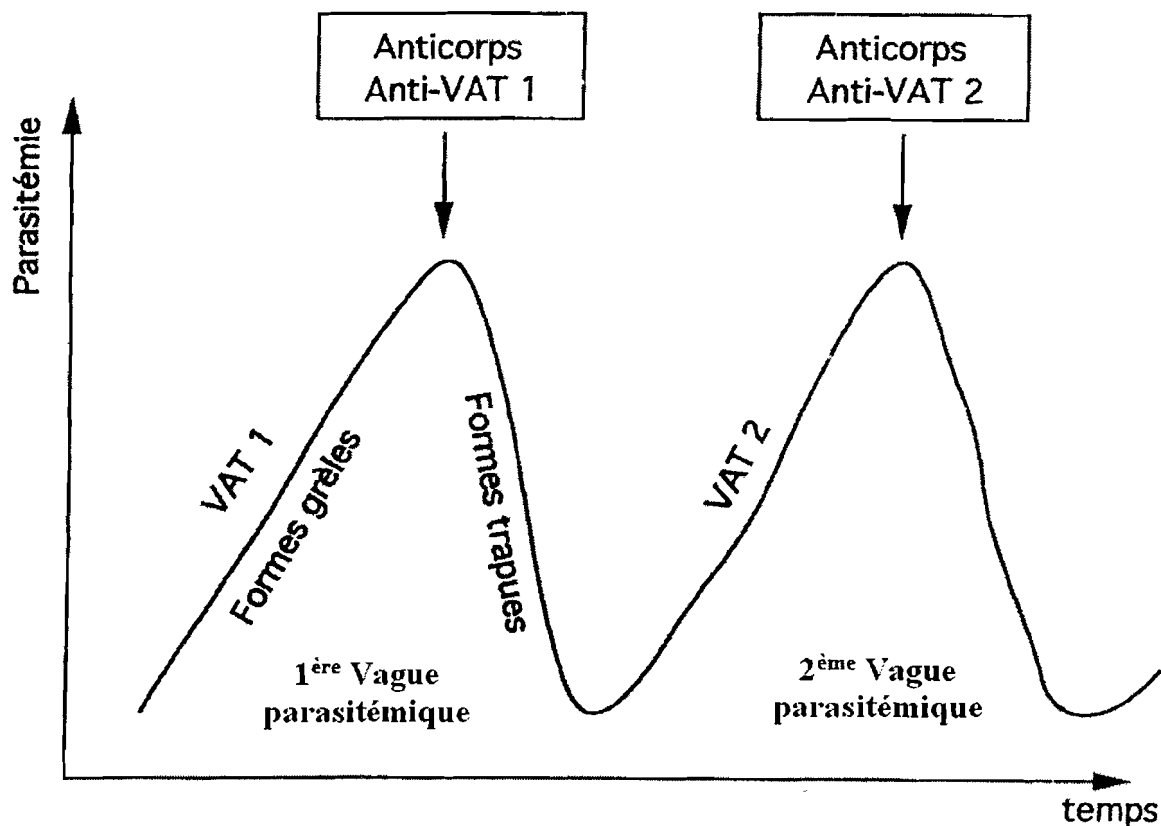
Chez l'homme : (A) formes longues (type slender) ; (B) formes intermédiaires ; (C) formes courtes (type stumpy). Chez la glossine : formes sanguines se transforment par (D) division en formes intestinales ; (E) formes épimastigotes (procycliques) ; (F) formes métacycliques infectieuses.

## 2.4. Variation antigénique

Les antigènes de *T. brucei* peuvent être classés en deux groupes : les antigènes invariants ou "communs" et les antigènes variables de surface.

✓ Les antigènes invariants regroupent tous les autres constituants immunogènes, structuraux ou fonctionnels. Ce sont les protéines de structure (protéine du cytosquelette, protéines membranaires) ou des molécules impliquées dans le métabolisme du parasite (récepteurs, transporteurs, enzymes). Ils sont peu spécifiques d'espèce et ne se modifient pas au cours des stades du cycle parasitaire (Magez *et al.*, 2010; Schwede et Carrington, 2010). Libérés dans le plasma, ils peuvent exercer de possibles effets pathogènes chez l'hôte et interagir avec les cellules du système immunitaire.

✓ Les antigènes variables de surface sont représentés par la famille des VSG qui forment l'enveloppe superficielle des trypanosomes métacycliques et sanguicoles. Leur structure tridimensionnelle montre qu'une seule petite partie de la protéine est exposée à la surface du parasite, la portion N-terminale. Les déterminants antigéniques qui stimulent la réponse immunitaire sont situés dans cette portion N-terminale. Le tiers de la séquence de la VSG situé du côté C-terminal est ancré dans la membrane plasmique grâce à un radical phospholipidique. Le rôle d'une VSG est de masquer les antigènes membranaires invariants du trypanosome, en présentant des antigènes variables immunodominants aux défenses de l'hôte. Le génome de *T. brucei* comporte plus de 1000 gènes de VSG. On parle de "Variant Antigen Type, VAT" pour une population de trypanosomes recouverts de la même VSG. L'apparition séquentielle des variants antigéniques au cours du processus infectieux permet continuellement au trypanosome d'échapper à la réponse anticorps de l'hôte telle que décrit dans la **Figure 10**.



**Figure 10 : Evolution de la parasitémie dans le sang de l'hôte en fonction du temps, illustration du phénomène de la variation antigénique.**

Les trypanosomes inoculés, revêtant tous la même couverture antigénique (VAT 1) se transforment rapidement en formes grêles et se multiplient activement dans le système lymphatico-sanguin de l'hôte pour former une population VAT 1 constituant la 1<sup>ère</sup> vague parasitémique. Une réaction immunitaire à médiation humorale (fabrication d'anticorps anti-VAT 1) combat rapidement cette première invasion. La plupart des trypanosomes sont détruits. Les survivants évoluent en forme trapue, sous laquelle ils peuvent changer leur couverture antigénique pour former une nouvelle population VAT 2. Les trypanosomes reprennent leur forme grêle de division et sont à l'origine d'une deuxième vague parasitémique responsable d'une nouvelle réaction immunitaire (fabrication d'anticorps anti-VAT 2).

## **2.5. Résistance de *T. brucei* au sérum humain**

Les humains et certains autres primates sont résistants à la plupart des trypanosomes en raison de la présence d'un facteur trypanolytique (TLF) dans leur sérum. Deux sous-espèces de *T. brucei* ; *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* ont développé des mécanismes d'évitement du TLF et sont donc capables d'infecter l'homme causant ainsi la maladie du sommeil (Poelvoorde *et al.*, 2004; Pays *et al.*, 2006). Ce mécanisme de résistance est

clairement différent entre les deux sous-espèces de trypanosome. Cette résistance s'explique chez *T. b. rhodesiense* par l'existence d'un gène spécifique SRA (Serum Resistance-Associated), responsable de la résistance au TLF. Ce gène SRA s'avère interagir fortement avec un composé du TLF (APOL1) et inhibe ainsi son activité trypanolytique. Il est présent dans l'une des multiples unités de transcription polycistronique et télomérique où l'expression des gènes codant les VSG se produit (Xong *et al.*, 1998). Par contre chez *T. b. gambiense*, le gène SRA n'est pas présent, et le mécanisme de résistance au TLF est moins bien connu (Pays et Vanhollebeke, 2009). Cependant, il semblerait que l'expression des récepteurs Hp/Hb chez *T. b. gambiense* est très réduite limitant ainsi la pénétration de l'APOL1 dans le trypanosome. Cette faible expression serait à l'origine de la résistance au TLF de *T. b. gambiense* (Kieft *et al.*, 2010). Le TLF contient deux protéines spécifiques des primates, l'APOL1 (apolipoprotéine) et l'HPR (haptoglobine-related protein) ainsi que l'APOA1 (apolipoprotéine A1), qui constituent des éléments importants de l'hôte interagissant avec les trypanosomes. APOL1 est une protéine lytique formant des pores ioniques dans la membrane lysosomale du parasite (Vanhamme *et al.*, 2003; Lecordier *et al.*, 2009; Bucheton *et al.*, 2011). La déficience en HPR ou en APOL1 conduit à la réduction ou à l'abolition de la protection des personnes contre des trypanosomes animaux comme *T. evansi* (Pays et Vanhollebeke, 2009). Ces molécules sont donc potentiellement impliquées dans les mécanismes de susceptibilité/résistance à *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense* (Genovese *et al.*, 2010).

## **2.6. Structure du génome du trypanosome**

Le génome de *T. brucei* est localisé dans deux parties différentes de la cellule : le noyau (ADN nucléaire) et le kinétoplaste (ADN kinétoplastique). Le kinétoplaste est un organelle qui provient d'une endosymbiose secondaire avec une chlorophyte aujourd'hui régressée (Embley et Martin, 2006).

### **2.6.1. Génome nucléaire**

De nombreuses études ont été menées sur l'organisation génétique, le caryotype et la structure nucléaire de *T. brucei* (Ersfeld *et al.*, 1999; Berriman *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2010). D'une taille de 26 Mb, le génome nucléaire de *T. brucei* contient approximativement 9068 gènes incluant environ 900 pseudogènes et 1700 gènes spécifiques (Berriman *et al.*,

2005). Ce génome serait constitué d'environ 120 chromosomes (Ersfeld *et al.*, 1999) classés en trois tailles selon leur migration en électrophorèse en champs pulsés "PFGE"(Pulsed Field Gel Electrophoresis) :

→ les grands ou " méga-chromosomes ", au nombre de 11 paires allant de 1 à 6 Mb (numérotées de I à XI, du plus petit au plus grand). Leur caryotype est essentiellement diploïde. Les chromosomes homologues n'ont pas toujours la même taille, le dimorphisme entre homologues pouvant aller jusqu'à 1 Mb (Melville *et al.*, 1999). Les causes de ce dimorphisme seraient dûes en partie aux réarrangements des VSG, des ESs (sites d'expression) et à la présence de rétrotransposons ou de séquences répétées (El-Sayed *et al.*, 2000; Wickstead *et al.*, 2003b).

→ plusieurs chromosomes intermédiaires de 200 à 700 kb, de ploïdie inconnue et dont le nombre et la taille varient entre les souches. La quasi-totalité des télomères des chromosomes intermédiaires sont des sites d'expression notamment des gènes codant pour des glycoprotéines variables de surface (VSG) impliquées dans le phénomène de la variation antigénique. Ces télomères sont principalement constitués de gènes non exprimés de VSG et semblent jouer le rôle d'entrepôt pour ces gènes (El-Sayed *et al.*, 2000; Barry *et al.*, 2003).

→ environ 100 mini-chromosomes de 30 à 150 kb qui sont linéaires et possèdent à leurs extrémités les répétitions télomériques (TTAGGG)<sub>n</sub> (El-Sayed *et al.*, 2000). Cependant, ces répétitions télomériques sont plus nombreuses que dans les autres types de chromosomes. Les mini-chromosomes sont essentiellement composés d'une séquence interne répétée palindromique de 177 pb qui constitue parfois plus de 90% de leur ADN [séquence TBR1/2, (Sloof *et al.*, 1983)]. D'autres répétitions riches en bases GC ou en AT sont présentes entre les régions télomériques et les répétitions internes de 177 pb (Gull, 2001). Dans leurs régions subtélomériques, les mini-chromosomes contiennent une copie du gène codant pour une protéine VSG fonctionnelle mais qui n'est pas exprimée (Wickstead *et al.*, 2004). Bien que la ploïdie des minichromosomes ne soit pas bien établie, due aux nombreuses répétitions des 177 pb, ces éléments sont hérités de façon stable durant la mitose (Wickstead *et al.*, 2003a). Il est supposé donc qu'une fonction importante des mini-chromosomes est de servir au stockage des gènes de glycoprotéine variable de surface (VSG) inexprimés pour la variation antigénique (Ogbadoyi *et al.*, 2000; Wickstead *et al.*, 2004) (voir **Figure 11**).

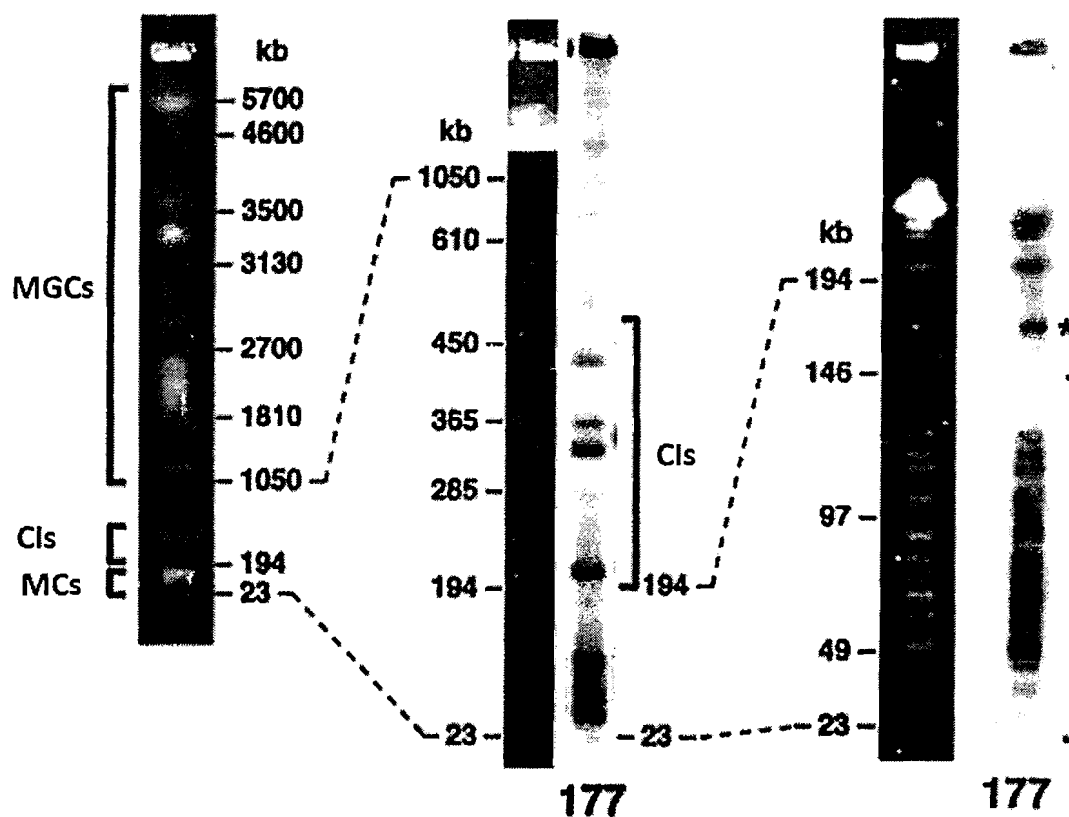


Figure 11 : Caryotype de *T. brucei* évalué par électrophorèse en champs pulsés (Wickstead *et al.*, 2004)

Les chromosomes se repartissent en trois catégories : les méga-chromosomes (MGCs), les chromosomes intermédiaires (CIs) et les mini-chromosomes (MCs). Les chromosomes intermédiaires (CIs) et les mini-chromosomes (MCs) contiennent de grandes quantités de séquences satellites répétées de 177 pb.

### 2.6.2. Génome mitochondrial ou kinétoplastique

Les trypanosomes contiennent une seule mitochondrie par cellule, qui est extrêmement grande et allongée. Tout le contenu en ADN de la mitochondrie est condensé dans une sous-structure, le kinétoplaste (Bastin *et al.*, 2000). L'ADN mitochondrial représente 10 à 20% de l'ADN cellulaire total avec un réseau d'ADN dans le kinétoplaste, qui est appelé ADN kinétoplastique (ADNk). Il est constitué d'un grand nombre de molécules d'ADN circulaires et enchaînés existant à des milliers d'exemplaires (El-Sayed *et al.*, 2000). Selon la taille de ces molécules, on distingue les maxicercles et les minicercles :

- Les maxicercles, de 23 kb chacun sont en très faible nombre, des douzaines environ, avec des séquences conservées et codent pour l'ARN ribosomal (ARNr) et quelques protéines mitochondriales telles que les sous-unités du complexe respiratoire (Motyka *et al.*, 2006).
- Les minicercles, de 1 kb chacun sont estimés à des milliers. Ils sont hautement variables au sein d'une espèce, voire au sein d'une souche. On estime qu'il existe 100 à 300 séquences différentes dans une même cellule. La fonction des minicercles, éléments très hétérogènes et non codants, est longtemps restée un mystère jusqu'à la découverte de l'édition des ARN messagers codés par l'ADN mitochondrial. La fonction des minicercles est de transcrire des ARN guides qui serviront de matrice pour l'insertion et la délétion d'uridines sur certains transcrits des maxicercles. Ce processus a été appelé "RNA editing" ou édition des ARN (Simpson *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2005; Hajduk et Ochsenreiter, 2010).

### 2.6.3. Reproduction de *T. brucei*

*T. brucei* a longtemps été considéré comme un parasite se reproduisant par scissiparité ou par fission binaire, un mode de reproduction asexuée. Par définition, la reproduction asexuée, ou clonalité reproduit à l'identique les individus qui la pratiquent. Comme pour toute cellule eucaryote, cette division s'opère en 4 phases appelées : M (mitose), G<sub>1</sub> (intervalle gap entre la mitose et l'initiation de la réplication de l'ADN), S (phase de réplication de l'ADN), G<sub>2</sub> (croissance et synthèse de protéines) (Cooper, 2000).

Plus récemment, plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'une reproduction sexuée chez les trypanosomes au laboratoire mais aussi dans la nature selon des mécanismes encore inconnus. Il semble y avoir des différences entre *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*. Ce débat sexualité versus clonalité qui concerne directement notre problématique est détaillé ci-dessous.

Ces deux premiers chapitres nous ont permis de décrire des généralités sur l'épidémiologie de la THA, permettant de situer notre sujet d'étude. Le prochain chapitre décrit de façon détaillée l'état des connaissances spécifiques à l'étude de la diversité génétique des trypanosomes qui fait l'objet de notre approche.

# CHAPITRE III : APPORT DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DANS L'ÉTUDE DE L'ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA THA

Afin d'améliorer nos connaissances sur la classification des trypanosomes et leur mode de reproduction, mais aussi pour rechercher d'éventuelles corrélations entre la diversité parasitaire et la diversité de réponses à l'infection, plusieurs outils moléculaires ont été développés pour caractériser génétiquement ces parasites. Certains outils ont alors été utilisés à des fins diagnostiques, d'autres dans le cadre d'étude de génétique des populations.

## 3.1. Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la THA

Le diagnostic de la THA est basé généralement sur les méthodes de diagnostic indirect (tests sérologiques) et sur les méthodes de diagnostic direct (tests parasitologiques). Ces tests manquent souvent de sensibilité et/ou de spécificité. Afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic, des techniques basées sur la détection de l'ADN des trypanosomes ont été récemment développées et évaluées (Jamonneau *et al.*, 2004c; Chappuis *et al.*, 2005). Les premières études moléculaires se sont basées sur le développement de sondes ADN spécifiques d'espèces de trypanosomes. Puis, à partir de ces sondes, avec l'avènement de la PCR, des amorces (*primers*) ont été synthétisées, spécifiques de telle ou telle espèce ou sous-espèce de trypanosome (Deborggraeve et Buscher, 2010). Le **Tableau II** donne une liste de toutes les méthodes développées à des fins diagnostiques, les cibles recherchées et leur limite de détection.

Parmi ces méthodes, certaines ont déjà été utilisées notamment sur des échantillonnages de terrain :

➤ Les amorces TBR 1/2 amplifient une séquence d'ADN satellite de 177 pb qui est répétée plusieurs centaines de fois dans le génome nucléaire sur les mini-chromosomes (Sloof *et al.*, 1983). Cette PCR très sensible est spécifique de tout le sous-genre *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi*, *T. equiperdum*) (Moser *et al.*, 1989).

**Tableau II : Limites de détection rapportées des différents tests moléculaires de diagnostique de la maladie du sommeil (Deborggraeve et Buscher, 2010)**

Groupe ciblé	Cible	Méthode	Limite de détection (parasites [n]) pg
<i>Trypanozoon</i>	ADN satellite (TBR 1/2)	PCR simple	0,1
<i>Trypanozoon</i>	ESAG6/7	Nested PCR	0,1
<i>Trypanozoon</i>	ESAG6/7	PCR simple	5
<i>Trypanozoon</i>	ITS1 ADNr	PCR simple	100-10 000
<i>Trypanozoon</i>	ITS1 ADNr	PCR simple	100-1000
<i>Trypanozoon</i>	ITS1 ADNr	Nested PCR	1
<i>Trypanozoon</i>	ITS1 ADNr	Nested PCR	1
<i>Trypanozoon</i>	18S et 28S et ADNr	FFLB	10
<i>Trypanozoon</i>	ITS1 et ADN satellite	MDA et PCR	2,5 (ITS1) et 0,025 (ADN satellite)
<i>Trypanozoon</i>	ADN satellite	PCR en temps réel	0,1
<i>Trypanozoon</i>	18S ADNr	PCR oligo-chromatographie	0,05
<i>Trypanozoon</i>	PFRA	LAMP	10
<i>Trypanozoon</i>	RIME	LAMP	0,001
<i>Trypanozoon</i>	18S ARNr	NASBA	0,005
<i>Trypanozoon</i>	18S ARNr	NASBA oligo-chromatographie	0,005
<i>Trypanozoon</i>	ADN satellite et RIME	ADN branché	10
<i>Trypanozoon</i>	18S ARNr	PNA-FISH	1
<i>T. b. gambiense</i>	TgsGP	PCR simple et nested	100 (simple) et 1 (nested)
<i>T. b. gambiense</i>	ADNk	PCR et southern blot	....
<i>T. b. rhodesiense</i>	SRA	PCR simple	....
<i>T. b. rhodesiense</i>	SRA	PCR simple	....
<i>T. b. rhodesiense</i>	SRA et GPI-PLC	PCR multiplex	1-10
<i>T. brucei</i> et <i>T. equiperdum</i>	Maxicercles	PCR simple	20

ESAG6/7=expression-site-associated genes 6/7. ITS1=first internal transcribed spacer. ADNr = ADN ribosomal. FFLB=fluorescent fragment-length barcoding. MDA= multiple displacement amplification. PFRA= paraflagellar rod protein A gene. LAMP= loop-mediated isothermal amplification. NASBA= nucleic acid sequence-based amplification. RIME= repetitive insertion mobile element. PNA-FISH= peptide nucleic acid fluorescence in-situ hybridization. TgsGP=*Trypanosoma brucei gambiense*-specific glycoprotein gene. ADNk=ADN kinétoplastique. SRA= serum-resistance-associated gene. GPI-PLC= glycosylphosphatidylinositol phospholipase C gene. (Parasites [n])=un parasite contient à peu près 0,1 pg d'ADN génomique.

➤ Les amorces ESAG 6/7 (Expression-Site-Associated Genes 6 and 7) amplifient les gènes ESAG 6/7 du sous-genre *Trypanozoon* (Kabiri *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 2001). Leur sensibilité est inférieure à celle de la PCR TBR 1/2 parce que les séquences ESAG 6/7 existent à environ 20 copies seulement dans le génome du parasite (Kabiri *et al.*, 1999). Cette PCR est spécifique de *Trypanozoon*.

➤ Les amorces ITS 1 CF/BR amplifient les « internal transcribed spacer » (ITS) de l'ADNr (Njiru *et al.*, 2005). La PCR basée sur les ITS est aussi spécifique de *Trypanozoon* mais permet aussi d'identifier de l'ADN de trypanosomes animaux tels que *T. congolense*, *T. vivax*, *T. simiae*, *T. theileri* (Desquesnes *et al.*, 2001).

➤ Les amorces 18S F/R amplifient les séquences des gènes de l'ARN 18S et de l'ADNr des *Trypanosomatidae*. Ces gènes sont en plusieurs copies et contiennent des séquences conservées et spécifiques aux *Trypanosomatidae* (Deborggraeve *et al.*, 2006; Deborggraeve *et al.*, 2011). Cette PCR très sensible est spécifique de *Trypanozoon*.

➤ Les amorces TgsGP amplifient la séquence spécifique de la glycoprotéine de surface de *T. b. gambiense* (TgsGP) (Radwanska *et al.*, 2002b). Comparé à d'autres gènes homologues de *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense* groupe 2, ce gène TgsGP est bien conservé et utilisable pour le diagnostic spécifique de l'espèce *T. b. gambiense* groupe 1. Par contre, la PCR-TgsGP amplifie une séquence unique du génome (Radwanska *et al.*, 2002b) limitant ainsi sa sensibilité notamment dans le cas de faibles parasitémies souvent observées dans la THA à *T. b. gambiense*.

➤ Les amorces ADNk qui amplifient les régions variables des minicercles de l'ADN kinétoplastique permettent aussi d'identifier spécifiquement *T. b. gambiense* groupe 1 (Mathieu-Daude et Tibayrenc, 1994) mais là encore, cette PCR est peu sensible.

Ces méthodes ont été en partie utilisées pour répondre à la question du statut parasitologique des sujets CATT-positifs non confirmés trypanosomés par les tests parasitologiques (SERO). Par exemple, en utilisant la PCR TBR 1/2, Kyambadde *et al.* (2000) ont obtenu 28,6% (6/21) de SERO positifs en PCR en Ouganda (Kyambadde *et al.*, 2000). De même, Garcia *et al.* (2000) lors d'un suivi longitudinal de deux ans de sujets SERO en Côte d'Ivoire ont révélé un taux de positivité de 14,5% (32/220) (Garcia *et al.*, 2000). Toujours en Côte d'Ivoire, en utilisant deux méthodes d'extraction et en répliquant les PCR, Koffi *et al.* (2006) ont obtenu un taux de 37% de PCR positives. Ces taux sont plus élevés que ceux

obtenus par Simo *et al.* (1999) dans trois foyers du Cameroun. Ces auteurs ont trouvé 51 PCR positives (3,8%) sur 1343 sujets SERO : 2,9% à Bipindi ; 0,5% à Campo et 5,5% à Fontem (Simo *et al.*, 1999). Ces résultats montrent une fois de plus très clairement que si certains SERO sont très probablement des faux positifs au CATT, de l'ADN de trypanosome est détectable chez d'autres. Ces sujets ont été ou sont toujours en contact avec le parasite. Malheureusement, les méthodes PCR les plus sensibles, ciblant des séquences répétées dans le génome du parasite sont spécifiques du sous-genre *Trypanozoon* et ne permettent pas de faire la différence entre *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* pathogènes pour l'homme et *T. b. brucei*, *T. evansi* et *T. equiperdum* en principe non pathogènes pour l'homme, responsables de la trypanosomose animale africaine. Dans les zones endémiques de THA où la trypanosomose animale est couramment rencontrée, les hommes sont exposés aux piqûres des mouches tsé-tsé infectées par *T. b. brucei*. Bien que *T. b. brucei* soit généralement considéré comme non-infectieux pour l'homme (Pays *et al.*, 2006), il est possible que l'ADN de *T. b. brucei* demeure détectable dans le sang de certains sujets donnant ainsi des résultats positifs en PCR. Il est alors difficile de dire si ces résultats positifs en PCR sont dûs à des infections à *T. b. gambiense* ou à une exposition répétée à *T. b. brucei* (Garcia *et al.*, 2000; Koffi *et al.*, 2006). Malheureusement, les PCR qui sont spécifiques de *T. b. gambiense* (c'est-à-dire *T. b. gambiense* groupe 1) ciblent des séquences uniques dans le génome des trypanosomes (Mathieu-Daude et Tibayrenc, 1994; Radwanska *et al.*, 2002a) limitant ainsi la sensibilité de ces tests dans le cas de faibles parasitémies suspectées chez les sujets SERO.

L'utilisation des méthodes moléculaires a donc permis d'améliorer nos connaissances en terme de diagnostic de la THA, notamment sur le statut des séropositifs sans confirmation parasitologique. Néanmoins, une question importante continue de se poser : **les PCR positives rencontrées chez ces sujets SERO, sont-elles dûes à des infections répétées de *T. b. brucei* ou à une infection de *T. b. gambiense* ? Dans le cas où ces sujets sont infectés par *T. b. gambiense*, les souches sont-elles identiques à celles détectées chez les trypanosomés ? En d'autres termes, existe-t-il des génotypes caractéristiques de souches particulièrement peu virulentes et pathogènes qui pourraient être responsables de ce phénotype SERO ?**

Ces questions introduisent la prochaine partie qui traite de l'existence d'éventuelles corrélations entre la diversité génétique des trypanosomes et la diversité de réponses à l'infection.

### 3.2. Diversité génétique des trypanosomes et diversité de réponses à l'infection

En dépit de la dichotomie classique entre la forme chronique de la THA causée par *T. b. gambiense* et la forme aiguë attribuable à *T. b. rhodesiense*, nous avons vu qu'une diversité d'évolutions cliniques a été observée. Pour *T. b. gambiense*, cette diversité va de formes asymptomatiques (Jamonneau *et al.*, 2000a; Sternberg, 2004) à des formes aiguës (Truc *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 2000). En Afrique de l'Est, certaines formes chroniques causées par *T. b. rhodesiense* ont également été observées (MacLean *et al.*, 2004). Cette diversité clinique ne correspond pas à la définition traditionnelle des formes cliniques de *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*. D'autre part, nous avons vu que des questions se posent aussi sur l'évolution de la maladie chez un sujet atteint. Les sujets SERO, s'ils sont infectés par *T. b. gambiense*, correspondraient à une forme d'évolution très lente de la maladie, comparés aux trypanosomés classiques (positifs en parasitologie) qui évoluent plus ou moins rapidement vers la phase neurologique. La diversité d'évolutions cliniques et la diversité de résultats aux tests de dépistage décrites ci-dessus témoignent d'une importante diversité de réponses à l'infection liée à des interactions complexes hôtes/parasites. 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).

Lors d'une étude menée entre 1996 et 1999 sur 139 patients dans l'ensemble des foyers de THA de Côte d'Ivoire (Aboisso au Sud-est et Sinfra, Daloa, Bouaflé et Bonon au Centre-ouest), les techniques de caractérisation des trypanosomes (isoenzymes et RAPD) ont mis en évidence un important monomorphisme génétique au sein des souches isolées. Cette étude a révélé une grande diversité de tableaux et d'évolutions cliniques au sein de 139 sujets susmentionnés. Cette diversité clinique a été aussi observée lors d'un suivi de sujets trypanosomés refusant le traitement (Jamonneau *et al.*, 2002). L'hypothèse du rôle primordial de l'hôte dans la diversité de présentation clinique se dégageait donc comme une hypothèse plausible. Cependant, si elle semble insuffisante, la caractérisation isoenzymatique des souches de trypanosomes a permis de conforter l'hypothèse d'une relation entre génome parasitaire et diversité clinique en Ouganda. 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 et Bailey, 1997). Aux souches du zymodème B17 du groupe "Busoga" des zones centrales de 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" provenant des zones à proximité des rives du lac ou du Nil, 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.* (1997) 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 (Truc *et al.*, 1997).

Lors d'un suivi de trypanosomés dépistés depuis 1995 dans le foyer de Sinfra et refusant le traitement, Jamonneau *et al.* (2004) ont mis en évidence 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 ; des infections mixtes qui pourraient être responsables d'une forme particulièrement chronique de THA, avec des parasitémies très faibles, et qui pourraient être impliquées dans le phénomène de séropositivité sans confirmation parasitologique des sujets SERO (Jamonneau *et al.*, 2004b).

La question du rôle de la diversité génétique des trypanosomes dans la diversité de réponses à l'infection reste donc entière et d'autant plus entière qu'elle semble liée à l'existence d'infections multiples par plusieurs génotypes chez un même hôte, un phénomène qui d'après plusieurs études semble répandu aussi bien chez l'hôte que chez l'insecte vecteur (MacLeod *et al.*, 1999; Truc *et al.*, 2002; Jamonneau *et al.*, 2004b; Koffi *et al.*, 2007; Balmer et Caccone, 2008). Cependant, la fréquence de ce phénomène est toujours très discutée. Par exemple, Koffi *et al.* (2007) ont mis en évidence des infections mixtes dans neuf (53%) patients sur 17. Ces résultats ont montré que les infections mixtes d'au moins deux souches circulant chez un patient simultanément peuvent être assez fréquentes. Une étude sur les isolats de terrain à travers l'Afrique a révélé une fréquence de 8,8% d'infections mixtes (souches multiples) de *T. brucei* dans les isolats (Balmer et Caccone, 2008). Chez le vecteur, il a été montré qu'une proportion importante des isolats de glossines sauvages (36% au Lugala (Ouganda) et 47% au Kiboko (Kenya)) contenait plus de deux allèles à un ou plusieurs loci démontrant ainsi qu'une forte proportion des mouches tsé-tsé ont été infectées par plus d'un génotype de trypanosomes (MacLeod *et al.*, 1999). Ces résultats montrent que l'hôte mammifère peut être infecté par plusieurs souches de trypanosomes qui pourraient être responsables de la diversité de réponses à l'infection.

Les trypanosomes peuvent être rencontrés chez l'hôte dans trois fluides biologiques différents tels que le sang, le suc ganglionnaire et le liquide céphalo-rachidien. La présence de génotypes différents de trypanosomes dans le sang et dans le LCR d'un même patient a déjà été évoquée (Truc *et al.*, 2002). L'existence d'un tropisme tissulaire par différents génotypes de trypanosomes est suspectée comme c'est le cas pour *T. cruzi* agent pathogène de la maladie de Chagas (Valadares *et al.*, 2008). Cette hypothèse doit être prise en compte dans l'étude de la diversité clinique. **En effet, existe-t-il des souches neurotropes qui pourraient être responsables d'une évolution rapide vers une phase neurologique de la maladie (forme aiguë) ? Inversement, il pourrait aussi exister des souches essentiellement sanguicoles ou lymphatiques, incapables de franchir la barrière hémato-méningée et qui pourraient être responsables des formes cliniques quasi-asymptomatiques sans évolution en deuxième phase (phase 2).**

L'étude du rôle de la diversité génétique des trypanosomes dans la diversité de réponses à l'infection se heurte donc encore à plusieurs questions primordiales :

**Quelle est la fréquence des infections mixtes chez l'hôte ? Existe-t-il un tropisme tissulaire des souches de trypanosomes ? Ce tropisme tissulaire est-il impliqué dans la diversité de réponses à l'infection ?**

La question de l'existence d'un tropisme tissulaire des souches de trypanosomes revient à se demander s'il n'existe pas une structuration des populations de trypanosomes en fonction du fluide biologique. Cette question peut être abordée par une approche de « génétique des populations ». Comme nous le verrons dans la prochaine partie, cette discipline a été très utilisée dans l'amélioration de nos connaissances sur l'épidémiologie de la THA.

### **3.3. Génétique des populations de trypanosomes, structuration temporelle et géographique et lutte contre la THA**

#### **3.3.1. Définition**

La génétique des populations est l'étude de la répartition de la variabilité génétique entre et au sein de populations naturelles et des forces génétiques, écologiques ou environnementales qui la gouvernent. Ces forces, nombreuses et interactives, sont notamment la mutation, la recombinaison, la sélection, la migration, la distance géographique entre individus et le système de reproduction. Reconnaître et quantifier ces facteurs est essentiel pour déterminer ou prédire l'évolution des populations et des espèces. En parasitologie, une description précise et intelligible de la variabilité génétique des populations et de sa répartition dans l'espace et/ou dans le temps peut fournir des indications précieuses permettant de mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie étudiée. La subdivision des populations naturelles en sous-unités locales apparaît d'un point de vue empirique comme un élément majeur à prendre en compte. En effet, chez la plupart des espèces, il existe des variations géographiques qui se manifestent tant au niveau morphologique qu'au niveau des fréquences de certains gènes. L'amplitude de ces différences résulte de la balance entre les forces qui tendent à individualiser les populations locales d'une part, et les forces qui tendent à homogénéiser la variabilité génétique au sein de l'espèce d'autre part. La complexité de ces systèmes nécessite le recours à des modèles mathématiques reposant sur un certain nombre de postulats simples qui permettront l'analyse des structures génétiques existantes.

#### **3.3.2. Fréquences génotypiques et alléliques**

Considérons que nous travaillons sur un locus codominant chez un organisme diploïde. Admettons que nous ayons génotypé  $N$  individus de cet organisme dans un site que nous supposons contenir une population. Parmi ces  $N$  individus,  $N_{11}$  se sont révélés être de génotype 1/1,  $N_{12}$  1/2 et  $N_{22}$  2/2. Notez que  $N$  est nécessairement égal à  $N_{11}+N_{12}+N_{22}$ . Soient  $p_1$  et  $p_2$  les fréquences des allèles 1 et 2 respectivement dans l'échantillon de  $N$  individus. Il y a  $2N$  allèles en tout puisque nous sommes chez des diploïdes. Il y a  $2N_{11}$  et  $N_{12}$  allèles 1 chez

les 1/1 et 1/2 respectivement et  $2N_{22}$  et  $N_{12}$  allèles 2 chez les 2/2 et 1/2 respectivement. La fréquence des allèles 1 et 2 dans l'échantillon est donc :

$$p_1 = \frac{2N_{11} + N_{12}}{2N} \quad \text{et} \quad p_2 = \frac{2N_{22} + N_{12}}{2N} = 1 - p_1$$

Notons que ces valeurs sont aussi des estimations des fréquences alléliques de la population échantillonnée.

### 3.3.3. *Equilibre de Hardy-Weinberg*

L'équilibre de Hardy-Weinberg a été mis en évidence par Hardy G. H, un mathématicien anglais et par Weinberg W, un médecin allemand en 1908 (Edwards, 2008). L'équilibre de Hardy-Weinberg est le modèle théorique central de la génétique des populations. La notion d'équilibre dans le modèle de Hardy-Weinberg est soumise aux conditions suivantes :

- La population est « infinie » (très grande pour minimiser les variations dues à la dérive génétique) ;
- Il ne doit y avoir ni mutation, ni migration, ni sélection (pas de pertes, ni de gain d'allèles) ;
- La population est panmictique : les zygotes (œufs) se forment après rencontre aléatoire des gamètes ;
- Les générations successives sont discrètes (pas de croisement entre générations différentes).

Pour un locus comptant 2 allèles (1 et 2) de fréquences  $p_1$  et  $p_2 = 1 - p_1$  respectivement, on peut calculer la probabilité de former des individus diploïdes 11, 12, 22 à la génération suivante. Sachant que nous puisons dans une population infinie, la probabilité d'obtenir un individu 11 est exactement égale à la probabilité de piocher un allèle 1, soit  $p_1$  par cette même probabilité, ce qui donne  $p_1^2$ . On aura donc  $p_1^2$  11 et de la même façon  $p_2^2$  22. Il existe deux manières de construire un hétérozygote 12, soit en piochant un allèle 1 ( $p_1$ ) puis un allèle 2 ( $p_2$ ), soit inversement en piochant d'abord 2 puis 1, soit une probabilité de  $p_1p_2 + p_2p_1$ . Il en

résulte que nous aurons  $p_1^2$  11,  $p_2^2$  22 et  $2p_1p_2$  12. Il est facile de constater que la somme de ces fréquences fait 1.

#### 3.3.4. Estimateurs non biaisés de *F*-Statistiques

La méthode d'analyse des données la plus utilisée est celle développée par Wright afin d'estimer la variance standardisée des fréquences alléliques entre les sous-populations (Wright, 1951, 1965). Wright a construit un ensemble d'outils mathématiques basés sur les rapports d'hétérozygoties observée et calculée sous l'hypothèse de l'équilibre de Hardy-Weinberg dans chaque sous-population et sur la population totale, les *F*-statistiques. Elles permettent de décrire la répartition de la variabilité génétique entre et au sein des populations. Trois coefficients sont utilisés et leurs formules sont données ci-dessous. Dans une population dont la structure est à trois niveaux (individus, sous-populations et population totale), les paramètres sont définis comme suit :

→  $F_{IS}$  est une mesure de la consanguinité des individus (I) par rapport à la consanguinité dans les sous-populations (S). Le  $F_{IS}$  varie de -1 (sous-population hétérozygote pour deux allèles), 0 (panmixie) à +1 (individus tous homozygotes pour différents allèles). Les valeurs négatives reflètent un excès d'hétérozygotes (mode clonal de reproduction, différenciation entre partenaires sexuels), les valeurs positives correspondent à un excès d'homozygotes (mode consanguin de reproduction). C'est donc ainsi une mesure de la déviation locale par rapport à la panmixie.

→  $F_{ST}$  est une mesure de la consanguinité dans les sous-populations (S) par rapport à la consanguinité dans la population totale (T). Le  $F_{ST}$  varie de 0 (distribution aléatoire des allèles entre les sous-populations : homogénéité des fréquences) à +1 (sous-populations toutes fixées pour l'un ou l'autre des allèles présents) et est donc aussi une mesure de la différenciation génétique entre les sous-populations.

→  $F_{IT}$  est une mesure de la consanguinité des individus (I) par rapport à la consanguinité dans la population totale (T). Il correspond à la résultante des deux précédents. Le  $F_{IT}$  varie de -1 (quand tous les individus de la population totale sont hétérozygotes pour les deux mêmes allèles) à 1 (quand tous les individus sont homozygotes, avec au moins deux allèles, dans la population totale).

Soient  $H_I$  : la probabilité de tirer deux allèles différents d'un individu d'une sous-population ;  $H_S$  : la probabilité de tirer deux allèles différents de deux individus de la même sous-population et  $H_T$  la probabilité de tirer deux allèles différents de deux sous-populations différentes et soient  $Q_I = 1 - H_I$ , la probabilité d'identité de deux allèles d'un même locus au sein d'un même individu ;  $Q_S = 1 - H_S$ , la probabilité de tirer deux allèles identiques de deux individus différents de la même sous-population et  $Q_T = 1 - H_T$ , la probabilité de tirer deux allèles identiques de deux individus de deux sous-populations différentes, alors on obtient :

$$\begin{array}{ll}
 F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S} & F_{IS} = \frac{Q_I - Q_S}{1 - Q_S} \\
 F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T} & \text{(Nei et Chesser, 1983)} \quad F_{ST} = \frac{Q_S - Q_T}{1 - Q_T} \quad \text{(Rousset, 2004)} \\
 F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T} & F_{IT} = \frac{Q_I - Q_T}{1 - Q_T}
 \end{array}$$

Ces trois paramètres sont reliés par l'équation :  $(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$

Weir et Cockerham (1984) ont montré la correspondance entre les  $F$ -Statistiques de Wright et les composantes de la variance des fréquences alléliques dans des populations structurées (Weir et Cockerham, 1984). L'analyse par les  $F$ -Statistiques est donc analogue à une analyse hiérarchique de variance ayant comme variables les fréquences alléliques et comme facteurs : l'individu, la sous-population et la population totale. Cette analyse de variance hiérarchique a conduit ces auteurs à proposer des estimateurs non biaisés (dont l'espérance mathématique est indépendante de la taille et du nombre des sous-échantillons) des  $F$ -statistiques de Wright.

### 3.3.5. 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  $P_{AB} = P_A P_B \pm D$ , où  $D$  est le déséquilibre de liaison entre les deux loci. Un déséquilibre de liaison significatif peut prendre sa source de multiples causes non exclusives telles de petites tailles de populations, le régime de reproduction (clonalité), les erreurs d'échantillonnage, la sélection ou la liaison physique entre les loci étudiés.

### 3.3.6. Apport de la génétique des populations à l'étude de l'épidémiologie de la trypanosomose

La technique d'électrophorèse des isoenzymes MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis) 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; Gibson, 2007). Les 20% restants ont été étiquetés par les auteurs comme « *gambiense* groupe 2 », « non *gambiense* » ou encore groupe « bouaflé ». Ce dernier groupe, génétiquement très hétérogène comprend aussi des souches isolées de l'animal (Godfrey *et al.*, 1990; Baker, 1995; Stevens et Tibayrenc, 1996; Truc *et al.*, 1997). 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). Cependant, des subdivisions homogènes définies avec l'apport des études sur l'ADNk, ont été mises en évidence : 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 Godfrey, 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 et Godfrey, 1992).

Les résultats obtenus par les techniques de "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP), (Gibson *et al.*, 1985), d'hybridations avec des sondes génomiques (Hide *et al.*, 1990; Mathieu-Daude et Tibayrenc, 1994), de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), (Tibayrenc *et al.*, 1993; Kanmogne *et al.*, 1996b) et d'Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), (Masiga *et al.*, 2000; Agbo *et al.*, 2002; Simo *et al.*, 2008) 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.

Par contre, cette caractérisation isoenzymatique de souches de trypanosomes semble insuffisante et reste controversée. Avec l'évolution des nouvelles technologies, de nouveaux outils moléculaires tels que les marqueurs microsatellites ont été utilisés pour la caractérisation génétique des organismes. Ils ont été très utilisés pour étudier la structure des populations de plusieurs agents pathogènes et aussi de plusieurs vecteurs des maladies infectieuses. Comme exemple d'agents pathogènes, nous avons : *Plasmodium* (Annan *et al.*, 2007; Pumpaibool *et al.*, 2009), *Leishmania* (Bulle *et al.*, 2002; Schwenkenbecher *et al.*, 2004; Schwenkenbecher *et al.*, 2006), *Theileria* (Oura *et al.*, 2003; Oura *et al.*, 2005; Odongo *et al.*, 2006) et *Trypanosoma* (Biteau *et al.*, 2000; Balmer *et al.*, 2006; Koffi *et al.*, 2007; Morrison *et al.*, 2008; Simo *et al.*, 2008; Koffi *et al.*, 2009; Simo *et al.*, 2010). De même un exemple de vecteurs est : *Anopheles* (Chen *et al.*, 2004; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2008; Ndo *et al.*, 2010) et *Glossina* (Solano *et al.*, 2000; Krafur *et al.*, 2008; Krafur, 2009; Solano *et al.*, 2009).

Ces marqueurs microsatellites ont permis de mettre en évidence une diversité génétique au sein de *T. b. gambiense* 1 (Gibson, 2007; Koffi *et al.*, 2009; Balmer *et al.*, 2011). Ils ont permis d'étudier la question de la reproduction de *T. brucei s.l* qui demeure de nos jours controversée. Jusqu'en 1980, on considérait que le trypanosome, asexué, ne se reproduisait que par fission binaire. Cependant, depuis la découverte de la diploïdie chez les trypanosomes, plusieurs auteurs se sont interrogés sur une éventuelle reproduction sexuée. Des échanges génétiques ont été mis en évidence chez trois espèces de trypanosomatidés dont les génomes ont été séquencés (Berriman *et al.*, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005; Ivens *et al.*, 2005) : *T. brucei*, *T. cruzi* et *Leishmania major*. Pour *T. brucei*, les échanges génétiques ont été mis en évidence au cours de son développement chez l'insecte vecteur par des expériences de croisement au laboratoire en montrant que les marqueurs étudiés ségrégaient suivant la loi de Mendel, laissant supposer l'existence d'une méiose normale (Jenni *et al.*, 1986; MacLeod *et al.*, 2005a; Akopyants *et al.*, 2009). Au laboratoire, il s'est avéré possible de croiser toutes les sous-espèces de *T. brucei* entre elles sauf l'agent pathogène humain *T. b. gambiense* groupe 1. La difficulté de mettre en place des croisements de *T. b. gambiense* groupe 1 est en partie due à la difficulté d'infecter *Glossina morsitans ssp*, la mouche tsétsé standard de laboratoire avec ce taxon (Gibson, 1986; Dukes *et al.*, 1989). Pour les autres espèces de trypanosomes, la reproduction sexuée semble avoir lieu dans les glandes salivaires de la

glossine durant le cycle de développement du trypanosome (Bingle *et al.*, 2001; Gibson *et al.*, 2008).

Lors des études de génétique des populations de *T. b. gambiense* à l'aide des marqueurs microsatellites, en Afrique de l'Ouest (Côte d'Ivoire et Guinée), les résultats obtenus ont montré que *T. b. gambiense* groupe 1 est un organisme dont la reproduction est strictement clonale (Koffi *et al.*, 2009). Ces auteurs ont aussi montré que la migration des souches de *T. b. gambiense* groupe 1 ne se produit pas à l'échelle de l'Afrique de l'Ouest, et que même à une échelle plus fine (entre les foyers de Boffa et Dubréka au sein de la Guinée), la migration est limitée, et que la taille des populations de trypanosomes est probablement plus élevée que celle suggérée par les enquêtes épidémiologiques (Koffi *et al.*, 2009). Ces résultats ont aussi montré qu'il existe une importante structuration géographique entre les souches de trypanosomes de Guinée et celles de la Côte d'Ivoire (Koffi *et al.*, 2009). Cette structuration a aussi été mise en évidence entre deux foyers beaucoup plus proches (150 km) du littoral guinéen (Boffa et Dubréka). **Cette structuration géographique est-elle toujours effective à une plus petite échelle, notamment à l'échelle du foyer ?** Il existe un troisième foyer de THA dans cette même région, le foyer de Forécariah, à une centaine de kilomètres de Dubréka (voir ci-dessous). **La structuration géographique mise en évidence entre Boffa et Dubréka se confirme-t-elle en prenant en compte le foyer de Forécariah ?** Nous pourrions aussi tester si les campagnes médicales menées ces dernières années sur tout le littoral guinéen ont eu un effet sur les effectifs clonaux calculés comme dans Koffi *et al.* (2009).

Il faut préciser que ces questions sont posées dans le contexte d'un projet d'élimination que nous souhaitons mener dans les prochaines années sur l'ensemble du littoral guinéen constitué par les trois foyers étudiés (Boffa, Dubréka et Forécariah). La connaissance des liens qui existent entre les populations de trypanosomes qui circulent dans ces trois foyers voire même à l'intérieur d'un de ces foyers nous aidera à optimiser la stratégie de lutte à mettre en place. Par exemple, il est important de savoir si une lutte séquentielle foyer par foyer, logistiquement plus facile à mettre en place, permettra une élimination durable de la THA sans craindre des phénomènes de ré-invasion.

Pour répondre à ces questions, nous allons utiliser une approche de génétique des populations. Comme évoqué ci-dessus, nous tiendrons compte, lors de nos analyses du fluide biologique à partir duquel les trypanosomes étudiés proviennent : **existe-t-il une structuration génétique entre les souches de trypanosomes extraits des trois fluides**

**biologiques?** Nous pourrions aussi tenir compte du stade d'évolution de la maladie au moment où le trypanosomé a été dépisté (phase 1, phase 2 précoce et phase 2 avancée). Cette approche nous permettra d'apporter des éléments de réponse à une question déjà posée dans la précédente partie : **existe-t-il des corrélations entre diversité génétique parasitaire et diversité d'évolutions cliniques ?**

Dans ce chapitre III, plusieurs questions relatives à l'épidémiologie moléculaire de la THA ont été soulevées. Nous allons tenter de répondre à ces questions mais une étape importante était le choix du marqueur à utiliser.

### **3.4. Le choix du marqueur**

Nous avons vu que plusieurs méthodes moléculaires basées sur les protéines, sur l'ADN et l'ARN ont été développées pour étudier la diversité génétique des trypanosomes. Les marqueurs les plus utilisés ont été dans leur ordre d'apparition chronologique : les marqueurs MLEE (Multi Locus Enzyme Electrophoresis) (Gibson, 1986; Tibayrenc *et al.*, 1993), les marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Kanmogne *et al.*, 1996c; Tilley et Hide, 2001), les marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Tibayrenc *et al.*, 1993; Kanmogne *et al.*, 1996b), les marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Masiga *et al.*, 2000; Agbo *et al.*, 2002; Simo *et al.*, 2008), les éléments génétiques mobiles (MGE-PCR, Mobile Genetic Element PCR) (Tilley *et al.*, 2003; Simo *et al.*, 2005), les marqueurs minisatellites et microsatellites (Barrett *et al.*, 1997; Biteau *et al.*, 2000; MacLeod *et al.*, 2000; Balmer *et al.*, 2006; Koffi *et al.*, 2007; Simo *et al.*, 2011).

Il est important d'être conscient des limites des différents marqueurs employés. Il est évident que la qualité de toute étude de génétique des populations est limitée par la méthode d'échantillonnage et les attributs des marqueurs génétiques. Le choix des marqueurs dépend de ce que l'on veut étudier.

Les microsatellites sont de courtes séquences d'ADN répétées en tandem, généralement de deux, trois, quatre (plus rarement cinq) paires de bases (par exemple : AC, CGT, GATA). Ce sont des marqueurs nucléaires codominants. Le polymorphisme de ces marqueurs se base sur la variation du nombre de répétitions du motif de base de la séquence. Les loci microsatellites sont généralement considérés comme hautement polymorphes, codominants, abondants dans le génome et relativement faciles à mettre en évidence

(Lehmann *et al.*, 1996). Ils sont particulièrement adaptés aux études de génétique des populations grâce à leurs propriétés (haut degré de polymorphisme intra-spécifique, codominance, facilités d'interprétation, neutralité supposée).

Dans le cadre de notre étude, nous allons nous intéresser à la diversité génétique de *T. b. gambiense*. Tous les marqueurs précités ont montré que les individus de ce groupe appartenaient à une entité génétiquement homogène (Gibson, 1986; Gibson, 2007). Les marqueurs microsatellites se sont montrés assez polymorphes pour mettre en évidence la diversité génétique au sein de cette entité monophylétique (Gibson, 2007; Koffi *et al.*, 2009; Balmer *et al.*, 2011). En plus, les marqueurs microsatellites se sont montrés assez sensibles pour être appliqués au génotypage de *T. brucei* directement à partir des échantillons biologiques (Morrison *et al.*, 2007) sans la nécessité d'amplifier les parasites *in vivo* (rongeurs) ou *in vitro*. Ils permettent aussi de détecter des infections multiples (Koffi *et al.*, 2007). Plusieurs marqueurs microsatellites ont été définis afin de différencier les différentes espèces et sous-espèces de trypanosomes d'intérêts médical et vétérinaire (Biteau *et al.*, 2000; Balmer *et al.*, 2006; Koffi *et al.*, 2007). En outre grâce aux récentes améliorations telles que l'utilisation de séquenceurs automatiques dotés de capillaires, des techniques d'extraction d'ADN et d'amplification ; il est possible de travailler sur de très petites quantités de matériel biologique. Razakandrainibe *et al.* (2005) sont parvenu en effet à génotyper un seul oocyste de *Plasmodium falciparum* au niveau de sept loci microsatellites (Razakandrainibe *et al.*, 2005).

C'est donc cet outil que nous avons utilisé dans le cadre de notre étude. Cependant, nous verrons qu'en utilisant ce marqueur pour répondre aux questions posées ci-dessus, nous avons malheureusement mis en évidence des contraintes méthodologiques liées à l'utilisation des marqueurs microsatellites pour l'étude de la diversité génétique des trypanosomes directement à partir des fluides biologiques. Nous nous sommes alors intéressés à ces contraintes probablement dûes à un manque de sensibilité des marqueurs, afin de répondre à la question : **les marqueurs microsatellites sont-ils réellement un outil de choix pour étudier la diversité génétique des trypanosomes sans étape d'isolement, de culture et de purification ?** Cette question nous a permis de tester si l'on peut faire de la « bonne » génétique des populations à partir des fluides biologiques.

Dans cette partie problématique, un certain nombre de questions relatives à l'épidémiologie moléculaire de la THA ont été soulevées. Dans cette étude nous avons tenté

de répondre à ces questions en utilisant un outil qui semble prometteur pour étudier la diversité génétique des trypanosomes, les marqueurs microsatellites. La partie expérimentale ci-dessous traite de la surveillance épidémiologique de la THA et de la présentation des zones d'étude, suivie des résultats obtenus. Les matériels et méthodes utilisés, les résultats obtenus ayant déjà été publiés ou soumis pour publication et la discussion de ces résultats seront présentés sous forme d'activité de recherche dans la suite du document :

✓ Le premier article déjà publié (Kaboré *et al.*, 2011a), aborde spécifiquement la problématique des sujets séropositifs (SERO). Sont-ils réellement porteurs de *T. b. gambiense* ? Certaines souches de *T. b. gambiense* sont-elles responsables de ce phénotype ?

✓ Le second article déjà publié (Kaboré *et al.*, 2011b) et qui fait l'objet d'une approche en génétique des populations, s'intéresse non seulement à la distribution des populations de trypanosomes dans les fluides biologiques humains et à son éventuelle implication dans la diversité de réponses à l'infection, mais aussi à la distribution spatio-temporelle de ces populations dans trois foyers géographiquement proches dans un contexte d'élimination de la THA.

✓ Le troisième article qui vient d'être soumis pour publication, s'intéresse à la question de savoir si les marqueurs microsatellites sont l'outil idéal pour faire de la génétique des populations de trypanosomes à partir des fluides biologiques.

Cette étude qui a pour objectif d'apporter des éléments de réponses aux questions soulevées dans ce chapitre, a été menée dans les foyers de THA les plus actifs actuellement en Afrique de l'Ouest. Ceux-ci sont décrits dans la partie suivante.

## **DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE**

# SURVEILLANCE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE LA THA EN AFRIQUE DE L'OUEST ET PRÉSENTATION DES ZONES D'ÉTUDE

L'équipe IRD/CIRDES qui est Centre Collaborateur de l'OMS pour la THA a été ces dernières années particulièrement impliquée dans les activités de surveillance épidémiologique en Afrique de l'Ouest en collaboration avec les programmes nationaux de lutte contre la THA (PNLTHA). La majeure partie des échantillons et des données de terrain utilisés dans ce travail a été collectée dans le cadre de ces activités menées en Guinée et en Côte d'Ivoire auxquelles j'ai eu à participer. Ce chapitre me permet de décrire les méthodes utilisées pour cette surveillance ainsi que les foyers de THA qui constituent les zones d'étude de ma thèse. Lors de cette partie « terrain », j'ai aussi contribué à améliorer certaines méthodes de diagnostic et de surveillance épidémiologique.

## 1. Prospections médicales

La première étape d'une prospection médicale est une phase de cartographie et de recensement exhaustif de la population de la zone ciblée. Ce recensement a été effectué famille par famille. Un numéro individuel de recensement a été attribué à toute personne recensée. L'ensemble de la population présente le jour de la prospection est prélevé (70 µl de sang) 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 sujets positifs à ce test (agglutination visible, signe d'une réaction antigènes/anticorps recherchés) sont prélevés au pli du coude (5ml de sang sur tube Vacutainer® hépariné) pour effectuer un test CATT sur dilutions successives de plasma (CATT/pl) plus spécifique que le CATT/sg (voir paragraphe 1.4. Diagnostic et traitement de la THA, Chapitre 1). 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 (quand le test est au moins positif à la dilution 1/8). Les sujets positifs

aux tests parasitologiques sont confirmés trypanosomés (T+), les sujets positifs au CATT/pl mais négatifs en parasitologie sont qualifiés de séropositifs (SERO). Le diagnostic de phase est alors effectué pour le choix du traitement à administrer.

Deux types de sujets ont ainsi été inclus lors des prospections médicales :

- Trypanosomés (T+) : sujets ayant un CATT/sg positif, un CATT/pl  $\geq 1/8$  et un test parasitologique positif
- Séropositifs (SERO) : sujets ayant un CATT/sg positif, un CATT/pl  $\geq 1/8$  sans confirmation parasitologique

Pour tous les sujets T+ et SERO, un questionnaire épidémiologique et clinique a été rempli. Ces sujets ont été géo-référencés.

Cinq prospections médicales ont été réalisées en Guinée pendant ma thèse et les résultats obtenus sont les suivants :

**Tableau III : Résultats des prospections médicales menées en collaboration avec le PNLTHA de Guinée et l'équipe IRD/CIRDES dans le cadre de cette étude**

Foyer	Période	Population vue	Trypanosomés (T+)	Séropositifs (SERO)
Forécariah	Nov 2007	7 586	13	16
	Mars 2008	3 867	6	14
	Oct 2008	865	6	1
Dubréka	Mai 2008	3437	29	8
	Fév 2009	968	11	5
	Av 2009	6171	50	38
Boffa	Mai 2008	3 358	10	9
	Fév 2009	---	3	2
<b>Total</b>		<b>26252</b>	<b>128</b>	<b>93</b>

Lors de ces prospections médicales, j'ai contribué à une étude permettant d'améliorer la sensibilité de la mAECT pour améliorer le diagnostic parasitologique de la THA. Le principe était d'effectuer le test avec 350  $\mu$ l de buffy-coat à la place de 350  $\mu$ l de sang

habituellement utilisés (Camara *et al.*, 2010). Les résultats obtenus ont été prometteurs et la nouvelle procédure est maintenant retenue dans les stratégies de diagnostic en Afrique de l'Ouest et commence à être utilisée par les équipes mobiles d'Afrique Centrale.

Lors des enquêtes de terrain, j'ai aussi contribué à l'évaluation de la technique dite de trypanolyse (TL), basée sur la détection d'anticorps spécifiques d'antigènes variables de surface des trypanosomes, comme outil de surveillance épidémiologique. Les résultats ont montré que le taux de positivité du test TL sur les sujets SERO est associé au degré d'endémicité, confirmant une fois de plus que ces sujets identifiés dans les foyers actifs et qui ne sont pas traités, sont ou ont été en contact avec *T. b. gambiense* et qu'il est important de les considérer dans les stratégies de lutte. La TL, dont la méthode a été transférée au CIRDES est maintenant utilisée comme marqueur de transmission dans une zone donnée. Elle pourrait être utilisée comme test de référence dans le contexte actuel des importantes initiatives d'élimination récemment lancées par l'OMS et l'UA (Jamonneau *et al.*, 2010).

## **2. Zones d'étude**

La zone du littoral guinéen se compose de trois foyers (Boffa, Dubréka et Forécariah), (Camara *et al.*, 2005). La zone du Centre-ouest ivoirien, dont le foyer de Bonon (Kaba *et al.*, 2006) a aussi fait l'objet d'un suivi.

### **2.1. Foyers de Boffa, Dubréka et Forécariah (Guinée)**

La République de Guinée se trouve sur la côte atlantique de l'Afrique de l'Ouest. Avec une population de 9,4 millions d'habitants en 2007, la République de Guinée couvre une superficie de 245 857 Km<sup>2</sup> répartie entre quatre régions naturelles caractérisées par une diversité climatique et culturelle. Il s'agit de la Haute-Guinée savanicole, de la Moyenne Guinée abritant le Fouta Djallon montagneux, de la Guinée forestière et enfin de la Guinée maritime. La majorité de la population (71%) vit en zone rurale où l'agriculture demeure la principale activité. Toutefois, le pays connaît de plus en plus un exode rural massif des jeunes vers les grands centres urbains et les zones minières. Au plan socio-politique, l'afflux de réfugiés et de populations déplacées consécutif à plus de quinze années de conflit dans la

sous-région a laissé des traces encore visibles sur l'environnement et les infrastructures de base.

La Guinée est actuellement le pays le plus touché par la maladie du sommeil en Afrique de l'Ouest. La maladie sévit en forêt mais aussi et surtout sur le littoral (Guinée maritime) en zone de mangrove. La Région Naturelle de Guinée Maritime occupe une bande d'environ 150 km de largeur entre les contreforts du plateau du Fouta-Djalón à l'Est et l'océan atlantique à l'Ouest. Cette région se caractérise par un climat très contrasté, puisque malgré l'existence d'une saison sèche qui s'étend sur cinq mois (décembre à avril), la pluviométrie est supérieure à 2000 mm/an. En 2000, la Guinée Maritime regroupait 36% de la population du pays soit 2,5 millions d'habitants parmi lesquels 1,4 millions de ruraux (Rossi *et al.*, 2000). La Guinée Maritime connaît une évolution démographique spectaculaire (croissance d'environ 3% par an), du fait de l'accroissement naturel de la population régionale et d'une migration massive en provenance de l'intérieur du pays. Ces dernières années, cette région littorale s'est fortement urbanisée, notamment à travers l'extension de la capitale Conakry, mais aussi du fait du développement de grandes villes industrielles (Kamsar, Fria) ou commerciales (Kindia) qui attirent des populations de l'ensemble du pays. L'attraction urbaine est également sensible dans certains centres secondaires tels que Boffa, Dubréka et Forécariah, qui profitent du commerce suscité par la monétarisation du marché de poissons, de sel, de riz et de bois (Rossi *et al.*, 2000).

Les trois foyers actifs de THA en Guinée qui ont fait l'objet de notre étude sont dans les zones suivantes (**Figure 12**) :

➤ La préfecture de Boffa à 150 kilomètres de la capitale Conakry se situe le long de l'océan atlantique sur un axe Conakry-Boké et est traversée par le fleuve Rio Pongo. Elle se caractérise par une importante zone de mangroves entre l'océan atlantique au sud et un vaste espace de savane au nord qui prend fin dans les contreforts du Fouta-Djalón.

➤ La préfecture de Dubréka est située à proximité de la capitale. La partie Sud-ouest, bordée par l'océan atlantique, est basse et constituée de mangroves. A l'intérieur, le relief s'élève rapidement. Le fleuve Konkouré descend du Fouta-Djalón, les crues de ce fleuve côtier alimentent d'importantes rizières près de Wassou.

➤ La préfecture de Forécariah est située au Sud-ouest du pays, limitée à l'Ouest par l'océan atlantique et au Sud par la Sierra Leone. Sur le plan administratif, elle dépend de la région de

Kindia et la ville de Forécariah en est le chef-lieu. La partie Ouest est une zone côtière basse, caractérisée par des mangroves et des rizières, traversée par de petits fleuves côtiers, le plus important étant la Forécariah. Au Nord-est, le relief s'élève jusqu'à 1 124 m près de Sikhourou, annonçant le massif du Fouta Djalon.

Les cartes de répartition des trypanosomés et des SERO dépistés pendant cette étude dans ces trois foyers sont représentées en **Annexe VII**. L'espace végétatif favorise la transmission et la diffusion de la maladie dans toute la zone de mangrove, notamment au niveau des estuaires et des chaînes de mangroves où les populations pratiquent de nombreuses activités de subsistance à risque (riziculture, extraction de sel, pêche, coupe du bois....) (**Figure 13**) qui impliquent des déplacements quotidiens ou saisonniers des populations et un important contact avec le vecteur (Courtin *et al.*, 2010a).

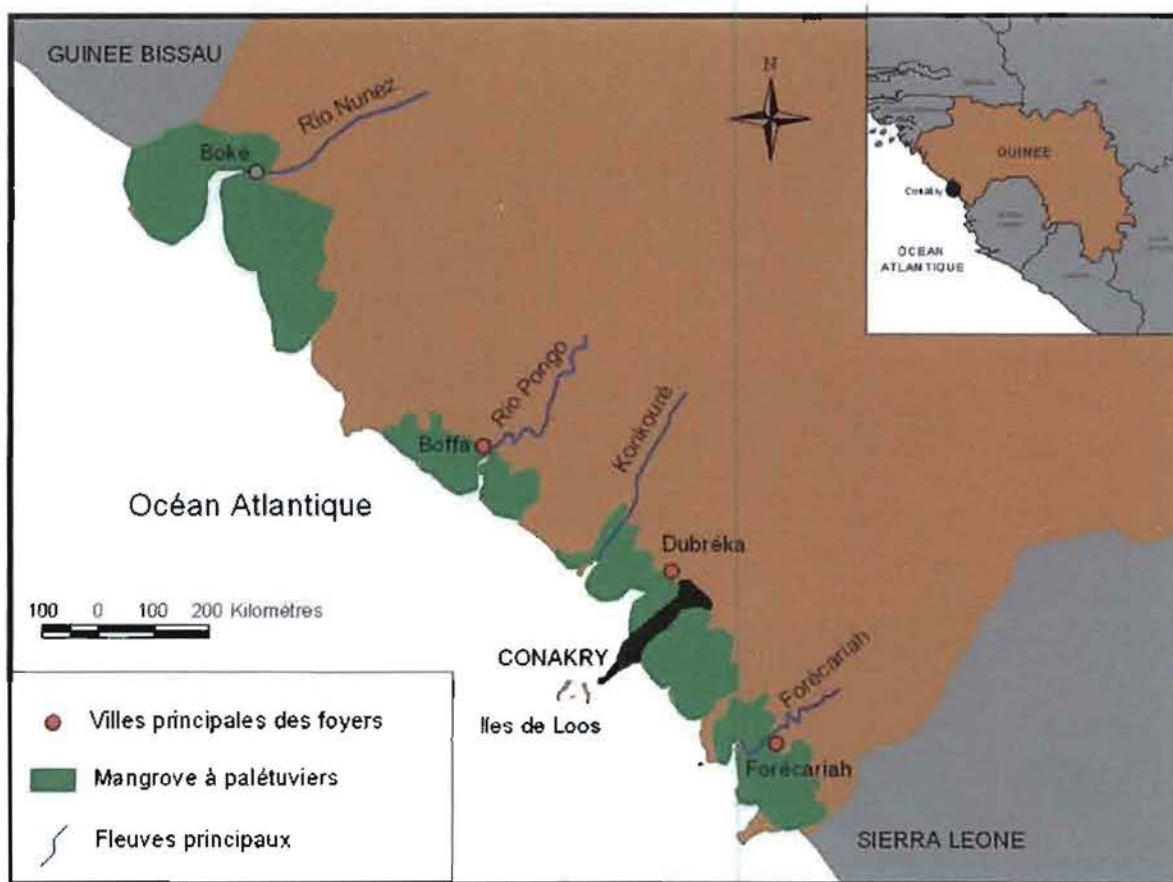


Figure 12 : Carte de la Guinée et localisation des zones d'étude



a. Rizières



b. Chenal de mangrove



c. Pêche



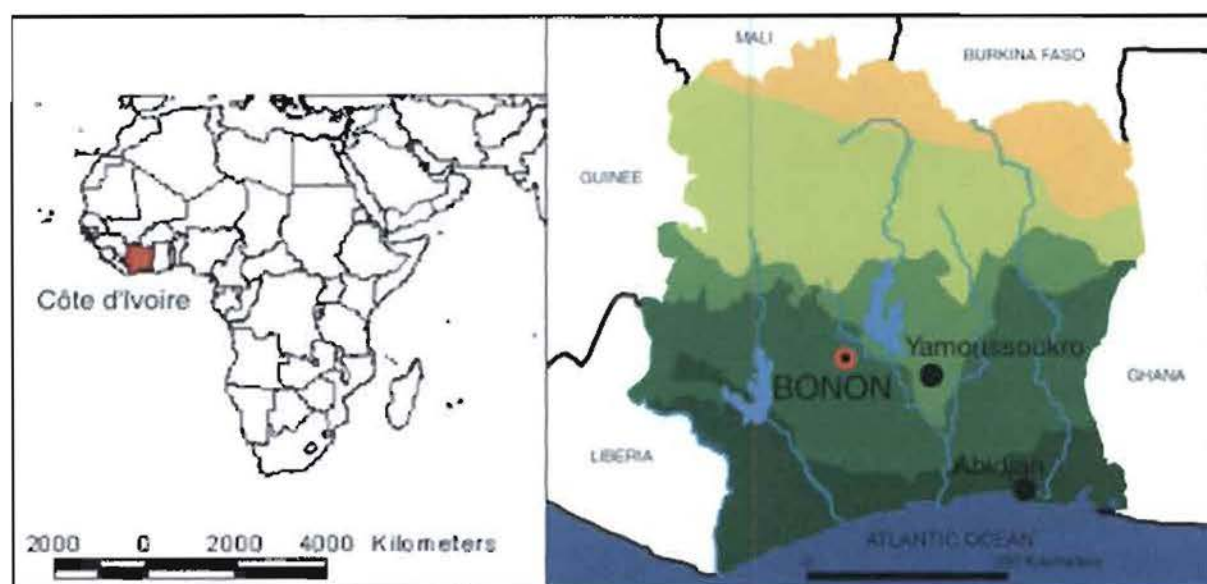
d. Extraction de sel

**Figure 13 : Exemples d'activités et de zones à risque en mangrove guinéenne**

## 2.2. Foyer de Bonon (Côte d'Ivoire)

Le foyer de Bonon est situé à 350 km au Nord-ouest d'Abidjan, dans le Centre-ouest de la Côte d'Ivoire (**Figure 14**) (Courtin *et al.*, 2005). La sous-préfecture, à l'instar de l'ensemble de la région, est sous l'influence d'un climat régional de type équatorial à deux saisons de pluies (de mai à mi-juillet, d'août à octobre). Les amplitudes thermiques annuelles sont faibles (3°C) et la pluviométrie annuelle oscille actuellement autour de 1300 mm. Le paysage est dominé par une succession de bas-fonds et de versants courts et étroits résultant de l'activité de nombreux cours d'eau temporaires qui se raccordent aux affluents de la Marahoué. Avec le développement des cultures de rente à partir du début des années 60, les plantations de café et de cacao ont remplacé progressivement la forêt humide qui n'y subsiste

plus que sous forme de forêt classée comme celle de la Marahoué (Parc National) (Solano *et al.*, 2003).



**Figure 14 : Carte de la Côte d'Ivoire et localisation de la zone d'étude (Bonon) (Courtin *et al.*, 2005)**

Le foyer de Bonon est le dernier foyer épidémique de la Côte d'Ivoire. Par exemple, lors d'une prospection médicale menée en 2000, sur un total de 15 227 individus qui ont été examinés dans la ville, les villages, les hameaux et les campements qui lui sont rattachés, un total de 74 trypanosomés ont été dépistés, soit une prévalence de 0,48%. Les prospections médicales menées entre 1998 et 2006 ont permis de dépister près de 200 trypanosomés et d'endiguer l'épidémie (Kaba *et al.*, 2006). En 2006, la prévalence de la THA était d'environ 0,1% (Kaba *et al.*, 2006). Depuis 2006, peu de données de surveillance sont disponibles pour ce foyer à cause de la crise en Côte d'Ivoire qui touche particulièrement cette zone géographique. J'ai néanmoins participé à une mission médicale dans le foyer de Bonon en 2009 dans le cadre du suivi de cohortes de trypanosomés refusant le traitement et de sujets SERO. Un article dans lequel je suis co-auteur est en préparation sur les résultats de cette étude qui s'intéresse plus particulièrement au rôle de l'hôte dans le phénomène de diversité de réponses à l'infection et à l'existence de phénomènes de trypanotolérance humaine. Les résultats montrent aussi que la THA sévit toujours à l'état endémique dans ce foyer.

Si la plupart des échantillons utilisés dans cette étude proviennent des foyers de THA du littoral guinéen, nous avons aussi utilisé des ADN extraits à partir de sujets SERO identifiés lors d'une prospection médicale menée en 2004 dans le foyer de Bonon. Ces derniers ont été essentiellement utilisés dans le premier article décrit ci-dessous visant à explorer le rôle des sujets SERO dans l'épidémiologie de la THA. Les deuxième et troisième articles présentés ensuite utilisent essentiellement des échantillons provenant de la Guinée.

### **3. Considérations éthiques**

Tous les échantillons utilisés dans le cadre de cette étude (à l'exception des souches de référence) ont été collectés lors des prospections médicales menées en collaboration avec les programmes nationaux de lutte contre la THA (PNLTHA) de Guinée et de Côte d'Ivoire suivant les procédures nationales de diagnostic de la THA. Tous les participants ont été informés de l'objectif de notre étude dans leur propre langue et ont donné leur consentement éclairé. Les enfants de moins de 12 ans ont été exclus de notre étude. Pour les participants entre 12 et 18 ans, le consentement éclairé a été obtenu de leurs parents. Cette étude fait partie d'un projet visant à améliorer les stratégies de surveillance épidémiologique de la THA pour lequel des accords éthiques ont été obtenus auprès des comités éthiques de l'OMS et de l'IRD.

**ACTIVITÉ DE RECHERCHE 1: PREMIÈRE MISE EN ÉVIDENCE QUE LES SUSPECTS SEROLOGIQUES (APPAREMMENT APARASITEMIQUES) DANS LA MALADIE DU SOMMEIL SONT PORTEURS DES MÊMES PARASITES (*TRYPANOSOMA BRUCEI GAMBIIENSE*) QUE CEUX INFECTANT LES TRYPANOSOMÉS CONFIRMÉS EN PARASITOLOGIE.**

## 1. Introduction

La THA causée par *T. b. gambiense* en Afrique de l'Ouest et Centrale, est habituellement diagnostiquée en utilisant deux étapes successives : d'abord, le test CATT [*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*, (Magnus *et al.*, 1978)] est utilisé pour le dépistage sérologique, suivi de la microscopie qui permet de confirmer la présence du parasite et d'initier le traitement (WHO, 1998; Chappuis *et al.*, 2005). Actuellement, le CATT continue d'être utilisé comme test de dépistage de masse du fait de sa simplicité et de sa sensibilité très élevée. Cependant, le CATT génère souvent des faux-positifs soulevant la question de savoir si les sujets CATT-positifs qui sont négatifs en microscopie (SERO) sont exposés à l'infection à *T. b. gambiense* (Garcia *et al.*, 2006). En effet, certains de ces sujets pourraient être porteurs d'une faible parasitémie indétectable en microscopie même quand la mini-colonne mAECT (mini Anion Exchange Centrifugation Technique), la méthode parasitologique la plus sensible actuellement (seuil de détection à 10 parasites/ml) (Buscher *et al.*, 2009; Camara *et al.*, 2010), est utilisée.

A cause de la faible sensibilité des méthodes parasitologiques, des méthodes moléculaires qui amplifient des séquences spécifiques d'ADN du parasite ont été développées pour le diagnostic de la THA (Deborggraeve et Buscher, 2010). Ces méthodes ont été utilisées en partie pour répondre à la question du statut parasitologique des sujets CATT-positifs non confirmés en microscopie (Kanmogne *et al.*, 1996a; Kabiri *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2000; Kyambadde *et al.*, 2000; Solano *et al.*, 2002; Koffi *et al.*, 2006). Malheureusement, les méthodes PCR les plus sensibles, ciblant des séquences répétées dans le génome du parasite sont spécifiques du sous-genre *Trypanozoon* et ne permettent donc pas de différencier les sous-espèces de *T. brucei* pathogènes pour l'homme (*T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*), de celles responsables de la trypanosomose animale africaine (*T. b. brucei*, *T. evansi* et *T. equiperdum*). Dans les zones endémiques de THA où la trypanosomose animale est couramment rencontrée, les hommes sont exposés aux piqûres des mouches tsé-tsé infectées par *T. b. brucei*. Alors que *T. b. brucei* est actuellement considéré comme non-infectieux pour l'homme (Pays *et al.*, 2006). Il est possible que l'ADN de *T. b. brucei* reste détectable dans le sang des sujets, conduisant ainsi à des PCR positives. Il est alors difficile de dire si ces PCR positives sont dues à une infection de *T. b. gambiense* ou une exposition répétée à *T. b. brucei* (Garcia *et al.*, 2000; Koffi *et al.*, 2006). D'autre part, les PCR qui sont spécifiques à *T. b. gambiense* (c'est-à-dire *T. b. gambiense* groupe 1) ciblent des séquences uniques de gènes

(Mathieu-Daude et Tibayrenc, 1994; Radwanska *et al.*, 2002b) limitant ainsi la sensibilité de ces tests dans le cas de faible parasitémie. Une autre hypothèse est que les sujets SERO pourraient être infectés par des souches particulières non virulentes de *T. b. gambiense*.

Les marqueurs microsatellites se sont avérés suffisamment polymorphes pour étudier la diversité génétique chez *T. b. gambiense* groupe 1 (Biteau *et al.*, 2000; MacLeod *et al.*, 2005b; Balmer *et al.*, 2006; Koffi *et al.*, 2007; Morrison *et al.*, 2008; Koffi *et al.*, 2009). Ces marqueurs se sont montrés assez sensibles pour caractériser les trypanosomes directement à partir d'échantillons biologiques (Koffi *et al.*, 2007) évitant ainsi la nécessité d'isoler et d'amplifier les parasites au laboratoire sur les rongeurs ou dans un milieu de culture avant analyse. Dans cette étude, nous avons appliqué la technique du génotypage par les marqueurs microsatellites pour répondre aux questions suivantes : les sujets SERO sont-ils infectés par des souches de *T. b. gambiense* et si oui, ces souches sont-elles les mêmes que celles circulant chez les sujets trypanosomés confirmés porteurs de parasites ?

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1. Zone d'étude et échantillonnage**

Cette étude a été menée dans les foyers de Bonon en Côte d'Ivoire et de Dubréka en Guinée.

### **2.2. Sujets de l'étude**

Tous les sujets de l'étude ont été identifiés en Guinée et en Côte d'Ivoire pendant les activités de surveillance de la THA (voir ci-dessus « surveillance épidémiologique »). Chez les sujets positifs au CATT/sg qui est spécifique à *T. b. gambiense*, du sang a été recueilli dans des tubes héparinés pour effectuer le CATT/pl. Il consiste à tester une série de dilutions en cascade du plasma dans du tampon CATT pour déterminer le titre final, c'est-à-dire la plus faible dilution toujours positive (CATT/pl). Tous les sujets CATT/pl positifs ont subi ensuite les examens parasitologiques par examen direct du suc ganglionnaire lorsqu'il y a présence de ganglions lymphatiques et/ou par la mAECT. Ainsi, deux catégories de participants ont été définies selon le but de l'étude :

T+ (Trypanosomés) : CATT/pl titre final  $\geq 1/8$  et confirmés en parasitologie  
SERO (séropositifs) : CATT/pl titre final  $\geq 1/8$  mais pas de parasites détectés

Les échantillons de sang ont été collectés :

(i) en 2004 dans le foyer de Bonon situé dans la partie Centre-ouest de la Côte d'Ivoire, entre la savane et la forêt mésophile où la prévalence de la THA est d'environ 0,1% (Kaba *et al.*, 2006). Des souches isolées de trypanosomés identifiés dans cette zone avaient déjà été génotypées (Koffi *et al.*, 2007) et ont été incluses dans cette étude (N = 13) de même que des souches de référence (voir ci-dessous). Pour l'échantillonnage des SERO, nous avons sélectionné des extraits d'ADN de sang provenant de sujets déjà décrits dans Koffi *et al.* (2006) pour lesquels le diagnostic PCR avait déjà été réalisé. Sur 38 SERO PCR-positifs, nous avons sélectionné ceux diagnostiqués en 2004 et pour lesquels l'ADN extrait était encore disponible (N = 24).

(ii) en 2008 dans le foyer de Dubréka situé en zone de mangrove guinéenne qui est actuellement le foyer le plus actif de la THA en Afrique de l'Ouest avec une prévalence d'environ 1% (Camara *et al.*, 2005).

### 2.3. PCR diagnostic

Pour tous les sujets, un aliquot de 1 ml de sang a été échantillonné dans des microtubes de 1,5 ml ; lesquels ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation. L'extraction d'ADN a été réalisée en utilisant le kit DNeasy ® Tissue (Qiagen) telle que décrite dans Koffi *et al.* (2006). Une PCR utilisant les amorces TBR 1/2 (**Tableau IV**) très sensibles, spécifiques du sous-genre *Trypanozoon* (Moser *et al.*, 1989) a été réalisée sur les échantillons d'ADN (Koffi *et al.*, 2006). Brièvement, l'amplification a été réalisée dans un volume final de 50  $\mu$ l contenant du tampon 1X + 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol de chaque amorce ; 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide (dNTP), 10  $\mu$ l de l'échantillon à amplifier et 1 unité de Taq ADN polymérase. L'amplification s'est faite dans un thermocycleur PTC-100 (programmable thermal controller-100) ; 35 cycles ont été effectués avec au préalable une dénaturation à 94°C de 3 min et par cycle : une phase de dénaturation à 94°C de 30 sec, une phase d'appariement des amorces à 55°C de 30 sec et une phase de polymérisation à 72°C de 1 min. Après élévation finale à 72°C pendant 5 min, 20  $\mu$ l des produits d'amplification ont été

migrés sur gel d'agarose à 2% contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. Le résultat de l'électrophorèse est photographié sous lumière UV. En cas de présence d'une bande à 177 pb, taille de la séquence spécifique recherchée, la PCR est considérée positive. Les échantillons de sang retenus pour le génotypage sont ceux positifs à la PCR diagnostic TBR 1/2.

**Tableau IV : Séquences des amorces TBR 1/2 spécifiques au groupe *Trypanozoon***

Spécificité	Amorces	Séquences des amorces	Référence
<i>T. brucei s.l.</i>	TBR-1	5'-CGAATGAATATTAACAATGCGCAG-3'	Moser et al. (1989)
	TBR-2	5'-AGAACCATTATTAGCTTTGTTGC-3'	

#### 2.4. Génotypage de microsatellites

Les souches de référence ainsi que celles isolées en 2004 dans le foyer de Bonon utilisées dans cette étude, ont été génotypées en utilisant la méthode décrite dans Koffi et al. (2007). Nous avons utilisé la même méthode pour génotyper les sujets SERO qui proviennent du même site d'étude. Avec l'amélioration de la technique de génotypage ces dernières années, nous avons utilisé des méthodes récentes pour caractériser les échantillons de Guinée.

Pour les échantillons de Côte d'Ivoire (souches de référence et celles isolées en 2004 dans le foyer de Bonon), les loci microsatellites ont été amplifiés en utilisant sept paires d'amorces: M6C8-CA (M6C8) et MT30/33-AC/TC (MT30/33, (Biteau et al., 2000), Micbg1, Micbg5, Micbg6, Misatg4, et Misatg9 (Koffi et al., 2007). L'amplification par PCR a été 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 désoxyribonucléotide (dNTP), 1 X de tampon d'enzyme contenant 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 unité de Taq polymérase (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, Micbg5, Micbg6 : après dénaturation à 95°C pendant 3 min, 40 cycles avec dénaturation à 95°C de 30 sec, une phase d'appariement des amorces à 60°C de 30 sec, une élongation à 72 °C de 1 min, suivie 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, une phase d'appariement des amorces 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 appariement à 56°C de 30 sec, une élongation à 72°C de 1 min, suivie d'une élongation finale 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, une phase d'appariement des amorces 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 appariement à 55°C de 30 sec, une élongation à 72°C de 1 min, suivie d'une élongation finale 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 (Koffi *et al.*, 2007).

Pour les échantillons de Guinée, les loci microsatellites ont été amplifiés en utilisant six paires d'amorces : M6C8-CA (Biteau *et al.*, 2000), Micbg5, Micbg6 et Misatg4 (Koffi *et al.*, 2007) et CH5/JS2 et CH1/18 (MacLeod *et al.*, 2005a). Un µl d'ADN extrait du sang a été utilisé pour la PCR dans un volume de 10 µl. L'amplification par Nested-PCR a été réalisée dans les conditions suivantes : Tampon buffer (45 mM Tris-HCl pH 8,8 ; 11 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4,5 mM de MgCl<sub>2</sub> ; 6,7 mM de 2-mercaptoéthanol ; 4,4 µM EDTA, 113 µg/ml de BSA, 1 mM de chacun des quatre désoxyribonucléotides triphosphates), 1 µM de chaque amorce et 0,1 unité de Taq polymérase (ABgene) par réaction de 10 µl. Les conditions de Nested-PCR pour les deux « rounds » étaient de 28 cycles de 50 sec à 95°C, 50 sec à 55°C et 1 min à 65°C. Ces conditions sont les mêmes pour tous les marqueurs microsatellites. Un µl de la dilution 1/280 du produit PCR du premier round a été utilisé comme produit à amplifier dans le deuxième round de Nested-PCR. Une amorce de chaque paire de microsatellites du second round de Nested-PCR était marquée par un fluorochrome 5'-FAM ou HEX, ce qui permet une séparation des produits sur un séquenceur à base de capillaires (ABI 3100 Genetic Analyser ; Applied Biosystems). Un ensemble de tailles standardisées et labellisées (GS400 HD markers ; Applied Biosystems) a été inclus dans chaque échantillon, permettant la détermination de la taille du produit PCR au niveau de 1 pb en utilisant le logiciel Peak Scanner V1.0 (Applied Biosystems).

## 2.5. Souches de référence

Pour les échantillons de Côte d'Ivoire, nous avons utilisé des souches de référence de *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense* groupes 1 et 2 (**Annexe II**). Nous avons également utilisé des souches de référence de *T. b. gambiense* groupe 1 isolées chez des trypanosomés en 2004 dans le foyer de Bonon (la même année et dans la même zone de même que les SERO). Pour les souches de référence décrites en **Annexe II**, les résultats du génotypage étaient déjà disponibles (Koffi *et al.*, 2007). Les résultats TRBPA ont été retirés pour la raison suivante : le locus TRBPA 1/2 présente une variance telle que ce locus en est devenu ininterprétable ; cette variance pourrait s'expliquer par l'existence d'allèles nuls ou une sélection complexe. TRBPA 1/2 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 (Koffi *et al.*, 2009).

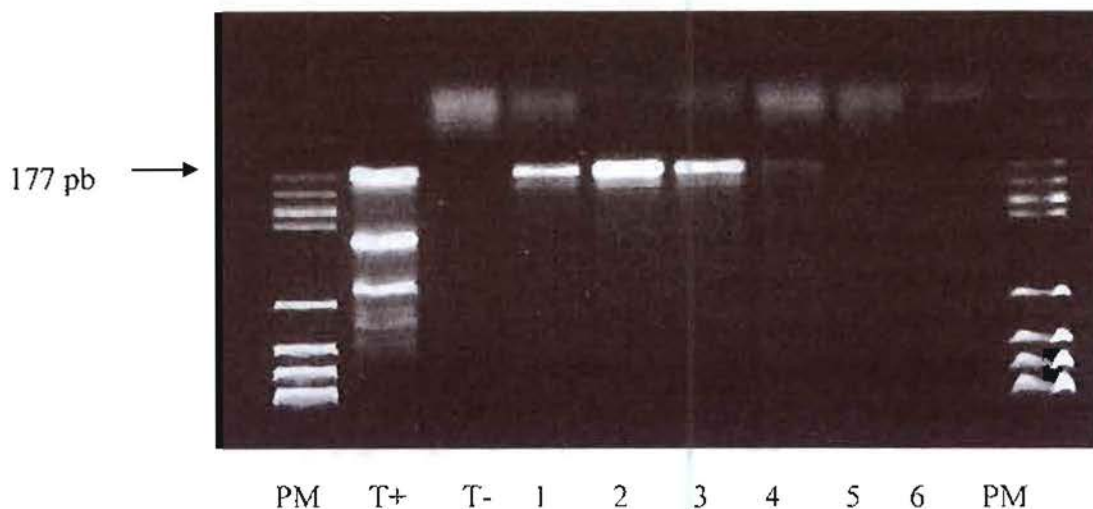
## 2.6. Analyses des données

Les relations entre souches isolées des SERO et les autres souches de trypanosomés (T+) ont été étudiées en générant un arbre « dendrogramme » (neighbour-joining tree, NJTree) sur la base de la matrice de distance de Cavalli-Sforza et Edwards (Cavalli-Sforza et Edwards, 1967) comme recommandé (Takezaki et Nei, 1996) à l'aide du logiciel Microsatellite analyser (MSA) 4.05 (Dieringer et Schlotterer, 2002). Le dendrogramme (NJTree) a été visualisé avec le logiciel Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA 5 Beta #04 (Tamura *et al.*, 2007).

# 3. Résultats

## 3.1. PCR diagnostic

Comme mentionné ci-dessus, 24 SERO de la Côte d'Ivoire donnant un résultat positif à la PCR TBR 1/2 (Koffi *et al.*, 2006) et pour lesquels l'ADN était encore disponible, ont été sélectionnés pour l'analyse. En Guinée, des échantillons de sang ont été prélevés chez 65 trypanosomés (ou T+) et 54 SERO. Tous les T+ et 20 SERO parmi les 54 étaient positifs à la PCR TBR 1/2 (**Figure 15**). Tous les extraits d'ADN positifs ont ensuite été utilisés pour la suite de l'étude.

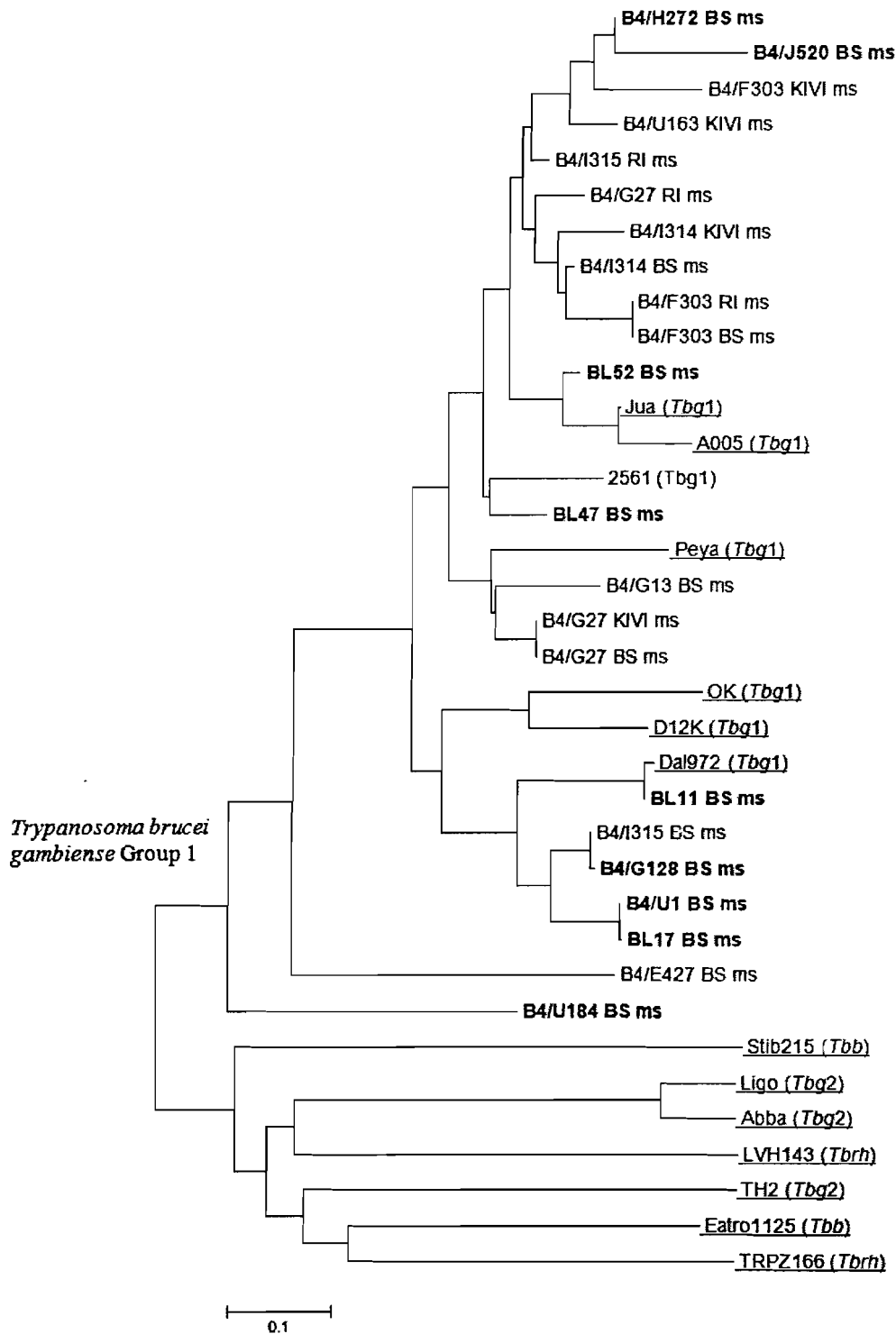


**Figure 15 : Exemple de révélation d'une PCR TBR 1/2 sur gel d'agarose**

PM = poids moléculaire, T+ = témoin positif de manipulation, T- = témoin négatif attestant qu'il n'y a pas eu de contamination de la PCR, les échantillons 1 et 2 correspondent à 2 trypanosomés (T+) positifs en PCR (présence de la bande à 177 paires de base), 3 et 4 sont des SERO positifs en PCR, 5 et 6 sont des SERO négatifs en PCR (absence de la bande à 177 pb).

### 3.2. Génotypage des échantillons de Côte d'Ivoire

Afin de déterminer le génotype des parasites, sept marqueurs microsatellites ont été amplifiés à partir des échantillons d'ADN. Il n'y a pas eu de produit d'amplification avec les sept loci pour 10 des 24 SERO. Les résultats du génotypage des 14 SERO restants et des 27 souches de référence, y compris les 13 souches de *T. b. gambiense* groupe 1 provenant de Bonon en 2004 sont donnés en **Annexe III**. Malheureusement, sur cinq SERO, un seul locus a été amplifié. Ces individus n'ont pas été pris en compte dans les analyses. Le dendrogramme « NJtree » obtenu avec les neuf autres SERO et les souches de référence est donné ci-dessous dans la **Figure 16**. Deux groupes peuvent être observés dans ce dendrogramme, un regroupement de toutes les souches de référence de *T. b. gambiense* groupe 1, et le second regroupant les autres souches de référence. Le fait le plus intéressant est que tous les SERO s'intègrent dans le même cluster que *T. b. gambiense* groupe 1. Huit SERO sur les neufs partagent des profils très similaires à ceux observés chez les trypanosomés et un, bien que s'intégrant toujours dans *T. b. gambiense* groupe 1, semble être génétiquement plus distant. On peut ajouter que les cinq SERO retirés des analyses du dendrogramme ont montré des allèles spécifiques de *T. b. gambiense* groupe 1 (**Annexe III**).

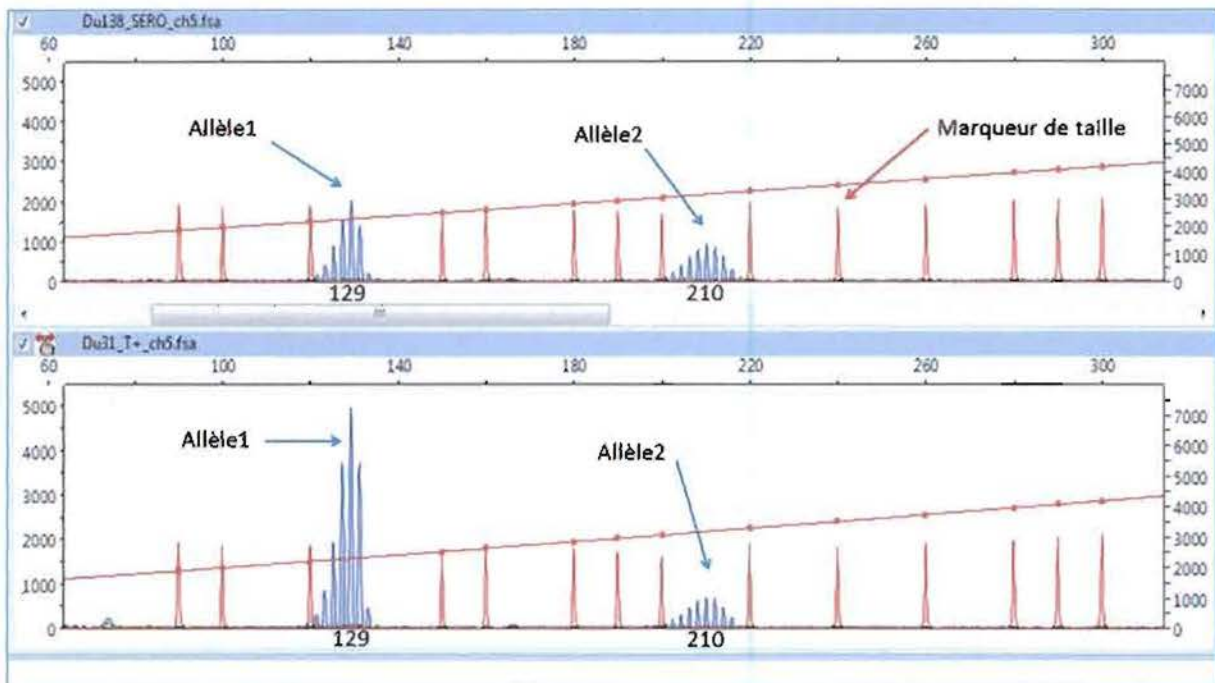


**Figure 16 : Dendrogramme basé sur la matrice de Cavalli-Sforza et Edwards des profils microsatellites des échantillons de Côte d'Ivoire.**

Les souches de référence sont soulignées et les séropositifs (SERO) sont en gras.

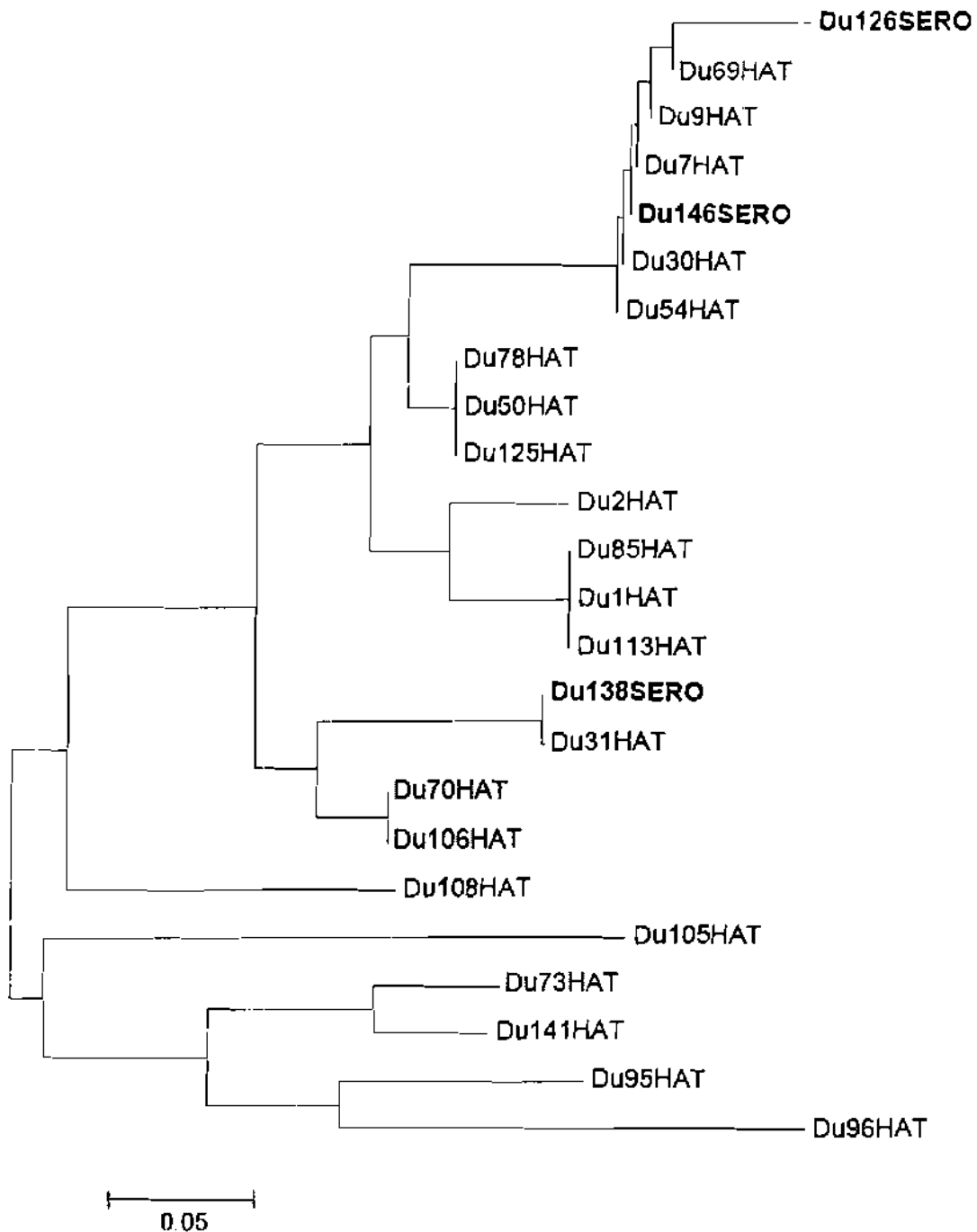
### 3.3. Génotypage des échantillons de Guinée

Sur les 65 échantillons d'ADN extraits des trypanosomés, 21 ont donné un génotype multilocus complet. Sur les 20 SERO utilisés pour le génotypage, seulement cinq ont donné un produit d'amplification avec au moins un locus. Les résultats du génotypage de microsatellites des 21 T+ et des cinq SERO sont donnés en **Annexe IV**. Pour deux SERO, un seul locus a été amplifié. Ces deux SERO ont été retirés des analyses. Le dendrogramme (NJtree) obtenu avec les trois SERO restants et les 21 T+ est donné dans la **Figure 18**. Les profils microsatellites des SERO sont identiques ou très similaires aux profils observés chez les trypanosomés (**Figure 17**).



**Figure 17 : Profils électrophorétiques d'un SERO (a) et d'un T+ (b) présentant des allèles identiques.**

Il semble n'y avoir aucune différence entre SERO et T+ qui sont regroupés dans le même cluster. Les deux SERO retirés de l'analyse présentaient des allèles qui sont également observés chez les trypanosomés (**Annexe IV**).



**Figure 18 : Dendrogramme basé sur la matrice de Cavalli-Sforza et Edwards des profils microsatellites obtenus des échantillons de Guinée.**

Les SERO sont en gras et les trypanosomés en normale (non gras).

#### 4. Discussion

Dans les zones endémiques de THA, le dépistage du sujet infecté par *T. b. gambiense* est problématique. Cela est dû au fait que le test de dépistage de masse (CATT) est connu pour son manque de spécificité et peut donc donner des faux-positifs, c'est-à-dire des individus qui sont positifs au test mais qui n'ont jamais été exposés à *T. b. gambiense*. En outre et contrairement à *T. b. rhodesiense*, il est connu que *T. b. gambiense* peut être présent chez son hôte humain avec de faibles parasitémies. Cependant, les tests parasitologiques disponibles ont une sensibilité limitée et peuvent seulement détecter, pour le mieux, des parasites à une concentration de 10 parasites/ml de sang (Buscher *et al.*, 2009; Camara *et al.*, 2010). Pour ces raisons, le statut parasitologique des sujets CATT-positifs qui sont négatifs aux tests parasitologiques (SERO) a longtemps été douteux. Plusieurs éléments prouvent qu'une partie au moins des sujets SERO sont effectivement porteurs de parasites, mais avec une parasitémie très faible en dessous du seuil de la limite de détection des tests parasitologiques. Les méthodes PCR pour détecter l'ADN du parasite ont montré qu'une fraction importante de sujets SERO étaient positifs, cependant cela a nécessité l'utilisation de méthodes très sensibles ciblant des séquences répétées du parasite qui ne sont pas spécifiques de *T. b. gambiense*, laissant ainsi des doutes sur la nature exacte des parasites infectant cette catégorie de sujets (Garcia *et al.*, 2006; Koffi *et al.*, 2006). En Afrique de l'Ouest, le suivi des sujets SERO dans les zones endémiques de THA a montré que certains de ces sujets restent CATT-positifs sur de longues périodes sans développer la maladie (Garcia *et al.*, 2000). La trypanolyse qui est très spécifique de *T. b. gambiense* (Van Meirvenne *et al.*, 1995) a montré qu'une fraction importante de ces sujets SERO étaient positifs à ce test dans les zones de transmission à *T. b. gambiense* (Jamonneau *et al.*, 2010). Enfin, une récente étude de la génétique de populations de trypanosomes en Guinée a montré que l'incidence locale observée de la THA semble être inférieure à la taille effective de la population clonale correspondante, sans doute parce que de nombreux hôtes demeurent inconnus (Koffi *et al.*, 2009).

Dans cette étude, nous avons utilisé des marqueurs microsatellites pour étudier l'importance épidémiologique des sujets SERO par rapport aux trypanosomés. Plus précisément, nous nous sommes intéressés à l'examen de ces sujets pour la mise en évidence de l'ADN et le génotypage de tout trypanosome présent afin de déterminer leur relation locale avec les parasites de *T. b. gambiense* groupe 1. Cependant, certains problèmes d'échecs

d'amplification comme déjà observés (Koffi *et al.*, 2007) ont soulevé la question de la sensibilité des marqueurs microsatellites lorsqu'ils sont appliqués sur l'ADN extrait directement à partir des échantillons de sang. Un tel problème est devenu un inconvénient important de la méthode lorsqu'elle est appliquée aux sujets SERO pour lesquels, la parasitémie dans le sang est faible (c'est-à-dire non détectable par les méthodes parasitologiques). Cela est particulièrement vrai en Guinée où les parasitémies de *T. b. gambiense* dans le sang des patients sont connues pour être très faibles (Camara *et al.*, 2005; Camara *et al.*, 2010). En effet, en Côte d'Ivoire, les échecs d'amplification ont été observés chez les SERO pour 119/168 (24 SERO/sept marqueurs) profils. En Guinée, les échecs d'amplification ont été observés chez les trypanosomés pour 144/390 (65 THA/six marqueurs) profils et chez les SERO pour 106/120 (20 SERO/six marqueurs) profils. L'amélioration de la sensibilité du génotypage de microsatellites directement à partir des échantillons biologiques est un objectif hautement souhaitable pour améliorer le génotypage des trypanosomes directement à partir des échantillons biologiques principalement chez les sujets présentant une faible parasitémie.

Néanmoins, en tenant compte des génotypes disponibles pour les SERO, nous avons montré pour la première fois que l'ADN du parasite extrait des sujets SERO appartient à *T. b. gambiense* groupe 1 à la fois en Côte d'Ivoire et en Guinée. Cette observation confirme donc qu'au moins certains SERO peuvent être infectés par *T. b. gambiense* groupe 1 comme précédemment suspecté par l'utilisation d'autres méthodes moléculaires.

Le traitement des sujets CATT-positifs qui ne sont pas confirmés par les tests parasitologiques a longtemps été une question controversée en raison (i) de la toxicité des médicaments disponibles, (ii) des contraintes des horaires de traitement pour les autres personnes en bonne santé (accompagnants de malades), (iii) du fait que les recommandations de l'OMS sont de traiter uniquement les cas de parasitologie positive (WHO, 1998). Toutefois, cette situation n'était pas satisfaisante car le suivi de cohortes de sujets CATT-positifs non confirmés en Angola (Simarro *et al.*, 1999) et au Sud-Soudan (Chappuis *et al.*, 2004) ont montré qu'ils avaient un risque élevé de développer la maladie dans les années suivantes, en particulier ceux présentant des titres faibles de CATT/pl  $\geq 1/16$ . Ainsi, ces auteurs ont recommandé le traitement de ces sujets dans les populations où la prévalence de la maladie est élevée comme dans les foyers de forte endémie ou épidémie rencontrés en Afrique Centrale. Pour Inojosa *et al.* (2006), cette stratégie ne devrait pas être appliquée

lorsque la prévalence de la maladie est faible, comme c'est le cas en Afrique de l'Ouest mais aussi dans de nombreux foyers en Afrique Centrale (Simarro *et al.*, 2010). Espérons que ce serait également le cas dans les foyers actuels de forte endémie ou épidémie dans le cadre du processus d'élimination de la THA (Simarro *et al.*, 2008). Dans les foyers à faible prévalence, la plupart des sujets SERO ne développent pas la maladie. Par exemple, dans un foyer d'endémie faible de la Côte d'Ivoire, un seul patient a été diagnostiqué comme trypanosomé durant deux ans de suivi sur 77 sujets SERO (Garcia *et al.*, 2000).

Notre constat, que les trypanosomes génotypés à partir du sang de sujets SERO s'intègrent dans le groupe 1 de *T. b. gambiense*, est donc conforme à la recommandation de traiter les cas de THA. Toutefois, il convient de garder à l'esprit que le phénotype des sujets SERO est complexe : (i) la réaction CATT peut ne pas être spécifique, (ii) ces sujets peuvent être dans la phase très précoce de l'infection, telle qu'elle est observée dans les foyers épidémiques en Afrique Centrale pour les personnes présentant des titres de CATT  $\geq 1/16$ , dont environ la moitié développe la maladie l'année suivante, (iii) ils peuvent être des porteurs asymptomatiques de parasites capables de contrôler la parasitémie du sang à un niveau très bas pendant de longues périodes de temps, tel qu'il est observé en Afrique Occidentale dans les zones de faible endémicité (Garcia *et al.*, 2006). Il convient de noter qu'une fraction importante des sujets CATT-positifs dans les foyers épidémiques de l'Afrique Centrale (dont la moitié des individus ont un CATT  $\geq 1/16$  et tous les autres) peut également entrer dans cette catégorie plus tard. Actuellement, ces sujets ne sont pas traités par les programmes nationaux de lutte bien qu'ils puissent agir en réservoir de parasites. Il est important de noter qu'en Guinée, pour les cinq SERO chez lesquels l'ADN de *T. b. gambiense* aurait été mis en évidence, trois SERO ont été suivis après un an et sont restés positifs au CATT mais sans être confirmés en parasitologie. En Côte d'Ivoire, trois SERO auraient été suivis en 2009 (cinq ans après le diagnostic initial) et un seul cas a été confirmé trypanosomé (données non présentées). Des travaux supplémentaires sont maintenant nécessaires pour mieux caractériser le rôle joué par ces sujets dans la transmission du parasite pour aider à la décision thérapeutique concernant cette catégorie de sujets. De toute façon, sur le plan éthique et en terme de santé publique, le traitement de sujets SERO restera une question ouverte jusqu'à ce que de nouveaux traitements bien tolérés et moins gênants (administration orale) soient disponibles pour le traitement de la THA. Avant cette issue incertaine, (Brun *et al.*, 2010), il a été récemment et fortement recommandé d'utiliser le test

trypanolyse très spécifique pour distinguer les SERO ayant été en contact avec *T. b. gambiense* qui devraient être suivis dans les stratégies de lutte (Jamonneau *et al.*, 2010). Les méthodes moléculaires telles que l'amplification isotherme (Njiru *et al.*, 2011) ou l'amplification basée sur la séquence de l'acide nucléique avec une oligochromatographie (Mugasa *et al.*, 2009) pourraient également être utilisées afin de mieux caractériser le statut parasitologique des SERO.

L'infection par *T. b. gambiense* produit une grande diversité de résultats chez les hôtes humains allant de la forme classique décrite fatale à des porteurs asymptomatiques (Checchi *et al.*, 2008; Sternberg et MacLean, 2010). Une question est donc de savoir si ces différences sont liées à des parasites ou à des facteurs de l'hôte. Une conclusion importante de cette étude est que nous n'avons pas trouvé de différence entre les parasites génotypés de SERO et des trypanosomés. Depuis que *T. b. gambiense* a été montré comme étant probablement un organisme strictement clonal (Koffi *et al.*, 2009), le regroupement des trypanosomes de SERO aurait dû être attendu si le phénotype des SERO était dû à des souches particulières de parasites. Ce n'est évidemment pas le cas puisque les parasites des SERO se retrouvent dans toutes les branches principales du dendrogramme en Guinée et en Côte d'Ivoire. Nos résultats sont donc en faveur de l'existence de facteurs liés à l'hôte impliqués dans le contrôle de l'infection. A cet égard, le polymorphisme des gènes de cytokines a été associé à la THA (Courtin *et al.*, 2006; Courtin *et al.*, 2007). D'autres investigations sont nécessaires pour explorer plus profondément les réponses immunitaires et les interactions hôtes/parasites chez ces sujets séropositifs et aparasitémiqes qui n'ont pas encore reçu d'attention. Comprendre comment les individus sont naturellement capables de contrôler l'infection parasitaire peut conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de la THA.

**ACTIVITÉ DE RECHERCHE 2 : STRUCTURE GÉNÉTIQUE  
DES POPULATIONS DE *TRYPANOSOMA BRUCEI*  
*GAMBIENSE* EN GUINÉE SELON LES FACTEURS DE  
L'HÔTE.**

## 1. Introduction

La THA ou maladie du sommeil est un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne. L'agent pathogène est *Trypanosoma brucei*, un euglénozoaire parasite diploïde transmis par des glossines ou mouches tsé-tsé. Cette espèce a été subdivisée en trois sous-espèces morphologiquement identiques sur la base de critères extrinsèques incluant l'hôte, la distribution géographique et les signes cliniques : *T. b. gambiense* est responsable de la forme chronique en Afrique de l'Ouest et Centrale et *T. b. rhodesiense* provoque une infection aiguë chez l'homme en Afrique de l'Est et du Sud, tandis que la 3<sup>ème</sup> sous-espèce, *T. b. brucei* n'est pas infectieux pour l'homme (Hoare, 1972). Grâce à la biologie moléculaire et aux analyses génétiques, c'est maintenant un fait connu que cette définition « ne reflète pas la réalité » (MacLean *et al.*, 2007) et seul le groupe 1 de *T. b. gambiense* (Gibson, 1986) peut être considéré comme une entité génétique distincte. Ce groupe génétiquement homogène (à tout le moins relativement aux autres lignées) est composé de souches isolées d'humains en Afrique de l'Ouest et Centrale (Gibson, 2007) mais aussi de souches isolées d'animaux sauvages et domestiques suggérant l'existence d'un réservoir animal (Mehlitz *et al.*, 1982; Simo *et al.*, 2008). En outre, une importante diversité clinique a été observée chez des patients infectés par des souches appartenant à ce groupe (Garcia *et al.*, 2006). Le rôle du polymorphisme génétique de *T. b. gambiense* groupe 1 dans la diversité de réponses à l'infection de la THA, demeure une question ouverte. En plus, des infections mixtes avec au moins deux génotypes chez le même patient semblent être répandues (Jamonneau *et al.*, 2003; Koffi *et al.*, 2007) et de telles infections sont suspectées être associées à une faible parasitémie chez les patients asymptomatiques (Jamonneau *et al.*, 2004a).

Dans la THA, les trypanosomes peuvent être rencontrés dans trois différents fluides biologiques : le sang, la lymphe et le liquide céphalo-rachidien. La localisation des trypanosomes dans l'un de ces trois fluides biologiques est corrélée avec la progression et le stade de la maladie. En effet, la THA commence par une phase lymphatico-sanguine (1<sup>ère</sup> phase ou phase précoce) durant laquelle le parasite se multiplie dans le sang et la lymphe, suivie d'une phase méningo-encéphalique (2<sup>ème</sup> phase ou phase avancée) correspondant à l'invasion du système nerveux central. Une importante observation sur le terrain de la THA est qu'une diversité de réponses à l'infection peut se produire lors de l'infection de l'homme par *T. b. gambiense* : alors qu'une invasion rapide du système nerveux central se produit chez certains individus (forme aiguë), la première phase de la maladie peut durer pendant des

années chez d'autres individus et il n'est pas encore bien compris si cela est dû à des souches particulières ayant un tropisme particulier pour le LCR ou à des facteurs liés à l'hôte (Sternberg et MacLean, 2010; Bucheton *et al.*, 2011). La présence chez le même patient de différents génotypes de trypanosomes dans le sang et le LCR a déjà été suspectée (Truc *et al.*, 2002). Comme il a été déjà mis en évidence dans la maladie de Chagas (Valadares *et al.*, 2008), un tropisme tissulaire différentiel peut aussi être suspecté dans le cas de la THA.

L'écologie, les modes de reproduction, les tailles des populations et la dispersion des trypanosomes peuvent surtout être appréciés par des méthodes indirectes utilisant des marqueurs moléculaires polymorphes sous le terme d'épidémiologie moléculaire (Tibayrenc, 1998; De Meeûs *et al.*, 2007). La connaissance des paramètres biologiques des parasites mentionnés ci-dessus est d'une importance cruciale pour une meilleure compréhension de l'épidémiologie de la maladie et définir des stratégies de lutte durable. Toutefois, une estimation précise de ces paramètres nécessite une prise en compte de l'analyse des facteurs ayant un impact sur la distribution de la variation génétique dans les populations de parasites tels les échelles temporelle et spatiale de l'échantillonnage (Koffi *et al.*, 2009; Rougeron *et al.*, 2009). Les marqueurs microsatellites sont assez polymorphes pour étudier la diversité génétique au sein du groupe 1 de *T. b. gambiense*. Il a été suggéré que de tels marqueurs pourraient offrir de nouvelles perspectives dans l'étude du rôle du polymorphisme génétique de *T. brucei s.l.* dans la diversité de réponses à l'infection (Koffi *et al.*, 2007). En plus, les marqueurs microsatellites se sont montrés assez sensibles pour être appliqués au génotypage de *T. brucei* directement sur les échantillons biologiques (Morrison *et al.*, 2007) évitant ainsi l'isolement *in vivo* et *in vitro* des trypanosomes qui sont des protocoles lourds et onéreux.

Dans cette étude, nous utilisons une approche de génétique des populations basée sur les marqueurs microsatellites pour tester l'homogénéité génétique des souches à travers différents fluides biologiques et différents statuts du patient en fonction de la phase de la maladie, du site et de la date de l'échantillonnage car une différenciation spatio-temporelle a été récemment observée (Koffi *et al.*, 2009).

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Zone d'étude et échantillonnage

Les échantillons de trypanosomes ont été collectés dans les foyers actifs de THA (Boffa, Dubréka et Foréariah) situés dans les zones de mangrove du littoral guinéen (Camara *et al.*, 2005; Courtin *et al.*, 2010a) entre novembre 2007 et avril 2009. Tous les échantillons (0,5 ml de sang, 10  $\mu$ l de suc ganglionnaire s'il y'a présence de ganglions et 0,5 ml de LCR collectés dans 1,5 ml de tube de centrifugation et conservés à -20°C jusqu'à utilisation) ont été collectés durant les prospections médicales.

### 2.2. PCR Diagnostic

L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide du kit DNeasy® Tissue (Qiagen). La PCR utilisant des amorces hautement sensibles TBR 1/2 ciblant des séquences répétées spécifiques au groupe *Trypanozoon* (Moser *et al.*, 1989) a été effectuée sur les extraits d'ADN comme brièvement décrit dans l'activité de recherche 1 (Koffi *et al.*, 2006). Seuls les extraits d'ADN positifs à la PCR TBR 1/2 ont été utilisés pour les analyses microsatellites.

### 2.3. Géotypage par les marqueurs microsatellites

#### 2.3.1. Nested PCR

La méthode d'amplification utilisée est la Nested PCR. C'est une méthode d'amplification au cours de laquelle le produit issu de la première PCR est de nouveau amplifié à l'aide d'un second couple d'amorces. Ce couple d'amorces s'hybride à une partie interne (*nested* ou niché) de la séquence amplifiée. Cette PCR permet d'augmenter d'une part la sensibilité de la méthode puisque deux PCR successives sont réalisées et d'autre part, la spécificité de la réaction car deux couples d'amorces sont utilisés.

Nous avons utilisé six « nested » paires d'amorces oligonucléotides pour les marqueurs microsatellites Ch5/JS2, Ch1/18 (MacLeod *et al.*, 2005a), M6C8 (Biteau *et al.*, 2000), Misatg4, Micbg5, Micbg6 (Koffi *et al.*, 2007). Le nombre de chromosomes sur

lesquels les loci microsatellites sont situés est indiqué dans le **Tableau V**. Un  $\mu\text{l}$  d'extrait d'ADN de chaque échantillon (sang, suc ganglionnaire, LCR) a été utilisé pour la PCR dans un volume final de 10  $\mu\text{l}$  de réaction. L'amplification par Nested-PCR a été réalisée en utilisant les conditions suivantes, PCR buffer (45 mM Tris-HCl pH 8,8 ; 11 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4,5 mM  $\text{MgCl}_2$  ; 6,7 mM 2-mercaptoéthanol ; 4,4  $\mu\text{M}$  EDTA, 113  $\mu\text{g/ml}$  de BSA, 1 mM de chacune des quatre désoxyribonucléotides triphosphates), 1  $\mu\text{M}$  de chaque amorce et 0,1 unité de Taq polymérase (ABgene) par réaction de 10  $\mu\text{l}$ . Les réactions ont été recouvertes d'huile minérale pour éviter l'évaporation et l'amplification a été réalisée dans un thermocycleur "Robocycler gradient 96" (Stratagene, La Jolla, CA, UK). Toutes les réactions PCR ont été amplifiées dans les conditions suivantes : 28 cycles de 95°C pendant 50 sec, 55°C pendant 50 sec et 65°C pendant 1 min. 1  $\mu\text{l}$  de la dilution 1/280 des produits de la 1<sup>ère</sup> étape de PCR a été utilisé pour la 2<sup>ème</sup> étape de PCR. Une amorce de chaque paire de microsatellites de la 2<sup>ème</sup> étape de Nested-PCR était marqué par un fluorochrome 5'-FAM ou HEX, ce qui permet une séparation des produits sur un séquenceur à capillaires (ABI 3100 Genetic Analyser ; Applied Biosystems). Un ensemble de tailles standardisées et labellisées (GS400 HD markers ; Applied Biosystems) a été inclus dans chaque échantillon, permettant de déterminer la taille du produit PCR au niveau de 1 pb en utilisant le logiciel Peak Scanner V1.0 (Applied Biosystems). Pour chaque plaque de PCR et chaque marqueur, un témoin négatif (eau ultra-pure) a été inclus à la première étape d'amplification et a ensuite été utilisé pour la deuxième amplification (Nested). Les produits de la 2<sup>ème</sup> étape de PCR ont été séparés par électrophorèse sur 3% de Nusieve GTG agarose gel dans un tampon TBE 0,5 X contenant 50ng/ml de bromure d'éthidium, puis visualisés à la lumière ultra-violette (UV). Le résultat de l'électrophorèse est photographié pour analyse. Les séquences des amorces sont données dans le **Tableau V**.

### *2.3.2. Préparation des plaques de génotypage*

En fonction de l'intensité des profils électrophorétiques sur le gel, une dilution adéquate (1/10 – 1/500) est réalisée pour chaque produit de la 2<sup>ème</sup> étape de Nested PCR en fonction de l'intensité du profil du témoin positif. Puis 20 µl de chaque dilution est distribuée dans les différents puits de la plaque de génotypage. Les puits sont ensuite recouverts d'huile minérale pour éviter l'évaporation. Les plaques sont enfin prêtes pour le génotypage.

### *2.3.3. Génotypage*

Le génotypage est réalisé à l'aide du séquenceur automatique doté de 8 capillaires (ABI 3730 Capillary DNA Sequencer, Genetic Analyser ; Applied Biosystems ; Dundee Sequencing Service <http://www.dnaseq.co.uk> ) qui est couplé à un ordinateur.

### *2.3.4. Détermination de la taille des allèles*

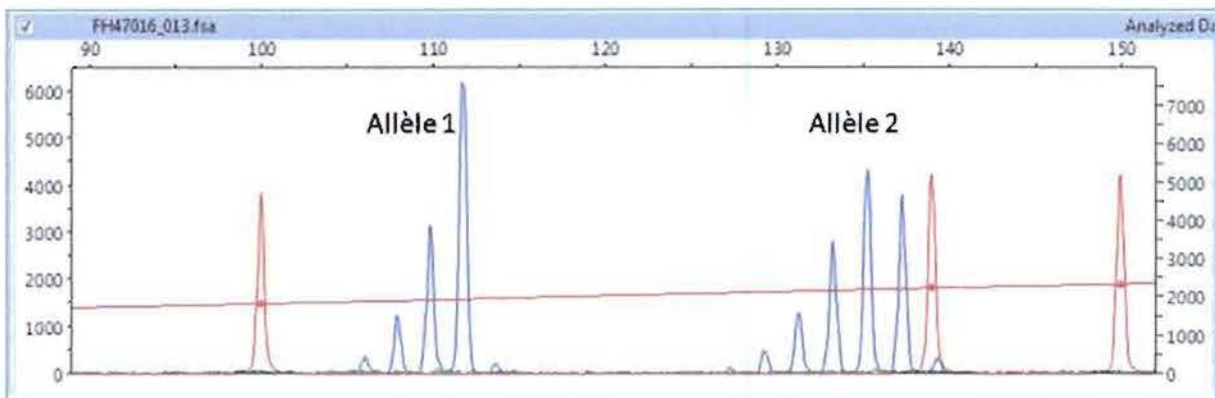
Après le génotypage, les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Peak Scanner<sup>TM</sup> Software Version 1.0 (Applied Biosystems). Ce logiciel a permis de déterminer la taille des allèles. La taille a été déterminée par rapport à un ensemble de normes de taille (GS400 HD markers, Applied Biosystems) qui permet une résolution de 1 pb.

**Tableau V : Liste des marqueurs microsatellites**

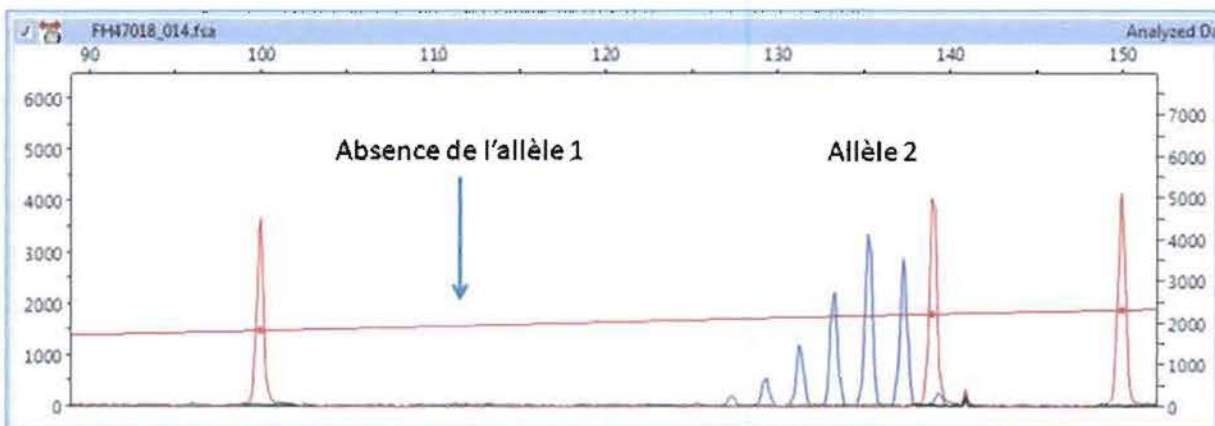
Loci	Outside (externe)		Nested (niché)	
	Amorces	Séquence (5' → 3')	Amorces	Séquence (5' → 3')
Ch1/18	1/18-C	tataatgcggttgtgagaat	1/18-A-FAM	tgtagaatggtactcacgcgctg
	1/18-D	gaagggaggggaacagaagcaggg	1/18-B	caacgttagcacacaattcctgtg
Ch1/M6C8 ( <i>T.b.g</i> )	M6C8-C1	gctgttgaattgcctgta	M6C8-A-FAM	cttcaaccgccttatcagc
	M6C8-D1	caaccactccttgatattcac	M6C8-B	ggctagttacactgtagttctc
Ch5/JS2	JS2-C	agtaatgggaatgagcgtcaccag	JS2-A-FAM	gattggcgaacaacttcacatacg
	JS2-D	gatcttcgcttacacaagcggtag	JS2-B	cttcttccttgccattgtttactat
Ch10/Micbg5 ( <i>T.brucei</i> )	Micbg5-C1	gctctatatatttcttgcactc	Micbg5-A-FAM	caaagcaaaggagaagcgtga
	Micbg5-D1	gcgagtagcgaaggaga	Micbg5-B	cccagttggacttgtaacgggt
Ch11/Micbg6 ( <i>T.b.g</i> )	Micbg6-C1	ggtagtggegggtgtattc	Micbg6-A-FAM	cggtgtagtggcattcgggt
	Micbg6-D1	gacctgaagaggccatgat	Micbg6-B	gctcgcgcctcatgaggtg
Ch11/Misatg 4 ( <i>T.b.g</i> )	Misatg4-C2	atcgtagtctggtgttgc	Misatg4-A-FAM	gaagtaactctatacgggtgg
	Misatg4-D2	caagatacgtcgcctctg	Misatg4-B	gtttccccttgnrtaatc

#### 2.4. Analyses des données

Les résultats du génotypage de microsatellites ont été analysés avec le logiciel Peak Scanner™ Software Version 1.0 (Applied Biosystems). Cette analyse a montré deux types de profil allélique : un profil allélique avec deux allèles interprété hétérozygote et un profil allélique avec un seul allèle, normalement interprété homozygote mais pouvant aussi provenir d'un allèle dropout (**Figure 19, Figure 20**). L'allèle dropout est, chez un individu hétérozygote, la non-amplification d'un allèle au cours de la PCR au profit de l'autre allèle. La suite des analyses a été réalisée en tenant compte de ces profils alléliques.



**Figure 19 : Profil bi-allélique (allèles 1 et 2) représentant un profil d'un hétérozygote.**



**Figure 20 : Profil mono-allélique représentant un homozygote ou un profil dû à l'allèle dropout.**

Pic rouge : marqueur de poids. Sur cette figure, nous notons l'absence de l'allèle 1 qui se traduit ici par la non-amplification au cours de la PCR.

En supposant que la population de *T. b. gambiense* groupe 1 est clonale en accord avec des études antérieures (Morrison *et al.*, 2008; Koffi *et al.*, 2009; Simo *et al.*, 2010), nous nous attendons à un excès d'hétérozygotes à plusieurs loci. Cependant, de nombreux échantillons n'ont pas pu être amplifiés à certains loci (génotypes blancs) dûs au faible nombre de parasites détectés directement dans les fluides biologiques. En prenant en considération le nombre élevé d'échantillons dont l'amplification a échoué, nous avons interprété ici (pour la comparaison entre fluides biologiques) la position des homozygotes comme étant le résultat de l'allèle « dropout » ; c'est-à-dire un seul allèle a été amplifié avec succès. Si cela est vrai, nous nous attendons à une corrélation négative entre le nombre des échecs d'amplification des deux allèles à un locus (blancs) avec la proportion des positions hétérozygotes. Nous avons ainsi testé cela avec une régression logistique sous le logiciel R (R-Development-core-team, 2010), dont le modèle est : proportion de sites hétérozygotes ~ nombre de loci non amplifiés. La densité parasitaire est connue pour être variable entre les fluides biologiques (Camara *et al.*, 2005). Nous avons donc comparé les proportions de génotypes blancs dans chaque fluide biologique avec le test exact de Fisher sous le module « Struc » du logiciel Genepop v3.4 (Raymond et Rousset, 1995) avec  $10^6$  randomisations.

#### 2.4.1. Indice de fixation de Wright

Les paramètres les plus largement utilisés pour décrire la structure d'une population sont les  $F$ -statistiques de Wright (Wright, 1965). Ces paramètres ont été estimés en utilisant les estimateurs non biaisés de Weir et Cockerham (Weir et Cockerham, 1984) sous le logiciel Fstat v2.9.4 (Goudet, 2003). Dans une population dont la structure est à trois niveaux (individus, sous-populations et population totale), le  $F_{IS}$  est une mesure de la consanguinité des individus par rapport à la consanguinité dans les sous-populations et le  $F_{ST}$  est une mesure de la consanguinité dans les sous-populations par rapport à la consanguinité dans la population totale. Le  $F_{IS}$  varie entre -1 (une classe d'hétérozygotes est fixée dans les sous-populations), +1 (tous les individus sont homozygotes) et est égal à 0 sous l'hypothèse de la panmixie. C'est donc ainsi une mesure de la déviation locale de la panmixie. Le  $F_{ST}$  varie entre 0 (distribution aléatoire des allèles entre les sous-populations) et +1 (toutes les sous-populations ont fixées l'un ou l'autre allèle) et est donc aussi une mesure de la différenciation génétique entre les sous-populations. Des marqueurs hautement polymorphes peuvent abaisser la valeur maximale possible du  $F_{ST}$  qui peut être estimée (Hedrick, 1999, 2005).

La définition générale de ce paramètre de  $F_{ST}$  est :  $F_{ST} = (Q_S - Q_T) / (1 - Q_T)$  (Rousset, 2004), où  $Q_S$  est la probabilité d'échantillonner deux allèles identiques dans la même sous-population et  $Q_T$  est la probabilité d'échantillonner deux allèles identiques dans deux sous-populations différentes. Quand les sous-populations sont totalement isolées les unes des autres, nous nous attendons à  $Q_T \sim 0$ , et donc que le  $F_{ST\_max} = Q_S$ . Cette  $Q_S$  peut être estimée avec  $1 - H_S$ , où  $H_S$  est l'estimateur non biaisé de Nei de la diversité génétique (Nei et Chesser, 1983). Une mesure pratique normalisée du  $F_{ST}$  peut donc être donnée par la formule :

$$F_{ST}' = F_{ST} / F_{ST\_max}.$$

#### 2.4.2. Mesure du déséquilibre de liaison

Les tests de déséquilibre de liaison ont été effectués avec le logiciel Fstat v2.9.4 (Goudet, 2003). Ce logiciel fait des randomisations (10 000 dans notre cas) de réassociation aléatoire des allèles des loci dans les sous-échantillons, calcule pour chaque paire de loci, la somme des « Log-likelihood ratio G » correspondant des sous-échantillons. La proportion de fois que ce G global randomisé est égal ou supérieur à celui observé fournit la valeur exacte de *P-value* pour une paire de locus donné. Cette procédure s'est avérée être la plus puissante (De Meeûs *et al.*, 2009). Il y a autant de tests que de paires de loci possibles (ici 12 paires parce que trois paires de loci n'ont pas pu être analysées dûes au faible polymorphisme). Sous l'hypothèse nulle, si on teste pour la même hypothèse nulle un certain nombre de fois  $k$ , à un seuil de signification  $\alpha$ , alors ces  $k$  tests devraient suivre une distribution uniforme bornée de 0 à 1, avec une moyenne de 0,5 et  $ak$  tests significatifs attendus. Si plus de  $ak$  sont trouvés (soit  $k'$ ), cela peut provenir d'une violation de l'hypothèse nulle dans la série. Cela peut être testé avec un test exact binomial et unilatéral (alternative = greater) avec  $k'$  succès parmi  $k$  essais et de moyenne  $\alpha$  [consulter (De Meeûs *et al.*, 2009)]. Ce test a été réalisé sous le logiciel R.

### 2.4.3. Tests de différenciation par paire

Pour tous les tests, nous avons classé chaque échantillon appartenant au même site, même période de temps (date), statut de la maladie du patient (statut) et nature du fluide biologique comme un sous-échantillon. En d'autres termes, chaque combinaison (site x date x statut x fluide) est considérée comme une entité séparée (sous-échantillon) sauf indication contraire. Nous avons considéré deux périodes différentes d'échantillonnage : la première correspond aux échantillons collectés entre Novembre 2007 et Mai 2008 et la seconde correspond aux échantillons collectés entre Octobre 2008 et Avril 2009 (six mois chacune). Trois statuts différents de patients peuvent être définis à partir de la littérature (Lejon *et al.*, 2002). Selon le nombre de lymphocytes trouvés par  $\mu\text{l}$  de LCR, les trypanosomés sont classés comme suit : phase précoce S1 (0-5 cellules/ $\mu\text{l}$ ), phase intermédiaire S2 (6-20 cellules/ $\mu\text{l}$ ) ou phase avancée S3 ( $> 20$  cellules/ $\mu\text{l}$ ). Enfin, il y avait trois types de fluides biologiques : le sang, le suc ganglionnaire et le LCR. La différenciation entre les souches de trypanosomes des différents fluides biologiques et entre le statut du trypanosomé, considérée séparément dans chaque cas, a été mesurée avec l'estimateur non biaisé de Weir et Cockerham (Weir et Cockerham, 1984), du  $F_{ST}$  de Wright (Wright, 1965). Il a été testé avec 10 000 randomisations des individus entre sous-échantillons en utilisant l'estimateur de Robertson et Hill (Robertson et Hill, 1984) sur les loci comme statistique. Cela a été effectué sous le logiciel Genetix v4.05 (Belkhir *et al.*, 2004). L'utilisation du logiciel Genetix à la place du logiciel Fstat est justifiée ici par la présence de nombreuses données manquantes dues aux allèles dropout. En utilisant le logiciel Genetix, les individus sont randomisés, même s'il y a des données manquantes à certains loci, alors que Fstat ne randomise que les individus complètement génotypés. Nous avons utilisé l'estimateur de Robertson et Hill comme statistique, car il est aussi puissant que le test basé sur le G (Goudet *et al.*, 1996), ce test n'est pas disponible dans Genetix. L'analyse a été réalisée entre chaque paire possible de sous-échantillons, par exemple entre le sang et le suc ganglionnaire dans un environnement homogène suivant le statut du trypanosomé, la période et le site. Nous avons ainsi obtenu plusieurs mesures et tests pour chaque type de comparaison que nous avons combiné pour moins de quatre tests avec le test Z de Stouffer (Whitlock, 2005), et pour quatre tests et plus avec le test binomial généralisé (Teriokhin *et al.*, 2007) en utilisant le logiciel Multitest V1.2 (De Meeûs *et al.*, 2009). Les nombreuses données manquantes peuvent fournir des résultats non fiables dans les tests de différenciation par paire (bug dans Genetix). Par conséquent, tous

les cas où une valeur de  $P\text{-value} = 0$  a été observée, ont été doublement et individuellement (et en fait a toujours conduit à une  $P\text{-value}$  beaucoup plus élevée) vérifiés avec le test sur permutations de Genetix en ne gardant que les deux sous-échantillons incriminés. Cette procédure a été appliquée aux deux sous-échantillons concernés.

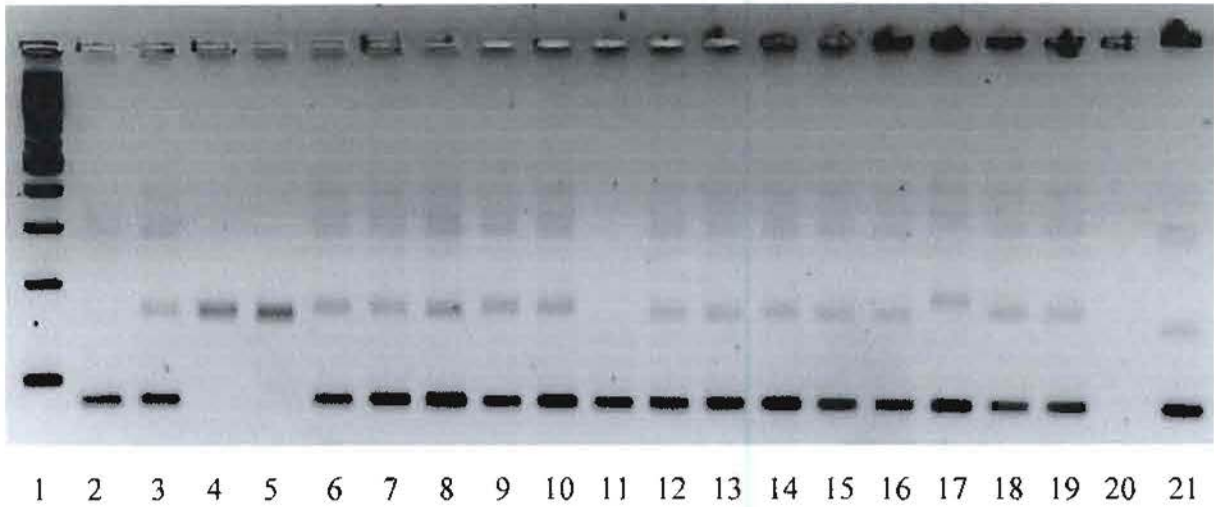
La clonalité, aidée de la dérive, augmente la liaison statistique entre les loci. Cela pourrait artificiellement augmenter ou diminuer la différenciation. Une façon de vérifier cela est d'effectuer des tests de différenciation avec les génotypes multilocus (MLGs) comme les différents allèles d'un locus unique (De Meeûs *et al.*, 2002; Koffi *et al.*, 2009).

Pour visualiser les relations génétiques entre les différents sous-échantillons, nous avons réalisé un dendrogramme « neighbour-joining tree, NJTree » basé sur la matrice de distance de Cavalli-Sforza et Edwards (Cavalli-Sforza et Edwards, 1967) qui a été construit sous le logiciel MSA (Dieringer et Schlotterer, 2002) avec Mega 5 Beta # 03 (Tamura *et al.*, 2007) comme cela a été recommandé (Takezaki et Nei, 1996).

### **3. Résultats**

#### ***3.1. Génotypage de microsatellites***

Au total, 119 trypanosomés ont été inclus dans l'étude dont 213 échantillons (88 sangs, 95 sucs ganglionnaires et 30 LCRs) ont donné un résultat positif à la PCR TBR 1/2. Ces échantillons ont été amplifiés par nested-PCR, puis migrés sur du nusieve gel (**Figure 21**) et enfin, ont été génotypés. Les résultats du génotypage des 213 échantillons sont présentés dans le tableau en **Annexe V**.



**Figure 21 : Profils de migration obtenus sur du nusieve gel avec le locus M6C8 mettant en évidence des profils différents entre souches isolées en Guinée.**

1 = marqueur de poids, 2 à 19 : échantillons de sucs ganglionnaires, 20 = témoin négatif de PCR, 21 = témoin positif.

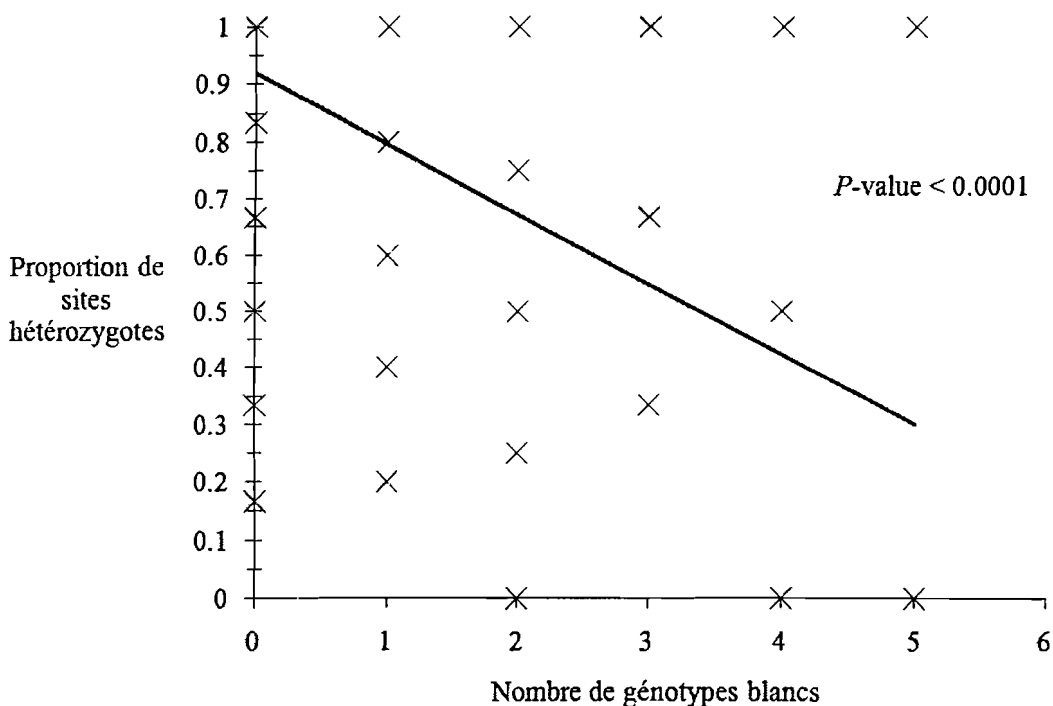
Les six couples d'amorces microsatellites ont été testés et certains se sont montrés très polymorphes comme M6C8 (17 allèles) et CH5/JS2 (23). Les tailles des allèles varient de 079 à 354 pb. Les loci Misatg4, Micbg6 et Micbg5 se sont révélés moyennement polymorphes. Par contre, Le locus CH1/18 est le moins polymorphe (**Tableau VI**).

**Tableau VI : Nombre et taille des allèles obtenus avec les six marqueurs**

Marqueurs	Nombre d'allèles	Taille des allèles en pb
CH5/JS2	23	129-354
CH1/18	3	163-169
M6C8	17	079-176
MISATG4	7	112-138
MICBG6	6	161-181
MICBG5	7	148-172

Nous avons pu observer 10 cas d'infections mixtes, c'est-à-dire la présence de différents génotypes multilocus (MLGs) dans les différents fluides biologiques d'un même trypanosomé, bien que les mêmes MLGs ont été souvent présents dans les différents fluides biologiques (**Annexe V**). Chez six de ces trypanosomés, les deux génotypes trouvés différaient seulement à un seul locus par deux paires de base. Ainsi pour ces derniers, un évènement de mutation du parasite infectant est l'hypothèse la plus probable. Aucune infection mixte n'a pu être trouvée dans le même fluide biologique (**Annexe V**).

L'un des inconvénients de l'examen des parasites directement à partir des fluides biologiques est que le nombre de parasites est généralement très faible, entraînant de fréquents échecs d'amplifications par PCR. Les positions homozygotes ne pourraient qu'être le résultat d'un échec d'amplification d'un allèle chez un hétérozygote. Pour vérifier cela, la relation entre les génotypes blancs (échec d'amplification des deux allèles) et les positions homozygotes a été testée. La régression de la proportion de sites hétérozygotes en fonction des données manquantes a donné un résultat hautement significatif ( $P\text{-value} < 0,0001$ ) (**Figure 22**), indiquant que de nombreuses positions homozygotes sont le résultat d'allèles dropout.



**Figure 22 : Régression entre la proportion de sites trouvés hétérozygotes en fonction du nombre de génotypes blancs (données manquantes).**

Il est également intéressant de noter que la proportion de sites hétérozygotes est pour la plupart du temps égale à 1 (tous les loci) quand le nombre de blancs est nul. En plus, pour tester notre hypothèse, nous avons sélectionné 20 échantillons d'ADN qui ont été génotypés comme homozygotes avec le marqueur Micbg5 (le marqueur pour lequel la plupart des génotypes homozygotes ont été observés) et avons répété la PCR avec des quantités croissantes d'ADN (2,5 et 5  $\mu$ l). Ce test a révélé des profils hétérozygotes observés pour 12 échantillons en utilisant 2,5  $\mu$ l d'ADN et deux autres échantillons en utilisant 5  $\mu$ l. Ainsi, la plupart des génotypes homozygotes pour ce marqueur (14/20) ont été en effet le résultat de l'échec d'amplification allélique (allèle dropout) en raison de la faible concentration d'ADN du parasite dans l'échantillon testé. Nous pouvons donc supposer que la plupart des loci homozygotes dans nos données sont le résultat de l'allèle dropout et ont été analysés comme tels sans modification.

La proportion de génotypes blancs était de 0,04 pour les souches provenant du suc ganglionnaire ; 0,26 pour celles provenant du sang et 0,54 pour celles provenant du LCR. Ces valeurs diffèrent toutes significativement les unes des autres (toutes les *P-value* < 0,0001) indiquant que le suc ganglionnaire contient une concentration plus élevée de parasites que le sang et le LCR.

### **3.2. Déséquilibre de liaison**

Sur les 12 paires de loci possibles, cinq paires se sont révélées significatives au seuil de significativité de 5%. Ce qui est plus élevé que la proportion attendue sous l'hypothèse nulle de la panmixie (*P-value* = 0,0002). Tous les tests restent significatifs après la correction séquentielle de Bonferroni et impliquent quatre des six loci utilisés. Les sous-échantillons ne sont pas très grands et la correction de Bonferroni est très conservatrice. Nous pouvons donc supposer que le déséquilibre de liaison implique tous les loci et partant tout l'ensemble du génome. Si la nature du fluide biologique est ignorée, neuf paires de loci deviennent significativement liées et restent toutes significatives après la correction de Bonferroni (**Tableau VII**). Ces neuf paires sont toutes impliquées mais le locus Ch1/18 est le moins polymorphe, et aucune de ces paires significatives n'a impliqué deux loci sur le même chromosome. Le polymorphisme semble en effet expliquer mieux quel locus devrait être préférentiellement trouvé dans une liaison significative.

**Tableau VII : Résultats des tests de déséquilibre de liaison des paires de loci significatives selon les conditions d'analyse et la correction de Bonferroni.**

Conditions d'analyse Paire de loci	Considérant les fluides biologiques			En ignorant les fluides biologiques		
	<i>P-value</i>	Tests	Bonferroni	<i>P-value</i>	Tests	Bonferroni
M6C8 X MISATG4	<b>0,0001</b>	9	<b>0,0009</b>	<b>0,0001</b>	9	<b>0,0009</b>
MICBG6 X MICBG5	<b>0,0001</b>	8	<b>0,0008</b>	<b>0,0001</b>	8	<b>0,0008</b>
M6C8 X MICBG5	<b>0,0003</b>	7	<b>0,0021</b>	<b>0,0001</b>	7	<b>0,0007</b>
MISATG4 X MICBG5	<b>0,0036</b>	6	<b>0,0216</b>	<b>0,0001</b>	6	<b>0,0006</b>
M6C8 X MICBG6	<b>0,0061</b>	5	<b>0,0305</b>	<b>0,0001</b>	5	<b>0,0005</b>
CH5JS2 X MISATG4	0,0859	4	0,3436	<b>0,0001</b>	4	<b>0,0004</b>
CH5JS2 X MICBG5	0,1448	3	0,4344	<b>0,0001</b>	3	<b>0,0003</b>
CH5JS2 X MICBG6	0,1874	2	0,3748	<b>0,0038</b>	1	<b>0,0038</b>
CH5JS2 X M6C8	0,2325	1	0,2325	<b>0,0001</b>	2	<b>0,0002</b>

### 3.3. Différenciation entre les fluides biologiques

L'examen des génotypes des parasites pour les différents fluides biologiques indique que dans la plupart des cas, des génotypes identiques sont trouvés dans les différents fluides biologiques de chaque individu (**Annexe V**). Cependant, il y a quatre exceptions notables où les génotypes dans les différents fluides biologiques diffèrent (Du57-2, Du226-6, Du188-6 et Du249-6) indiquant des infections mixtes avec différents génotypes de parasites présents dans les différents fluides biologiques. Toutefois, l'examen de la population dans son ensemble a révélé une différenciation génétique non significative statistiquement, avec un  $F_{ST} = -0,037$  ( $P\text{-value} = 0,687$ ) entre les souches du sang et du suc ganglionnaire ; ensuite un  $F_{ST} = -0,009$  ( $P\text{-value} = 0,629$ ) entre les souches du sang et du LCR ; enfin  $F_{ST} = 0,022$  ( $P\text{-value} = 0,447$ ) entre les souches du suc ganglionnaire et du LCR (**Tableau VIII**). En fait, parmi les 16 tests qui ont été effectués, un seul (soit 6%) était significatif au seuil de 5%. C'est exactement ce qui est attendu sous l'hypothèse nulle (si les tests sont assez puissants) (test exact binomial, avec une  $P\text{-value} = 0,556$ ).

Les tests sur les MLGs ont confirmé ce résultat (toutes les  $P\text{-values} > 0,6$ ). Ce paramètre (fluide biologique) a été donc ignoré dans les analyses suivantes.

**Tableau VIII : Tests de différenciation par paire entre les souches de trypanosomes de patients de différents fluides biologiques.**

Comparaison	Foyer	Date	Statut	$\theta$	<i>P-value</i>	<i>H<sub>S</sub></i>	<i>F<sub>ST</sub>'</i>	
Sang versus suc ganglionnaire	Boffa	Date1	S1	-0,037	0,733	0,688	-0,121	
			S2	-0,058	0,203	0,541	-0,128	
			S3	-0,084	0,498	0,725	-0,307	
	Dubréka	Date1	S1	-0,060	0,660	0,768	-0,260	
			S2	-0,008	0,800	0,626	-0,023	
			S3	-0,010	0,928	0,643	-0,029	
		Date 2	S1	-0,049	0,687	0,752	-0,200	
			S2	-0,014	0,961	0,661	-0,043	
			S3	-0,009	0,906	0,640	-0,025	
	Combiné			-0,037	0,687	0,671	-0,113	
	Sang versus LCR	Dubréka	Date 1	S3	0,085	0,048	0,808	0,446
			Date 2	S2	-0,090	0,965	0,661	-0,268
S3				-0,020	0,657	0,689	-0,066	
Combiné				-0,009	0,629	0,719	-0,030	
Suc ganglionnaire versus LCR		Dubréka	Date 1	S3	0,178	0,140	0,801	0,898
	Date 2		S2	-0,065	1,000	0,649	-0,186	
			S3	-0,011	0,355	0,683	-0,037	
	Forécariah	Date 1	S3	-0,013	0,417	0,720	-0,047	
	Combiné			0,022	0,447	0,713	0,076	

L'estimateur  $F_{ST}$  de Weir et Cockerhan ( $\theta$ ), les *P-values* correspondantes, les valeurs combinées, moyenne de la diversité génétique ( $H_S$ ) et le  $F_{ST}$  standardisé ( $F_{ST}'$ ) sont aussi donnés.

### 3.4. Différenciation entre les statuts du patient

La différenciation s'est révélée significative entre les souches provenant de trypanosomés appartenant à différents stades de la maladie pour tous les types de comparaison avec une moyenne  $F_{ST}' \sim 0,106 - 0,264$  (Tableau IX). Les tests sur les MLGs ont confirmé qu'une différenciation génétique significative existe entre les souches de S1 et S3, S2 et S3 mais pas entre les souches de S1 et S2. Bien que les valeurs des  $F_{ST}'$  soient assez élevées, il est intéressant de noter que la plupart des *P-values* ne sont pas très faibles (peu significatives), ce qui témoigne de la grande variabilité dans le signal.

**Tableau IX: Tests de différenciation par paire entre les souches de trypanosomes de patients de différents statuts : S1 phase précoce, S2 phase intermédiaire, S3 phase avancée de différents foyers et dates.**

Comparaison	Foyer	Date	$\theta$	<i>P-value</i>	<i>Hs</i>	$F_{ST}'$
S1/S2	Boffa	D1	0,0162	0,2468	0,6470	0,0459
		D2	0,0882	0,0727	0,8324	0,5263
	Dubréka	D1	0,0442	<b>0,0034</b>	0,6453	0,1247
		D2	0,0054	0,1527	0,6516	0,0154
	Forécariah	D1	0,1255	<b>0,0256</b>	0,7965	0,6164
	Combiné			0,0559	<b>0,0063</b>	0,7145
S1/S3	Boffa	D1	0,0092	0,1405	0,6525	0,0264
		D2	0,2398	0,1375	0,7699	1,0420
	Dubréka	D1	0,0325	<b>0,0068</b>	0,6641	0,0967
		D2	0,0150	0,1457	0,6447	0,0421
	Forécariah	D1	0,0915	0,0616	0,8020	0,4620
	Combiné			0,0776	<b>0,0335</b>	0,7066
S2/S3	Boffa	D1	0,0196	0,1006	0,6521	0,0565
		D2	0,1476	0,1114	0,7133	0,5149
	Dubréka	D1	0,0009	0,3581	0,6217	0,0023
		D2	0,0006	0,0559	0,6388	0,0016
	Forécariah	D1	0,0126	0,1638	0,6262	0,0336
		D2	0,0290	0,1130	0,7712	0,1266
Combiné			0,0350	<b>0,0214</b>	0,6705	0,1064

L'estimateur  $F_{ST}$  de Weir et Cockerhan ( $\theta$ ), les *P-values* correspondantes (en gras quand c'est significatif), les valeurs combinées, moyenne de la diversité génétique ( $H_s$ ) et le  $F_{ST}$  standardisé ( $F_{ST}'$ ) sont aussi donnés.

### 3.5. Différenciation temporelle

Les résultats des tests de différenciation temporelle sont donnés dans le **Tableau X** et, avec une moyenne  $F_{ST}' = 0,12$  (*P-value* combinée = 0,037), donnant des résultats similaires à ceux observés avec les statuts du trypanosomé. La différenciation temporelle apparaît plus faible que dans Koffi et *al.* (2009), ce qui n'est pas surprenant car la distance temporelle maximale dans nos données était d'environ 11-16 mois alors qu'elle était à un minimum de 24 mois dans Koffi et *al.* (2009). Néanmoins, cela confirme que le temps (période) et le statut du trypanosomé ont une influence sur la répartition de la variabilité génétique et sont

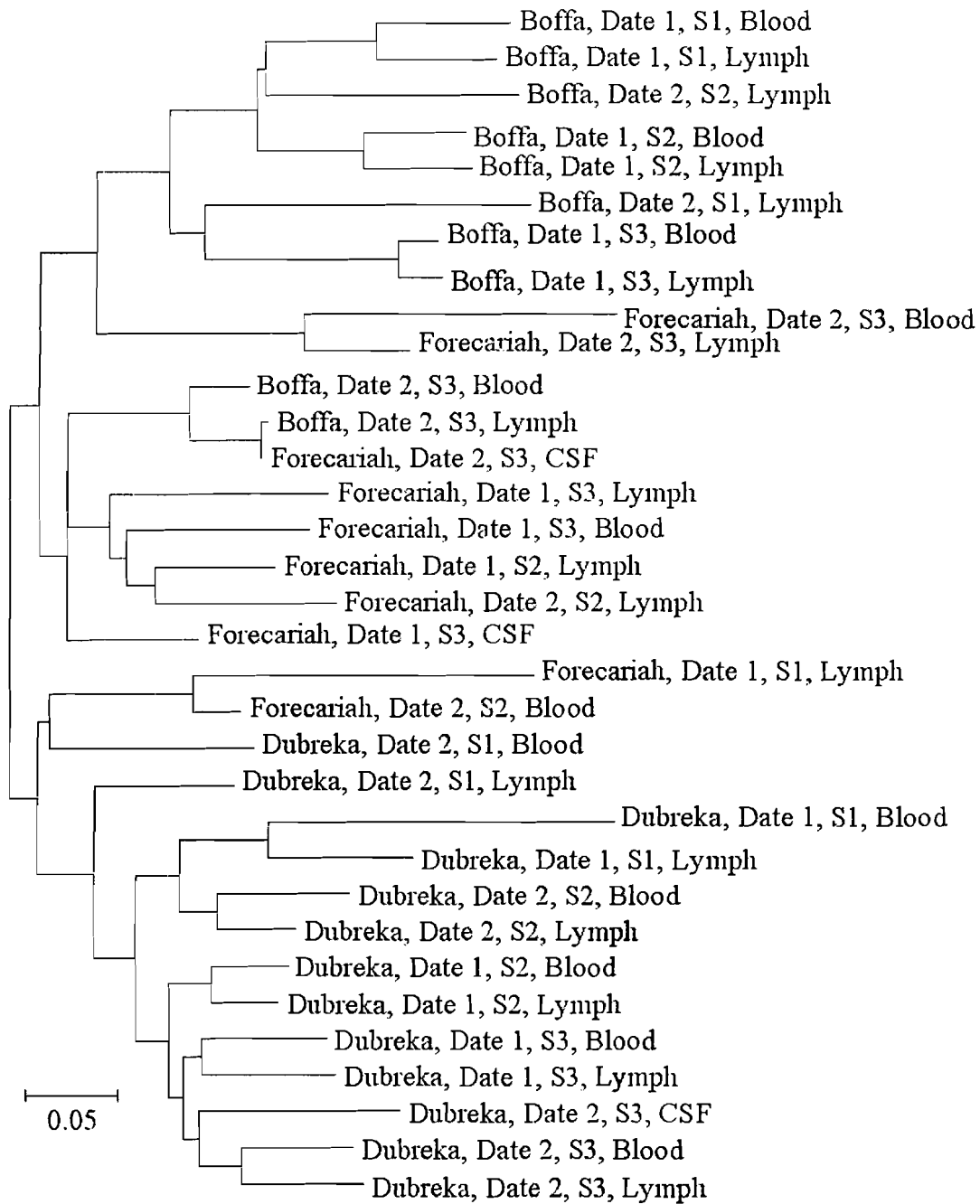
probablement corrélés. Les analyses avec les MLGs confirment cette différenciation temporelle (moyenne  $F_{ST}' = 0,24$  ;  $P$ -value combinée = 0,045). Bien que les valeurs moyennes des  $F_{ST}'$  soient assez élevées, il est intéressant de noter que la  $P$ -value combinée n'est que peu significative, ce qui témoigne encore une fois ici de la grande variabilité dans le signal.

**Tableau X : Résultats des tests de différenciation temporelle pour chaque combinaison (foyer x statut).**

Dates	Foyer	Statut	$F_{ST}$	$P$ -value	$H_s$	$F_{ST}'$
D1 versus D2	Boffa	S1	0,1217	0,4519	0,7681	0,5248
		S2	0,0250	0,1670	0,7112	0,0866
		S3	0,1198	<b>0,0309</b>	0,6542	0,3464
D1 versus D2	Dubréka	S1	0,0000	0,3320	0,6726	0,0000
		S2	0,0100	0,0581	0,6243	0,0266
		S3	0,0017	0,2053	0,6362	0,0047
D1 versus D2	Forécariah	S2	-0,0209	0,5105	0,7409	-0,0807
		S3	0,0409	<b>0,0320</b>	0,6565	0,1191
		Combiné	0,0309	<b>0,0373</b>	0,6830	0,1176

L'estimateur  $F_{ST}$  de Weir et Cockerhan ( $\theta$ ), les  $P$ -values correspondantes (en gras quand c'est significatif), les valeurs combinées, moyenne de la diversité génétique ( $H_s$ ) et le  $F_{ST}$  standardisé ( $F_{ST}'$ ) sont aussi donnés.

L'analyse du dendrogramme « NJTree » de la **Figure 23** montre que les sous-échantillons sont d'abord regroupés en fonction de la localisation géographique avec deux groupes principaux (Boffa et Dubréka) alors que les sous-échantillons de Forécariah sont plus hétérogènes. Le deuxième regroupement est la combinaison de la date de l'échantillonnage et le stade de la maladie du trypanosomé et enfin les fluides biologiques.

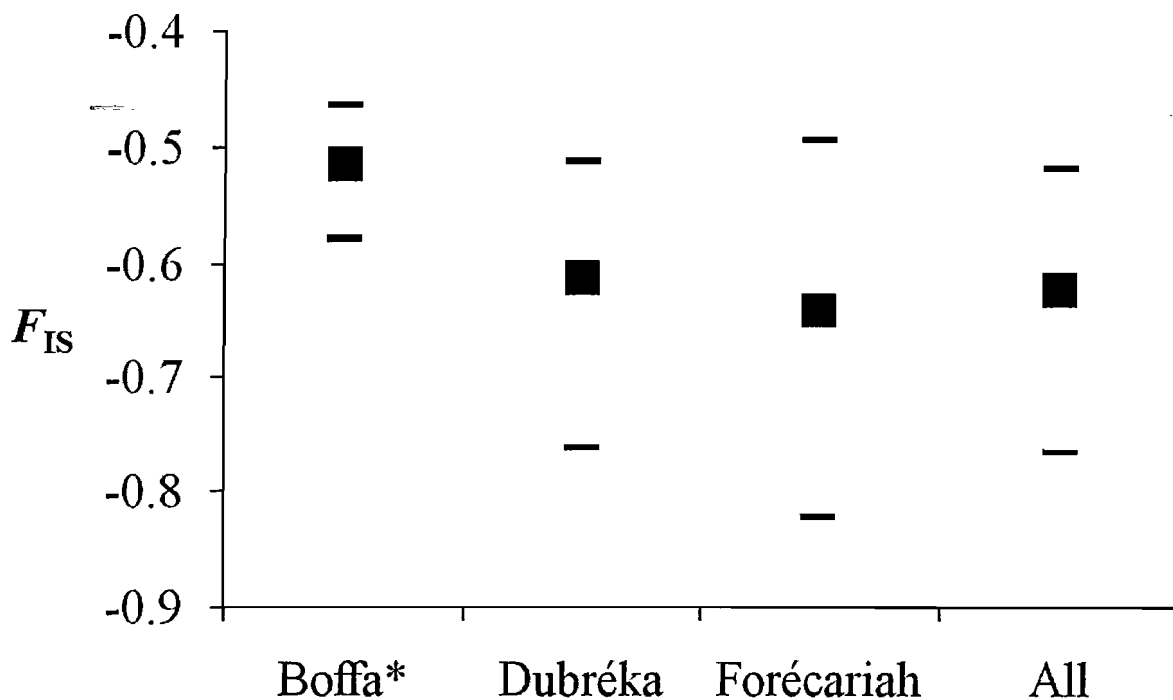


**Figure 23 : Dendrogramme non raciné décrivant la répartition génétique entre les différents sous-échantillons de *T. brucei gambiense* dans les foyers de la Guinée.**

Les sous-échantillons sont définis en fonction de la géographie (Boffa, Dubréka, Forécariah), de la date de l'échantillonnage (D1 et D2), du statut du patient en fonction du stade de la maladie : S1 (phase précoce), S2 (phase intermédiaire), S3 (phase avancée) et enfin du fluide biologique (sang, suc ganglionnaire, LCR).

Nous savons par Koffi *et al.* (2009) et par la présente étude qu'une différenciation significative se produit avec le temps. La première phase de la maladie peut donc correspondre en moyenne à des infections plus récentes que les phases avancées, conduisant à une signature génétique. Nous avons donc choisi de considérer chaque combinaison (date x statut) comme un sous-échantillon réel pour le calcul du  $F_{IS}$  et nous avons considéré les données homozygotes comme données manquantes.

Le  $F_{IS}$  a montré des valeurs fortement négatives dans tous les sous-échantillons et à travers tous les loci (**Figure 24**) avec une moyenne générale et un intervalle de confiance 95% de  $F_{IS} \sim -0,615 [-0,757 ; -0,505]$ , c'est à dire la même valeur que précédemment obtenue en Guinée (Koffi *et al.*, 2009), c'est à dire  $F_{IS} = -0,62 [-0,7 ; -0,35]$  avec des données majoritairement issues de souches isolées avec très peu de pics uniques (positions homozygotes).



**Figure 24 : Moyennes  $F_{IS}$  obtenues pour les sous-échantillons de *T. b. gambiense* dans les trois foyers de Guinée.**

95% d'intervalles de confiance des loci sont présentés sauf Boffa car seulement quatre loci étaient disponibles pour lesquels les valeurs minimum et maximum sont présentées.

## 4. Discussion

Tous les échantillons analysés dans cette étude ont été isolés à partir des fluides biologiques (sang, suc ganglionnaire et le LCR) qui ont permis d'éviter le coût, le temps et le lourd protocole des techniques habituellement utilisées pour l'isolement *in vivo* ou *in vitro* des trypanosomes. Il est apparu qu'en raison du faible nombre de parasites dans ces fluides, l'amplification directe à partir des fluides biologiques conduit à des problèmes techniques. En effet, de nombreux allèles dropout ont été observés. Il est clair que cette situation requiert notre attention pour des études ultérieures. Il est toutefois apparu que le meilleur fluide biologique à utiliser pour le génotypage est le suc ganglionnaire au moins en Guinée, tandis que les deux autres (sang et LCR) ont fourni de nombreux échecs d'amplification, surtout le liquide céphalo-rachidien où, plus de la moitié des données sont manquantes. Cela peut être attribué à la très faible parasitémie habituellement rencontrée en Guinée dans le sang et le LCR, alors que les trypanosomes semblent s'accumuler dans les ganglions lymphatiques (Camara *et al.*, 2005).

Notre décision de recoder les homozygotes apparents comme données manquantes parce que potentiellement des hétérozygotes avec un allèle manquant, a fourni une estimation du  $F_{IS}$  rigoureusement identique à celui calculé par Koffi *et al.* (2009) dans les foyers de Boffa et de Dubréka sur des échantillons isolés avec des techniques classiques. Il est donc probable que cette décision a conduit à des estimations plus précises que les données brutes comme également confirmé par les expériences supplémentaires qui ont rejeté la plupart des génotypes homozygotes.

L'analyse des données n'a montré aucune différenciation génétique significative entre les souches isolées des différents fluides biologiques. Ce résultat ne peut guère être une conséquence de la faible puissance des tests car nous avons en effet 6% des tests qui sont significatifs au cours de la procédure. Nous pouvons donc en conclure qu'aucun type particulier de souche n'est spécifique à n'importe quel type de fluide. Un goulot d'étranglement « bottleneck » comme celui qui se trouve entre l'infection et l'invasion des glandes salivaires des mouches tsé-tsé (Oberle *et al.*, 2010) aurait probablement été détecté entre les souches du sang et du LCR au moyen des tests de différenciation. Ici, les souches de LCR semblent être représentatives de ce qui peut être trouvé dans le sang.

Dans la présente étude, les loci microsatellites n'ont pas détecté d'infections mixtes dans un échantillon biologique donné. Cela pourrait provenir du fait que les génotypes surreprésentés sont préférentiellement amplifiés par rapport aux autres. Néanmoins, en multipliant les tentatives d'isolement dans le temps ou en utilisant des techniques d'isolement différentes, des infections mixtes d'au moins deux génotypes chez l'homme ont été observées (MacLeod *et al.*, 1999; Jamonneau *et al.*, 2003; Koffi *et al.*, 2007). Des infections mixtes ont également été observées dans la présente étude (différentes souches de trypanosomes circulant dans différents fluides du même patient) dans au moins quatre trypanosomés. Le rôle de ces infections mixtes dans la diversité de réponses aux infections parasitaires a été mis en évidence dans la maladie de Chagas (Lauria-Pires et Teixeira, 1997; Franco *et al.*, 2003; Mantilla *et al.*, 2010) ou dans la trypanosomose animale (Masumu *et al.*, 2009). Des infections mixtes ont été suspectées pour être associées à une parasitémie faible chez les patients asymptomatiques de la maladie du sommeil (Jamonneau *et al.*, 2004b). Des études supplémentaires seront nécessaires pour approfondir cette problématique.

La différenciation entre les statuts du trypanosomé vient probablement d'une interaction avec la différenciation temporelle. En effet, il est probable que des trypanosomés en phase précoce (S1) ont été infectés par des souches plus récentes que ceux de la phase intermédiaire (S2) ou de la phase avancée (S3). La durée de la première période peut en effet durer plusieurs années (MacLean *et al.*, 2007). Nous ne pouvons cependant pas exclure totalement la possibilité que certains génotypes puissent conduire plus ou moins rapidement à un stade de la maladie ou à l'autre stade. Mais dans ce cas, nous aurions probablement trouvé quelques différences significatives entre les souches provenant de différents fluides biologiques. Cette hypothèse n'est donc pas mieux supportée que l'hypothèse de différenciation dépendante du temps.

La différenciation temporelle apparaît plus faible que dans Koffi *et al.* (2009), ce qui n'est pas surprenant car la distance temporelle maximale dans nos données était d'environ de 11-16 mois alors qu'elle était à un minimum de 24 mois dans Koffi *et al.* (2009). L'interaction probable entre le statut du trypanosomé et la date d'échantillonnage combinée avec les problèmes techniques sont des facteurs probablement importants pour expliquer la variabilité trouvée dans les deux signaux, ce qui explique l'absence de *P-values* très significatives. Toutefois, ceci confirme que le temps et le statut du trypanosomé influencent effectivement la

répartition génétique et interagissent probablement. Cela devra être pris en compte dans les études ultérieures.

## 5. Structuration géographique

Nous avons vu que notre étude a été confrontée à des problèmes méthodologiques qui sont abordés dans l'activité de recherche 3. Ils sont probablement liés à un manque de sensibilité des marqueurs utilisés pour l'étude des trypanosomes directement à partir des fluides biologiques. Cette contrainte méthodologique ne nous a pas permis d'obtenir tous les résultats pour une analyse fine de la structuration géographique des trypanosomes entre nos trois foyers d'étude voire même au sein d'un même foyer. Néanmoins, en attendant d'obtenir un jeu de données complet, nous avons pu obtenir des résultats préliminaires qui n'ont pas été publiés mais qu'il nous semblait important de présenter dans ce document.

Nous avons utilisé le même modèle que celui de Koffi *et al.* (2009) qui nous a permis d'estimer les effectifs clonaux de la population ( $N_{cl}$ ) et les taux de migration ( $m$ ) pour deux taux de mutation probables ( $\mu=0,001$  ou  $\mu=0,0001$ ). La prise en compte de ces paramètres permet de mettre en évidence les échanges entre les différents foyers.

$$N = -\frac{1+F_{IS}}{8\mu F_{IS}} \quad (1) \quad \text{et} \quad m = \frac{1}{2} \left[ 1 - \sqrt{\frac{F_{ST}}{F_{ST} - 4\mu F_{IS}}} \right] \quad (2)$$

Dans le cas des estimations effectuées à partir des modèles de populations clonales, c'est un effectif clonal que l'on estime. L'effectif clonal d'une population noté  $N_{cl}$  est sensé représenter avec quelle vitesse une population clonale perd sa diversité génétique par dérive génétique. Les estimations de la taille de la population clonale et les taux de migration ont permis d'aboutir aux résultats rapportés dans le **Tableau XI**.

**Tableau XI : Estimation de l'effectif clonal  $N_{cl}$  de la population des trois foyers et les proportions de migrants entre chaque paire de foyer ( $m$ ) selon les estimations des équations (1) et (2) en utilisant deux taux de mutation probables.**

$u=0,001$	Effectif clonal	Boffa	Dubrêka
Boffa	$N_{cl}=118$		
Dubrêka	$N_{cl}=79$	$m=0,006$	
Forécariah	$N_{cl}=70$	$m=0,005$	$m=0,01$
$u=0.0001$	Effectif clonal	Boffa	Dubrêka
Boffa	$N_{cl}=1181$		
Dubrêka	$N_{cl}=789$	$m=0,0007$	
Forécariah	$N_{cl}=697$	$m=0,0005$	$m=0,001$

$N_{cl}$  : effectif clonal ;  $m$  : taux de migration ;  $u$  : taux de mutation

Ces résultats préliminaires montrent que le taux de migration  $m$  reste relativement faible entre les différents foyers de la Guinée. En observant la taille effective de la population clonale et la migration respectivement dans les foyers de Boffa, Dubrêka et Forécariah, la migration est faible (Koffi *et al.*, 2009). Ces analyses préliminaires semblent montrer l'existence d'une structuration géographique entre foyers qui est illustrée par la **Figure 25** avec un nombre d'individus migrants ( $Nm < 1$ ) entre foyers qui est relativement faible.

L'étude de la structuration géographique est d'une importance capitale car elle permet de connaître les différents liens qui existent entre les différents foyers tels que les échanges parasitaires. Sur le long du littoral guinéen, la maladie du sommeil se manifeste dans trois foyers (Boffa, Dubrêka et Forécariah). Ces foyers sont considérés comme étant les plus actifs en Afrique de l'Ouest. Nous souhaitons mener en collaboration avec le PNLTHA de Guinée une vaste campagne de lutte dans ces trois foyers. Mais pour la mise en place d'un tel projet de lutte, il est impératif de connaître la structuration géographique entre ces foyers afin d'identifier la stratégie de lutte à mettre en place. Cette stratégie de lutte est relative à la structuration géographique. La stratégie de lutte à adopter peut être :

- une lutte simultanée lorsqu'il n'existe pas de structuration géographique. Cette lutte se révèle très coûteuse en terme de logistique et de ressources humaines ;
- une lutte séquentielle c'est-à-dire procéder foyer par foyer, lorsqu'il existe une structuration géographique entre foyers mais avec un risque de ré-invasion. Cette lutte s'avère moins coûteuse et facile à mettre en place en terme de logistique.

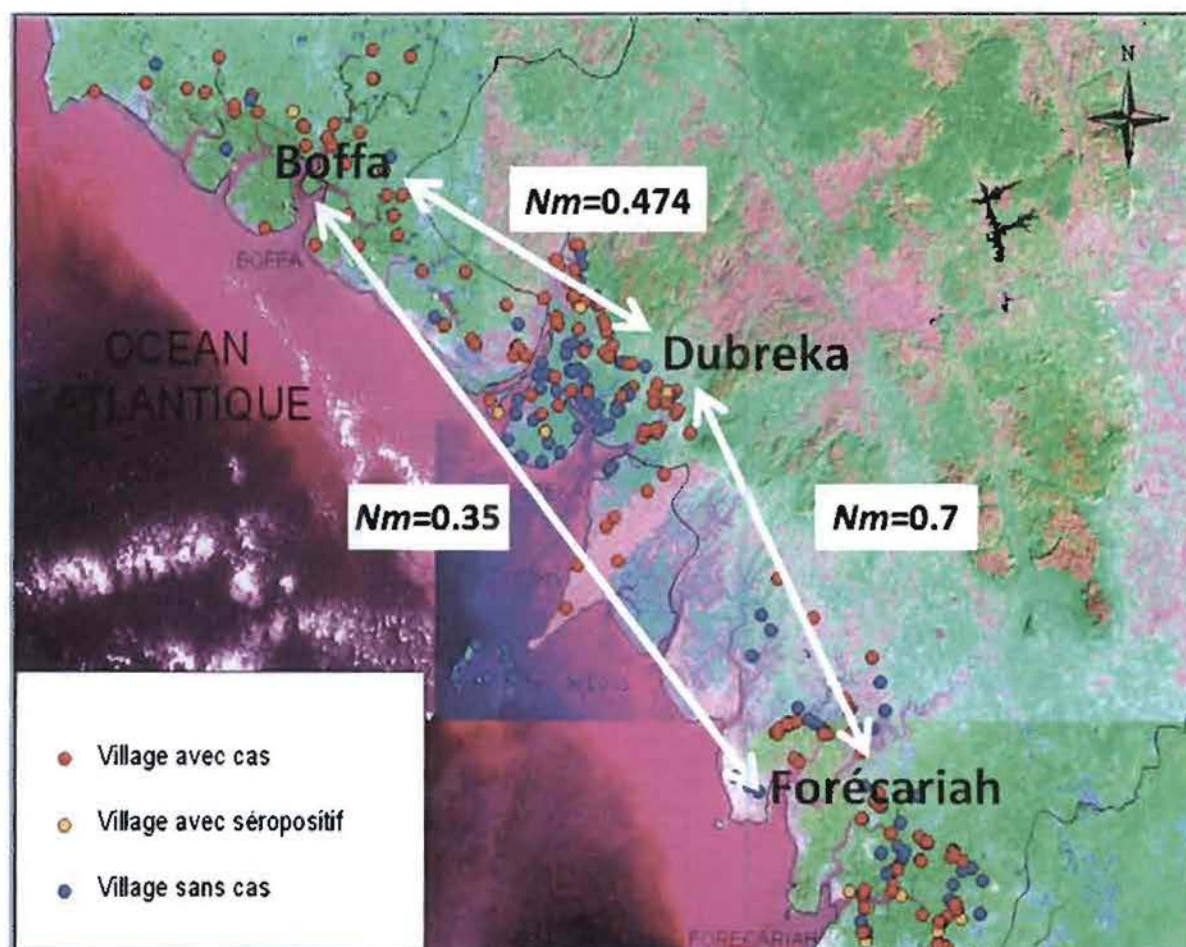


Figure 25 : Structuration géographique des souches de *T. b. gambiense* entre trois foyers situés sur le littoral guinéen (Boffa, Dubréka et Forécariah)

**ACTIVITÉ DE RECHERCHE 3: AMÉLIORATION DE  
L'AMPLIFICATION DE LOCI MICROSATELLITES DE  
*TRYPANOSOMA BRUCEI GAMBIENSE* À PARTIR DE  
FLUIDES BIOLOGIQUES.**

## 1. Introduction

La Trypanosomose Humaine Africaine est une maladie parasitaire dont l'agent pathogène est *Trypanosoma brucei*. Il peut être rencontré dans les différents fluides biologiques (sang, suc ganglionnaire, LCR). Des études antérieures ont montré que les marqueurs microsatellites sont assez polymorphes pour faire du génotypage directement à partir des fluides biologiques (Morrison *et al.*, 2007) sans passer par des isolements *in vitro* ou *in vivo* qui sont des protocoles lourds et onéreux. Cependant, il a été observé que le génotypage de *T. brucei* directement à partir des fluides biologiques est confronté à des échecs d'amplification (Morrison *et al.*, 2007; Koffi *et al.*, 2009; Kaboré *et al.*, 2011b) qui sont dûs soit à des allèles dropout et/ou à des allèles nuls. Ces problèmes d'amplification conduisent à l'observation de profils homozygotes qui sont assez fréquents, ce qui n'est pas attendu dans une population purement clonale comme celle de *T. b. gambiense* (Koffi *et al.*, 2009). Il est toutefois apparu en Guinée que le meilleur fluide biologique à utiliser pour le génotypage est le suc ganglionnaire, tandis que le sang et le liquide céphalo-rachidien fournissaient de nombreux échecs d'amplification, surtout le liquide céphalo-rachidien où, plus de la moitié des données sont manquantes (Kaboré *et al.*, 2011a; Kaboré *et al.*, 2011b).

Dans la présente étude, nous avons tenté de vérifier si les nombreux profils homozygotes rencontrés sont de vrais homozygotes ou sont dûs à des allèles dropout et/ou à des allèles nuls et si ces profils manquants sont dûs à des allèles dropout et/ou allèles nuls, nous avons étudié dans ce cas, les moyens d'améliorer la sensibilité de la technique de génotypage de *T. b. gambiense* directement à partir des fluides biologiques.

## 2. Matériels et méthodes

Pour ce faire, nous avons testé trois protocoles (P1, P2, P3) en variant la concentration d'ADN (1  $\mu$ l ; 2,5  $\mu$ l et 5  $\mu$ l d'ADN) sur quatre types de fluide biologique (sang, buffy-coat, suc ganglionnaire et liquide céphalo-rachidien) en utilisant trois marqueurs microsatellites (Micbg5, Micbg6, Misatg4) pour lesquels de nombreux échecs d'amplification avaient été précédemment observés. Le buffy-coat ou couche leucocytaire est la fraction d'un échantillon de sang non coagulé après centrifugation qui contient la plupart des éléments qui se trouvaient dans le sang (globules blancs, plaquettes, parasites). Nous avons sélectionné des échantillons biologiques pour lesquels des problèmes de génotypage avaient été observés.

## **2.1. Echantillonnage :**

Nous avons réalisé l'échantillonnage en tenant compte des échecs d'amplification et de la nature du fluide biologique.

Pour les deux marqueurs microsatellites Misatg4 et Micbg6, nous avons choisi 6 échantillons qui sont : Du 132-6 (suc ganglionnaire), 7-1 (suc ganglionnaire), Du143-6 (suc ganglionnaire), Du117-6 (buffy-coat), Du29-6 (buffy-coat) et 45-1 (sang).

Pour le marqueur microsatellite Micbg5 qui a causé le plus d'échecs d'amplification dans nos études antérieures, nous avons choisi 31 échantillons qui se composent de : 8 sucs ganglionnaires (7-1, Du143-6, Du192-6, Du167-6, Du180-6, Bo92-1, 40-1, Du132-6), 9 buffy-coats (Bo92-1, Bo9-6, Du115-6, Du36-6, Du168-6, Du257-6, Du57-2, Du117-6, Du29-6), 7 sangs (58-6, B3, 45-1, Du22-6, Du184-6, Bo91-2, Du28-6) et 7 liquides céphalo-rachidiens (Du24-6, Du11-6, Du34-6, Bo92-1, Bo230-6, 15-2, 50-1).

## **2.2. Conditions d'amplification :**

Les amplifications de Nested-PCR ont été réalisées en utilisant les conditions suivantes, PCR buffer (45 mM Tris-HCl pH 8,8 ; 11 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ; 4,5 mM  $\text{MgCl}_2$  ; 6,7 mM 2-mercaptoéthanol ; 4,4  $\mu\text{M}$  EDTA, 113  $\mu\text{g/ml}$  de BSA, 1 mM de chacune des quatre désoxyribonucléotides triphosphates), 1  $\mu\text{M}$  de chaque amorce et 0,1 unité de Taq polymérase (ABgene) par réaction de 10  $\mu\text{l}$ . Les réactions ont été recouvertes d'huile minérale pour éviter l'évaporation et l'amplification est réalisée dans un thermocycleur "Robocycler gradient 96" (Stratagene, La Jolla, CA, UK). Toutes les réactions PCR ont été amplifiées dans les conditions suivantes : 28 cycles de 95°C pendant 50 sec, 55°C pendant 50 sec et 65°C pendant 1 min. Un  $\mu\text{l}$  de la dilution 1/280 des produits de la 1<sup>ère</sup> étape de PCR a été utilisé pour la 2<sup>ème</sup> étape de PCR. Une amorce de chaque paire de microsatellites de la 2<sup>ème</sup> étape de Nested-PCR était marquée par un fluorochrome 5'-FAM ou HEX, ce qui permet une séparation des produits sur un séquenceur à capillaires (ABI 3100 Genetic Analyser ; Applied Biosystems). Un ensemble de tailles standardisées et labellisées (GS400 HD markers ; Applied Biosystems) a été inclus dans chaque échantillon, permettant de déterminer la taille du produit PCR au niveau de 1 pb en utilisant le logiciel Peak Scanner V1.0 (Applied Biosystems). Les produits de la 2<sup>ème</sup> étape de PCR ont été séparés par électrophorèse sur 3% de Nusieve GTG agarose gel dans un tampon TBE 0,5 X contenant 50 ng/ml de bromure

d'éthidium. Les produits ont été visualisés aux UV. Le résultat de l'électrophorèse est photographié pour analyse. Pour tester les protocoles (P1, P2 et P3), nous avons utilisé respectivement 1 µl ; 2,5 µl et 5 µl d'ADN.

### ***2.3. Préparation des plaques de génotypage***

En fonction de l'intensité des profils électrophorétiques, une dilution adéquate (1/10 – 1/500) est réalisée pour chaque produit de la 2<sup>ème</sup> étape de Nested PCR. Puis 20 µl de chaque dilution est distribuée dans les différents puits de la plaque de génotypage. Les puits sont ensuite recouverts d'huile minérale pour éviter l'évaporation. Les plaques sont prêtes pour le génotypage.

### ***2.4. Génotypage***

Le génotypage est réalisé à l'aide du séquenceur automatique doté de 8 capillaires (ABI 3730 Capillary DNA Sequencer, Genetic Analyser ; Applied Biosystems ; Dundee Sequencing Service <http://www.dnaseq.co.uk> ).

### ***2.5. Détermination de la taille des allèles***

Après le génotypage, les profils électrophorétiques ont été analysés à l'aide du logiciel Peak Scanner<sup>TM</sup> Software Version 1.0 (Applied Biosystems). Ce logiciel a permis de déterminer la taille des allèles. La taille a été déterminée par rapport à un ensemble de normes de tailles (GS400 HD markers, Applied Biosystems) qui permet une résolution de 1 pb.

### ***2.6. Analyses des données***

Le succès de l'amplification a été analysé avec les modèles linéaires généralisés (GLiM) sous le logiciel R 2.1.2.0 (R-Development-core-team, 2010). Les modèles ont été de la forme : Réponse ~ Protocole + Fluide + Locus + Protocole : Fluide + Protocole : Locus + Fluide : Locus.

La réponse a été soit le nombre d'allèles amplifiés observés, analysé avec un modèle de Poisson et une erreur de log-normale, soit la présence d'échec d'amplification des deux

allèles (des blancs) ou la présence du succès de l'amplification d'un ou des deux allèles différents (révélé individus hétérozygotes) dans lequel des deux cas des régressions logistiques ont été utilisées avec une erreur logit. Dans tous les cas, nous avons sélectionné le meilleur modèle suivant une procédure stepwise et la significativité des paramètres du modèle minimal a été testée avec un test du Chi carré.

### 3. Résultats

Le nombre d'allèles amplifiés a varié pour le même échantillon d'une expérience à l'autre. Certains allèles manquants ont pu être amplifiés et la plupart des profils initialement homozygotes ont pu donner des profils hétérozygotes (**Annexe VI**). Ces résultats montrent que ces profils homozygotes sont de faux homozygotes et sont dûs à l'effet de l'allèle dropout. Pour l'amélioration de la sensibilité du protocole de génotypage, nous avons effectué les tests suivants :

#### 3.1. Effets du sang et du buffy-coat

Les résultats des différents protocoles sont résumés dans le tableau en **Annexe VI**. Etant donné que le buffy-coat est une centrifugation du sang, nous avons cherché à savoir si le buffy-coat et le sang donnaient des résultats différents par une régression linéaire log-normale. Cette analyse n'a donné aucune différence significative entre le buffy-coat et le sang (toutes les *P-values* > 0,18) (**Tableau XII**). Ainsi, nous pouvons mélanger les souches du buffy-coat avec celles du sang pour constituer un seul fluide biologique (sang) pour les analyses suivantes. Nous disposons maintenant de trois fluides biologiques qui sont le sang, le suc ganglionnaire et le liquide céphalo-rachidien.

**Tableau XII : Régression du nombre d'allèles amplifiés entre le sang et le buffy-coat**

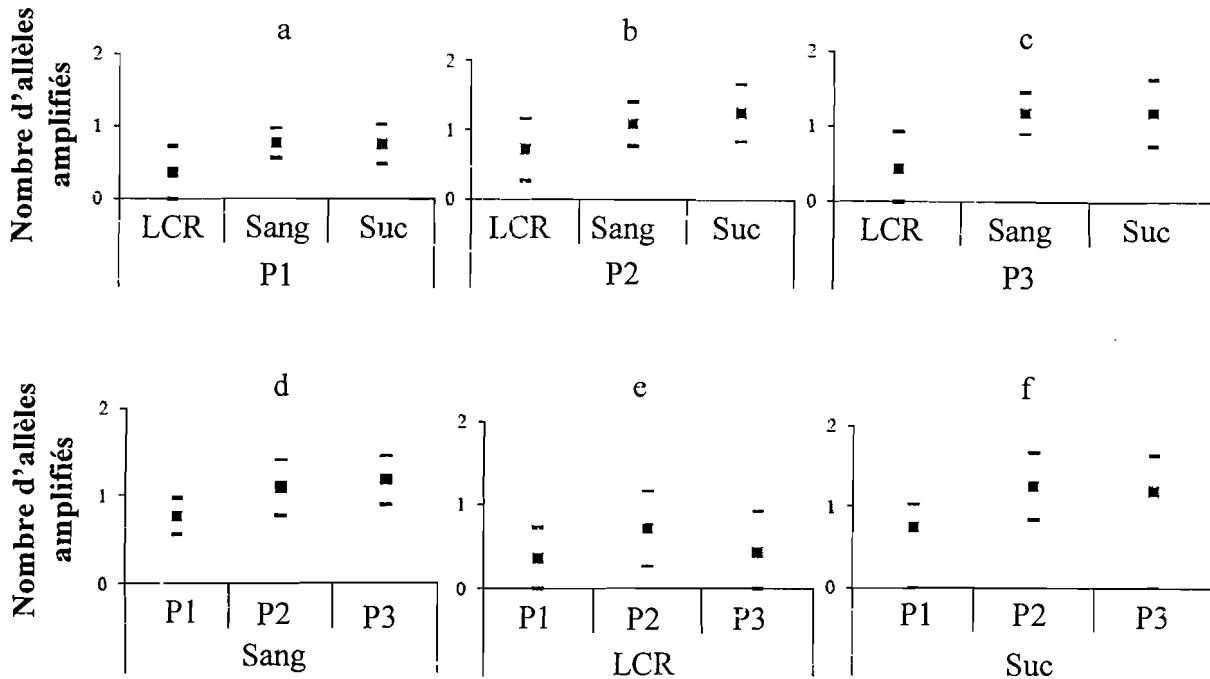
	Df	Deviance Resid	Df Resid	Dev	$P (>   \text{Chi}   )$
Nulle			91	67,948	
Fluides	1	0,6910	90	67,257	0,4058
Protocoles	2	3,4202	88	63,836	0,1808
Loci	2	1,3745	86	62,462	0,5030
Fluides : Protocoles	2	1,7345	84	60,727	0,4201
Fluides : Loci	2	0,6878	82	60,040	0,7090
Protocoles : Loci	4	0,9361	78	59,103	0,9193

### 3.2. Effets des fluides biologiques, des protocoles et des loci

Après la procédure du « stepwise », seuls les fluides biologiques et les protocoles ont été gardés dans les modèles. Ces deux facteurs ont donné une différence significative (Fluides :  $P\text{-value} = 0,01974$  ; Protocoles :  $P\text{-value} = 0,02255$ ) (**Tableau XIII**). Par contre, les trois loci examinés ici n'ont pas montré de différence significative dans le succès de l'amplification de l'ADN ( $P\text{-value} = 0,49667$ ). Il reste à déterminer les différents liens qui existent entre les trois fluides biologiques (sang, suc ganglionnaire et liquide céphalo-rachidien) et les trois protocoles (P1, P2 et P3) par des comparaisons multiples planifiées corrigées au seuil de Bonferroni.

Les analyses entre les fluides biologiques ont révélé une différence significative entre le LCR et les deux autres fluides (sang et suc ganglionnaire) ( $P\text{-value} = 0,015$ ). Par contre, il n'y a pas eu de différence significative entre le sang et le suc ganglionnaire ( $P\text{-value} = 0,808$ ). De même, les analyses entre les protocoles ont montré aussi une différence significative entre le protocole P1 et les deux protocoles P2 et P3 ( $P\text{-value} = 0,0392$ ). Par contre, il n'y a pas eu de différence significative entre P2 et P3 ( $P\text{-value} = 0,92$ ). Les multiples comparaisons montrent que ces résultats sont dûs au fait que moins d'allèles sont amplifiés chez les trypanosomes du liquide céphalo-rachidien ou avec le protocole P1 comparés aux deux autres fluides et protocoles ( $P\text{-value} = 0,01535$  ; **Figure 26**). Les régressions logistiques ont confirmé que la plupart des échecs d'amplification (blancs) se sont produits dans le LCR et

pour le protocole P1 et la plupart des génotypes hétérozygotes ont été vus pour les trypanosomes du sang et du suc ganglionnaire durant les protocoles P2 et P3.



**Figure 26 : Nombre d'allèles amplifiés en fonction des fluides biologiques par protocole et en fonction des protocoles par fluide biologique.**

**Tableau XIII : Régression du nombre d'allèles amplifiés entre le sang, le LCR et le suc ganglionnaire.**

	Df	Deviance Resid	Df Resid	Dev	$P (>   \text{Chi}   )$
Fluides	2	7,8504	181	148,10	<b>0,01974</b>
Protocoles	2	7,5843	179	140,52	<b>0,02255</b>
Loci	2	1,3996	177	139,12	<b>0,49667</b>

## 4. Discussion

Le premier résultat de notre étude est que nous pourrions repêcher quelques génotypes initialement manquants et en effet confirmer avec une évidence certaine que la plupart des profils homozygotes vus pendant des études antérieures (Kaboré *et al.*, 2011b) sont en fait des hétérozygotes comme attendu pour un organisme diploïde et clonal (De Meeûs *et al.*, 2006).

Notre étude a montré que l'importance des allèles dropout est relative au type de fluide biologique et au protocole mais aussi à la réplication des expériences, étant donné que pour le même protocole, des PCR successives ont donné des résultats différents (**Annexe VI**). Les meilleurs fluides biologiques étaient le suc ganglionnaire et le sang, et la meilleure concentration d'ADN, les deux plus élevées étaient les concentrations issues des protocoles P2 et P3 ( $P$ -value = 0,0392 ; **Figure 26**). Dans nos études antérieures, nous avons trouvé qu'en Guinée, les trypanosomes du suc ganglionnaire donnaient de meilleurs résultats que ceux du sang et du LCR (Kaboré *et al.*, 2011b). La différence vient probablement du fait que nous avons utilisé ici un sous-ensemble de souches (sous-échantillon moins grand) et serait assez puissant pour détecter la différence entre le LCR et les deux autres fluides (sang et suc ganglionnaire). En Guinée, les parasitémies sont très faibles dans le LCR et très élevées dans le suc provenant des ganglions lymphatiques (Camara *et al.*, 2005). Ces différences dans la parasitémie expliquent les différences dans les succès d'amplification.

Suivant nos résultats, nous recommandons, pour des investigations ultérieures en génétique des populations, l'utilisation du fluide biologique où les parasites sont le plus concentrés, c'est-à-dire le suc ganglionnaire provenant des ganglions lymphatiques pour *T. b. gambiense* en Guinée, une concentration d'ADN adéquate et une répétition des PCR afin d'augmenter les chances d'obtenir le bon génotype. La variation de la quantité d'ADN a permis de recouvrir plusieurs allèles dropout. Plus important, nous montrons aussi que beaucoup de profils initialement interprétés homozygotes se sont avérés être des hétérozygotes. C'est un résultat extrêmement important car les allèles dropout tendent rapidement à augmenter les taux d'homozygotie et peuvent conduire à surestimer l'impact possible de recombinaison sexuelle dans de tels genres d'organismes. Il est donc important que de telle possibilité soit investiguée dans d'autres études. Les études de génétique des populations exigent l'identification de loci hétérozygotes. Une telle situation est donc importante lorsqu'elle est appliquée à des organismes qui sont dilués dans leur

environnement, comme les trypanosomes le sont dans le sang, le LCR ou le suc ganglionnaire de leurs hôtes. L'amélioration des protocoles de génotypage nous permettra d'améliorer les estimations d'hétérozygotie et donc la précision des conclusions concernant le système de reproduction, la taille de la population et la dispersion de *T. b. gambiense* au sein et entre les différents foyers de cette maladie tropicale négligée, où cette maladie mortelle continue toujours de menacer la santé humaine et le développement.

## DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La lutte contre la THA repose essentiellement sur le dépistage/traitement des trypanosomés. On observe une grande diversité de tableaux cliniques (troubles infectieux/inflammatoires, cutanés, cardiaques, hormonaux, neurologiques...), raison pour laquelle on ne peut pas baser un diagnostic de la maladie sur un simple examen clinique. On a alors recours à des tests de diagnostic. La stratégie de dépistage se base en Afrique de l'Ouest et Centrale sur un test sérologique permettant de faire un dépistage actif de masse des populations à risque : le CATT.

Cependant lors des prospections médicales, les équipes de terrain font face à une diversité de résultats : des individus négatifs au CATT qualifiés de sujets indemnes de THA, des individus positifs au CATT chez lesquels le parasite est mis en évidence par les tests parasitologiques, qualifiés de trypanosomés et traités, et enfin des individus séropositifs sans confirmation parasitologique appelés SERO. Ces derniers ne sont pas traités à cause de la toxicité et de l'aspect contraignant des traitements et parce que des doutes subsistent sur le fait qu'ils soient réellement porteurs de trypanosomes et qu'ils constituent ainsi un réservoir de parasites dans les foyers. Des tests PCR ont pourtant mis en évidence la présence d'ADN de trypanosomes chez certains de ces individus, mais ces tests spécifiques du sous-genre *Trypanozoon* ne permettent pas de différencier les sujets qui pourraient être des porteurs d'infections transitoires à *T. b. brucei* (non pathogène pour l'homme) de ceux vraiment infectés par *T. b. gambiense*.

La THA évolue chez l'homme en deux phases : une phase lymphatico-sanguine et une phase méningo-encéphalique qui correspond au passage du trypanosome dans le LCR. Pour la décision thérapeutique et toujours à cause de la toxicité des médicaments utilisés, une classification des phases en fonction de la cytorachie a été proposée comme suit et adoptée dans notre étude : phase 1 avec une cytorachie < 5 cellules/ml (notée S1), phase 2 précoce avec une cytorachie comprise entre 6 et 20 cellules/ml (notée S2), phase 2 avancée avec une cytorachie > 20 cellules/ml (notée S3). Les sujets S3 doivent être traités au mélarsoprol qui est très toxique alors que les sujets S1 et S2 peuvent être traités efficacement à la pentamidine qui est moins toxique.

On observe une importante diversité d'évolutions cliniques qui ne correspond pas à la définition traditionnelle qui décrit *T. b. gambiense* responsable de la forme chronique de THA en Afrique de l'Ouest et Centrale. En effet, on décrit des sujets totalement asymptomatiques pendant plusieurs années et qui n'évoluent pas en S3. Les sujets SERO potentiellement porteurs de *T. b. gambiense* pourraient d'ailleurs être dûs à une forme asymptomatique de THA avec des parasitémies très faibles. A l'inverse, on décrit aussi des sujets qui évoluent très rapidement de S1 à S3 évoquant une forme aiguë de la maladie (attribuable par définition à *T. b. rhodesiense* en Afrique de l'Est).

La diversité de tableaux et d'évolutions cliniques et de réponses aux tests de dépistage témoignent d'une importante diversité de réponses à l'infection qui doit être recherchée à la fois chez le parasite (variabilité génétique) et chez l'hôte (susceptibilité individuelle).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la caractérisation génétique des trypanosomes par PCR microsatellites afin (i) d'identifier les trypanosomes présents chez les sujets séropositifs et (ii) d'étudier la variabilité génétique en fonction des fluides biologiques et du stade de la maladie. Un autre objectif de l'approche génétique des populations est d'avoir accès à un certain nombre de paramètres liés au parasite tels que la taille des populations, leurs niveaux de subdivision et leur capacité de dispersion dans l'espace et le temps, ainsi que leur modalité de reproduction, qui sont des paramètres importants à connaître dans la perspective d'une campagne d'élimination de la maladie à l'échelle du littoral guinéen qui est la zone la plus touchée par la THA en Afrique de l'Ouest.

### *Sujets séropositifs sans confirmation parasitologique (SERO)*

Dans l'activité de recherche 1, nous avons traité les questions relatives aux sujets séropositifs qui ne sont pas confirmés par les tests parasitologiques classiques, mais chez lesquels de l'ADN parasitaire peut être détecté par PCR : sont-ils porteurs de *T. b. gambiense*, et si oui, les trypanosomes détectés sont-ils identiques à ceux trouvés chez les trypanosomés positifs aux tests parasitologiques ? Notre étude a montré pour la première fois que l'ADN des trypanosomes extrait de sujets SERO identifiés en Côte d'Ivoire et en Guinée est bien de l'ADN de *T. b. gambiense* groupe 1. Nos résultats ont montré aussi que ces sujets SERO étaient infectés par les mêmes profils génotypiques des trypanosomes rencontrés chez les trypanosomés « classiques ». Ces résultats confirment donc définitivement qu'au moins

certaines sujets SERO peuvent être infectés par *T. b. gambiense* groupe 1 comme précédemment suspecté par l'utilisation d'autres méthodes moléculaires. Ces sujets SERO seraient donc de potentiels porteurs asymptomatiques de *T. b. gambiense* groupe 1 et pourraient constituer un réservoir de parasites. L'existence de ces porteurs asymptomatiques (généralement non pris en charge par les programmes de lutte) pourrait être responsable du plateau observé dans la **Figure 2** qui décrit le nombre de cas rapportés cette dernière décennie. Malgré les nombreux efforts de lutte médicale qui ont permis ces dernières années de faire baisser significativement les prévalences de la maladie à l'échelle du continent, la THA continue de se maintenir à un niveau hypo-endémique. Ce phénomène est aussi observé en Guinée (Camara *et al.*, 2005) et en Côte d'Ivoire (Kaba *et al.*, 2006). Ce maintien à l'état hypo-endémique n'est possible que dans un contexte où la transmission du parasite est toujours possible notamment du fait du maintien d'un contact homme/vecteur important. Par exemple, en zone de savane qui était la plus touchée par la THA dans les années 50/60 (Mali, Burkina Faso), si la lutte médicale semble avoir permis d'éliminer la maladie, il semble de plus en plus évident que d'autres facteurs ont contribué à cette élimination progressive. Les changements climatiques (assèchement des rivières), la démographie, le développement économique, l'anthropisation (dégradation du biotope des tsé-tsé, élimination des hôtes sauvages des glossines, l'aménagement d'installations hydrauliques) sont responsables de la réduction du contact homme/glossines (Courtin *et al.*, 2009; Rayaisse *et al.*, 2009). Par exemple le conflit ivoirien (2002) a provoqué le retour de 360 000 rapatriés burkinabés dans leur pays d'origine. En provenance de foyers ivoiriens de maladie du sommeil, ces rapatriés se sont principalement installés dans des régions du Burkina Faso qui furent les foyers les plus actifs de la maladie au milieu du XX<sup>e</sup> siècle. Malgré ce retour massif, on n'a pas observé de réémergence de la maladie du sommeil au Burkina Faso car les conditions pour une reprise de la transmission semblent ne plus être réunies (Courtin *et al.*, 2010b).

Dans les foyers où les conditions d'une transmission sont toujours réunies, on peut se demander quelle pourrait être la stratégie de prise en charge des sujets SERO dans les campagnes de lutte : certains individus SERO pourraient en effet constituer un réservoir de *T. b. gambiense* et pourraient être responsables du maintien de la maladie à l'état hypo-endémique dans un foyer. Ces sujets pourraient aussi être responsables des phénomènes de réémergence épidémique de la maladie dans des foyers historiques plusieurs dizaines d'années après une apparente disparition de la maladie.

Si certains auteurs ont recommandé le traitement de ces sujets SERO pour réduire le risque de transmission (Simarro *et al.*, 1999; Chappuis *et al.*, 2004; Ilboudo *et al.*, 2011), d'autres pensent que le traitement des SERO ne devrait pas être appliqué lorsque la prévalence de la maladie est faible (Inojosa *et al.*, 2006), une situation qui devrait se généraliser dans les années à venir grâce aux campagnes d'élimination en cours (Simarro *et al.*, 2010). Le traitement de ces sujets SERO restera une question ouverte jusqu'à ce que de nouveaux traitements bien tolérés et moins contraignants (administration orale) soient disponibles. En attendant, ce qui malheureusement risque d'être assez long (Brun *et al.*, 2010), nous recommandons aux acteurs de la lutte de mettre en place des suivis actifs de ces sujets SERO afin d'identifier ceux qui vont développer la maladie et de limiter le risque de traiter à tort des sujets faux-positifs. Une alternative est d'associer à la lutte médicale qui montre ici des limites, la lutte anti-vectorielle contre les glossines pour réduire les risques de transmission du parasite. Il faut bien entendu continuer à mener des activités de recherche pour préciser le rôle épidémiologique de tels sujets apparemment porteurs de parasitémies très faibles. Notre équipe a mis en place des suivis de cohortes en Côte d'Ivoire et en Guinée qui sont toujours en cours et auxquels je participe. En collaboration avec l'OMS et les programmes nationaux, nous constituons au CIRDES une banque de données et d'échantillons biologiques qui vont, à l'aide d'analyses transcriptomiques et protéomiques nous permettre d'améliorer nos connaissances sur ce statut, son évolution dans le temps et les facteurs humains et parasitaires impliqués. Si nous mettons par exemple en évidence des facteurs d'hôtes impliqués dans le maintien de faibles parasitémies, ceci pourrait ouvrir de nouvelles voies dans la recherche de thérapies alternatives.

Une autre question se pose aussi : avec des parasitémies si faibles, les glossines qui vont se nourrir sur ces sujets peuvent-elles s'infecter ? On pourrait répondre à cette question en faisant du xénodiagnostic sur les SERO que nous suivons, mais cette approche est éthiquement et logistiquement difficile à mettre en place. Néanmoins une étude préliminaire en conditions expérimentales (glossine/rongeurs/porcs) est actuellement menée par notre équipe au CIRDES.

## *Tropisme tissulaire et corrélation entre diversité génétique des trypanosomes et diversité d'évolutions cliniques*

Dans l'activité de recherche 2, nous avons répondu aux questions suivantes : les trypanosomes circulant dans les différents fluides biologiques de l'homme sont-ils identiques ? Quelle est la fréquence des infections mixtes chez l'hôte ? Existe-t-il des corrélations entre diversité génétique parasitaire et diversité d'évolutions cliniques ? Nos résultats ont montré qu'il n'y a pas de différenciation génétique entre les souches provenant des différents fluides biologiques. En d'autres termes, on peut considérer que les parasites présents dans le sang, le suc ganglionnaire et le LCR proviennent d'une seule population.

Ces résultats montrent qu'il ne semble pas exister de tropisme tissulaire de certains génotypes de trypanosomes qui pourraient être impliqués dans l'évolution de la THA. Ces résultats vont plutôt dans le sens d'une absence de corrélations entre la diversité génétique parasitaire observée et la diversité d'évolutions cliniques résultant de l'infection par les trypanosomes, mais ceci reste à prouver par une étude spécifique. Par contre, nous avons observé des infections mixtes dans la présente étude (différents génotypes de trypanosomes circulant dans différents fluides du même patient). Le rôle de ces infections mixtes dans la diversité de réponses aux infections parasitaires a été prouvé dans la maladie de Chagas (Lauria-Pires et Teixeira, 1997; Franco *et al.*, 2003; Mantilla *et al.*, 2010) ou dans la trypanosomose animale (Masumu *et al.*, 2009) et est suspecté dans la THA (Jamonneau *et al.*, 2004b). Des études supplémentaires seront nécessaires pour approfondir nos connaissances sur ce phénomène (voir perspectives).

Cependant, nos résultats ont montré l'existence d'une différenciation génétique entre les souches de trypanosomes provenant de trypanosomés à différents stades de la maladie (entre S1 et S3, entre S2 et S3). Nous avons aussi confirmé l'existence d'une différenciation temporelle (Koffi *et al.*, 2009). Etant donné qu'il n'y a pas de différenciation génétique entre les souches en fonction du fluide biologique, la différenciation génétique notée entre les statuts du trypanosomé vient probablement d'une interaction avec la différenciation temporelle. En effet, il est probable que des trypanosomés en phase précoce (S1) ont été infectés par des souches plus récentes que ceux de la phase intermédiaire (S2) ou de la phase avancée (S3). La première phase de la maladie peut en effet durer plusieurs années (Checchi *et al.*, 2008). Cela confirme que le statut du malade et le temps (période) ont une influence sur

la répartition génétique et sont probablement corrélés. Ces paramètres doivent être pris en compte dans les études de génétique des populations de *T. b. gambiense*.

### *Marqueurs microsatellites, outil de choix pour l'étude des trypanosomes ?*

Les échecs d'amplification rencontrés (allèle dropout/nul) lors du génotypage des souches de trypanosomes directement à partir des échantillons biologiques, posent le problème de la sensibilité des marqueurs microsatellites. Pour la suite de nos études, nous avons cherché à savoir, d'un point de vue technique, si les marqueurs microsatellites représentent réellement un outil de choix pour l'étude de la variabilité génétique des trypanosomes directement à partir des fluides biologiques (c'est-à-dire, s'il est possible d'optimiser le protocole de génotypage pour qu'il soit suffisamment sensible). Cette étude a permis d'améliorer la sensibilité du protocole de génotypage et d'augmenter ainsi le succès de l'amplification. Un résultat très important était de confirmer que les profils interprétés homozygotes ou blancs rencontrés dans lors du génotypage étaient de faux homozygotes et de fausses données manquantes qui sont dûs à des allèles dropout et/ou des allèles nuls. Nous avons pu voir que le succès de l'amplification est dépendant de la nature du fluide biologique, de la concentration d'ADN du protocole et de la réplication des expériences.

La plupart des études de caractérisation génétique a été réalisée sur des échantillons de sang et de LCR. La particularité de notre étude est l'utilisation non seulement de ces deux fluides mais aussi et pour la première fois à notre connaissance du suc ganglionnaire. En Guinée, le meilleur fluide biologique pour des études de génotypage s'est révélé être le suc ganglionnaire. Ceci présente un avantage du moins dans le contexte guinéen où plus de 80% des sujets dépistés le sont à l'examen microscopique de ce fluide. On peut aussi très bien baser une analyse de génétique des populations sur les trypanosomes circulant dans ce fluide sans engendrer de biais puisque dans l'activité de recherche 2, nous avons montré qu'il n'y a pas de structuration génétique des populations de *T. b. gambiense* en fonction des trois différents fluides biologiques.

Les marqueurs microsatellites sont de bons marqueurs malgré les problèmes de sensibilité rencontrés. En Guinée, ces problèmes semblent pouvoir être surmontés par l'utilisation du suc ganglionnaire et en effectuant le génotypage avec différentes

concentrations d'ADN et en répliquant les expériences afin de minimiser les problèmes d'échecs d'amplification des allèles.

### *Perspectives*

Ce sont ces échecs d'amplification qui ne nous ont pas permis d'analyser finement la structuration géographique des populations de trypanosomes entre et au sein des trois foyers (Boffa, Dubréka, Forécariah) en Guinée. Par contre, nous avons présenté ci-dessus des résultats préliminaires. Ces résultats confirment qu'il existe une structuration géographique entre les foyers de Boffa et Dubréka (Koffi *et al.*, 2009) qui semble aussi exister avec le foyer de Forécariah. La connaissance de la structuration géographique entre foyers est d'un intérêt capital pour la mise en place d'un projet de lutte contre la THA. Elle permet de connaître les échanges parasitaires entre les différents foyers et ainsi de décider de la stratégie de lutte à mettre en place d'où la nécessité d'approfondir cette approche.

Avec l'amélioration de la technique de génotypage de microsatellites (activité de recherche 3), nous allons dans un premier temps compléter nos génotypes blancs (données manquantes de génotypage) pour une analyse plus fine en génétique des populations. Notre banque d'échantillons s'est élargie avec les différentes prospections médicales effectuées de fin 2009 à juin 2011. Nous disposons actuellement d'échantillons de sang, de suc ganglionnaire et de LCR de 200 trypanosomés et de 150 sujets SERO. Ces études nous permettront de mieux connaître les relations existant entre les différents foyers géographiques voire même à l'échelle d'un foyer, c'est-à-dire la connaissance des échanges interfoyers et intrafoyers qui conditionneront la mise en place d'un vaste projet de lutte contre la maladie du sommeil.

Enfin et toujours dans l'objectif de rechercher des corrélations entre diversité parasitaire et diversité de réponses à l'infection, nous allons mener une approche expérimentale sur rongeurs de laboratoire au CIRDES qui vise à caractériser phénotypiquement en terme de pathogénicité et de virulence, 10 souches de trypanosomes isolées ces dernières années en Guinée et en Côte d'Ivoire. Nous étudierons alors les interactions entre souches (infections mixtes) ayant montré des caractéristiques différentes et les comparerons aux infections simples. Nous allons effectuer des suivis en parallèle de la réponse immune ou cellulaire à l'infection qui devrait permettre de déterminer si certaines

souches ou combinaisons de souches sont capables d'influencer le développement de la réponse de l'hôte. Et des analyses protéomiques et génétiques conduites sur les souches de parasite présentant des phénotypes extrêmes seront réalisées pour identifier les facteurs parasitaires impliqués dans les processus de virulence et de pathogénicité au cours de la THA.

Ces études se feront en collaboration entre le CIRDES, l'IRD, le Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology de l'Université de Glasgow et les programmes nationaux de lutte contre la THA (PNLTHA) de Guinée et de Côte d'Ivoire.

## CONCLUSION

Au cours de cette thèse, nous avons pu montrer que certains sujets séropositifs sont infectés par *T. b. gambiense* groupe 1. Les souches rencontrées chez ces sujets SERO sont les mêmes que celles retrouvées chez les trypanosomés. Ces individus SERO constituent donc un réservoir de parasites de *T. b. gambiense*. Cependant, la prise en charge de ces SERO dans les stratégies de lutte reste toujours une question ouverte. Nous avons aussi montré qu'il n'y a pas de différenciation génétique entre les souches de trypanosomes circulant dans les trois fluides biologiques humains (sang, suc ganglionnaire et LCR). Ce résultat suggère qu'il n'existe pas de tropisme tissulaire et semble montrer une absence de corrélations entre la diversité d'évolutions cliniques et la diversité génétique parasitaire. En d'autres termes, n'importe quel tissu biologique peut être utilisé pour la caractérisation génétique des trypanosomes. Cependant, le meilleur fluide en Guinée pour des études de génétique des populations est le suc ganglionnaire. Nous avons aussi mis en évidence l'existence d'une structuration temporelle, dont il faut tenir compte pour l'analyse de la structuration géographique au sein et entre les trois foyers (Boffa, Dubréka, Forécariah) en Guinée. Ce paramètre temporel doit être pris en compte dans les études de génétique de populations. La sensibilité des PCR microsatellites sur échantillons biologiques peut être augmentée en utilisant le liquide biologique le plus approprié (suc ganglionnaire en Guinée), en faisant varier les concentrations d'ADN et en répliquant les expériences. Les marqueurs microsatellites restent à l'heure actuelle les meilleurs marqueurs pour étudier la diversité génétique au sein des populations de trypanosomes directement à partir des fluides biologiques.

## BIBLIOGRAPHIE

- Agbo, E.E., Majiwa, P.A., Claassen, H.J., te Pas, M.F., 2002. Molecular variation of *Trypanosoma brucei* subspecies as revealed by AFLP fingerprinting. *Parasitology* 124, 349-358.
- Akopyants, N.S., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., Dobson, D.E., Beverley, S.M., Sacks, D.L., 2009. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science* 324, 265-268.
- Annan, Z., Durand, P., Ayala, F.J., Arnathau, C., Awono-Ambene, P., Simard, F., Razakandrainibe, F.G., Koella, J.C., Fontenille, D., Renaud, F., 2007. Population genetic structure of *Plasmodium falciparum* in the two main African vectors, *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7987-7992.
- Antonio-Nkondjio, C., Ndo, C., Kengne, P., Mukwaya, L., Awono-Ambene, P., Fontenille, D., Simard, F., 2008. Population structure of the malaria vector *Anopheles moucheti* in the equatorial forest region of Africa. *Malar J* 7, 120.
- Bailey, J.W., Smith, D.H., 1992. The use of the acridine orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86, 630.
- Baker, J.R., 1995. The subspecific taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *Parasite* 2, 3-12.
- Balmer, O., Palma, C., Macleod, A., Caccone, A., 2006. Characterization of di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite markers with perfect repeats for *Trypanosoma brucei* and related species. *Mol Ecol Notes* 6, 508-510.
- Balmer, O., Caccone, A., 2008. Multiple-strain infections of *Trypanosoma brucei* across Africa. *Acta Trop* 107, 275-279.
- Balmer, O., Beadell, J.S., Gibson, W., Caccone, A., 2011. Phylogeography and Taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e961.
- Baral, T.N., 2010. Immunobiology of African trypanosomes: need of alternative interventions. *J Biomed Biotechnol* 2010, 389153.
- Barrett, M.P., MacLeod, A., Tovar, J., Sweetman, J.P., Tait, A., Le Page, R.W., Melville, S.E., 1997. A single locus minisatellite sequence which distinguishes between *Trypanosoma brucei* isolates. *Mol Biochem Parasitol* 86, 95-99.
- Barry, J.D., Ginger, M.L., Burton, P., McCulloch, R., 2003. Why are parasite contingency genes often associated with telomeres? *Int J Parasitol* 33, 29-45.
- Bastin, P., Ellis, K., Kohl, L., Gull, K., 2000. Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. *J Cell Sci* 113 (Pt 18), 3321-3328.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05, Logiciel sous Windows TM pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome,

Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M.A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U.C., Arrowsmith, C., Atkin, R.J., Barron, A.J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.J., Churcher, C., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R.M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M.C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B.R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A.X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P.J., Moule, S., Martin, D.M., Morgan, G.W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C.S., Peterson, J., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Reitter, C., Salzberg, S.L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A.J., Tallon, L., Turner, C.M., Tait, A., Tivey, A.R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M.D., Embley, T.M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J.D., Fairlamb, A.H., Opperdoes, F., Barrell, B.G., Donelson, J.E., Hall, N., Fraser, C.M., Melville, S.E., El-Sayed, N.M., 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416-422.

Bingle, L.E., Eastlake, J.L., Bailey, M., Gibson, W.C., 2001. A novel GFP approach for the analysis of genetic exchange in trypanosomes allowing the in situ detection of mating events. *Microbiology* 147, 3231-3240.

Biteau, N., Bringaud, F., Gibson, W., Truc, P., Baltz, T., 2000. Characterization of *Trypanozoon* isolates using a repeated coding sequence and microsatellite markers. *Mol Biochem Parasitol* 105, 187-202.

Blum, J., Nkunku, S., Burri, C., 2001. Clinical description of encephalopathic syndromes and risk factors for their occurrence and outcome during melarsoprol treatment of human African trypanosomiasis. *Trop Med Int Health* 6, 390-400.

Bregues, J., Challier, A., Ouedraogo, V.K., 1964. Contribution à la connaissance de l'épidémiologie de la trypanosomiase humaine: enquête entomologique dans les territoires kissis et limitrophes (avril-mai 1964: Sierra-Leone, Libéria, Guinée). OCCGE, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., Burri, C., 2010. Human African trypanosomiasis. *Lancet* 375, 148-159.

Bucheton, B., Macleod, A., Jamonneau, V., 2011. Human host determinants influencing the outcome of *T. b. gambiense* infections. *Parasite Immunol*, 10.1111/j.1365-3024.2011.01287.x.

Bulle, B., Millon, L., Bart, J.M., Gallego, M., Gambarelli, F., Portus, M., Schnur, L., Jaffe, C.L., Fernandez-Barredo, S., Alunda, J.M., Piarroux, R., 2002. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J Clin Microbiol* 40, 3391-3397.

Burri, C., 2010. Chemotherapy against human African trypanosomiasis: is there a road to success? *Parasitology* 137, 1987-1994.

Buscher, P., Draelants, E., Magnus, E., Vervoort, T., Van Meirvenne, N., 1991. An experimental latex agglutination test for antibody detection in human African trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* 71, 267-273.

Buscher, P., Lejon, V., Magnus, E., Van Meirvenne, N., 1999. Improved latex agglutination test for detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense* infected patients. *Acta Trop* 73, 11-20.

Buscher, P., Mumba Ngoyi, D., Kabore, J., Lejon, V., Robays, J., Jamonneau, V., Bebronne, N., Van der Veken, W., Bieler, S., 2009. Improved Models of Mini Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT) and Modified Single Centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e471.

Camara, M., Kaba, D., KagbaDouno, M., Sanon, J.R., Ouendeno, F.F., Solano, P., 2005. Human African trypanosomiasis in the mangrove forest in Guinea: epidemiological and clinical features in two adjacent outbreak areas. *Med Trop (Mars)* 65, 155-161.

Camara, M., Camara, O., Ilboudo, H., Sakande, H., Kabore, J., N'Dri, L., Jamonneau, V., Bucheton, B., 2010. Sleeping sickness diagnosis: use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test. *Trop Med Int Health* 15, 796-799.

Cattand, P., Miezán, B.T., de Raadt, P., 1988. Human African trypanosomiasis: use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *Bull World Health Organ* 66, 83-86.

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

Cavalier-Smith, T., 2004. Only six kingdoms of life. *Proc Biol Sci* 271, 1251-1262.

Cavalier-Smith, T., 2009. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol Lett* 6, 342-345.

Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W.F., 1967. Phylogenetic analysis: model and estimation procedures. *Am J Hum Genet* 19, 233-257.

Chappuis, F., Stivanello, E., Adams, K., Kidane, S., Pittet, A., Bovier, P.A., 2004. Card agglutination test for trypanosomiasis (CATT) end-dilution titer and cerebrospinal fluid cell count as predictors of human African Trypanosomiasis (*Trypanosoma brucei gambiense*) among serologically suspected individuals in southern Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 71, 313-317.

Chappuis, F., Loutan, L., Simarro, P., Lejon, V., Buscher, P., 2005. Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 18, 133-146.

Checchi, F., Filipe, J.A., Barrett, M.P., Chandramohan, D., 2008. The natural progression of Gambiense sleeping sickness: what is the evidence? *PLoS Negl Trop Dis* 2, e303.

Chen, H., Minakawa, N., Beier, J., Yan, G., 2004. Population genetic structure of *Anopheles gambiae* mosquitoes on Lake Victoria islands, west Kenya. *Malar J* 3, 48.

- Cooper, G.M., 2000. The Cell, 2nd edition. A Molecular Approach, Boston University
- Courtin, D., Argiro, L., Jamonneau, V., N'Dri, L., N'Guessan, P., Abel, L., Dessein, A., Cot, M., Laveissiere, C., Garcia, A., 2006. Interest of tumor necrosis factor-alpha -308 G/A and interleukin-10 -592 C/A polymorphisms in human African trypanosomiasis. *Infect Genet Evol* 6, 123-129.
- Courtin, D., Milet, J., Jamonneau, V., Yeminanga, C.S., Kumeso, V.K., Bilengue, C.M., Betard, C., Garcia, A., 2007. Association between human African trypanosomiasis and the IL6 gene in a Congolese population. *Infect Genet Evol* 7, 60-68.
- Courtin, F., Jamonneau, V., Oke, E., Coulibaly, B., Oswald, Y., Dupont, S., Cuny, G., Doumenge, J.P., Solano, P., 2005. Towards understanding the presence/absence of Human African Trypanosomiasis in a focus of Cote d'Ivoire: a spatial analysis of the pathogenic system. *Int J Health Geogr* 4, 27.
- Courtin, F., Jamonneau, V., Duvallet, G., Garcia, A., Coulibaly, B., Doumenge, J.P., Cuny, G., Solano, P., 2008. Sleeping sickness in West Africa (1906-2006): changes in spatial repartition and lessons from the past. *Trop Med Int Health* 13, 334-344.
- Courtin, F., Sidibe, I., Rouamba, J., Jamonneau, V., Gouro, A., Solano, P., 2009. Population growth and global warming: impacts on tsetse and trypanosomes in West Africa. *Parasite* 16, 3-10.
- Courtin, F., Jamonneau, V., Camara, M., Camara, O., Coulibaly, B., Diarra, A., Solano, P., Bucheton, B., 2010a. A geographical approach to identify sleeping sickness risk factors in a mangrove ecosystem. *Trop Med Int Health* 15, 881-889.
- Courtin, F., Jamonneau, V., Kambire, R., Solano, P., 2010b. Ivory Coast uprising and returning Burkinabe immigrants: evaluation of the risk for reemergence of sleeping sickness in Burkina Faso. *Med Trop (Mars)* 70, 490-496.
- Courtioux, B., Pervieux, L., Bisser, S., Bouteille, B., 2008. Criteria for diagnosis of the neurological stage of human African trypanosomiasis: update and perspectives. *Med Trop (Mars)* 68, 17-23.
- De Meeûs, T., Renaud, F., Mouveroux, E., Reynes, J., Galeazzi, G., Mallié, M., Bastide, J.M., 2002. Genetic structure of *Candida glabrata* populations in AIDS and non-AIDS patients. *J Clin Microbiol* 40, 2199-2206.
- De Meeûs, T., Lehmann, L., Balloux, F., 2006. Molecular epidemiology of clonal diploids: A quick overview and a short DIY (do it yourself) notice. *Infect Genet Evol* 6, 163-170.
- De Meeûs, T., McCoy, K.D., Prugnolle, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Boussès, S., Renaud, F., 2007. Population genetics and molecular epidemiology or how to "débusquer la bête". *Infect Genet Evol* 7, 308-332.
- De Meeûs, T., Guégan, J.F., Teriokhin, A.T., 2009. MultiTest V.1.2, a program to binomially combine independent tests and performance comparison with other related methods on proportional data. *BMC Bioinformatics* 10, 443.

Deborggraeve, S., Claes, F., Laurent, T., Mertens, P., Leclipteux, T., Dujardin, J.C., Herdewijn, P., Buscher, P., 2006. Molecular dipstick test for diagnosis of sleeping sickness. *J Clin Microbiol* 44, 2884-2889.

Deborggraeve, S., Buscher, P., 2010. Molecular diagnostics for sleeping sickness: what is the benefit for the patient? *Lancet Infect Dis* 10, 433-439.

Deborggraeve, S., Lejon, V., Ekangu, R.A., Mumba Ngoyi, D., Pati Pyana, P., Ilunga, M., Mulunda, J.P., Buscher, P., 2011. Diagnostic accuracy of PCR in gambiense sleeping sickness diagnosis, staging and post-treatment follow-up: a 2-year longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e972.

Desquesnes, M., McLaughlin, G., Zoungrana, A., Davila, A.M., 2001. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int J Parasitol* 31, 610-614.

Diallo, P.B., Truc, P., Meda, H.A., Kamenan, A., 1996. Serologic diagnosis of human african trypanosomiasis caused by *Trypanosoma brucei gambiense*. 1--Production and use of rough antigens in ELISA and latex agglutination tests. *Bull Soc Pathol Exot* 89, 262-268.

Dieringer, D., Schlötterer, C., 2002. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol Ecol Notes* 3, 167-169.

Docampo, R., Moreno, S.N., 2003. Current chemotherapy of human African trypanosomiasis. *Parasitol Res* 90 Supp 1, S10-S13.

Doua, F., Miezán, T.W., Sanon Singaro, J.R., Boa Yapo, F., Baltz, T., 1996. The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* 55, 586-588.

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. *Trop Med Parasitol* 35.

Dukes, P., Kaukas, A., Hudson, K.M., Asonganyi, T., Gashumba, J.K., 1989. A new method for isolating *Trypanosoma brucei gambiense* from sleeping sickness patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83, 636-639.

Dukes, P., Gibson, W.C., Gashumba, J.K., Hudson, K.M., Bromidge, T.J., Kaukas, A., Asonganyi, T., Magnus, E., 1992. Absence of the LiTat 1.3 (CATT antigen) gene in *Trypanosoma brucei gambiense* stocks from Cameroon. *Acta Trop* 51, 123-134.

Dumas, M., Bouteille, B., 1996. Human African trypanosomiasis. *C R Seances Soc Biol Fil* 190, 395-408.

Edwards, A.W., 2008. G. H. Hardy (1908) and Hardy-Weinberg equilibrium. *Genetics* 179, 1143-1150.

El-Sayed, N.M., Hegde, P., Quackenbush, J., Melville, S.E., Donelson, J.E., 2000. The African trypanosome genome. *Int J Parasitol* 30, 329-345.

El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J.F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D., Andersson, B., 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409-415.

Embley, T.M., Martin, W., 2006. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440, 623-630.

Ersfeld, K., Melville, S.E., Gull, K., 1999. Nuclear and genome organization of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today* 15, 58-63.

Fevre, E.M., Picozzi, K., Jannin, J., Welburn, S.C., Maudlin, I., 2006. Human African trypanosomiasis: Epidemiology and control. *Adv Parasitol* 61, 167-221.

Fevre, E.M., Wissmann, B.V., Welburn, S.C., Lutumba, P., 2008. The burden of human African trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e333.

Franco, D.J., Vago, A.R., Chiari, E., Meira, F.C.A., Galvão, L.M.C., Machado, C.R.S., 2003. *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp Parasitol* 104 54-61.

Garcia, A., Jamonneau, V., Magnus, E., Laveissiere, C., Lejon, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., Van Meirvenne, N., Buscher, P., 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.

Garcia, A., Courtin, D., Solano, P., Koffi, M., Jamonneau, V., 2006. Human African trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics. *Trends Parasitol* 22, 405-409.

Genovese, G., Friedman, D.J., Ross, M.D., Lecordier, L., Uzureau, P., Freedman, B.I., Bowden, D.W., Langefeld, C.D., Oleksyk, T.K., Uscinski Knob, A.L., Bernhardt, A.J., Hicks, P.J., Nelson, G.W., Vanhollebeke, B., Winkler, C.A., Kopp, J.B., Pays, E., Pollak, M.R., 2010. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science* 329, 841-845.

Gibson, W., Osinga, K.A., Michels, P.A.M., Borst, P., 1985. Trypanosomes of subgenus *Trypanozoon* are diploid for housekeeping genes. *Mol Biochem Parasitol* 16, 231-242.

Gibson, W., 2007. Resolution of the species problem in African trypanosomes. *Int J Parasitol* 37, 829-838.

- Gibson, W., Peacock, L., Ferris, V., Williams, K., Bailey, M., 2008. The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. *Parasit Vectors* 1, 4.
- Gibson, W.C., 1986. Will the real *Trypanosoma brucei gambiense* please stand up. *Parasitol Today* 2, 255-257.
- Gibson, W.C., Stevens, J., Truc, P., 1999. Identification of trypanosomes: from morphology to molecular biology, in: Springer (Ed.), *Progress in Human African Trypanosomiasis*, Paris, pp. 7-29.
- Godfrey, D.G., Baker, R.D., Rickman, L.R., Mehiitz, D., 1990. The distribution, relationships and identification of enzymic variants within the subgenus *Trypanozoon*. *Adv Parasitol* 29, 1-74.
- Goudet, J., Raymond, M., De Meeûs, T., Rousset, F., 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144, 1933-1940.
- Goudet, J., 2003. Fstat (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> Updated from Goudet [1995].
- Gull, K., 2001. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. *Int J Parasitol* 31, 443-452.
- Hainard, A., Tiberti, N., Robin, X., Ngoyi, D.M., Matovu, E., Enyaru, J.C., Muller, M., Turck, N., Ndung'u, J.M., Lejon, V., Sanchez, J.C., 2011. Matrix metalloproteinase-9 and intercellular adhesion molecule 1 are powerful staging markers for human African trypanosomiasis. *Trop Med Int Health*.
- Hajduk, S., Ochsenreiter, T., 2010. RNA editing in kinetoplastids. *RNA Biol* 7, 229-236.
- Heby, O., Persson, L., Rentala, M., 2007. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. *Amino Acids* 33, 359-366.
- Hedrick, P.W., 1999. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53, 313-318.
- Hedrick, P.W., 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59, 1633-1638.
- Hide, G., Cattand, P., LeRay, D., Barry, J.D., Tait, A., 1990. The identification of *Trypanosoma brucei* subspecies using repetitive DNA sequences. *Mol Biochem Parasitol* 39, 213-225.
- Hoare, C.A., 1972. *The trypanosomes of mammals. A zoological monograph.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, 749p.
- Holland, W.G., Claes, F., My, L.N., Thanh, N.G., Tam, P.T., Verloo, D., Buscher, P., Goddeeris, B., Vercruyse, J., 2001. A comparative evaluation of parasitological tests and a

PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Vet Parasitol* 97, 23-33.

Ilboudo, H., Jamonneau, V., Camara, M., Camara, O., Dama, E., Leno, M., Ouendeno, F., Courtin, F., Sakande, H., Sanon, R., Kabore, J., Coulibaly, B., N'Dri, L., Diarra, A., N'Goran, E., Bucheton, B., 2011. Diversity of response to *Trypanosoma brucei gambiense* infections in the Forecariah mangrove focus (Guinea): perspectives for a better control of sleeping sickness. *Microbes Infect*, 10.1016/j.micinf.2011.05.007.

Inojosa, W.O., Augusto, I., Bisoffi, Z., Josenado, T., Abel, P.M., Stich, A., Whitty, C.J., 2006. Diagnosing human African trypanosomiasis in Angola using a card agglutination test: observational study of active and passive case finding strategies. *BMJ* 332, 1479.

Iten, M., Matovu, E., Brun, R., Kaminsky, R., 1995. Innate lack of susceptibility of Ugandan *Trypanosoma brucei rhodesiense* to DL-alpha-difluoromethylornithine (DFMO). *Trop Med Parasitol* 46, 190-194.

Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C.V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M., Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J.M., Stuart, K.D., Barrell, B., Myler, P.J., 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442.

Jackson, A.P., Sanders, M., Berry, A., McQuillan, J., Aslett, M.A., Quail, M.A., Chukualim, B., Capewell, P., MacLeod, A., Melville, S.E., Gibson, W., Barry, J.D., Berriman, M., Hertz-Fowler, C., 2010. The genome sequence of *Trypanosoma brucei gambiense*, causative agent of chronic human african trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e658.

Jamonneau, V., Garcia, A., Frezil, J.L., N'Guessan, P., N'Dri, L., Sanon, R., Laveissiere, C., Truc, P., 2000a. Clinical and biological evolution of human trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol* 94, 831-835.

Jamonneau, V., Truc, P., Garcia, A., Magnus, E., Buscher, P., 2000b. Preliminary evaluation of LATEX/*T. b. gambiense* and alternative versions of CATT/*T. b. gambiense* for the serodiagnosis of human african trypanosomiasis of a population at risk in Côte d'Ivoire: considerations for mass-screening. *Acta Trop* 76, 175-183.

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 characterization of *Trypanosoma brucei*

*gambiense* and clinical evolution of human African trypanosomiasis in Cote d'Ivoire. Trop Med Int Health 7, 610-621.

Jamonneau, V., Barnabe, C., Koffi, M., Sane, B., Cuny, G., Solano, P., 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.

Jamonneau, V., Ravel, S., Garcia, A., Koffi, M., Truc, P., Laveissiere, C., Herder, S., Grebaut, P., Cuny, G., Solano, P., 2004a. 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.

Jamonneau, V., Ravel, S., Koffi, M., Kaba, D., Zeze, D.G., Ndri, 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 Cote d'Ivoire. Parasitology 129, 693-702.

Jamonneau, V., Solano, P., Koffi, M., Denizot, M., Cuny, G., 2004c. Apports et limites du diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine. Med Sci (Paris) 20, 871-875.

Jamonneau, V., Bucheton, B., Kabore, J., Ilboudo, H., Camara, O., Courtin, F., Solano, P., Kaba, D., Kambire, R., Lingue, K., Camara, M., Baelmans, R., Lejon, V., Buscher, P., 2010. Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in west Africa. PLoS Negl Trop Dis 4, e917.

Jamot, E., 1935. Rapport sur la maladie du sommeil en AOF, Document Technique n° 691, OCCGE, Bobo-Dioulasso.

Jannin, J., Moulia-Pelat, J.P., Chanfreau, B., Penchenier, L., Louis, J.P., Nzaba, P., de La Baume, F.E., Eozenou, P., Cattand, P., 1993. African human trypanosomiasis: study of a scoring system of presumptive diagnosis in the Congo. Bull World Health Organ 71, 215-222.

Jenni, L., Marti, S., Schweizer, J., Betschart, B., Lepage, 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.

Kaba, D., Dje, N.N., Courtin, F., Oke, E., Koffi, M., Garcia, A., Jamonneau, V., Solano, P., 2006. The impact of war on the evolution of sleeping sickness in west-central Cote d'Ivoire. Trop Med Int Health 11, 136-143.

Kabayo, J.P., 2002. Aiming to eliminate tsetse from Africa. Trends Parasitol 18, 473-475.

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 4, 658-661.

Kaboré, J., Koffi, M., Bucheton, B., Macleod, A., Duffy, C., Ilboudo, H., Camara, M., De Mees, T., Belem, A.M., Jamonneau, V., 2011a. First evidence that parasite infecting apparent aparasitemic serological suspects in human African trypanosomiasis are

- Trypanosoma brucei gambiense* and are similar to those found in patients. *Infect Genet Evol* 11, 1250-1255.
- Kaboré, J., Macleod, A., Jamonneau, V., Ilboudo, H., Duffy, C., Camara, M., Camara, O., Belem, A.M., Bucheton, B., De Meeus, T., 2011b. Population genetic structure of Guinea *Trypanosoma brucei gambiense* isolates according to host factors. *Infect Genet Evol* 11, 1129-1135.
- Kanmogne, G.D., Asonganyi, T., Gibson, W.C., 1996a. Detection of *Trypanosoma brucei gambiense*, in serologically positive but aparasitaemic sleeping-sickness suspects in Cameroon, by PCR. *Ann Trop Med Parasitol* 90, 475-483.
- Kanmogne, G.D., Stevens, J.R., Asonganyi, T., Gibson, W.C., 1996b. Genetic heterogeneity in the *Trypanosoma brucei gambiense* genome analysed by random amplification of polymorphic DNA. *Parasitol Res* 82, 535-541.
- Kanmogne, G.D., Stevens, J.R., Asonganyi, T., Gibson, W.C., 1996c. Characterization of *Trypanosoma brucei gambiense* isolates using restriction fragment length polymorphisms in 5 variant surface glycoprotein genes. *Acta Trop* 61, 239-254.
- Keeling, P., Leander, B.S., Simpson, A., 2009. Eukaryotes. Eukaryota, Organisms with nucleated cells. Version 28 October 2009. <http://tolweb.org/Eukaryotes/3/2009.10.28> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.
- Kieft, R., Capewell, P., Turner, C.M., Veitch, N.J., MacLeod, A., Hajduk, S., 2010. Mechanism of *Trypanosoma brucei gambiense* (group 1) resistance to human trypanosome lytic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16137-16141.
- Kjeldsberg, C.R., Knight, J.A., 1993. Body fluids : laboratory examination of amniotic, cerebrospinal, seminal, serous & synovial fluids. 436p, 3 ed.
- Koffi, M., Solano, P., Denizot, M., Courtin, D., Garcia, A., Lejon, V., Buscher, P., Cuny, G., Jamonneau, V., 2006. Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: a potential human reservoir of parasites? *Acta Trop* 98, 183-188.
- Koffi, M., Solano, P., Barnabe, C., de Meeus, T., Bucheton, B., Cuny, G., Jamonneau, V., 2007. Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei s.l.* using microsatellite typing: new perspectives for the molecular epidemiology of human African trypanosomiasis. *Infect Genet Evol* 7, 675-684.
- Koffi, M., De Meeus, T., Bucheton, B., Solano, P., Camara, M., Kaba, D., Cuny, G., Ayala, F.J., Jamonneau, V., 2009. Population genetics of *Trypanosoma brucei gambiense*, the agent of sleeping sickness in Western Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 209-214.
- Kohl, L., Bastin, P., 2005. The flagellum of trypanosomes. *Int Rev Cytol* 244, 227-285.
- Krafsur, E.S., Marquez, J.G., Ouma, J.O., 2008. Structure of some East African *Glossina fuscipes fuscipes* populations. *Med Vet Entomol* 22, 222-227.

- Krafsur, E.S., 2009. Tsetse flies: Genetics, evolution, and role as vectors. *Infect Genet Evol* 9, 124-141.
- Kristensson, K., Nygard, M., Bertini, G., Bentivoglio, M., 2010. African trypanosome infections of the nervous system: parasite entry and effects on sleep and synaptic functions. *Prog Neurobiol* 91, 152-171.
- 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. *Bull World Health Organ* 78, 119-124.
- Lanham, S.M., Godfrey, D.G., 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp Parasitol* 28, 521-534.
- Lauria-Pires, L., Teixeira, A.R.L., 1997. Superinfections with genetically characterized *Trypanosoma cruzi* clones did not aggravate morbidity and mortality in BALB/c mice. *J Parasitol* 83, 819-824.
- Laveissiere, C., Meda, H., 1993. Mobile teams or health agents: which strategy against sleeping sickness? *Ann Soc Belg Med Trop* 73, 1-6.
- Laveissière, C., Grébaut, P., Herder, S., Penchenier, L., 2000. Les Glossines Vectrices de la Trypanosomiase Humaine Africaine. OCEAC-IRD, Yaoundé. 246p.
- Lecordier, L., Vanhollebeke, B., Poelvoorde, P., Tebabi, P., Paturiaux-Hanocq, F., Andris, F., Lins, L., Pays, E., 2009. C-terminal mutants of apolipoprotein L-I efficiently kill both *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Pathog* 5, e1000685.
- Lehmann, T., Hawley, W.A., Kamau, L., Fontenille, D., Simard, F., Collins, F.H., 1996. Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and west Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity* 77 (Pt 2), 192-200.
- Lejon, V., Rosengren, L.E., Buscher, P., Karlsson, J.E., Sema, H.N., 1999. Detection of light subunit neurofilament and glial fibrillary acidic protein in cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense*-infected patients. *Am J Trop Med Hyg* 60, 94-98.
- Lejon, V., Lardon, J., Kenis, G., Pinoges, L., Legros, D., Bisser, S., N'Siesi, X., Bosmans, E., Buscher, P., 2002. Interleukin (IL)-6, IL-8 and IL-10 in serum and CSF of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness patients before and after treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96, 329-333.
- 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. *Trop Med Int Health* 11, 620-627.
- Lejon, V., Robays, J., N'Siesi, F.X., Mumba, D., Hoogstoel, A., Bisser, S., Reiber, H., Boelaert, M., Buscher, P., 2007. Treatment failure related to intrathecal immunoglobulin M (IgM) synthesis, cerebrospinal fluid IgM, and interleukin-10 in patients with hemolymphatic-stage sleeping sickness. *Clin Vaccine Immunol* 14, 732-737.

- Louis, F.J., Buscher, P., Lejon, V., 2001. Diagnosis of human African trypanosomiasis in 2001. *Med Trop (Mars)* 61, 340-346.
- Louis, F.J., Simarro, P.P., Lucas, P., 2002. Sleeping sickness: one hundred years of control strategy evolution. *Bull Soc Pathol Exot* 95, 331-336.
- Louis, F.J., Simarro, P.P., 2005. Rough start for the fight against sleeping sickness in French equatorial Africa. *Med Trop (Mars)* 65, 251-257.
- Lumsden, W.H., Kimber, C.D., Strange, M., 1977. *Trypanosoma brucei*: detection of low parasitaemias in mice by a miniature anion-exchanger/centrifugation technique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 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. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73, 312-317.
- 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. *Infect Immun* 72, 7040-7044.
- MacLean, L., Odiit, M., MacLeod, A., Morrison, L., Sweeney, L., Cooper, A., Kennedy, P.G.E., Sternberg, J.M., 2007. Spatially and genetically distinct African trypanosome virulence variants defined by host interferon- $\gamma$  response. *J Infect Dis* 196, 1620-1628.
- MacLeod, A., Turner, C.M., Tait, A., 1999. A high level of mixed *Trypanosoma brucei* infections in tsetse flies detected by three hypervariable minisatellites. *Mol Biochem Parasitol* 102, 237-248.
- MacLeod, A., Tweedie, A., Welburn, S.C., Maudlin, I., Turner, C.M., Tait, A., 2000. Minisatellite marker analysis of *Trypanosoma brucei*: reconciliation of clonal, panmictic, and epidemic population genetic structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13442-13447.
- MacLeod, A., Tweedie, A., McLellan, S., Hope, M., Taylor, S., Cooper, A., Sweeney, L., Turner, C.M., Tait, A., 2005a. Allelic segregation and independent assortment in *T. brucei* crosses: proof that the genetic system is Mendelian and involves meiosis. *Mol Biochem Parasitol* 143, 12-19.
- MacLeod, A., Tweedie, A., McLellan, S., Taylor, S., Hall, N., Berriman, M., El-Sayed, N.M., Hope, M., Turner, C.M., Tait, A., 2005b. The genetic map and comparative analysis with the physical map of *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 33, 6688-6693.
- Magez, S., Caljon, G., Tran, T., Stijlemans, B., Radwanska, M., 2010. Current status of vaccination against African trypanosomiasis. *Parasitology* 137, 2017-2027.
- 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. *Ann Soc Belg Med Trop* 58, 169-176.

- Mantilla, J.C., Zafra, G.A., Macedo, A.M., González, C.I., 2010. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. *Hum. Pathol.* 41, 610-613.
- Masiga, D.K., Tait, A., Turner, C.M., 2000. Amplified restriction fragment length polymorphism in parasite genetics. *Parasitol Today* 16, 350-353.
- Masumu, J., Geysen, D., Van den Bossche, P., 2009. Endemic type of animal trypanosomiasis is not associated with lower genotype variability of *Trypanosoma congolense* isolates circulating in livestock. *Res Vet Sci* 87, 265-269.
- Mathieu-Daude, F., Tibayrenc, M., 1994. Isozyme variability of *Trypanosoma brucei* s.l.: genetic, taxonomic, and epidemiological significance. *Exp Parasitol* 78, 1-19.
- 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. *Trop Med Parasitol* 33, 113-118.
- Melville, S.E., Gerrard, C.S., Blackwell, J.M., 1999. Multiple causes of size variation in the diploid megabase chromosomes of African trypanosomes. *Chromosome Res* 7, 191-203.
- Miezan, T.W., Meda, H.A., Doua, F., Dje, N.N., Lejon, V., Buscher, P., 2000. Single centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 293.
- Morrison, L.J., McCormack, G., Sweeney, L., Likeufack, A.C., Truc, P., Turner, C.M., Tait, A., MacLeod, A., 2007. Use of multiple displacement amplification to increase the detection and genotyping of *trypanosoma* species samples immobilized on FTA filters. *Am J Trop Med Hyg* 76, 1132-1137.
- Morrison, L.J., Tait, A., McCormack, G., Sweeney, L., Black, A., Truc, P., Likeufack, A.C., Turner, C.M., MacLeod, A., 2008. *Trypanosoma brucei gambiense* Type 1 populations from human patients are clonal and display geographical genetic differentiation. *Infect Genet Evol* 8, 847-854.
- 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 Pt 1, 57-66.
- Motyka, S.A., Drew, M.E., Yildirim, G., Englund, P.T., 2006. Overexpression of a cytochrome b5 reductase-like protein causes kinetoplast DNA loss in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 281, 18499-18506.
- Mugasa, C.M., Laurent, T., Schoone, G.J., Kager, P.A., Lubega, G.W., Schallig, H.D., 2009. Nucleic acid sequence-based amplification with oligochromatography for detection of *Trypanosoma brucei* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 47, 630-635.
- Ndo, C., Antonio-Nkondjio, C., Cohuet, A., Ayala, D., Kengne, P., Morlais, I., Awono-Ambene, P.H., Couret, D., Ngassam, P., Fontenille, D., Simard, F., 2010. Population genetic structure of the malaria vector *Anopheles nili* in sub-Saharan Africa. *Malar J* 9, 161.

- Nei, M., Chesser, R.K., 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann Hum Genet* 47, 253-259.
- Njiru, Z.K., Constantine, C.C., Guya, S., Crowther, J., Kiragu, J.M., Thompson, R.C., Davila, A.M., 2005. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol Res* 95, 186-192.
- Njiru, Z.K., Traub, R., Ouma, J.O., Enyaru, J.C., Matovu, E., 2011. Detection of Group 1 *Trypanosoma brucei gambiense* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J Clin Microbiol* 49, 1530-1536.
- Noireau, F., Gouteux, J.P., Frezil, J.L., 1986. Sensitivity of the card agglutination test (Testryp CAAT) in porcine infection with *Trypanosoma* (Nannomonas) *congolense* in the People' Republic of the Congo. *Ann Soc Belg Med Trop* 66, 63-68.
- Oberle, M., Balmer, O., Brun, R., Roditi, I., 2010. Bottlenecks and the maintenance of minor genotypes during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog* 6, e1001023.
- Odongo, D.O., Oura, C.A., Spooner, P.R., Kiara, H., Mburu, D., Hanotte, O.H., Bishop, R.P., 2006. Linkage disequilibrium between alleles at highly polymorphic mini- and micro-satellite loci of *Theileria parva* isolated from cattle in three regions of Kenya. *Int J Parasitol* 36, 937-946.
- Ogbadoyi, E., Ersfeld, K., Robinson, D., Sherwin, T., Gull, K., 2000. Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma* 108, 501-513.
- Oura, C.A., Odongo, D.O., Lubega, G.W., Spooner, P.R., Tait, A., Bishop, R.P., 2003. A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterisation of field isolates of *Theileria parva*. *Int J Parasitol* 33, 1641-1653.
- Oura, C.A., Asiimwe, B.B., Weir, W., Lubega, G.W., Tait, A., 2005. Population genetic analysis and sub-structuring of *Theileria parva* in Uganda. *Mol Biochem Parasitol* 140, 229-239.
- Pays, E., Vanhollenbeke, B., Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D.P., Perez-Morga, D., 2006. The trypanolytic factor of human serum. *Nat Rev Microbiol* 4, 477-486.
- Pays, E., Vanhollenbeke, B., 2009. Human innate immunity against African trypanosomes. *Curr Opin Immunol* 21, 493-498.
- Penchenier, L., Grebaut, P., Njokou, F., Eboo Eyenga, V., Buscher, P., 2003. Evaluation of LATEX/*T.b.gambiense* for mass screening of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Central Africa. *Acta Trop* 85, 31-37.
- Pepin, J., Mpia, B., 2005. Trypanosomiasis relapse after melarsoprol therapy, Democratic Republic of Congo, 1982-2001. *Emerg Infect Dis* 11, 921-927.
- Poelvoorde, P., Vanhamme, L., Van Den Abbeele, J., Switzer, W.M., Pays, E., 2004. Distribution of apolipoprotein L-I and trypanosome lytic activity among primate sera. *Mol Biochem Parasitol* 134, 155-157.

Pumpaibool, T., Arnathau, C., Durand, P., Kanchanakhan, N., Siripoon, N., Suegorn, A., Sitthi-Amorn, C., Renaud, F., Harnyuttanakorn, P., 2009. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in Thailand, a low transmission country. *Malar J* 8, 155.

R-Development-core-team, 2010. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>, ISBN 3-900051-07-0.

Radwanska, M., Chamekh, M., Vanhamme, L., Claes, F., Magez, S., Magnus, E., de Baetselier, P., Buscher, P., Pays, E., 2002a. The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Am J Trop Med Hyg* 67, 684-690.

Radwanska, M., Claes, F., Magez, S., Magnus, E., Perez-Morga, D., Pays, E., Buscher, P., 2002b. Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am J Trop Med Hyg* 67, 289-295.

Radwanska, M., 2010. Emerging trends in the diagnosis of human African Trypanosomiasis. *Parasitology* 137, 1977-1986.

Rayaisse, J.B., Courun, F., Akoundjin, M., César, J., Solano, P., 2009. Influence of anthropisation on local vegetation and tsetse abundance in Southern Burkina Faso. *Parasite* 16, 21-28.

Rayaisse, J.B., Tirados, I., Kaba, D., Dewhirst, S.Y., Logan, J.G., Diarrassouba, A., Salou, E., Omolo, M.O., Solano, P., Lehane, M.J., Pickett, J.A., Vale, G.A., Torr, S.J., Esterhuizen, J., 2010. Prospects for the development of odour baits to control the tsetse flies *Glossina tachinoides* and *G. palpalis* s.l. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e632.

Raymond, M., Rousset, F., 1995. Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered* 86, 248-249.

Razakandrainibe, F.G., Durand, P., Koella, J.C., De Meeûs, T., Rousset, F., Ayala, F.J., Renaud, F., 2005. "Clonal" population structure of the malaria agent *Plasmodium falciparum* in high-infection regions. *P Natl Acad Sci U S A* 102, 17388-17393.

Robertson, A., Hill, W.G., 1984. Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* 107, 713-718.

Rossi, G., Bazzo, D., Lauffer, M., Moreau, N., Fontana, A., Sow, M., Diallo, I., 2000. Atlas Infogéographique de la Guinée Maritime, projet observatoire de la mangrove, Ministère de l'agriculture et de l'élevage, Ministère de la pêche et de l'aquaculture. 179p.

Rougeron, V., De Meeûs, T., Hide, M., Waleckx, E., Bermudez, H., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Dujardin, J.C., De Doncker, S., Le Ray, D., Ayala, F.J., Bañuls, A.L., 2009. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *P Natl Acad Sci U S A* 106, 10224-10229.

Rousset, F., 2004. Genetic Structure and Selection in Subdivided Populations. Princeton University Press, Princeton.

- Sanderson, L., Dogruel, M., Rodgers, J., De Koning, H.P., Thomas, S.A., 2009. Pentamidine movement across the murine blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers: effect of trypanosome infection, combination therapy, P-glycoprotein, and multidrug resistance-associated protein. *J Pharmacol Exp Ther* 329, 967-977.
- Schwede, A., Carrington, M., 2010. Bloodstream form Trypanosome plasma membrane proteins: antigenic variation and invariant antigens. *Parasitology* 137, 2029-2039.
- Schwenkenbecher, J.M., Frohlich, C., Gehre, F., Schnur, L.F., Schonian, G., 2004. Evolution and conservation of microsatellite markers for *Leishmania tropica*. *Infect Genet Evol* 4, 99-105.
- Schwenkenbecher, J.M., Wirth, T., Schnur, L.F., Jaffe, C.L., Schallig, H., Al-Jawabreh, A., Hamarsheh, O., Azmi, K., Pralong, F., Schonian, G., 2006. Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *Int J Parasitol* 36, 237-246.
- Simarro, P.P., Ruiz, J.A., Franco, J.R., Josenando, T., 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.
- Simarro, P.P., Jannin, J., Cattand, P., 2008. Eliminating human African trypanosomiasis: Where do we stand and what comes next? *Plos Med* 5, 174-180.
- Simarro, P.P., Cecchi, G., Paone, M., Franco, J.R., Diarra, A., Ruiz, J.A., Fevre, E.M., Courtin, F., Mattioli, R.C., Jannin, J.G., 2010. The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *Int J Health Geogr* 9, 57.
- Simarro, P.P., Diarra, A., Ruiz Postigo, J.A., Franco, J.R., Jannin, J.G., 2011. The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1007.
- Simo, G., Grebaut, P., Herder, S., Nkinin, S.W., Penchenier, L., 1999. Interêt de la PCR dans le diagnostic de la Trypanosomiase Humaine Africaine. *Bull Liais Doc OCEAC* 32, 17-21.
- 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. *Exp Parasitol* 110, 353-362.
- Simo, G., Cuny, G., Demonchy, R., Herder, S., 2008. *Trypanosoma brucei gambiense*: study of population genetic structure of Central African stocks using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Exp Parasitol* 118, 172-180.
- Simo, G., Njiokou, F., Tume, C., Lueong, S., De Meeûs, T., Cuny, G., Asonganyi, T., 2010. Population genetic structure of Central African *Trypanosoma brucei gambiense* isolates using microsatellite DNA markers. *Infect Genet Evol* 10, 68-76.
- Simo, G., Njitchouang, G.R., Njiokou, F., Cuny, G., Asonganyi, T., 2011. *Trypanosoma brucei* s.l.: Microsatellite markers revealed high level of multiple genotypes in the mid-guts of wild tsetse flies of the Fontem sleeping sickness focus of Cameroon. *Exp Parasitol* 128, 272-278.

- Simpson, L., Sbicego, S., Aphasizhev, R., 2003. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business. *RNA* 9, 265-276.
- Sloof, P., Menke, H.H., Caspers, M.P., Borst, P., 1983. Size fractionation of *Trypanosoma brucei* DNA: localization of the 177-bp repeat satellite DNA and a variant surface glycoprotein gene in a mini-chromosomal DNA fraction. *Nucleic Acids Res* 11, 3889-3901.
- Smith, D.H., Bailey, J.W., 1997. Human African trypanosomiasis in south-eastern Uganda: clinical diversity and isoenzyme profiles. *Ann Trop Med Parasitol* 91, 851-856.
- Sokolova, A.Y., Wyllie, S., Patterson, S., Oza, S.L., Read, K.D., Fairlamb, A.H., 2010. Cross-resistance to nitro drugs and implications for treatment of human African trypanosomiasis. *Antimicrob Agents Ch* 54, 2893-2900.
- Solano, P., De La Rocque, S., De Meeûs, T., Cuny, G., Duvallet, G., Cuisance, D., 2000. Microsatellite DNA markers reveal genetic differentiation among populations of *Glossina palpalis gambiensis* collected in the agro-pastoral zone of Sideradougou, Burkina Faso. *Insect Mol Biol* 9, 433-439.
- Solano, P., Jamonneau, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., Dje, N.N., Miezán, T.W., Lejon, V., Buscher, P., Garcia, A., 2002. Comparison of different DNA preparation protocols for PCR diagnosis of Human African Trypanosomiasis in Cote d'Ivoire. *Acta Trop* 82, 349-356.
- Solano, P., Kone, A., Garcia, A., Sane, B., Michel, V., Michel, J.F., Coulibaly, B., Jamonneau, V., Kaba, D., Dupont, S., Fournet, F., 2003. Role of patient travel in transmission of human African trypanosomiasis in a highly endemic area of the Ivory Coast. *Med Trop (Mars)* 63, 577-582.
- Solano, P., Ravel, S., Bouyer, J., Camara, M., Kagbadouno, M.S., Dyer, N., Gardes, L., Herault, D., Donnelly, M.J., De Meeûs, T., 2009. The population structure of *Glossina palpalis gambiensis* from island and continental locations in coastal Guinea. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e392.
- Stanghellini, A., Josenando, T., 2001. The situation of sleeping sickness in Angola: a calamity. *Trop Med Int Health* 6, 330-334.
- Sternberg, J.M., 2004. Human African trypanosomiasis: clinical presentation and immune response. *Parasite Immunol* 26, 469-476.
- Sternberg, J.M., MacLean, L., 2010. A spectrum of disease in Human African trypanosomiasis: the host and parasite genetics of virulence. *Parasitology*, 1-6.
- Stevens, J.R., Godfrey, D.G., 1992. Numerical taxonomy of *Trypanozoon* based on polymorphisms in a reduced range of enzymes. *Parasitology* 104 Pt 1, 75-86.
- Stevens, J.R., Tibayrenc, M., 1996. *Trypanosoma brucei s.l.*: evolution, linkage and the clonality debate. *Parasitology* 112 (Pt 5), 481-488.
- Steverding, D., 2008. The history of African trypanosomiasis. *Parasit Vectors* 1, 1-8.

- Stuart, K.D., Schnauffer, A., Ernst, N.L., Panigrahi, A.K., 2005. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci* 30, 97-105.
- Tait, A., Barry, J.D., Wink, R., Sanderson, A., Crowe, J.S., 1985. Enzyme variation in *T. brucei* ssp. II. Evidence for *T. b. rhodesiense* being a set of variants of *T. b. brucei*. *Parasitology* 90 (Pt 1), 89-100.
- Takezaki, N., Nei, M., 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144, 389-399.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Teriokhin, A.T., De Meeûs, T., Guegan, J.F., 2007. On the power of some binomial modifications of the Bonferroni multiple test. *Zh Obshch Biol* 68, 332-340.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1335-1339.
- Tibayrenc, M., 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 28, 85-104.
- Tiberti, N., Hainard, A., Lejon, V., Robin, X., Ngoyi, D.M., Turck, N., Matovu, E., Enyaru, J., Ndung'u, J.M., Scherl, A., Dayon, L., Sanchez, J.C., 2010. Discovery and Verification of Osteopontin and Beta-2-microglobulin as Promising Markers for Staging Human African Trypanosomiasis. *Mol Cell Proteomics* 9, 2783-2795.
- Tilley, A., Hide, G., 2001. Characterization of *Trypanosoma brucei* stocks using PCR-RFLP analysis of ribosomal internal transcribed spacers (IRT). *Ann Trop Med Parasitol* 95, 617-621.
- Tilley, A., Welburn, S.C., Fevre, E.M., Feil, E.J., Hide, G., 2003. *Trypanosoma brucei*: trypanosome strain typing using PCR analysis of mobile genetic elements (MGE-PCR). *Exp Parasitol* 104, 26-32.
- Truc, P., Bailey, J.W., Doua, F., Laveissiere, 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. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88, 419-421.
- Truc, P., Formenty, P., Diallo, P.B., Komoin-Oka, C., Lauginie, F., 1997. Confirmation of two distinct classes of zymodemes of *Trypanosoma brucei* infecting man and wild mammals in Cote d'Ivoire: suspected difference in pathogenicity. *Ann Trop Med Parasitol* 91, 951-956.
- 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 Cote d'Ivoire. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96, 52-55.

Tshimungu, K., Okenge, L.N., Mukeba, J.N., de Mol, P., 2010. Re-emergence of human African trypanosomiasis in Kinshasa, Democratic Republic of Congo (DRC). *Med Mal Infect* 40, 462-467.

Valadares, H.M., Pimenta, J.R., de Freitas, J.M., Duffy, T., Bartholomeu, D.C., Oliveira, R.d.P., Chiari, E., Moreira, M.C., Filho, G.B., Schijman, A.G., Franco, G.R., Machado, C.R., Pena, S.D., Macedo, A.M., 2008. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int J Parasitol* 38, 839–850.

Van Meirvenne, N., Magnus, E., Buscher, P., 1995. Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop* 60, 189-199.

Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Poelvoorde, P., Nolan, D.P., Lins, L., Van Den Abbeele, J., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H., Jacquet, A., Moguilevsky, N., Dieu, M., Kane, J.P., De Baetselier, P., Brasseur, R., Pays, E., 2003. Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* 422, 83-87.

Vanhecke, C., Guevart, E., Ezzedine, K., Receveur, M.C., Jamonneau, V., Bucheton, B., Camara, M., Vincendeau, P., Malvy, D., 2010. Human African trypanosomiasis in mangrove epidemiologic area. Presentation, diagnosis and treatment in Guinea, 2005-2007. *Pathol Biol (Paris)* 58, 110-116.

Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.

Whitlock, M.C., 2005. Combining probability from independent tests: the weighted Z-method is superior to Fisher's approach. *J Evol Biol* 18, 1368-1373.

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

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

WHO, 2002. Rapport OMS 2002, Geneva.

WHO, 2010. African trypanosomiasis (sleeping sickness), WHO Media centre, Fact sheet N°259, World Health Organization, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>.

Wickstead, B., Ersfeld, K., Gull, K., 2003a. The frequency of gene targeting in *Trypanosoma brucei* is independent of target site copy number. *Nucleic Acids Res* 31, 3993-4000.

Wickstead, B., Ersfeld, K., Gull, K., 2003b. Repetitive elements in genomes of parasitic protozoa. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 360-375.

Wickstead, B., Ersfeld, K., Gull, K., 2004. The small chromosomes of *Trypanosoma brucei* involved in antigenic variation are constructed around repetitive palindromes. *Genome Res* 14, 1014-1024.

Woo, P.T., 1970. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop* 27, 384-386.

Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugenics* 15, 323-354.

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

Xong, H.V., 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.

Yun, O., Priotto, G., Tong, J., Flevaud, L., Chappuis, F., 2010. NECT is next: implementing the new drug combination therapy for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e720.

# ANNEXES

## Annexe I : Illustration du déroulement d'une prospection médicale



**Figure 1: Recensement/Enregistrement**

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



**Figure 2: Prélèvement digital**

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



**Figure 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



**Figure 4: CATT/sang**



**Figure 5:** Parasitologie

Prélèvement du sang total au pli du coude dans un tube hépariné de chaque sujet séropositif pour effectuer la mini-colonne (mAECT)



**Figure 6:** Parasitologie

Ponction des ganglions cervicaux pour la recherche des trypanosomes dans le suc ganglionnaire étalé à l'état frais entre lame et lamelle



**Figure 7:** Parasitologie

Ponction lombaire effectuée au moment de la prospection médicale pour déterminer la phase de la maladie



**Figure 8:** Parasitologie

Recherche de trypanosomes dans les fluides biologiques par microscopie et en mini-colonne



**Figure 9:** Convocation pour le traitement  
Les sujets positifs en parasitologie sont 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



**Figure 10:** Equipe Trypano IRD/CIRDES et PNLTHA de Gulnée au centre de traitement

**Annexe II : Souches de référence utilisées pour la caractérisation avec les loci microsatellites (activité de recherche 1)**

CI, Côte d'Ivoire; Tbg1, *Trypanosoma brucei gambiense* group 1; Tbg2, *Trypanosoma brucei gambiense* group 2; Tbb, *Trypanosoma brucei brucei*; Tbrh, *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

Souches	Forme	Hôte	Origine	Année	Espèces	Réf.
Jua	Procyclique	Homme	Cameroun	1979	Tbg1	1
Peya	Procyclique	Homme	Congo	1980	Tbg1	1
A005	Procyclique	Homme	Cameroun	1988	Tbg1	1
Dal972	Procyclique	Homme	Côte d'Ivoire	1986	Tbg1	1
OK	Sanguine	Homme	Congo	1974	Tbg1	1
2561	Procyclique	Homme	Côte d'Ivoire	1997	Tbg1	2
D12K	Sanguine	Mouton	Congo	1980	Tbg1	3
Ligo	Sanguine	Homme	Côte d'Ivoire	1984	Tbg2	5
Abba	Sanguine	Homme	Côte d'Ivoire	1983	Tbg2	5
TH2	Procyclique	Homme	Côte d'Ivoire	1978	Tbg2	6
Eatro 1125	Procyclique	Bushbuck	Ouganda	1966	Tbb	5
Stib 215	Procyclique	Lion	Tanzanie	1971	Tbb	7
TRPZ166	Procyclique	Zébu	Zambie	1982	Tbrh	4
LVH143	Sanguine	Homme	Kenya	1982	Tbrh	4
B4/F303 KIVI ms	Procyclique	Homme	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	8
B4/F303 RI ms	Sanguine	Homme	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	8
B4/G27 KIVI ms	Procyclique	Homme	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	8
B4/G27 RI ms	Sanguine	Homme	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	8
B4/I314 KIVI ms	Procyclique	Homme	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	8
B4/U163 KIVI ms	Procyclique	Homme	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	8
B4/I315 RI ms	Sanguine	Homme	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	8
B4/F303 BS ms	Sanguine	Homme	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	8
B4/G27 BS ms	Sanguine	Homme	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	8
B4/I314 BS ms	Sanguine	Homme	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	8
B4/I315 BS ms	Sanguine	Homme	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	8
B4/E427 BS ms	Sanguine	Homme	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	8
B4/G13 BS ms	Sanguine	Homme	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	8

### Annexe III : Génotypes microsatellites en Côte d'Ivoire et souches de référence utilisés dans l'étude (activité de recherche 1)

KIVI = isolated Kit of In Vitro Isolation of trypanosomes (Kit d'isolement des trypanosomes)

RI = isolated by rodent inoculation (isolé sur rongeurs)

BS = blood sample (échantillon de sang)

Ms = medical survey (Prospection médicale)

réf.souche = souche de référence

Les résultats sont donnés comme suit: XXX/YYYY où XXX est la taille (paire de base) du petit allèle et YYY est la taille du grand allèle

000 = échec d'amplification

Souches	Identité	Micbg1	Micbg5	Micbg6	Misatg4	Misatg9	M6C8	MT3033
<u>Jua</u>	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/226	182/266	115/145	128/190	085/157	154/170
<u>Peya</u>	réf.souche (Tbg1)	162/194	172/226	182/266	115/143	128/184	083/157	154/190
<u>A005</u>	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/190	182/266	115/145	128/190	085/157	154/170
<u>Dal 972</u>	réf.souche (Tbg1)	164/200	170/226	182/266	115/149	128/190	085/149	154/178
<u>OK</u>	réf.souche (Tbg1)	160/192	170/226	182/266	115/143	120/120	085/157	154/190
<u>2561</u>	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/226	182/266	115/149	128/184	085/165	154/194
<u>D12K</u>	réf.souche (Tbg1)	160/192	170/226	182/266	115/145	128/190	085/155	154/190
<u>Ligo</u>	réf.souche (Tbg2)	136/168	166/182	180/180	101/139	152/166	105/151	142/170
<u>Abba</u>	réf.souche (Tbg2)	136/168	166/182	180/180	101/147	152/166	105/137	142/170
<u>TH 2</u>	réf.souche (Tbg2)	190/232	166/190	174/250	109/169	132/156	135/155	126/166
<u>Eatro 1125</u>	réf. souche (Tbb)	136/178	166/192	178/178	125/165	120/184	185/185	122/166
<u>Stib 215</u>	réf. souche (Tbb)	220/310	178/230	162/194	087/111	116/170	103/145	110/146
<u>TRPZ 166</u>	réf.souche (Tbrh)	136/218	176/238	178/178	139/159	116/156	121/137	126/166
<u>LVH143</u>	réf.souche (Tbrh)	152/178	166/166	180/234	129/165	118/154	195/275	110/160
B4/F303 KIVI ms	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/226	182/266	121/143	130/184	085/157	154/178
B4/F303 RI ms	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/226	182/266	115/145	130/184	085/165	154/178
B4/G27 KIVI ms	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/226	182/266	115/143	128/184	085/165	154/190
B4/G27 RI ms	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/226	182/266	115/145	128/184	085/175	154/178
B4/I314 KIVI ms	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/226	182/266	115/145	128/194	085/165	154/178
B4/U163 KIVI ms	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/226	182/266	121/145	128/184	085/157	154/178
B4/I315 RI ms	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/226	182/266	115/145	128/184	085/157	154/178
B4/F303 BS ms	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/226	182/266	115/145	130/184	085/165	154/178
B4/G27 BS ms	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/226	182/266	115/143	128/184	085/165	154/190
B4/I314 BS ms	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/226	182/266	115/145	128/184	085/165	154/178
B4/I315 BS ms	réf.souche (Tbg1)	164/200	170/226	182/266	115/145	128/184	085/165	154/190
B4/E427 BS ms	réf.souche (Tbg1)	162/194	176/210	182/266	115/145	122/256	097/195	126/170
B4/G13 BS ms	réf.souche (Tbg1)	162/194	170/226	182/266	101/143	128/184	085/175	154/190
<b>BL52 BS ms</b>	SERO	162/194	170/226	182/266	115/145	128/190	085/157	154/178
<b>B4/U1 BS ms</b>	SERO	164/200	170/226	182/266	115/143	128/184	085/175	154/190
<b>B4/U184 BS ms</b>	SERO	164/200	168/226	182/266	000/000	000/000	157/195	146/166
<b>B4/G128 BS ms</b>	SERO	164/200	170/226	182/266	000/000	128/184	085/165	154/190
<b>BL17 BS ms</b>	SERO	164/200	170/226	182/266	000/000	000/000	085/175	154/190

<b>B4/H272 BS ms</b>	SERO	162/194	170/226	182/266	000/000	000/000	000/000	154/178
<b>BL11 BS ms</b>	SERO	164/200	000/000	182/266	000/000	000/000	000/000	154/178
<b>B4/J520 BS ms</b>	SERO	162/194	170/226	000/000	000/000	000/000	075/083	154/178
<b>BL47 BS ms</b>	SERO	162/194	000/000	182/266	000/000	000/000	085/181	000/000
<b>BL18 BS ms</b>	SERO	000/000	000/000	000/000	000/000	000/000	000/000	126/170
<b>B4/E337 BS ms</b>	SERO	000/000	000/000	000/000	000/000	000/000	000/000	154/190
<b>B4/U27 BS ms</b>	SERO	000/000	000/000	000/000	000/000	000/000	000/000	154/178
<b>B4/D515 BS ms</b>	SERO	164/200	000/000	000/000	000/000	000/000	000/000	000/000
<b>B4/F100 BS ms</b>	SERO	162/194	000/000	000/000	000/000	000/000	000/000	000/000

#### Annexe IV : Profils microsatellites des isolats de THA (T+) et des SERO de Guinée (activité de recherche 1)

Les résultats sont donnés comme suit : XXX/YYY où XXX est la taille (paire de base) du petit allèle et YYY est la taille du grand allèle  
000 = échec d'amplification

Souches	Identité	CH5/JS2	CH1/18	M6C8	MISATG4	MICBG6	MICBG5
<b>Du103</b>	SERO	000/000	163/169	000/000	000/000	000/000	000/000
<b>Du126</b>	SERO	000/000	000/000	079/151	000/000	173/181	000/000
<b>Du127</b>	SERO	000/000	000/000	000/000	112/132	000/000	000/000
<b>Du138</b>	SERO	129/210	163/169	079/153	000/000	000/000	154/166
<b>Du146</b>	SERO	129/208	163/169	079/151	112/132	173/181	154/166
Du108	THA	129/212	163/169	079/151	112/132	173/179	148/154
Du2	THA	129/226	163/169	079/153	112/132	173/181	154/166
Du30	THA	129/208	163/169	079/151	112/132	173/181	154/166
Du31	THA	129/210	163/169	079/153	112/132	173/179	154/166
Du54	THA	129/208	163/169	079/151	112/132	173/181	154/166
Du78	THA	129/208	163/169	079/153	112/132	173/181	154/166
Du85	THA	129/214	163/169	079/153	112/132	173/181	154/166
Du105	THA	129/228	163/169	079/163	114/132	173/179	154/168
Du1	THA	129/214	163/169	079/153	112/132	173/181	154/166
Du7	THA	129/208	163/169	079/151	112/132	173/181	154/166
Du9	THA	129/208	163/169	079/151	112/132	173/181	154/166
Du50	THA	129/208	163/169	079/153	112/132	173/181	154/166
Du69	THA	129/208	163/169	079/151	112/132	173/181	154/166
Du70	THA	129/208	163/169	079/153	112/132	173/179	154/166
Du73	THA	129/208	163/169	079/161	112/130	173/179	154/164
Du95	THA	129/214	163/169	079/159	112/134	173/179	154/164
Du96	THA	129/226	163/169	079/174	114/134	173/179	154/164
Du106	THA	129/208	163/169	079/153	112/132	173/179	154/166
Du113	THA	129/214	163/169	079/153	112/132	173/181	154/166
Du125	THA	129/208	163/169	079/153	112/132	173/181	154/166
Du141	THA	129/208	163/169	079/159	112/130	173/179	154/164

**Annexe V : Résultats bruts du géotypage des souches de *T. b. gambiense* en Guinée (activité de recherche 2)**

D1 : Date 1 ; D2 : Date 2 ; S1 : statut 1 (trypanosomé en phase précoce) ; S2 : statut 2 (trypanosomé en phase intermédiaire) ; S3 : statut 3 (trypanosomé en phase avancée)

N° terrain	Foyer	Date	Statut	Nature	CH5/JS2	CH1/18	M6C8	MISATG4	MICBG6	MICBG5						
Bo10-6	Boffa	D1	S1	sang	129	226	163	169	079	161	114	132	173	179	154	168
Bo10-6	Boffa	D1	S1	suc	129	228	163	169	079	161	114	132	173	179	154	168
Bo1-6	Boffa	D1	S2	suc	000	354	163	000	000	000	000	130	173	179	000	166
Bo2-6	Boffa	D1	S1	LCR	000	000	000	000	000	000	000	000	173	000	000	000
Bo2-6	Boffa	D1	S1	suc	129	230	163	169	079	147	114	132	173	179	154	166
Bo3-6	Boffa	D1	S3	sang	129	228	163	169	079	143	114	132	173	179	154	166
Bo3-6	Boffa	D1	S3	suc	129	228	163	169	079	143	114	132	173	179	154	166
Bo4-6	Boffa	D1	S1	sang	129	302	163	169	079	165	114	130	173	179	154	166
Bo4-6	Boffa	D1	S1	suc	129	302	163	169	079	165	114	130	173	179	154	166
Bo5-6	Boffa	D1	S2	LCR	000	000	000	000	079	000	000	000	000	000	000	000
Bo5-6	Boffa	D1	S2	sang	129	306	163	169	079	163	114	132	173	179	154	166
Bo5-6	Boffa	D1	S2	suc	129	306	163	169	079	163	114	132	173	179	154	166
Bo6-6	Boffa	D1	S3	sang	129	000	163	169	079	163	114	130	173	179	154	166
Bo6-6	Boffa	D1	S3	suc	129	296	163	169	079	163	114	130	173	179	154	166
Bo7-6	Boffa	D1	S3	sang	129	226	163	169	079	174	114	134	173	179	154	164
Bo7-6	Boffa	D1	S3	suc	129	226	163	169	079	174	114	134	173	179	154	164
Bo8-6	Boffa	D1	S1	sang	129	228	163	169	079	163	114	134	173	179	154	168
Bo8-6	Boffa	D1	S1	sang	129	000	163	169	079	163	114	134	173	179	154	168
Bo8-6	Boffa	D1	S1	suc	129	228	163	169	079	163	114	134	173	179	154	168
Bo9-6	Boffa	D1	S2	sang	129	226	163	169	000	000	114	132	173	179	000	000
Bo9-6	Boffa	D1	S2	suc	129	226	163	169	079	161	114	132	173	179	154	168
Bo77-6	Boffa	D2	S3	suc	000	238	163	169	079	000	000	134	000	179	000	000
Bo110-6	Boffa	D2	S1	sang	000	000	163	169	000	000	000	000	000	000	154	164
Bo110-6	Boffa	D2	S1	suc	129	228	163	169	079	172	114	134	173	179	154	164
Bo230-6	Boffa	D2	S3	LCR	000	000	163	169	079	000	000	000	000	000	154	000
Bo230-6	Boffa	D2	S3	sang	129	204	163	169	079	151	112	132	173	179	154	164
Bo230-6	Boffa	D2	S3	suc	129	204	163	169	079	151	112	132	173	179	154	164
Bo79-2	Boffa	D2	S1	sang	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
Bo89-6	Boffa	D2	S3	sang	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
<b>Bo91-7*</b>	<b>Boffa</b>	<b>D2</b>	<b>S2</b>	<b>sang</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>079</b>	<b>167</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>173</b>	<b>179</b>	<b>154</b>	<b>000</b>
<b>Bo91-7*</b>	<b>Boffa</b>	<b>D2</b>	<b>S2</b>	<b>suc</b>	<b>129</b>	<b>234</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>165</b>	<b>114</b>	<b>132</b>	<b>173</b>	<b>179</b>	<b>154</b>	<b>168</b>
Bo92-1	Boffa	D2	S2	sang	000	000	163	169	079	000	114	000	000	000	000	000
Bo92-1	Boffa	D2	S2	LCR	129	236	163	169	079	163	000	000	000	000	154	000
Bo92-1	Boffa	D2	S2	suc	129	236	163	169	079	163	000	000	173	179	000	000
Du228-6	Boffa	D2	S3	LCR	000	000	000	000	000	000	000	000	173	000	000	000
Du228-6	Boffa	D2	S3	sang	000	232	000	000	000	145	114	000	173	179	154	166
A52	Dubréka	D1	S3	sang	129	208	163	169	079	151	112	132	173	181	154	166
A52	Dubréka	D1	S3	suc	129	208	163	169	079	151	112	132	173	181	154	166
A55	Dubréka	D1	S3	suc	129	210	163	169	079	153	112	132	173	181	000	000
A57	Dubréka	D1	S3	suc	129	208	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du11-6	Dubréka	D1	S3	LCR	000	000	163	000	000	000	000	000	000	000	000	000
Du11-6	Dubréka	D1	S3	sang	131	230	163	169	000	000	114	000	000	000	000	000
Du11-6	Dubréka	D1	S3	suc	131	230	163	169	079	163	114	132	173	179	154	166
Du12-6	Dubréka	D1	S1	sang	129	000	163	169	079	163	114	132	173	000	154	168
Du12-6	Dubréka	D1	S1	suc	129	226	163	169	079	163	114	132	173	179	154	168

Du13-6	Dubréka	D1	S2	sang	129	208	163	169	079	151	112	132	173	181	154	166
Du13-6	Dubréka	D1	S2	suc	129	208	163	169	079	151	112	132	173	181	154	166
Du14-6	Dubréka	D1	S3	sang	129	208	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du14-6	Dubréka	D1	S3	suc	129	208	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du15-6	Dubréka	D1	S2	suc	129	208	163	169	079	167	112	132	173	179	154	166
Du15-6	Dubréka	D1	S2	sang	000	000	163	169	079	000	000	000	173	000	000	000
Du16-6	Dubréka	D1	S2	sang	000	000	163	169	079	151	112	000	173	000	154	166
Du16-6	Dubréka	D1	S2	suc	000	212	163	000	079	151	112	132	173	179	154	166
Du17-6	Dubréka	D1	S1	sang	000	000	163	169	000	000	112	000	000	000	000	000
Du17-6	Dubréka	D1	S1	suc	129	000	163	169	079	167	112	132	173	179	000	000
Du18-6	Dubréka	D1	S3	sang	129	000	163	169	079	000	112	132	173	179	154	166
Du18-6	Dubréka	D1	S3	LCR	129	204	163	000	079	000	112	132	173	179	154	166
Du19-6	Dubréka	D1	S3	sang	129	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
Du19-6	Dubréka	D1	S3	suc	129	214	163	169	079	159	112	136	173	179	154	166
Du20-6	Dubréka	D1	S3	suc	129	208	163	169	079	155	112	132	175	181	154	166
Du21-2	Dubréka	D1	S3	sang	000	000	000	000	079	000	114	130	000	000	000	000
Du21-2	Dubréka	D1	S3	LCR	129	000	000	000	079	159	114	130	000	000	152	166
Du21-6	Dubréka	D1	S3	sang	129	208	163	169	079	159	112	130	173	179	154	166
Du22-6	Dubréka	D1	S3	sang	129	210	163	169	079	000	112	132	173	000	154	000
Du22-6	Dubréka	D1	S3	suc	129	210	163	169	079	153	112	132	173	000	154	166
Du22-9	Dubréka	D1	S1	sang	000	000	163	169	000	000	112	132	173	179	000	000
Du22-9	Dubréka	D1	S1	suc	129	212	163	169	079	151	112	132	173	179	154	166
Du24-6	Dubréka	D1	S3	LCR	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
Du24-6	Dubréka	D1	S3	sang	129	210	163	169	079	151	112	000	000	000	154	166
Du24-6	Dubréka	D1	S3	suc	129	210	163	169	079	151	112	132	173	179	154	166
Du25-6	Dubréka	D1	S2	sang	000	000	163	169	079	000	000	000	000	000	000	000
Du25-6	Dubréka	D1	S2	suc	129	210	163	169	079	151	112	132	173	179	154	166
Du26-6	Dubréka	D1	S2	sang	129	210	163	169	079	151	000	132	173	179	154	166
Du27-6	Dubréka	D1	S2	suc	129	208	163	169	079	153	112	132	173	181	000	000
<b>Du28-6*</b>	<b>Dubréka</b>	<b>D1</b>	<b>S1</b>	<b>suc</b>	<b>129</b>	<b>212</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>153</b>	<b>112</b>	<b>132</b>	<b>173</b>	<b>181</b>	<b>154</b>	<b>166</b>
<b>Du28-6*</b>	<b>Dubréka</b>	<b>D1</b>	<b>S1</b>	<b>sang</b>	<b>131</b>	<b>212</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>153</b>	<b>112</b>	<b>132</b>	<b>173</b>	<b>181</b>	<b>000</b>	<b>000</b>
Du29-6	Dubréka	D1	S3	sang	129	000	163	169	079	000	112	132	173	000	154	000
Du29-6	Dubréka	D1	S3	suc	129	208	163	169	079	153	112	132	173	179	154	166
<b>Du30-6*</b>	<b>Dubréka</b>	<b>D1</b>	<b>S2</b>	<b>LCR</b>	<b>129</b>	<b>000</b>	<b>163</b>	<b>000</b>	<b>079</b>	<b>151</b>	<b>112</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>
<b>Du30-6*</b>	<b>Dubréka</b>	<b>D1</b>	<b>S2</b>	<b>sang</b>	<b>129</b>	<b>210</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>153</b>	<b>112</b>	<b>132</b>	<b>173</b>	<b>179</b>	<b>154</b>	<b>166</b>
<b>Du30-6*</b>	<b>Dubréka</b>	<b>D1</b>	<b>S2</b>	<b>suc</b>	<b>129</b>	<b>210</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>153</b>	<b>112</b>	<b>132</b>	<b>173</b>	<b>179</b>	<b>154</b>	<b>166</b>
Du31-6	Dubréka	D1	S2	suc	129	208	163	169	079	153	112	132	173	179	154	166
Du33-6	Dubréka	D1	S2	sang	129	208	163	169	079	151	112	132	173	181	154	166
Du33-6	Dubréka	D1	S2	suc	129	208	163	169	079	151	112	132	173	181	154	166
<b>Du34-6</b>	<b>Dubréka</b>	<b>D1</b>	<b>S2</b>	<b>LCR</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>
<b>Du34-6*</b>	<b>Dubréka</b>	<b>D1</b>	<b>S2</b>	<b>sang</b>	<b>129</b>	<b>000</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>151</b>	<b>112</b>	<b>132</b>	<b>173</b>	<b>000</b>	<b>154</b>	<b>166</b>
<b>Du34-6*</b>	<b>Dubréka</b>	<b>D1</b>	<b>S2</b>	<b>suc</b>	<b>129</b>	<b>208</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>153</b>	<b>112</b>	<b>132</b>	<b>173</b>	<b>179</b>	<b>154</b>	<b>166</b>
Du35-6	Dubréka	D1	S3	sang	129	208	163	169	079	151	112	132	173	000	154	166
Du36-6	Dubréka	D1	S3	sang	129	208	163	169	079	153	000	000	173	000	154	000
Du36-6	Dubréka	D1	S3	suc	129	208	163	169	079	153	112	132	173	179	154	166
Du37-6	Dubréka	D1	S3	suc	129	208	163	169	079	153	112	132	173	179	154	166
Du37-6	Dubréka	D1	S3	sang	129	208	163	169	000	153	112	132	173	179	154	166
Du38-17	Dubréka	D1	S3	sang	129	208	163	169	079	153	112	132	173	179	154	166
Du38-6	Dubréka	D1	S2	suc	129	212	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du113-6	Dubréka	D2	S2	LCR	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	154	166
Du113-6	Dubréka	D2	S2	sang	129	214	000	000	079	149	112	132	000	000	154	166
Du113-6	Dubréka	D2	S2	suc	129	214	163	169	079	149	112	132	173	179	154	166
Du114-6	Dubréka	D2	S3	sang	129	208	163	169	079	151	112	132	173	181	154	166

Du114-6	Dubrčka	D2	S3	LCR	129	208	163	169	079	151	112	132	173	181	154	166
Du114-6	Dubrčka	D2	S3	suc	129	208	163	169	079	151	112	132	173	181	154	166
Du115-6	Dubrčka	D2	S2	sang	000	000	163	169	000	000	112	134	173	000	000	000
Du115-6	Dubrčka	D2	S2	suc	129	208	163	169	079	151	112	134	173	181	154	166
Du117-6	Dubrčka	D2	S3	LCR	129	000	000	000	079	153	000	000	173	181	000	000
Du117-6	Dubrčka	D2	S3	suc	129	210	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du117-6	Dubrčka	D2	S3	sang	129	210	000	000	000	153	112	000	173	000	154	000
Du119-6	Dubrčka	D2	S3	suc	129	210	163	169	079	157	112	134	173	181	154	166
Du121-6	Dubrčka	D2	S3	sang	129	210	163	000	079	153	112	132	173	181	154	000
Du121-6	Dubrčka	D2	S3	suc	129	210	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du123-6	Dubrčka	D2	S3	sang	129	208	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du125-6	Dubrčka	D2	S2	sang	129	208	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du125-6	Dubrčka	D2	S2	suc	129	208	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du130-6	Dubrčka	D2	S1	suc	129	210	163	169	079	151	112	132	173	179	154	164
Du13-15	Dubrčka	D2	S3	LCR	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
Du13-15	Dubrčka	D2	S3	sang	129	208	163	169	079	151	112	132	173	181	154	166
Du13-15	Dubrčka	D2	S3	suc	129	208	163	169	079	151	112	132	173	181	154	166
Du132-6	Dubrčka	D2	S2	sang	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
Du132-6	Dubrčka	D2	S2	suc	000	210	000	000	000	000	112	000	000	179	000	166
Du133-6	Dubrčka	D2	S3	LCR	133	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
Du139-6	Dubrčka	D2	S3	sang	129	000	163	169	079	153	112	000	173	000	154	166
Du139-6	Dubrčka	D2	S3	suc	129	208	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du143-6	Dubrčka	D2	S3	suc	000	214	000	169	079	151	112	132	173	179	154	000
Du149-6	Dubrčka	D2	S1	sang	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
Du149-6	Dubrčka	D2	S1	suc	129	212	163	169	079	151	112	132	173	179	154	164
Du150-6	Dubrčka	D2	S2	suc	129	214	163	169	079	151	112	132	173	179	000	000
Du153-2	Dubrčka	D2	S3	sang	129	214	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du153-2	Dubrčka	D2	S3	suc	129	214	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du153-6	Dubrčka	D2	S3	sang	129	214	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du155-6	Dubrčka	D2	S1	sang	129	210	163	169	079	153	112	132	000	181	154	166
Du156-6	Dubrčka	D2	S2	sang	000	212	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
Du158-6	Dubrčka	D2	S1	suc	129	204	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du163-6	Dubrčka	D2	S3	LCR	000	000	163	169	000	161	000	000	000	000	000	000
Du163-6	Dubrčka	D2	S3	sang	129	208	163	169	079	161	112	130	173	179	154	164
Du163-6	Dubrčka	D2	S3	suc	129	208	163	169	079	161	112	130	173	179	154	164
Du165-6	Dubrčka	D2	S1	sang	129	212	163	169	079	151	112	132	173	179	148	154
Du167-6	Dubrčka	D2	S2	sang	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
Du167-6	Dubrčka	D2	S2	suc	129	208	000	169	079	153	112	000	173	181	154	000
Du168-6	Dubrčka	D2	S2	suc	129	208	163	169	000	000	112	132	000	000	000	000
Du168-6	Dubrčka	D2	S2	sang	129	208	163	169	079	000	112	132	000	179	000	166
Du171-6	Dubrčka	D2	S2	LCR	000	000	000	000	000	000	000	000	173	000	154	166
Du171-6	Dubrčka	D2	S2	sang	129	214	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du171-6	Dubrčka	D2	S2	suc	129	214	163	169	079	153	112	132	173	181	154	166
Du172-6	Dubrčka	D2	S3	sang	129	208	000	000	000	000	112	000	173	000	000	000
Du172-6	Dubrčka	D2	S3	suc	129	208	000	169	079	153	112	132	173	000	154	166
Du180-6	Dubrčka	D2	S2	suc	131	214	163	169	079	153	000	000	000	179	000	000
Du182-6	Dubrčka	D2	S3	sang	129	000	163	169	079	155	112	000	173	181	000	000
Du184-6	Dubrčka	D2	S3	sang	129	226	163	169	079	143	114	132	173	000	154	000
<b>Du188-6**</b>	<b>Dubrčka</b>	<b>D2</b>	<b>S2</b>	<b>sang</b>	<b>129</b>	<b>214</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>151</b>	<b>112</b>	<b>134</b>	<b>173</b>	<b>179</b>	<b>000</b>	<b>000</b>
<b>Du188-6**</b>	<b>Dubrčka</b>	<b>D2</b>	<b>S2</b>	<b>suc</b>	<b>129</b>	<b>212</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>149</b>	<b>112</b>	<b>132</b>	<b>173</b>	<b>181</b>	<b>154</b>	<b>164</b>
Du190-6	Dubrčka	D2	S3	suc	129	208	163	169	000	000	112	130	173	175	154	000
Du192-6	Dubrčka	D2	S3	suc	129	000	000	000	079	153	112	132	173	179	148	000
Du194-6	Dubrčka	D2	S3	sang	000	000	163	169	079	000	112	132	173	179	000	000

Du210-6	Dubrčka	D2	S3	suc	129	000	163	169	079	000	112	132	000	000	154	160
Du210-6	Dubrčka	D2	S3	LCR	129	210	163	169	000	000	112	132	173	181	154	160
Du213-6	Dubrčka	D2	S3	LCR	129	210	000	000	000	153	000	000	000	000	000	000
Du213-6	Dubrčka	D2	S3	sang	129	210	163	169	079	000	112	132	173	181	154	160
Du213-6	Dubrčka	D2	S3	suc	129	210	163	169	079	153	112	132	173	181	154	160
Du214-6	Dubrčka	D2	S3	sang	129	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
Du214-6	Dubrčka	D2	S3	suc	129	208	163	169	079	000	112	134	173	181	154	160
Du218-6	Dubrčka	D2	S2	suc	129	156	163	169	079	167	112	132	173	179	000	000
Du218-6	Dubrčka	D2	S2	sang	129	000	000	000	000	167	112	132	173	179	000	000
Du220-6	Dubrčka	D2	S3	suc	000	210	163	169	079	153	112	132	000	181	154	160
<b>Du226-6**</b>	<b>Dubrčka</b>	<b>D2</b>	<b>S3</b>	<b>LCR</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>079</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>138</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>
<b>Du226-6**</b>	<b>Dubrčka</b>	<b>D2</b>	<b>S3</b>	<b>sang</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>000</b>	<b>151</b>	<b>000</b>	<b>132</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>	<b>000</b>
<b>Du226-6**</b>	<b>Dubrčka</b>	<b>D2</b>	<b>S3</b>	<b>suc</b>	<b>129</b>	<b>204</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>151</b>	<b>112</b>	<b>132</b>	<b>173</b>	<b>179</b>	<b>154</b>	<b>164</b>
<b>Du232-6**</b>	<b>Dubrčka</b>	<b>D2</b>	<b>S3</b>	<b>LCR</b>	<b>129</b>	<b>226</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>176</b>	<b>114</b>	<b>136</b>	<b>173</b>	<b>179</b>	<b>154</b>	<b>164</b>
<b>Du232-6**</b>	<b>Dubrčka</b>	<b>D2</b>	<b>S3</b>	<b>sang</b>	<b>129</b>	<b>226</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>174</b>	<b>114</b>	<b>134</b>	<b>173</b>	<b>179</b>	<b>154</b>	<b>164</b>
<b>Du232-6**</b>	<b>Dubrčka</b>	<b>D2</b>	<b>S3</b>	<b>suc</b>	<b>129</b>	<b>226</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>174</b>	<b>114</b>	<b>134</b>	<b>173</b>	<b>179</b>	<b>154</b>	<b>164</b>
Du248-6	Dubrčka	D2	S2	sang	129	226	163	169	079	153	112	132	173	181	154	160
Du248-6	Dubrčka	D2	S2	suc	129	226	163	169	079	153	112	132	173	181	154	160
<b>Du249-6*</b>	<b>Dubrčka</b>	<b>D2</b>	<b>S3</b>	<b>sang</b>	<b>129</b>	<b>214</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>159</b>	<b>112</b>	<b>134</b>	<b>173</b>	<b>179</b>	<b>154</b>	<b>164</b>
<b>Du249-6*</b>	<b>Dubrčka</b>	<b>D2</b>	<b>S3</b>	<b>suc</b>	<b>129</b>	<b>214</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>157</b>	<b>112</b>	<b>134</b>	<b>173</b>	<b>000</b>	<b>154</b>	<b>164</b>
Du37-15	Dubrčka	D2	S3	LCR	000	000	000	000	079	000	000	000	000	000	000	000
Du37-15	Dubrčka	D2	S3	sang	129	208	163	169	079	153	112	132	173	179	154	160
Du37-15	Dubrčka	D2	S3	suc	129	208	163	169	079	153	112	132	173	179	154	160
Du38-21	Dubrčka	D2	S2	suc	129	212	163	169	079	153	112	132	173	181	154	160
Du38-21	Dubrčka	D2	S2	sang	129	212	163	169	079	153	112	132	173	181	000	000
Du42-6	Dubrčka	D2	S2	LCR	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
Du42-6	Dubrčka	D2	S2	suc	131	208	163	169	079	153	112	132	173	181	154	160
Du46-6	Dubrčka	D2	S3	sang	129	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
Du46-6	Dubrčka	D2	S3	suc	129	212	163	169	079	153	112	132	173	181	154	160
Du50-6	Dubrčka	D2	S3	sang	129	000	163	169	079	155	112	132	000	179	154	000
<b>Du57-2**</b>	<b>Dubrčka</b>	<b>D2</b>	<b>S2</b>	<b>sang</b>	<b>129</b>	<b>210</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>000</b>	<b>112</b>	<b>132</b>	<b>171</b>	<b>173</b>	<b>154</b>	<b>164</b>
<b>Du57-2**</b>	<b>Dubrčka</b>	<b>D2</b>	<b>S2</b>	<b>suc</b>	<b>129</b>	<b>210</b>	<b>163</b>	<b>169</b>	<b>079</b>	<b>151</b>	<b>112</b>	<b>132</b>	<b>173</b>	<b>179</b>	<b>154</b>	<b>164</b>
Du69-2	Dubrčka	D2	S2	suc	129	228	163	169	079	163	114	132	173	179	154	168
Du69-2	Dubrčka	D2	S2	sang	129	228	163	169	079	163	114	132	173	179	000	000
Du72-6	Dubrčka	D2	S2	sang	129	228	163	169	079	163	114	132	173	179	154	168
7-1	Forćariah	D1	S2	suc	000	000	163	000	079	153	000	000	000	000	000	000
15-2	Forćariah	D1	S2	LCR	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
15-2	Forćariah	D1	S2	sang	000	000	163	169	000	000	000	000	173	000	000	000
15-2	Forćariah	D1	S2	suc	129	242	163	169	079	155	112	132	173	179	154	164
40-1	Forćariah	D1	S3	suc	129	000	163	169	079	149	000	132	161	179	154	172
43-6	Forćariah	D1	S3	sang	000	000	000	169	000	000	000	000	173	000	000	000
50-1	Forćariah	D1	S3	LCR	129	208	000	000	000	151	112	132	000	000	152	166
A21	Forćariah	D1	S3	sang	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
A21	Forćariah	D1	S3	suc	129	240	163	169	079	155	112	132	173	179	154	164
A31	Forćariah	D1	S3	LCR	129	240	163	169	079	000	112	132	000	000	154	164
A31	Forćariah	D1	S3	suc	129	240	163	169	079	155	112	132	173	179	154	164
A36	Forćariah	D1	S2	suc	129	212	163	169	000	151	112	132	173	179	154	164
A54	Forćariah	D1	S3	sang	129	212	163	169	079	149	112	132	173	179	154	164
B11	Forćariah	D1	S2	suc	129	242	163	169	079	155	112	132	173	179	154	164
B23	Forćariah	D1	S1	suc	129	232	163	169	079	153	112	132	175	179	154	172
B24	Forćariah	D1	S3	suc	129	212	163	169	079	151	112	132	173	179	154	164
B25	Forćariah	D1	S3	LCR	129	000	163	169	000	000	112	132	173	179	154	164
B25	Forćariah	D1	S3	suc	129	000	163	169	079	151	112	132	173	179	154	164

B26	Forécariah	D1	S2	LCR	000	000	163	169	000	000	000	000	000	000	000	000
B26	Forécariah	D1	S2	suc	129	214	163	169	079	153	112	132	173	179	154	164
B3	Forécariah	D1	S1	sang	129	236	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
17-3	Forécariah	D2	S3	suc	129	236	163	167	079	157	112	132	173	179	154	164
17-3	Forécariah	D2	S3	sang	129	000	163	167	079	157	112	000	173	179	000	000
58-6*	Forécariah	D2	S2	sang	129	242	163	169	000	000	112	132	173	000	000	000
58-6*	Forécariah	D2	S2	suc	129	244	163	169	079	155	112	132	173	179	154	164
68-6	Forécariah	D2	S3	LCR	000	212	000	169	079	151	112	132	173	179	154	164
74-6	Forécariah	D2	S3	suc	129	214	163	169	079	153	112	132	173	179	154	164

**Annexe VI : Résultats de l'amélioration de l'amplification de locus microsatellites de *Trypanosoma brucei gambiense* à partir de fluides biologiques (activité de recherche 3)**

Nallèles : Nombre d'allèles amplifiés

Echantillons	Fluides	Protocoles	Loci	Allèle 1	Allèle 2	Nallèles
Bo92-1	buffy-coat	P1	Micbg5	000	000	0
Bo92-1	buffy-coat	P1	Micbg5	000	000	0
Bo9-6	buffy-coat	P1	Micbg5	000	000	0
Bo9-6	buffy-coat	P1	Micbg5	154	000	1
Du115-6	buffy-coat	P1	Micbg5	000	000	0
Du115-6	buffy-coat	P1	Micbg5	154	166	2
Du36-6	buffy-coat	P1	Micbg5	154	000	1
Du36-6	buffy-coat	P1	Micbg5	154	168	2
Du168-6	buffy-coat	P1	Micbg5	000	166	1
Du168-6	buffy-coat	P1	Micbg5	000	000	0
Du257-6	buffy-coat	P1	Micbg5	154	000	1
Du257-6	buffy-coat	P1	Micbg5	154	168	2
Du57-2	buffy-coat	P1	Micbg5	154	164	2
Du57-2	buffy-coat	P1	Micbg5	000	000	0
Du117-6	buffy-coat	P1	Micbg5	154	000	1
Du117-6	buffy-coat	P1	Micbg5	154	000	1
Du29-6	buffy-coat	P1	Micbg5	154	000	1
Du29-6	buffy-coat	P1	Micbg5	000	000	0
Du117-6	buffy-coat	P1	Micbg6	173	000	1
Du117-6	buffy-coat	P1	Micbg6	173	000	1
Du29-6	buffy-coat	P1	Micbg6	173	000	1
Du29-6	buffy-coat	P1	Micbg6	173	000	1
Du117-6	buffy-coat	P1	Misatg4	112	000	1
Du117-6	buffy-coat	P1	Misatg4	112	000	1
Du29-6	buffy-coat	P1	Misatg4	112	000	1
Du29-6	buffy-coat	P1	Misatg4	112	132	2

Bo92-1	buffy-coat	P2	Micbg5	154	000	1
Bo9-6	buffy-coat	P2	Micbg5	000	000	0
Du115-6	buffy-coat	P2	Micbg5	154	166	2
Du36-6	buffy-coat	P2	Micbg5	000	168	1
Du168-6	buffy-coat	P2	Micbg5	154	000	1
Du257-6	buffy-coat	P2	Micbg5	154	000	1
Du57-2	buffy-coat	P2	Micbg5	000	000	0
Du117-6	buffy-coat	P2	Micbg5	154	000	1
Du29-6	buffy-coat	P2	Micbg5	000	166	1
Du117-6	buffy-coat	P2	Micbg6	173	181	2
Du29-6	buffy-coat	P2	Micbg6	173	179	2
Du117-6	buffy-coat	P2	Misatg4	112	000	1
Du29-6	buffy-coat	P2	Misatg4	000	000	0
Bo92-1	buffy-coat	P3	Micbg5	000	000	0
Bo9-6	buffy-coat	P3	Micbg5	154	000	1
Du115-6	buffy-coat	P3	Micbg5	154	000	1
Du36-6	buffy-coat	P3	Micbg5	154	000	1
Du168-6	buffy-coat	P3	Micbg5	154	166	2
Du257-6	buffy-coat	P3	Micbg5	154	000	1
Du57-2	buffy-coat	P3	Micbg5	000	000	0
Du117-6	buffy-coat	P3	Micbg5	154	000	1
Du29-6	buffy-coat	P3	Micbg5	154	166	2
Du117-6	buffy-coat	P3	Micbg6	173	181	2
Du29-6	buffy-coat	P3	Micbg6	000	179	1
Du117-6	buffy-coat	P3	Misatg4	112	130	2
Du29-6	buffy-coat	P3	Misatg4	112	132	2
Du24-6	CSF	P2	Micbg5	154	000	1
Du11-6	CSF	P2	Micbg5	000	168	1
Du34-6	CSF	P2	Micbg5	000	168	1
Bo92-1	CSF	P2	Micbg5	150	000	1
Bo230-6	CSF	P2	Micbg5	000	000	0
15-2	CSF	P2	Micbg5	000	000	0
50-1	CSF	P2	Micbg5	152	000	1
Du24-6	LCR	P1	Micbg5	000	000	0
Du24-6	LCR	P1	Micbg5	000	000	0
Du11-6	LCR	P1	Micbg5	000	000	0
Du11-6	LCR	P1	Micbg5	000	000	0
Du34-6	LCR	P1	Micbg5	000	000	0
Du34-6	LCR	P1	Micbg5	000	000	0
Bo92-1	LCR	P1	Micbg5	000	154	1
Bo92-1	LCR	P1	Micbg5	000	000	0
Bo230-6	LCR	P1	Micbg5	154	000	1

Bo230-6	LCR	P1	Micbg5	000	000	0
15-2	LCR	P1	Micbg5	000	000	0
15-2	LCR	P1	Micbg5	000	000	0
50-1	LCR	P1	Micbg5	152	166	2
50-1	LCR	P1	Micbg5	000	166	1
Du24-6	LCR	P3	Micbg5	000	000	0
Du11-6	LCR	P3	Micbg5	000	168	1
Du34-6	LCR	P3	Micbg5	000	000	0
Bo92-1	LCR	P3	Micbg5	000	154	1
Bo230-6	LCR	P3	Micbg5	000	000	0
15-2	LCR	P3	Micbg5	000	000	0
50-1	LCR	P3	Micbg5	152	000	1
58-6	sang	P1	Micbg5	000	000	0
58-6	sang	P1	Micbg5	154	164	2
B3	sang	P1	Micbg5	000	000	0
B3	sang	P1	Micbg5	000	000	0
45-1	sang	P1	Micbg5	000	000	0
45-1	sang	P1	Micbg5	000	000	0
Du22-6	sang	P1	Micbg5	154	000	1
Du22-6	sang	P1	Micbg5	000	166	1
Du184-6	sang	P1	Micbg5	154	000	1
Du184-6	sang	P1	Micbg5	154	000	1
Bo91-2	sang	P1	Micbg5	000	000	0
Bo91-2	sang	P1	Micbg5	000	000	0
Du28-6	sang	P1	Micbg5	000	000	0
Du28-6	sang	P1	Micbg5	154	000	1
45-1	sang	P1	Micbg5	000	000	0
45-1	sang	P1	Micbg5	154	172	2
45-1	sang	P1	Micbg6	000	179	1
45-1	sang	P1	Micbg6	000	000	0
45-1	sang	P1	Misatg4	112	000	1
45-1	sang	P1	Misatg4	000	000	0
58-6	sang	P2	Micbg5	154	164	2
B3	sang	P2	Micbg5	000	000	0
45-1	sang	P2	Micbg5	000	172	1
Du22-6	sang	P2	Micbg5	154	166	2
Du184-6	sang	P2	Micbg5	154	000	1
Bo91-2	sang	P2	Micbg5	000	164	1
Du28-6	sang	P2	Micbg5	154	166	2
45-1	sang	P2	Micbg5	000	000	0
45-1	sang	P2	Micbg6	175	000	1
45-1	sang	P2	Misatg4	112	130	2

58-6	sang	P3	Micbg5	154	000	1
B3	sang	P3	Micbg5	154	000	1
45-1	sang	P3	Micbg5	154	000	1
Du22-6	sang	P3	Micbg5	154	166	2
Du184-6	sang	P3	Micbg5	154	000	1
Bo91-2	sang	P3	Micbg5	000	000	0
Du28-6	sang	P3	Micbg5	154	166	2
45-1	sang	P3	Micbg5	154	000	1
45-1	sang	P3	Micbg6	175	000	1
45-1	sang	P3	Misatg4	112	000	1
Du132-6	suc gangl	P1	Micbg5	000	166	1
Du132-6	suc gangl	P1	Micbg5	000	000	0
7-1	suc gangl	P1	Micbg5	000	000	0
7-1	suc gangl	P1	Micbg5	000	000	0
Du143-6	suc gangl	P1	Micbg5	154	000	1
Du143-6	suc gangl	P1	Micbg5	000	000	0
7-1	suc gangl	P1	Micbg5	000	000	0
7-1	suc gangl	P1	Micbg5	000	000	0
Du143-6	suc gangl	P1	Micbg5	154	000	1
Du143-6	suc gangl	P1	Micbg5	154	164	2
Du192-6	suc gangl	P1	Micbg5	148	000	1
Du192-6	suc gangl	P1	Micbg5	148	154	2
Du167-6	suc gangl	P1	Micbg5	154	000	1
Du167-6	suc gangl	P1	Micbg5	154	000	1
Du180-6	suc gangl	P1	Micbg5	000	000	0
Du180-6	suc gangl	P1	Micbg5	156	000	1
Bo92-1	suc gangl	P1	Micbg5	000	000	0
Bo92-1	suc gangl	P1	Micbg5	150	154	2
40-1	suc gangl	P1	Micbg5	154	172	2
40-1	suc gangl	P1	Micbg5	154	000	1
Du132-6	suc gangl	P1	Micbg6	000	179	1
Du132-6	suc gangl	P1	Micbg6	000	000	0
7-1	suc gangl	P1	Micbg6	000	000	0
7-1	suc gangl	P1	Micbg6	000	000	0
Du143-6	suc gangl	P1	Micbg6	173	179	2
Du143-6	suc gangl	P1	Micbg6	000	000	0
Du132-6	suc gangl	P1	Misatg4	112	000	1
Du132-6	suc gangl	P1	Misatg4	112	000	1
7-1	suc gangl	P1	Misatg4	000	000	0
7-1	suc gangl	P1	Misatg4	000	000	0
Du143-6	suc gangl	P1	Misatg4	112	132	2
Du143-6	suc gangl	P1	Misatg4	000	132	1

Du132-6	suc gangl	P2	Micbg5	154	166	2
7-1	suc gangl	P2	Micbg5	154	000	1
Du143-6	suc gangl	P2	Micbg5	154	164	2
7-1	suc gangl	P2	Micbg5	000	172	1
Du143-6	suc gangl	P2	Micbg5	154	000	1
Du192-6	suc gangl	P2	Micbg5	148	154	2
Du167-6	suc gangl	P2	Micbg5	154	166	2
Du180-6	suc gangl	P2	Micbg5	000	000	0
Bo92-1	suc gangl	P2	Micbg5	150	154	2
40-1	suc gangl	P2	Micbg5	154	000	1
Du132-6	suc gangl	P2	Micbg6	173	000	1
7-1	suc gangl	P2	Micbg6	000	000	0
Du143-6	suc gangl	P2	Micbg6	173	179	2
Du132-6	suc gangl	P2	Misatg4	112	132	2
7-1	suc gangl	P2	Misatg4	000	000	0
Du143-6	suc gangl	P2	Misatg4	112	000	1
Du132-6	suc gangl	P3	Micbg5	154	000	1
7-1	suc gangl	P3	Micbg5	000	000	0
Du143-6	suc gangl	P3	Micbg5	154	000	1
7-1	suc gangl	P3	Micbg5	000	000	0
Du143-6	suc gangl	P3	Micbg5	154	000	1
Du192-6	suc gangl	P3	Micbg5	148	154	2
Du167-6	suc gangl	P3	Micbg5	154	000	1
Du180-6	suc gangl	P3	Micbg5	000	000	0
Bo92-1	suc gangl	P3	Micbg5	150	154	2
40-1	suc gangl	P3	Micbg5	000	000	0
Du132-6	suc gangl	P3	Micbg6	173	179	2
7-1	suc gangl	P3	Micbg6	175	179	2
Du143-6	suc gangl	P3	Micbg6	173	179	2
Du132-6	suc gangl	P3	Misatg4	112	000	1
7-1	suc gangl	P3	Misatg4	112	130	2
Du143-6	suc gangl	P3	Misatg4	112	132	2

Annexe VII : Cartes de répartition des trypanosomés et des séropositifs dans les trois foyers de THA en Guinée

**Foyer de Boffa**

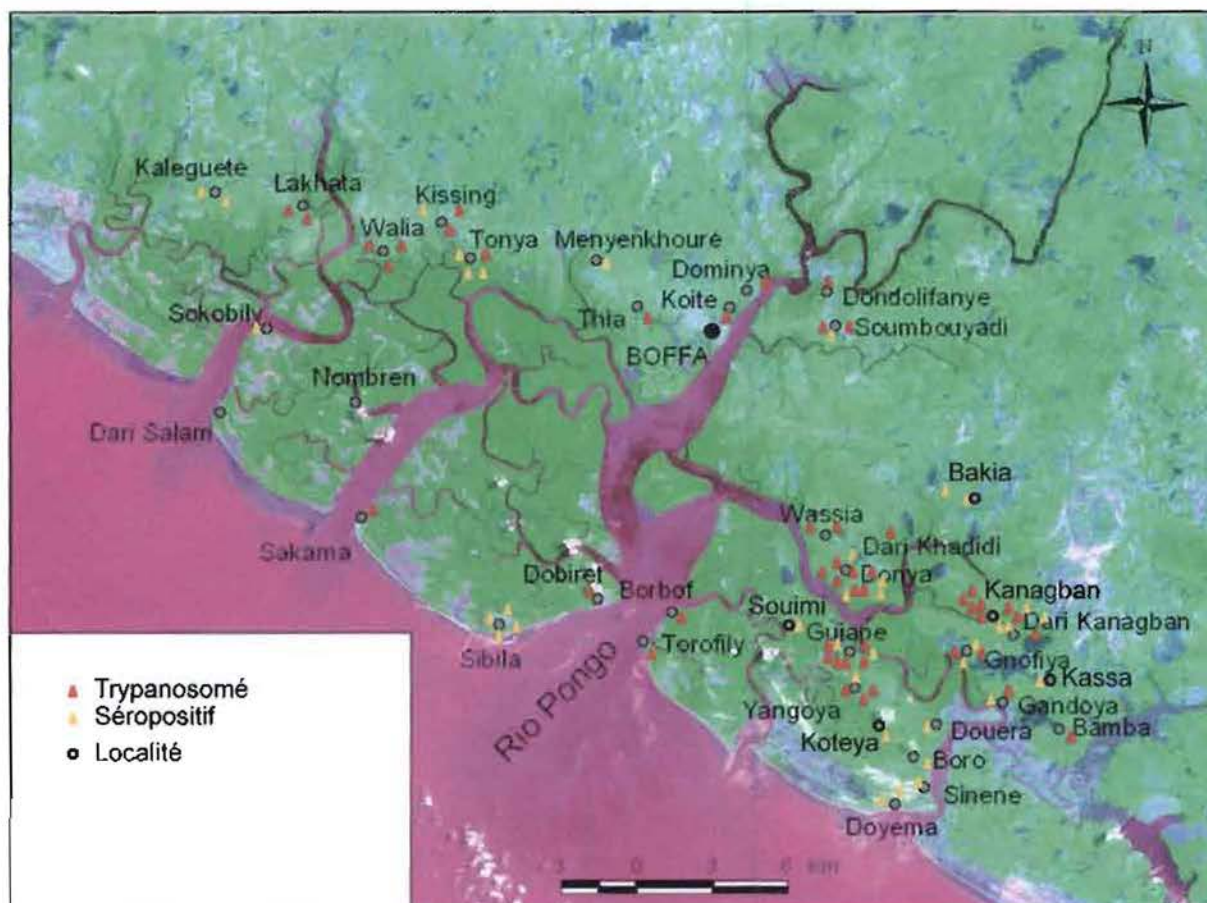


Figure 1 : Carte de répartition des trypanosomés et des séropositifs dans le foyer de Boffa

## Foyer de Dubréka

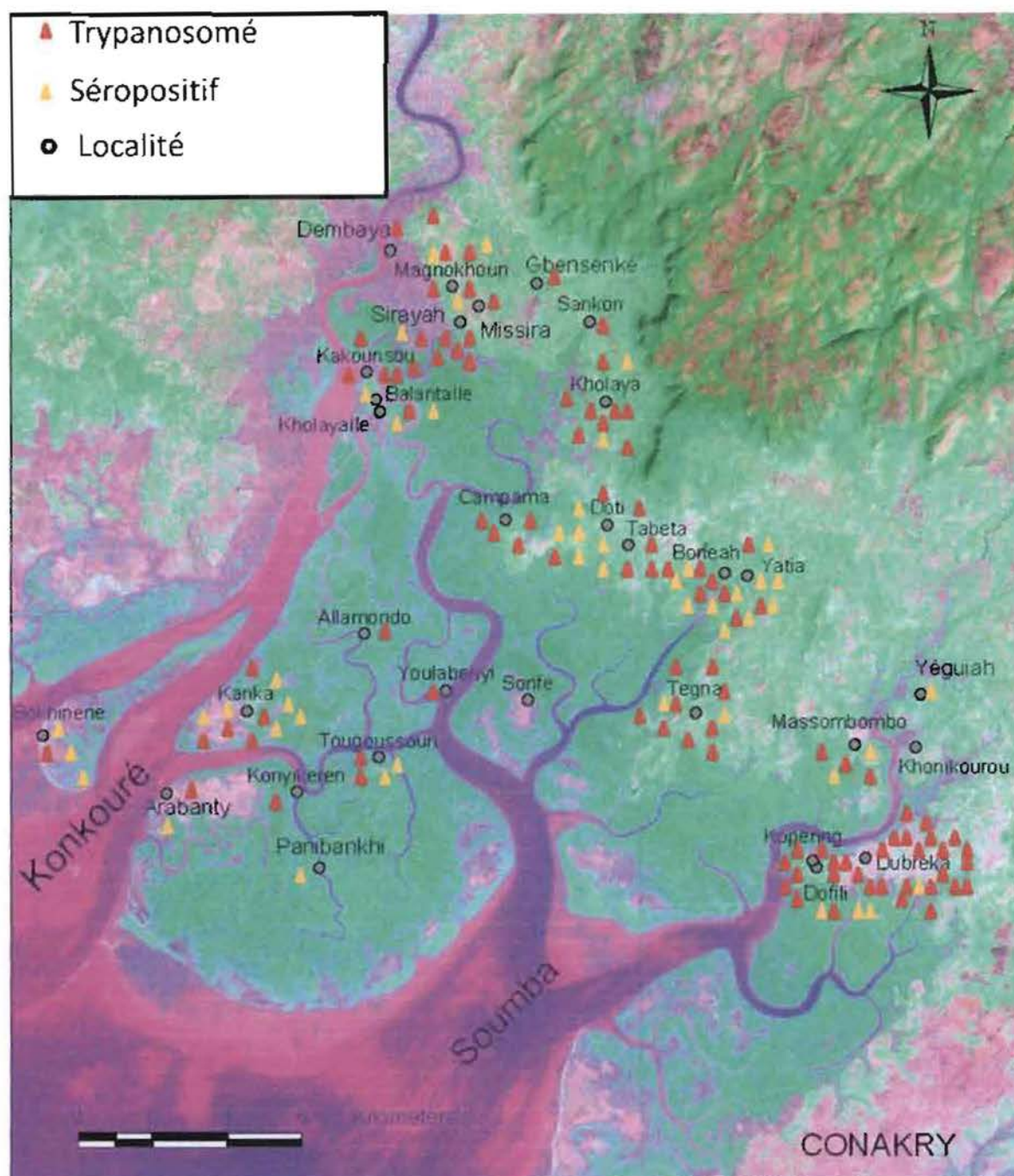


Figure 2 : Carte de répartition des trypanosomés et des séropositifs dans le foyer de Dubréka

## Foyer de Forécariah

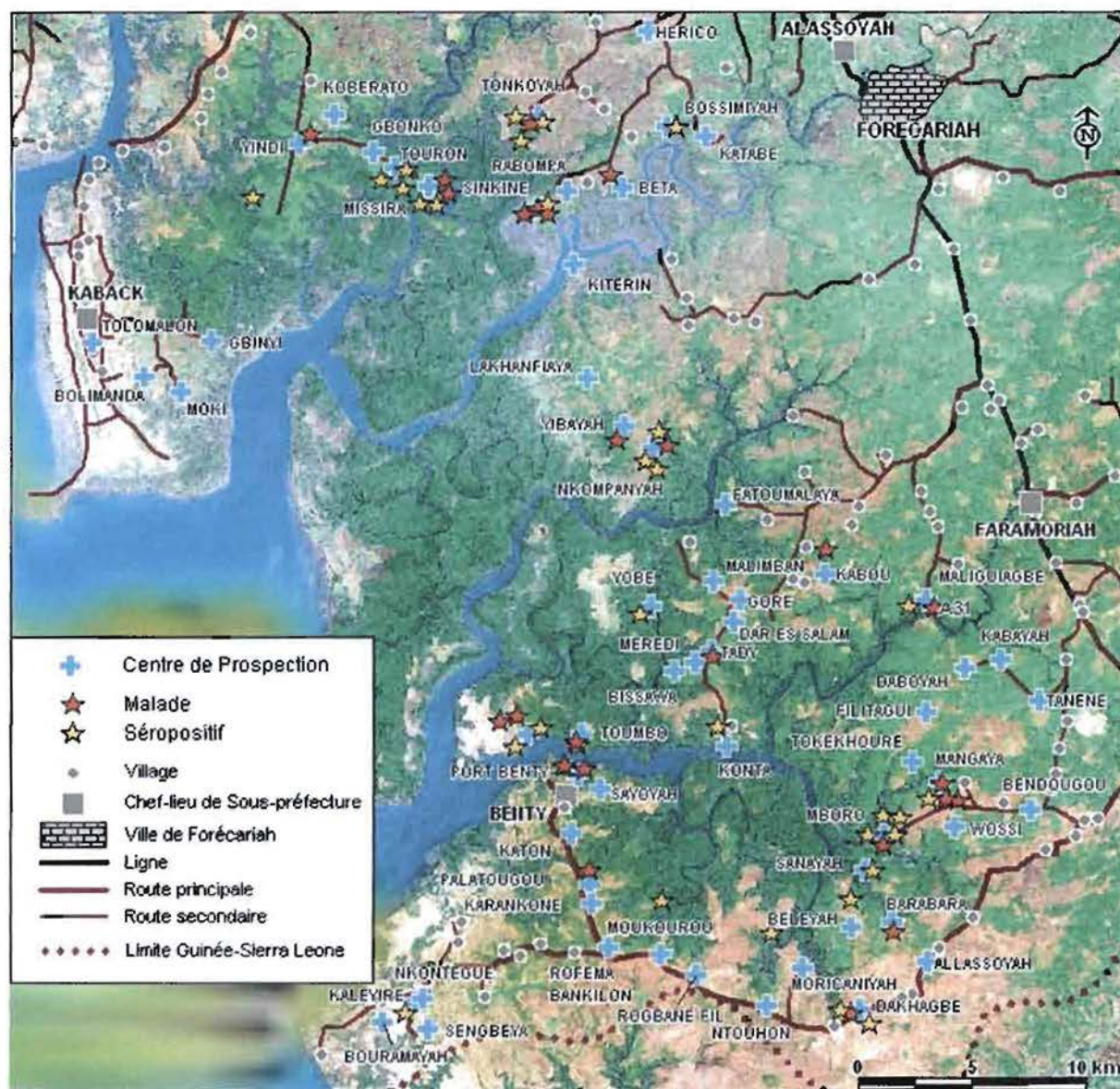


Figure 3 : Carte de répartition des trypanosomés et des séropositifs dans le foyer de Forécariah

**Annexe VIII : Liste des publications**



Contents lists available at ScienceDirect

## Infection, Genetics and Evolution

Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)

## First evidence that parasite infecting apparent aparasitemic serological suspects in human African trypanosomiasis are *Trypanosoma brucei gambiense* and are similar to those found in patients

Jacques Kaboré<sup>a,1</sup>, Mathurin Koffi<sup>b,1</sup>, Bruno Bucheton<sup>a</sup>, Annette MacLeod<sup>c</sup>, Craig Duffy<sup>c</sup>, Hamidou Ilboudo<sup>a</sup>, Mamadou Camara<sup>d</sup>, Thierry De Meeûs<sup>a,e</sup>, Adrien Marie Gaston Belem<sup>f</sup>, Vincent Jamonneau<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR 177 IRD-CIRAD, Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

<sup>b</sup> Université d'Abobo-Adjamé, URES de Daloa, Laboratoire de Génétique Moléculaire et Evolution des Maladies Infectieuses Tropicales, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire

<sup>c</sup> Wellcome Center for Molecular Parasitology, University Place, Glasgow G12 8TA, UK

<sup>d</sup> Programme National de Lutte contre la THA, BP 851 Conakry, Guinée

<sup>e</sup> CNRS, Délégation Languedoc-Roussillon, 1919, route de Mende – 34293 Montpellier Cedex 5, France

<sup>f</sup> Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, 01 BP 1091 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 December 2010

Received in revised form 7 April 2011

Accepted 11 April 2011

Available online 17 April 2011

## Keywords:

Human African trypanosomiasis

*Trypanosoma brucei gambiense*

Seropositive

Côte d'Ivoire

Guinea

Human reservoir

Control strategies

## ABSTRACT

Thanks to its sensitivity and its ease of use in the field, the card agglutination test for trypanosomiasis (CATT) is widely used for serological screening of *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis (HAT). Positive subjects are then examined by microscopy to confirm the disease. However, the CATT exhibits false-positive results raising the question of whether CATT-positive subjects who are not confirmed by microscopic detection of trypanosomes (SERO) are truly exposed to *T.b. gambiense* infection. For this purpose, we applied microsatellite genotyping on DNA extracted from blood of both HAT confirmed patients and SERO subjects in Guinea and Côte d'Ivoire since microsatellite genotyping has proved useful for the study of *T.b. gambiense* genetic diversity. Problems of amplification failures raise the question of the sensitivity of microsatellite markers when applied on biological samples especially from SERO subjects for who low blood parasitaemia are suspected. Nevertheless, we have shown that the trypanosomes from SERO individuals that have been genotyped belong to *T.b. gambiense* group 1 and were identical to those found in HAT patients. These results constitute the first evidences that at least some SERO are indeed infected by *T.b. gambiense* group 1 and that they may constitute a human reservoir of parasite in HAT foci. Whether these individuals should undergo treatment remains an open question as long as their role in HAT transmission is unknown. Our results strongly recommend the follow-up of such subjects to improve control strategies.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Human African trypanosomiasis (HAT) caused by *Trypanosoma brucei* (*T.b.*) *gambiense* in West and Central Africa is usually diagnosed using two sequential steps: first the Card Agglutination Test for Trypanosomiasis CATT, (Magnus et al., 1978) is used for serological screening, followed by microscopy to confirm the

disease and initiate treatment (Chappuis et al., 2005; WHO, 1998). Currently, CATT continues to be used as a test for mass screening because of its simplicity and high sensitivity. However, the CATT can often exhibit false-positive results raising the question of whether CATT-positive subjects who are negative by microscopy (SERO) are exposed to *T.b. gambiense* infection (García et al., 2006). Indeed, some of these subjects may harbor low blood parasitaemia undetected by microscopy even when the mini Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT), the most sensitive (detection threshold around 10 parasite/ml) parasitological method to date (Büscher et al., 2009; Camara et al., 2010), is used.

Because of the low sensitivity of parasitological methods, molecular methods that amplify parasite specific DNA sequences have been developed for HAT diagnostic (Deborggrave and Büscher, 2010). These methods were partly used to address

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

\* Corresponding author. Tel.: +226 20 97 62 15; fax: +226 20 97 23 20.

E-mail addresses: [jacqueskabore@yahoo.fr](mailto:jacqueskabore@yahoo.fr) (J. Kaboré), [m9koffi@yahoo.fr](mailto:m9koffi@yahoo.fr) (M. Koffi), [bruno.bucheton@ird.fr](mailto:bruno.bucheton@ird.fr) (B. Bucheton), [gvwa08@udcf.gla.ac.uk](mailto:gvwa08@udcf.gla.ac.uk) (A. MacLeod), [hamidou\\_ilboudo@hotmail.com](mailto:hamidou_ilboudo@hotmail.com) (H. Ilboudo), [mamadycamarafr@yahoo.fr](mailto:mamadycamarafr@yahoo.fr) (M. Camara), [thierry.demeeus@ird.fr](mailto:thierry.demeeus@ird.fr) (T. De Meeûs), [belemamg@hotmail.fr](mailto:belemamg@hotmail.fr) (A.M.G. Belem), [vincent.jamonneau@ird.fr](mailto:vincent.jamonneau@ird.fr) (V. Jamonneau).

the question of the parasitological status of unconfirmed CATT-positive subjects (Garcia et al., 2000; Kabiri et al., 1999; Kanmogne et al., 1996; Koffi et al., 2006; Kyambadde et al., 2000; Solano et al., 2002). Unfortunately, the most sensitive PCR methods targeting sequences occurring at multiple copies in the parasite genome are *Trypanozoon* specific and cannot differentiate between *T. brucei* subspecies, i.e. the human pathogenic *T. b. gambiense* and *T. b. rhodesiense* from *T. b. brucei*, *T. evansi*, and *T. equiperdum* that cause animal African trypanosomiasis (AAT). In HAT endemic areas, where animal trypanosomiasis are commonly encountered, humans are exposed to the bites of tsetse flies infected by *T. b. brucei*. While *T. b. brucei* is currently considered as non-infective to humans (Pays et al., 2006), it is possible that *T. b. brucei* DNA remains detectable in blood of such subjects thus resulting in positive PCR. It is then difficult to say if positive PCR results are due to *T. b. gambiense* infections or repeated exposure to *T. b. brucei*. (Garcia et al., 2000; Koffi et al., 2006). Unfortunately, PCRs that are specific for *T. b. gambiense* (i.e. *T. b. gambiense* group 1) are targeting single copy genes (Mathieu-Daude and Tibayrenc, 1994; Radwanska et al., 2002) thus limiting the sensitivity of these tests in case of low parasitaemia. Another hypothesis is that such SERO subjects could be infected by particular non-virulent strains of *T. b. gambiense*.

Microsatellite markers were shown to be polymorphic enough to study the genetic diversity among *T. b. gambiense* group 1 (Balmer et al., 2006; Biteau et al., 2000; Koffi et al., 2007, 2009; MacLeod et al., 2005a; Morrison et al., 2008). Such markers were confirmed to be sensitive enough to be applied to *T. brucei* profiling directly from biological samples (Koffi et al., 2007) thus avoiding the need to isolate and amplify the parasites in laboratory rodents or axenic medium before analysis. In this study, we applied microsatellite genotyping to address the following questions: are SERO subjects infected with *T. b. gambiense* strains and if yes, are these strains the same as those found in HAT confirmed patients?

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethical consideration

All samples used in the frame of the present study (excluding reference stocks) were collected during medical surveys conducted by the National Control Programs (NCP) of Guinea and Côte d'Ivoire according to the respective national HAT diagnostic procedures. No samples other than those collected for routine screening and diagnostic procedures were collected for the purpose of the study. All participants were informed about the objective of the study in their own language and signed an informed consent. Children less than 12 years old were excluded. For participants between 12 and 18 years old, informed consent was obtained from their parents. This study is part of a larger project aiming at improving HAT diagnosis for which ethical clearance was obtained from WHO and IRD ethical committees.

### 2.2. Study subjects

All study subjects were identified in Guinea and Côte d'Ivoire during HAT surveillance activities. Subjects positive for the *T. b. gambiense* specific CATT (CATT-B) performed on blood collected by finger prick, blood was collected in heparinised tubes and twofold plasma dilution series in CATT buffer were tested to assess the end titer, i.e. the highest dilution still positive (CATT-P). All CATT-P positive subjects underwent parasitological examinations by direct examination of lymph node aspirate when swollen lymph nodes were present and/or by mAECT. Thus, two categories of study participants were defined for the purposes of the study:

HAT (patients): CATT-P end titer  $\geq 1/8$  and parasitologically confirmed;  
 SERO (seropositives): CATT-P end titer  $\geq 1/8$  but no parasites detected.

Specimens were collected:

- i) in 2004 in the Bonon focus situated in the Western central part of Côte d'Ivoire, between the savannah and the mesophilic forest where HAT prevalence is about 0.1% (Kaba et al., 2006). Stocks isolated from HAT patients from this area had already been genotyped (Koffi et al., 2007) and were included in this study ( $N = 13$ ) as reference stocks (see below). For the SERO sample, we selected blood extracted DNA samples from subjects already described in Koffi et al. (2006) for whom diagnostic PCR (see below) had already been performed. From the 38 PCR-positive SEROs, we selected those diagnosed in 2004 and for whom extracted DNA was still available ( $N = 24$ ).
- ii) in 2008 in the Dubreka mangrove focus of coastal Guinea that is currently the most active West African focus with a prevalence of about 1% (Camara et al., 2005).

### 2.3. PCR/diagnostic

For all participants, 1 ml blood was aliquoted in 1.5 ml microcentrifuge tube and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. DNA extraction was performed using the DNeasy<sup>®</sup> Tissue kit (Qiagen) as described in Koffi et al. (2006). A PCR using the highly sensitive TBR1/2 primers, specific to *Trypanozoon* (Moser et al., 1989) was performed with the DNA samples (as described in Koffi et al., 2006). Only TBR1/2 positive DNA was used for subsequent microsatellite analysis.

### 2.4. Microsatellite genotyping

Reference stocks including those isolated in 2004 in the Bonon focus used for this study have been genotyped using the method described in Koffi et al. (2007). We then used the same method to genotype SERO that were from the same study site. Since microsatellite genotyping technology has been improved these last years, we used more recent methods to characterize Guinean samples.

For Côte d'Ivoire samples, microsatellite loci were amplified using seven primer pairs: M6C8-CA (M6C8) and MT30/33-AC/TC (MT30/33, Biteau et al., 2000), Micbg1, Micbg5, Micbg6, Misatg4, and Misatg9 (Koffi et al., 2007). Primer sequences are given in Supplementary Table S1. The amplification conditions were identical to those previously described in the corresponding articles. Allele bands were resolved and band size determined in 10% non-denaturing acrylamide gels. Bands were visualized by ethidium bromide staining under UV illumination.

For Guinean samples, microsatellite loci were amplified using six primer pairs: M6C8-CA (M6C8, Biteau et al., 2000), Micbg5, Micbg6 and Misatg4 (Koffi et al., 2007) and CH5JS2 and CH118 (MacLeod et al., 2005b). One  $\mu\text{l}$  of blood-extracted DNA was used as template for PCR, in a volume of 10  $\mu\text{l}$ . Nested PCR amplifications were carried out using the following conditions, PCR buffer (45 mM Tris-HCl pH 8.8, 11 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6.7 mM 2-mercaptoethanol, 4.4  $\mu\text{M}$  EDTA, 113  $\mu\text{g}$  per ml BSA, 1 mM of each of the four deoxyribonucleotide triphosphates), 1  $\mu\text{M}$  of each primer, and 0.1 unit of Taq polymerase (ABgene) per 10  $\mu\text{l}$  reaction. Nested PCR conditions for all markers for both rounds were 28 cycles of 50 s at  $95^{\circ}\text{C}$ , 50 s at  $55^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $65^{\circ}\text{C}$ . One  $\mu\text{l}$  of a 1/280 dilution of the first round product was used as template in the second round PCR. One primer out of every

second round pair for the nested PCR amplification of microsatellite markers included a 5'-FAM or HEX modification, allowing size separation of products on a capillary-based sequencer (ABI 3100 Genetic Analyser; Applied Biosystems). A set of ROX-labelled size standards (GS400HD markers; Applied Biosystems) was included in each sample, allowing determination of PCR product size to the level of 1 bp using Peak Scanner V1.0 software (Applied Biosystems). Primer sequences are given in Supplementary Table S1.

### 2.5. Reference stocks

For Côte d'Ivoire samples, we used some reference stocks of *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* and *T. b. gambiense* groups 1 and 2. We also used *T. b. gambiense* groups 1 reference stocks isolated from HAT patients in 2004 from Bonon (the same year and in the same area as the SERO). As these reference stocks, described in Supplementary Table S2, have been already processed as mentioned above (Koffi et al., 2007), genotyping results were still available. TRBPA results were removed for reasons expounded in (Koffi et al., 2009).

### 2.6. Data analysis

The relationships between SERO isolates and other strains were investigated by generating a neighbour-joining tree (NJTree) based on Cavalli-Sforza and Edwards' chord distance matrix as recommended (Takezaki and Nei, 1996) and computed with MSA 4.05 (Dieringer and Schlötterer, 2002). The NJTree was built with MEGA 4 (Tamura et al., 2007).

## 3. Results

### 3.1. PCR/diagnostic

As mentioned above, 24 SERO from Côte d'Ivoire displaying positive result to the TBR1/2 PCR (Koffi et al., 2006) and for which DNA was still available were selected for analysis. In Guinea, blood samples were collected from 65 HAT patients and 54 SERO. All HAT and 20/54 SERO were TBR1/2 PCR-positive. All blood positive extracted DNA were then used for the rest of the study.

### 3.2. Genotyping samples from Côte d'Ivoire

In order to genotype the parasites, 7 microsatellite markers were amplified from the DNA samples. No amplification products were observed with the 7 loci for 10 out of the 24 SERO. Microsatellite results for the remaining 14 SERO and for the 27 reference stocks including the 13 *T. b. gambiense* group 1 stocks coming from Bonon 2004, are given in Supplementary Table S3. Unfortunately, for 5 SERO, only one locus was amplified. These individuals were removed for further analysis. The NJtree obtained with the 9 remaining SERO and reference stocks is given in Fig. 1. Two clusters can be observed in this tree, one grouping all the *T. b. gambiense* group 1 reference stocks, and the second one grouping the other reference stocks. Interestingly, all SERO fit in the *T. b. gambiense* group 1 cluster. Eight out of nine shared very similar profiles with those observed in HAT patients and one, although still fitting in *T. b. gambiense* group 1, appears to be genetically more distant. All five SERO removed from the NJtree analysis showed alleles specific to *T. b. gambiense* group 1 (Supplementary Table S3).

### 3.3. Genotyping samples from Guinea

From the 65 DNA samples extracted from HAT patients, 21 gave a complete multilocus genotype. From the 20 SERO used for microsatellite genotyping, only five gave an amplification product

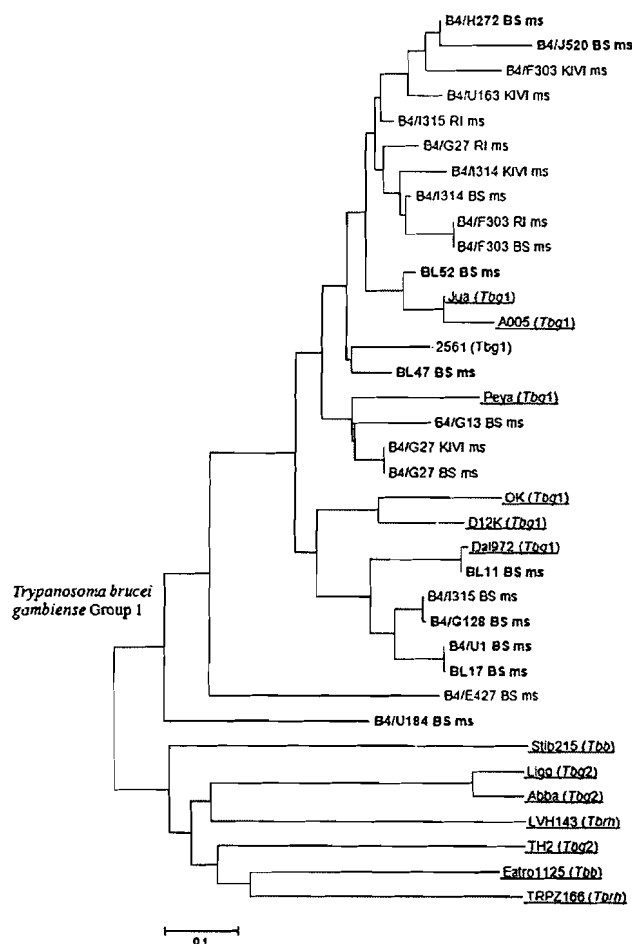


Fig. 1. NJtree based on Cavalli-Sforza and Edwards chord distance matrix computed out of microsatellite loci profiles obtained with Côte d'Ivoire isolates and reference stocks. Reference stocks other than those referenced in 9 (Supplementary Table S2) are underlined. SERO are in bold. KIVI = isolated with Kit of In Vitro Isolation of trypanosomes, RI = isolated by rodent inoculation, BS = blood sample, Ms = medical survey.

with at least one locus. Microsatellite results of both the 21 HAT and five SERO are given in Supplementary Table S4. For 2 SERO, only one locus was amplified. These two isolates were removed from further analysis. The NJtree obtained with the 3 remaining SERO and the 21 HAT is given in Fig. 2. Microsatellite profiles of SEROs were either identical or very similar to the profiles observed in HAT patients. There seems to be no difference between SERO and HAT that are grouped in common clusters. The two SERO removed from the NJtree analysis had alleles that were also observed in HAT cases (Supplementary Table S4).

## 4. Discussion

In HAT endemic areas, identification of subject infected by *T. b. gambiense* is problematic although the clearance of the human reservoir of parasite is a hallmark of disease control or elimination. This is due to the fact that the mass screening test (CATT) is known to lack specificity and thus may give false positive results; i.e. individuals who are positive to the test but who were never exposed to *T. b. gambiense*. In addition, and in contrast to *T. b. rhodesiense*, it is known that *T. b. gambiense* may occur in its human host at low parasitaemia levels, furthermore available parasitological tests have limited sensitivity and can only detect, at best, parasites at concentration of 10 parasite/ml of blood (Büscher et al., 2009; Camara et al., 2010). For these reasons the parasitological

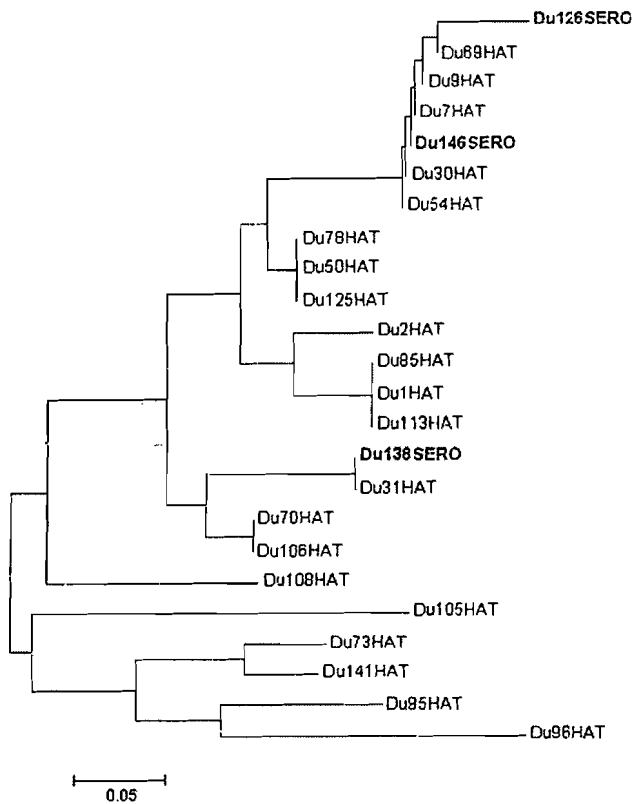


Fig. 2. NJtree based on Cavalli-Sforza and Edwards chord distance matrix computed out of microsatellite loci profiles obtained with Guinean stocks. SERO are in bold.

status of CATT positive subjects that are otherwise negative to parasitological tests (SERO) has long been doubtful. Several lines of evidence however indicate that at least part of the SERO subjects are indeed carriers of parasites but with very low parasitaemia below the detection limit of parasitological tests. Use of PCR methods to detect parasite DNA have shown that an important fraction of SERO subjects were positive, however this required the use of highly sensitive methods targeting repeated parasite sequences that are not *T.b. gambiense* specific, thus leaving some doubts about the exact nature of the parasites infecting these category of subjects (Garcia et al., 2006; Koffi et al., 2006). In West Africa, follow-up of SERO subjects in HAT endemic areas showed that some of these individuals maintain long lasting CATT responses without developing the disease (Garcia et al., 2000). Furthermore application of the immune trypanolysis test, a test that is highly specific of *T.b. gambiense* (Van Meirvenne et al., 1995), to these subjects, showed that an important fraction of SERO subjects were positive in areas of proven *T.b. gambiense* transmission (Jamonneau et al., 2010). Finally, a recent population genetics study in Guinea showed that the observed local incidence of HAT appears to be lower than the corresponding effective clonal population size, probably because many hosts remain unnoticed (Koffi et al., 2009).

In this study, we used microsatellite markers to investigate the epidemiological significance of SERO individuals in comparison to confirmed HAT cases. More precisely, we were interested in examining these individuals for the presence of trypanosome DNA and genotyping any trypanosomes present to determine their relationship to local *T.b. gambiense* group 1 parasites. However some problems of amplification failures as already observed (Koffi et al., 2007) raised the question of the sensitivity of microsatellite markers when applied on DNA directly extracted from blood samples. Such problem became an important drawback of the

method when applied to SERO subjects for whom, low blood parasitaemia are suspected (i.e. not detectable by the parasitological methods). This is particularly true in Guinea where *T.b. gambiense* blood parasitaemia are known to be very low (Camara et al., 2005, 2010). Indeed, in Côte d'Ivoire, amplification failures were observed in SERO for 119/168 (24 SERO/7 markers) trials. In Guinea, amplification failures were observed in HAT for 144/390 (65 HAT/6 markers) and in SERO for 106/120 (20 SERO/6 markers) trials. Improving the sensitivity of microsatellite genotyping directly from biological samples is a highly desirable goal to improve trypanosomes genotyping in subjects with low parasitaemia.

Nevertheless, taking into account the available genotypes for SERO, we have shown for the first time that parasite DNA extracted from SERO individuals belong to *T.b. gambiense* group 1, both in Côte d'Ivoire and Guinea. This observation thus confirms definitively that at least some SERO may be infected by *T.b. gambiense* group 1 as previously suspected by the use of others molecular methods.

Treatment of CATT positive individuals that are not confirmed by parasitological tests has for long been a controversial issue owing (i) to the toxicity of available drugs, (ii) to the constraints of the treatment schedules for otherwise healthy individuals and (iii) to the fact that WHO recommendations are to treat only in case of positive parasitology (WHO, 1998). However this situation was unsatisfactory since follow-up of cohorts of unconfirmed CATT positive subjects in Angola (Simarro et al., 1999) and Southern Sudan (Chappuis et al., 2004) showed that they had a high risk of developing HAT in the following year; in particular those exhibiting CATT-P end titers  $\geq 1:16$ . Thus, these authors recommended treatment for such subjects in populations with high disease prevalence such as in the highly endemic or epidemic foci encountered in Central Africa. For Inojosa et al. (2006), this strategy should not be applied when disease prevalence is low as it is the case in West Africa but also in many foci in Central Africa (Simarro et al., 2010). Hopefully, this would be also the case in the current highly endemic or epidemic foci in the context of the HAT elimination process (Simarro et al., 2008). In such low prevalence foci, most of the SERO subjects do not develop the disease. For example, in a weakly endemic focus of Côte d'Ivoire, only one patient was diagnosed as HAT during a two-year follow-up study of 77 SERO subjects (Garcia et al., 2000).

Our finding that trypanosomes, genotyped from the blood of SERO subjects, fit in *T.b. gambiense* group 1 is thus in line with the recommendation of treating serologically suspect HAT cases. However, one should bear in mind that the SERO phenotype is complex: (i) the CATT reaction may not be specific; (ii) these individuals may be in the very early phase of infection, such as it is observed in the epidemic foci of Central Africa for individuals displaying CATT end titers  $\geq 1:16$ , of which around half develop HAT in the following year; (iii) they may be asymptomatic carriers of parasites able to control blood parasitaemia to very low level for long periods of time, such as it is observed in West Africa in areas of lower endemicity (Garcia et al., 2006). Noteworthy it should be noted that an important fraction of CATT positive individuals in epidemic foci of Central Africa (half of CATT  $\geq 1:16$  individuals and all others) may also fall in this later category. Currently these individuals are left untreated by NCPs although they could act as a reservoir of parasite. Importantly in Guinea, from the five SERO from whom *T.b. gambiense* DNA could be evidenced, three were followed-up after one year, remained CATT positive but were not parasitologically confirmed. In Côte d'Ivoire three of such SERO could be followed-up in 2009 (5 years after initial diagnosis) with only one confirmed as HAT (data not shown). Further work is now required to better characterize the role played by such individuals in parasite transmission to help in the therapeutic decision

concerning this category of subjects. Anyhow, ethically and in terms of public health, treating SERO subjects will remain an open question until new well tolerated and less inconvenient (oral administration) treatments become available for the treatment of HAT. Before this uncertain issue (Brun et al., 2010), it was recently strongly suggested to use the very specific trypanolysis test to distinguish SERO who had contact with *T.b. gambiense* and should be followed up in control strategies (Jamonneau et al., 2010). Field applicable molecular methods such as loop-mediated isothermal amplification (Njiru et al., 2011) or nucleic acid sequence-based amplification with oligochromatography (Mugasa et al., 2009) could also be used in order to better characterize the parasitological status of SERO.

It is now becoming increasingly clear that infection by *T.b. gambiense* results in a wide diversity of outcomes in its human hosts ranging from the classically described fatal form to asymptomatic carriage (Checchi et al., 2008; Sternberg and Maclean, 2010). A question is thus to know whether these differences are linked to parasite or to host related factors. An important finding of this study is that we did not find any differences between parasites genotyped from SERO and HAT patients. Since *T.b. gambiense* group 1 was shown to be most likely a strictly clonal organism (Koffi et al., 2009), clustering of trypanosomes from SERO would have been expected if the SERO phenotypes were due to particular parasite strains. This is obviously not the case since parasites from SERO scatter in all the main branches of the NJtrees both in Guinea and Côte d'Ivoire. Our results are thus rather in favor of the existence of host factors involved in the control of infection. In this regard cytokine genes polymorphisms have been associated with HAT (Courtin et al., 2006, 2007). Further investigations are needed to explore more deeply the immune responses and host/parasite interactions in these aparasitemic seropositive subjects that have yet received poor attention. Understanding how individuals are naturally able to control parasite infection may lead to the identification of new therapeutic target for the treatment of HAT.

## Acknowledgements

We particularly acknowledge all the technicians from (i) the HAT team of the Institut Pierre Richet (Abidjan, Côte d'Ivoire), (ii) the HAT team of the Sinfra health district (Côte d'Ivoire), (iii) the Centre de Santé Urbain of Bonon (Côte d'Ivoire) (iv) the HAT team of the CIRDES (Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso) and (v) the HAT NCP of Burkina-Faso, Côte d'Ivoire and Guinea for their help in sampling. This study was supported by the Institut de Recherche pour le Développement (IRD), the Ministère Français des Affaires Étrangères (Fonds de Solidarité Prioritaire « Recherches en Entomologie, Formation et Stratégies de formation, le cas du paludisme et de la Trypanosomose Humaine Africaine »), and the World Health Organisation (WHO). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors would like to thank Bo Adebén for his advice in writing the manuscript. Annette MacLeod is a Wellcome Trust research career development fellow.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.meegid.2011.04.014.

## References

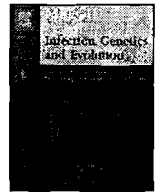
- Balmer, O., Palma, C., Macleod, A., Caccone, A., 2006. Characterization of di-, tri- and tetranucleotide microsatellite markers with perfect repeats for *Trypanosoma brucei* and related species. *Mol. Ecol. Notes* 6, 508–510.
- Biteau, N., Bringaud, F., Gibson, W., Truc, P., Baltz, T., 2000. Characterization of *Trypanosoma* isolates using a repeated coding sequence and microsatellite markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105, 187–202.
- Brun, R., Blum, F., Chappuis, F., Burri, C., 2010. Human African trypanosomiasis. *Lancet* 375, 148–159.
- Büscher, P., Ngoyi, D.M., Kabore, J., Lejon, V., Robays, J., Jamonneau, V., Bebronne, N., Van der Veken, W., Bieler, S., 2009. Improved models of mini anion exchange centrifugation technique (mAECT) and modified single centrifugation (MSC) for Sleeping Sickness diagnosis and staging. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e471.
- Camara, M., Kaba, D., Kagbadouno, M., Sanon, J.R., Ouendeno, F.F., Solano, P., 2005. Human African trypanosomiasis in the mangrove forest in Guinea: epidemiological and clinical features in two adjacent outbreak areas. *Med. Trop.* 65, 155–161.
- Camara, M., Camara, O., Iboudo, H., Sakande, H., Kabore, J., N'Dri, L., Jamonneau, V., Bucheton, B., 2010. Sleeping sickness diagnosis: use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test. *Trop. Med. Int. Health* 15, 796–799.
- Checchi, F., Filipe, J.A., Barrett, M.P., Chandramohan, D., 2008. The natural progression of Gambiense sleeping sickness: what is the evidence? *PLoS Negl Trop. Dis.* 2, e303.
- Chappuis, F., Stivanello, E., Adams, K., Kidane, S., Pittet, A., Bovier, P.A., 2004. Card agglutination test for trypanosomiasis (CATT) end-dilution titer and cerebrospinal fluid cell count as predictors of human African trypanosomiasis (*Trypanosoma brucei gambiense*) among serologically suspected individuals in southern Sudan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 313–317.
- 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.
- Courtin, D., Argiro, L., Jamonneau, V., N'Dri, L., N'Gouessan, P., Abel, L., Dessein, A., Cot, M., Laveissière, C., Garcia, A., 2006. Interest of tumor necrosis factor- $\alpha$ -308 G/A and interleukin-10-592 C/A polymorphisms in human African trypanosomiasis. *Inf. Genet. Evol.* 6, 123–129.
- Courtin, D., Milet, J., Jamonneau, V., Yeminanga, C.S., Kumeso, V.K.B., Bilengue, C.M.M., Betard, C., Garcia, A., 2007. Association between human African trypanosomiasis and the IL6 gene in a Congolese population. *Inf. Genet. Evol.* 7, 60–68.
- Deborggrave, S., Büscher, P., 2010. Molecular diagnostics for sleeping sickness: what is the benefit for the patient? *Lancet Infect. Dis.* 10, 433–439.
- Dieringer, D., Schlotterer, C., 2002. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol. Ecol. Notes* 3, 167–169.
- Garcia, A., Jamonneau, V., Magnus, E., Laveissière, C., Lejon, V., N'Gouessan, P., N'Dri, L., Van Meirvenne, N., Büscher, P., 2000. Follow-up of card agglutination trypanosomiasis test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Côte d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population. *Trop. Med. Int. Health* 5, 786–793.
- Garcia, A., Courtin, D., Solano, P., Koffi, M., Jamonneau, V., 2006. Human African trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics. *Trends Parasitol.* 22, 405–409.
- Inojosa, W.O., Augusto, I., Bisoffi, Z., Josenando, T., Abel, P.M., Stich, A., Whitty, J.M., 2006. Diagnosing human African trypanosomiasis in Angola using a card agglutination test: observational study of active and passive case finding strategies. *BMJ* 332, 1479.
- Jamonneau, V., Bucheton, B., Kaboré, J., Iboudo, H., Camara, O., Courtin, F., Solano, P., Kaba, D., Kambire, R., Lingue, K., Camara, M., Baelmans, R., Lejon, V., Büscher, P., 2010. Immune trypanolysis is a marker for *Trypanosoma brucei gambiense* contact: applications for diagnosis and surveillance of sleeping sickness in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, 417.
- Kaba, D., Dje, N.N., Courtin, F., Oke, E., Koffi, M., Garcia, A., Jamonneau, V., Solano, P., 2006. The impact of war on the evolution of sleeping sickness in west-central Cote d'Ivoire. *Trop. Med. Int. 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. *Trop. Med. Int. Health* 4, 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.
- Koffi, M., Solano, P., Denizot, M., Courtin, D., Garcia, A., Lejon, V., Büscher, P., Cuny, G., Jamonneau, V., 2006. Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: a potential human reservoir of parasites? *Acta Trop.* 98, 183–188.
- Koffi, M., Solano, P., Barnabé, C., De Meeüs, T., Bucheton, B., N'Dri, L., Cuny, G., Jamonneau, V., 2007. Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei* ssp by microsatellite typing: new perspectives for the molecular epidemiology of human African trypanosomiasis. *Inf. Genet. Evol.* 7, 675–684.
- Koffi, M., De Meeüs, T., Bucheton, B., Solano, P., Camara, M., Kaba, D., Cuny, G., Ayala, F.J., Jamonneau, V., 2009. Population genetics of *Trypanosoma brucei gambiense*, the agent of sleeping sickness in Western Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 209–214.
- 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. *Bull. World Health Organ.* 78, 119–124.
- MacLeod, A., Tweedie, A., McLellan, S., Taylor, S., Hall, N., Berriman, M., El-Sayed, N.M., Hope, M., Turner, C.M.R., Tait, A., 2005a. The genetic map and comparative analysis with the physical map of *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* 33, 6688–6693.

- MacLeod, A., Tweedie, A., McLellan, S., Taylor, S., Cooper, A., Sweeney, L., Turner, C.M.R., Tait, A., 2005b. Allelic segregation and independent assortment in *T. brucei* crosses: proof that the genetic system is Mendelian and involves meiosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 143, 12–19.
- Magnus, E., Vervoot, Van Meirvenne, N., 1978. A card agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 58, 169–176.
- Mathieu-Daude, F., Tibayrenc, M., 1994. Isozyme variability of *Trypanosoma brucei* s.l.: genetic, taxonomic, and epidemiological significance. *Exp. Parasitol.* 78, 1–19.
- Morrison, L.J., Tait, A., McCormack, G., Sweeney, L., Black, A., Truc, P., Likeufack, A.C.L., Turner, C.M., MacLeod, A., 2008. *Trypanosoma brucei gambiense* Type 1 populations from human patients are clonal and display geographical genetic differentiation. *Inf. Genet. Evol.* 8, 847–854.
- 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.
- Mugasa, C.M., Laurent, T., Schoone, G.J., Kager, P.A., Lubega, G.W., Schallig, H.D.F.H., 2009. Nucleic acid sequence-based amplification with oligochromatography for detection of *Trypanosoma brucei* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 47, 630–635.
- Njiru, Z.K., Traub, R., Ouma, J.O., Enyaru, J.C., 2011. Matovu E. Detection of Group 1 *Trypanosoma brucei gambiense* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J. Clin. Microbiol.* 49, 1530–1536.
- Pays, E., Vanhollebeke, B., Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D.P., Perez-Morga, D., 2006. The trypanolytic factor of human serum. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 477–486.
- 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*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67, 684–690.
- Simarro, P.P., Ruiz, J.A., Franco, J.R., Josenando, T., 1999. Attitude towards CATT-positive individuals without parasitological confirmation in the African trypanosomiasis (*T.b. gambiense*) focus of Quiçama (Angola). *Trop. Med. Int. Health* 4, 858–861.
- Simarro, P.P., Jannin, J., Cattand, P., 2008. Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? *PLoS Med.* 5, 174–180.
- Simarro, P.P., Cecchi, G., Paone, M., Franco, J.R., Diarra, A., Ruiz, J.A., Fèvre, E.M., Courtin, F., Mattioli, R.C., Jannin, J.G., 2010. The atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *Int. J. Health Geogr.* 9, 57.
- 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 Côte d'Ivoire. *Acta Trop.* 82, 349–356.
- Sternberg, J.M., Maclean, L., 2010. A spectrum of disease in human African trypanosomiasis: the host and parasite genetics of virulence. *Parasitology* 137, 2007–2015.
- Takezaki, N., Nei, M., 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144, 389–399.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Van Meirvenne, N., Magnus, E., Buscher, P., 1995. Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop.* 60, 189–199.
- WHO, 1998. La trypanosomiase africaine: lutte et surveillance. Rapport d'un comité d'experts. In: Série de Rapports techniques, pp. 881.



Contents lists available at ScienceDirect

## Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)

## Population genetic structure of Guinea *Trypanosoma brucei gambiense* isolates according to host factors

Jacques Kaboré<sup>a</sup>, Annette MacLeod<sup>b</sup>, Vincent Jamonneau<sup>a,c</sup>, Hamidou Ilboudo<sup>a</sup>, Craig Duffy<sup>b</sup>, Mamady Camara<sup>d</sup>, Oumou Camara<sup>d</sup>, Adrien Marie Gaston Belem<sup>e</sup>, Bruno Bucheton<sup>a,c</sup>, Thierry De Meeûs<sup>a,c,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zones Subhumides (CIRDES), Unité de recherches sur les bases biologiques de la lutte intégrée, 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

<sup>b</sup> Wellcome Centre for Molecular Parasitology, University of Glasgow, Henry Wellcome Building of Comparative Medicine, 464 Bearsden Road, Glasgow G61 1QH, United Kingdom

<sup>c</sup> Institut de Recherche pour le Développement, Unité Mixte de Recherche IRD-CIRAD 177, Programme Santé Animale, TA 207/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

<sup>d</sup> Programme National de Lutte contre la Trypanosomose Humaine Africaine, Conakry, Guinée

<sup>e</sup> Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, 01 BP 1091 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

<sup>f</sup> CNRS, Délégation Languedoc-Roussillon, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 December 2010

Received in revised form 4 April 2011

Accepted 7 April 2011

Available online 14 April 2011

## Keywords:

*Trypanosoma brucei gambiense*

Genetic diversity

Clonality

Western Africa

Microsatellite markers

Genetic differentiation

Body fluids

Disease phase

## ABSTRACT

Human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is a major public health problem in sub-Saharan Africa and is due to the kinetoplastid parasite *Trypanosoma brucei gambiense* in West and Central Africa. The exact role of multiple infections, the basis of clinical diversity observed in patients and the determinism that leads trypanosomes into different body fluids of the host remain opened questions to date. In this paper we investigate, in three Guinean foci, whether strains found in blood, lymph or cerebrospinal fluid (CSF) or in patients at different phase of HAT (phase 1, early phase 2 and late phase 2) are representative of the focus they belong to. Amplifications of parasites directly from body fluids led to substantial amounts of allelic drop outs, especially so for blood and CSF samples, which required data recoding of all homozygous sites into missing data. While controlling for geography, date of sampling and patient's phase of the disease, we found no effect of body fluids in the genetic structure of *T. b. gambiense* despite the presence of mixed infections. On the contrary, we found that the strains found in patients in different phase of the disease differed genetically, with early phase patients being more likely to be infected with more recent strains than patients at a more advanced phase of the disease. Thus, the combination of date of sampling and patient's status represents a parameter to be controlled for in population genetic structure analyses. Additional studies will also be required to explore further the phenomenon of mixed infections and its consequences.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is a major public health problem in sub-Saharan Africa. The pathogenic agent is *Trypanosoma brucei*, a diploid protozoan parasite transmitted by tsetse flies. This species has been subdivided into three morphologically identical subspecies on the basis of extrinsic criteria including host range, geographical distribution and clinical features: *T. b. gambiense* is responsible of a chronic form in West and Central Africa and *T. b. rhodesiense* causes acute infection in

humans in East and Southern Africa, whereas the third subspecies, *T. b. brucei*, is not infective to humans (Hoare, 1972). Thanks to molecular biology and genetic analyses, it is now an acknowledged fact that this definition "does not reflect the reality" (MacLean et al., 2007) and the only *T. b. gambiense* group 1 (Gibson, 1986) can be considered as a distinct genetic entity. This genetically homogeneous group is composed by stocks isolated from humans in West and Central Africa (Gibson, 2007) but also from wild and domestic animals suggesting the existence of an animal reservoir (Mehlitz et al., 1982; Simo et al., 2008). Furthermore, an important clinical diversity was observed in patients infected by stocks belonging to this group (Garcia et al., 2006). The role of *T. b. gambiense* group 1 genetic polymorphism in the diversity of responses to HAT infections remains an open question. Furthermore, mixed infection with at least two genotypes in a same patient seems to be widespread (Jamonneau et al., 2003; Koffi et al., 2007) and such

\* Corresponding author at: Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zones Subhumides (CIRDES), Unité de recherches sur les bases biologiques de la lutte intégrée, 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

E-mail address: [thierry.demeeus@ird.fr](mailto:thierry.demeeus@ird.fr) (T. De Meeûs).

infections have been suspected to be associated with low parasitaemia in asymptomatic patients (Jamonneau et al., 2004).

In HAT, trypanosomes can be found in three different biological fluids: blood, lymph and cerebrospinal fluid (CSF). The localization of trypanosomes in one of these three body fluids is correlated with the progression and the stage of the disease. Indeed, HAT begins with a hemo-lymphatic phase (first or early stage) during which the parasite proliferates in the blood and the lymph, to a meningo-encephalitic phase (second, late or advanced stage) corresponding to invasion of the central nervous system. An important field observation in HAT is that a wide range of infection outcomes can occur upon infection of humans by *T. b. gambiense*: whereas a rapid invasion of the central nervous system occurs in some individuals (acute forms), stage one of the disease may last for years in others and it is not yet well understood whether this is due to particular strains having a particular tropism for CSF or to host related factors (Sternberg and Maclean, 2010; Bucheton et al., in press). The presence in the same patient of different genotypes of trypanosomes in blood and in CSF has already been suspected (Truc et al., 2002). As shown in Chagas disease (Valadares et al., 2008), a differential tissue tropism can also be suspected in HAT.

Because of their small size, location, biology and behavior, direct observation of trypanosomes population biology is almost impossible. Thus the ecology, reproductive modes and/or strategies, dispersal and effective population sizes can mainly be assessed by indirect methods using polymorphic molecular markers encompassed under the term molecular epidemiology (Tibayrenc, 1998; De Meeüs et al., 2007). The knowledge of the parasite biological parameters mentioned above is of crucial importance for a better understanding of the epidemiology of disease and to define sustainable control strategies. However, an accurate estimation of these parameters requires taking into account in the analysis factors having an impact on the distribution of genetic variation in parasite populations such as do the temporal and spatial scale of the sampling (Koffi et al., 2009; Rougeron et al., 2009). Microsatellite markers were shown to be polymorphic enough to study the genetic diversity among *T. b. gambiense* group 1. It was then suggested that such markers could offer new perspectives in studying the role of *T. brucei* s.l. genetic polymorphism in the diversity of responses to HAT infections (Koffi et al., 2007). Moreover, microsatellite markers were confirmed to be sensitive enough to be applied to *T. brucei* profiling directly from biological samples (Morrison et al., 2007) thus avoiding time costly amplification either *in vivo* or *in vitro* steps.

In this study, we use a population genetic approach based on microsatellite markers to test the genetic homogeneity of stocks across different biological fluids and different patient status regarding the stage of the disease and controlling all these with site and date of sampling since a spatio-temporal differentiation was recently observed (Koffi et al., 2009). To our knowledge, this is the first time that such parameters are taken into account all together in a population genetics survey of *T. brucei* or even of other trypanosomatid parasites. Here we show no influence of body fluids but a significant effect of the interaction between the date of sampling and phase of the disease. We conclude that date and phase of the disease require to be controlled for in population genetics analyses and that the consequences of mixed infections will require further investigations.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area, sample collection and ethical considerations

Trypanosome samples were taken from HAT active foci (Dubreka, Boffa and Forecariyah) in the coastal mangroves area in Guinea (Camara et al., 2005; Courtin et al., 2010) between November 2007 and April 2009. All samples (0.5 ml blood, 10 µl

lymph node, if presence, of enlarged cervical node and 0.5 ml CSF collected in 1.5 ml microcentrifuge tube and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use) were collected during active surveillance conducted by the national HAT control programs (NCP) according to the Guinean HAT diagnostic procedures. No samples other than those collected for routine screening and diagnostic procedures were collected for the purposes of the present study. All participants were informed of the objective of the study in their own language and signed a written informed consent form. Children less than 12 years old were excluded. For participants between 12 and 18 years of age, informed consent was obtained from their parents.

### 2.2. Diagnostic PCR

DNA extraction was performed using the DNeasy<sup>®</sup> Tissue kit (Qiagen). A PCR using the highly sensitive TBR1/2 primers, which target a multicopy sequence specific to *Trypanozoon* (Moser et al., 1989) was performed with the DNA samples as described in (Koffi et al., 2006). Only TBR1/2 positive DNA were used for subsequent microsatellite analysis.

### 2.3. Microsatellite genotyping

We used six nested oligonucleotide primers for microsatellite markers Ch5/JS2, Ch1/18 (MacLeod et al., 2005), M6C8 (Biteau et al., 2000), Misatg4, Micbg5, Micbg6 (Koffi et al., 2007). The chromosome number on which these microsatellite loci are located is indicated in Supplementary Table S1. 1 µl of blood extracted DNA was used as template for PCR, in a volume of 10 µl. Nested PCR amplifications were carried out using the following conditions, PCR buffer (45 mM Tris-HCl pH 8.8, 11 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6.7 mM 2-mercaptoethanol, 4.4 µM EDTA, 113 µg per ml BSA, 1 mM of each of the four deoxyribonucleotide triphosphates), 1 µM of each primer, and 0.1 unit of Taq polymerase (ABgene) per 10 µl reaction. Nested PCR conditions for all markers for both rounds were 28 cycles of 50 s at  $95^{\circ}\text{C}$ , 50 s at  $55^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $65^{\circ}\text{C}$ . 1 µl of a 1/280 dilution of the first round product was used as template in the second round PCR. One primer out of every second round pair for the nested PCR amplification of microsatellite markers included a 5'-FAM or HEX modification, allowing size separation of products on a capillary-based sequencer (ABI 3100 Genetic Analyser; Applied Biosystems). A set of ROX-labelled size standards (GS400HD markers; Applied Biosystems) was included in each sample, allowing determination of PCR amplicon size to the level of 1 bp using Peak Scanner V1.0 software (Applied Biosystems). For each PCR plate and each marker, a negative control (ultrapure water) was included at the first amplification step and was used in the nested one.

### 2.4. Data analyses

Assuming this population of *T. b. gambiense* group 1 is clonal in accordance with a previous study from the same and other foci (Morrison et al., 2008; Koffi et al., 2009; Simo et al., 2010) we expect an excess of heterozygosity at most loci. However, many samples failed to amplify at some loci (blank genotypes) due to the low number of parasites detected directly from body fluids. Taking into account the high number of samples that failed to amplify, homozygous positions we interpreted here (for the purposes of comparison between body fluids) as the result of allelic dropout i.e. only one allele was successfully amplified. If this is true, we expect a negative relationship between number of amplification failures of both alleles at a locus (blanks) with the proportion of heterozygous positions. We thus tested this with a logistic regression under R (R-Development-core-team, 2008), with

number of phenotypically visible loci as a weight. We then recoded homozygous positions as potentially the result of amplification failure of an allele and therefore containing missing data. Parasite density is known to vary across body fluids (Camara et al., 2005). We thus compared the proportions of blank genotypes in each body fluid with exact Fisher's tests under the module "Struc" of Genepop v3.4 (Raymond and Rousset, 1995) with  $10^6$  randomizations.

The most widely used parameters to describe population structure are Wright's  $F$ -statistics (Wright, 1965). These parameters were estimated using Weir and Cockerham's unbiased estimators (Weir and Cockerham, 1984) under Fstat v2.9.4 (Goudet, 2003). In a three levels population structure (individual, subpopulation and total)  $F_{IS}$  is a measure of inbreeding of individuals relative to inbreeding in subpopulations and  $F_{ST}$  is a measure of inbreeding in subpopulations relative to total inbreeding.  $F_{IS}$  varies between  $-1$  (one heterozygote class fixed in subpopulations) to  $+1$  (all individuals are homozygous) and equals 0 under random mating. It is thus also a measure of local deviation from panmixia.  $F_{ST}$  varies between 0 (random distribution of alleles across subpopulations) to  $+1$  (all subpopulations fixed for one or another allele) and is thus also a measure of genetic differentiation between subpopulations. Highly polymorphic markers may lower the maximum possible  $F_{ST}$  value that can be estimated (Hedrick, 1999, 2005). The general parametric definition of  $F_{ST}$  is (Rousset, 2004)  $F_{ST} = (Q_S - Q_T)/(1 - Q_T)$ , where  $Q_S$  is the probability to sample two identical alleles from the same subpopulation and  $Q_T$  is the probability to sample two identical alleles from two different subpopulations. When subpopulations are totally isolated from each other, we expect  $Q_T \sim 0$ , and hence that  $F_{ST,max} = Q_S$ .  $Q_S$  can be estimated with  $1 - H_S$ , where  $H_S$  is Nei's unbiased estimate of genetic diversity (Nei and Chesser, 1983). A convenient standardized measure of  $F_{ST}$  can thus be provided by the quantity  $F_{ST}' = F_{ST}/F_{ST,max}$ .

Linkage disequilibrium tests were undertaken with Fstat v2.9.4 (Goudet, 2003). It uses randomizations (here 10,000) of alleles between loci within subsamples and computes the corresponding Log-likelihood ratio  $G$  and sum it across subsamples. The proportion of times this global randomized  $G$  is equal or higher than the observed one provides the exact  $P$ -value for a given locus pair. This procedure was shown to be the most powerful (De Meeüs et al., 2009). There are as many tests as possible pairs of loci (here 12 pairs because three locus pairs could not be analyzed because of polymorphism weakness). Under the null hypothesis, if one tests for the same null and alternative hypotheses a number of times  $k$ , at level of significance  $\alpha$ , then these  $k$  tests should follow a uniform distribution bounded to 0 and 1, mean 0.5 and  $\alpha k$  expected significant tests. If more than  $\alpha k$  are found (say  $k'$ ) this can come from a violation of the null hypothesis across the  $k$  tests series. This can be tested with a unilateral (alternative = greater) exact binomial test with  $k'$  success within  $k$  attempts and mean  $\alpha$  (e.g. see De Meeüs et al., 2009). The significance across the 12 locus pairs was then obtained with an exact binomial test with the number of success equal to the number of  $P$ -values  $\leq 0.05$ , number of trials equal to 12, significance level  $\alpha = 0.05$  and an alternative hypothesis:  $H_1 =$  there are more than 5% significant  $P$ -values across the 12 tests. This test was undertaken under R.

For all tests, we have classified each sample belonging to the same site (site), same period of time (date), patient disease status (status) and biological fluid (fluid) into as many subsamples. Another way to say it is that each site  $\times$  date  $\times$  status  $\times$  fluid combination was considered as a separate entity (subsampling) unless specified otherwise. We considered two different time periods, the first one corresponding to samples collected between November 2007 and May 2008 and the second one corresponding to samples collected between October 2008 and April 2009 (6 months each).

Patient status corresponded to three different kinds of patients as defined in the literature (Lejon et al., 2002). According to the number of lymphocytes found per  $\mu\text{l}$  of CSF, patients are classified as: earlier-stage S1 (0–5 cells/ $\mu\text{l}$ ), intermediate-stage S2 (6–20 cells/ $\mu\text{l}$ ) or late-stage S3 ( $>20$  cells/ $\mu\text{l}$ ). Finally, there were three kinds of biological fluids: blood, lymph from cervical lymph node and CSF. The differentiation between trypanosome isolates from different body fluids and between patient status, in each case considered separately, was measured with Weir and Cockerham (Weir and Cockerham, 1984) unbiased estimator of Wright's  $F_{ST}$  (Wright, 1965). It was tested with the 10,000 randomizations of individuals between subsamples using Robertson and Hill (1984) estimator over loci as the statistic. This was undertaken under Genetix v4.05 (Belkhir et al., 2004). The use of Genetix, instead of Fstat is here justified by the many missing data points due to allele drop out. Using Genetix, individuals are randomized, even if data are missing at some loci. We used Robertson and Hill estimator as a statistic because it is almost as powerful as the  $G$ -based test (which is not available in Genetix) (Goudet et al., 1996). This was undertaken between each possible relevant pair of subsamples (e.g. between blood and lymph node in homogeneous environment regarding patient status, period and site). We thus obtained several measures and tests for each comparison kind that we combined with Stouffer's  $Z$  test (Whitlock, 2005) for less than four tests and, for four or more tests, with the generalized binomial procedure of (Teriokhin et al., 2007) with the software Multitest V 1.2 (De Meeüs et al., 2009) as recommended (De Meeüs et al., 2009). Because many missing data can provide unreliable results in paired differentiation tests, all cases where a  $P$ -value = 0 was outputted were double checked individually (and in fact always lead to a much higher  $P$ -value) with the "Test sur permutations" procedure applied on the two subsamples of concern.

Clonality enhances linkage between loci and hence correlation between them. This might artificially increase or decrease differentiation. One way to check this is to undertake differentiation tests with multilocus genotypes (MLGs) as the different alleles of a unique locus (De Meeüs et al., 2002; Koffi et al., 2009).

To visualize the genetic relationships between the different subsamples we have computed a neighbor-joining tree based on Cavalli-Sforza and Edwards chord distance matrix (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967) computed under MSA (Dieringer and Schlötterer, 2002) with Mega 5 Beta#03 (Tamura et al., 2007) as recommended (Takezaki and Nei, 1996).

### 3. Results

#### 3.1. Microsatellite genotyping

In total, 119 patients were included in the study, 213 samples (blood, lymph node and CSF) gave a positive TBR1/2 PCR positive result. We found a substantial amount of mixed infections (10), i.e. presence of different multilocus genotypes (MLGs) in different body fluids, though the same MLGs were also often found in different body fluids (Table S1). In six of these individuals, the two genotypes found only differed at a single locus by two base pairs. Thus for these, a mutation event of the infecting parasite is the most likely hypothesis. No mixed infection could be found in the same body fluid (Table S1). Patient status, biological fluids, study sites, time periods and microsatellite genotyping of these 213 samples are given in Supplementary Table S1.

One of the drawbacks of examining parasites directly from body fluids is that the number of parasites is generally very low, resulting in frequent PCR amplification failure. Homozygous positions therefore could be a result of a failure to amplify one allele in a heterozygote. To test this, the relationship between blank genotypes (both alleles failed to amplify) and homozygous

positions was tested. The regression of the proportion of heterozygous sites as a function of missing data provided a highly significant result ( $P$ -value  $< 0.0001$ ), indicating that many homozygous positions are a result of allele dropout. It is also worthy of note that number of heterozygous sites is most of the time six (all loci) when the number of blanks is null. In addition, and to test further our hypothesis, we selected 20 DNA samples that were genotyped as homozygous with Micbg5 (the marker for which most homozygous genotypes were observed) and repeated the PCR with increasing amounts of DNA (2.5 and 5  $\mu$ l). Heterozygous genotypes were observed for 12 samples using 2.5  $\mu$ l of DNA and two other samples using 5  $\mu$ l. Thus most homozygous genotypes for this marker (14/20) were indeed the result of allelic dropout due to the low concentration of parasite DNA in the sample tested. We could thus safely assume that most homozygous loci in our data set are the result of allelic dropout and so have coded these as missing data for further analyses.

The proportion of blank genotypes was 0.04 for isolates from lymph nodes, 0.26 for isolates from blood and 0.54 for isolates from CSF. These values all significantly differ from each other (all  $P$ -values  $< 0.0001$ ) indicating that the lymph nodes contain a higher concentration of parasites than either blood or CSF.

### 3.2. Linkage disequilibrium

Across the 12 possible locus pairs, five pairs were significant at the 5% level of significance. This is much higher than the proportion expected under the null hypothesis of random mating ( $P$ -value = 0.0002). All tests stay significant after sequential Bonferroni correction and involve four of the six available loci. Subsamples are not very big and Bonferroni correction is highly conservative. It can thus be safely assumed that the linkage disequilibrium involves all loci and hence all the whole genome. If body fluid origin is ignored (see below), then nine pairs of loci become significantly linked that all stay significant after Bonferroni correction. These nine pairs involved all but locus Ch1/18, the less polymorphic one, and none of these significant pairs involved two loci on the same chromosome. Polymorphism indeed seemed to explain better which loci should be preferentially found in significant linkage.

### 3.3. Differentiation between body fluids

Examination of the parasite genotypes for the different body fluids (Table S1) indicates that in most cases identical genotypes are found in the different body fluids for each individual. However there are four notable exceptions where the genotypes in the different body fluids differ (Du57-2, Du226-6, Du188-6 and Du249-6) indicative of mixed infections with different parasite genotypes sequestering to different body fluids. However, examination of the population as a whole found no statistically significant genetic differentiation,  $F_{ST} = -0.037$  ( $P$ -value = 0.687) between blood and lymph strains,  $F_{ST} = -0.009$  ( $P$ -value = 0.629) between blood and CSF strains and  $F_{ST} = 0.022$  ( $P$ -value = 0.447) between lymph and CSF (see Table S2). In fact, among the 16 tests that could be handled, only one (i.e. 6%) was significant at the 5% level. This is exactly what is expected under the null hypothesis (if the tests are powerful enough) (exact binomial test,  $P$ -value = 0.556). Using MLGs confirmed this result (all  $P$ -values  $> 0.6$ ). This parameter (body fluid) was thus ignored in further analyses.

### 3.4. Differentiation between patient's statuses

Differentiation appeared significant between strains from patients belonging to different disease classes for all comparison types with a mean  $F_{ST}' \sim 0.106$ – $0.264$  (Table 1). Using MLGs confirmed that a significant genetic differentiation exists between

**Table 1**

Paired differentiation tests between strains from patients belonging to different status: S1 (phase 1 HAT patients), S2 (early phase 2 HAT patients) and S3 (advanced phase 2 HAT patients), in different sites and dates. Weir and Cockerham  $F_{ST}$  estimator ( $\theta$ ), corresponding  $P$ -value (in bold when significant), combined values, mean genetic diversity ( $H_s$ ) and standardized  $F_{ST}'$  ( $F_{ST}'$ ) are also given.

Comparison	Site	Date	$\theta$	$P$ -value	$H_s$	$F_{ST}'$
S1/S2	Boffa	D1	0.0162	0.2468	0.6470	0.0459
		D2	0.0882	0.0727	0.8324	0.5263
	Dubreka	D1	0.0442	<b>0.0034</b>	0.6453	0.1247
		D2	0.0054	0.1527	0.6516	0.0154
	Forecariah Combined	D1	0.1255	<b>0.0256</b>	0.7965	0.6164
			0.0559	<b>0.0063</b>	0.7145	0.1958
S1/S3	Boffa	D1	0.0092	0.1405	0.6525	0.0264
		D2	0.2398	0.1375	0.7699	1.0420
	Dubreka	D1	0.0325	<b>0.0068</b>	0.6641	0.0967
		D2	0.0150	0.1457	0.6447	0.0421
	Forecariah Combined	D1	0.0915	0.0616	0.8020	0.4620
			0.0776	<b>0.0335</b>	0.7066	0.2645
S2/S3	Boffa	D1	0.0196	0.1006	0.6521	0.0565
		D2	0.1476	0.1114	0.7133	0.5149
	Dubreka	D1	0.0009	0.3581	0.6217	0.0023
		D2	0.0006	0.0559	0.6388	0.0016
	Forecariah Combined	D1	0.0126	0.1638	0.6262	0.0336
		D2	0.0290	0.1130	0.7712	0.1266
		0.0350	<b>0.0214</b>	0.6705	0.1064	

strains from S1 and S3, from S2 and S3 but not between strains from S1 and S2 (see Supplementary Table S3). Although  $F_{ST}'$  values are quite high it is noteworthy that most  $P$ -values are not very low, which testifies of the great variance in the signal.

### 3.5. Temporal differentiation

Temporal differentiation test results are given in Table 2 and, with a mean  $F_{ST}' = 0.12$  (combined  $P$ -value = 0.037), provide results similar to those observed with patient's disease status. Temporal differentiation appears weaker than in Koffi et al. (2009) which is not unexpected as the maximum temporal distance in our data was of approximately 11–16 months while it was at a minimum of 24 months in Koffi et al. (2009). Nevertheless, this confirms that both time and patient disease status indeed influence genetic apportioning and are probably correlated. Analyses with MLGs confirm this temporal differentiation (mean  $F_{ST}' = 0.24$ , combined  $P$ -value = 0.045). Although mean  $F_{ST}'$  values are quite high it is noteworthy that the combined  $P$ -value is not very low, which testifies again here of the great variance in the signal.

A glance at the NJTree in Fig. 1 shows that subsamples are primarily grouped according to geographical location with two main clusters (Boffa and Dubreka) and the more heterogeneous Forecariah subsamples distributed between these two. On the second rank of clustering is the combination of date of sampling

**Table 2**

Results of temporal differentiation tests in each focus  $\times$  status combination. Weir and Cockerham  $F_{ST}$  estimator ( $\theta$ ), corresponding  $P$ -value (in bold when significant), combined values,  $H_s$  and standardized measure of differentiation corrected for polymorphism  $F_{ST}'$  are also given.

Focus	Status	$\theta$	$P$ -value	$H_s$	$F_{ST}'$
Boffa	S1	0.1217	0.4519	0.7681	0.5248
	S2	0.0250	0.1670	0.7112	0.0866
	S3	0.1198	<b>0.0309</b>	0.6542	0.3464
Dubreka	S1	0.0000	0.3320	0.6726	0.0000
	S2	0.0100	0.0581	0.6243	0.0266
	S3	0.0017	0.2053	0.6362	0.0047
Forecariah	S2	-0.0209	0.5105	0.7409	-0.0807
	S3	0.0409	<b>0.0320</b>	0.6565	0.1191
	Combined	0.0373	<b>0.0309</b>	0.6830	0.1176

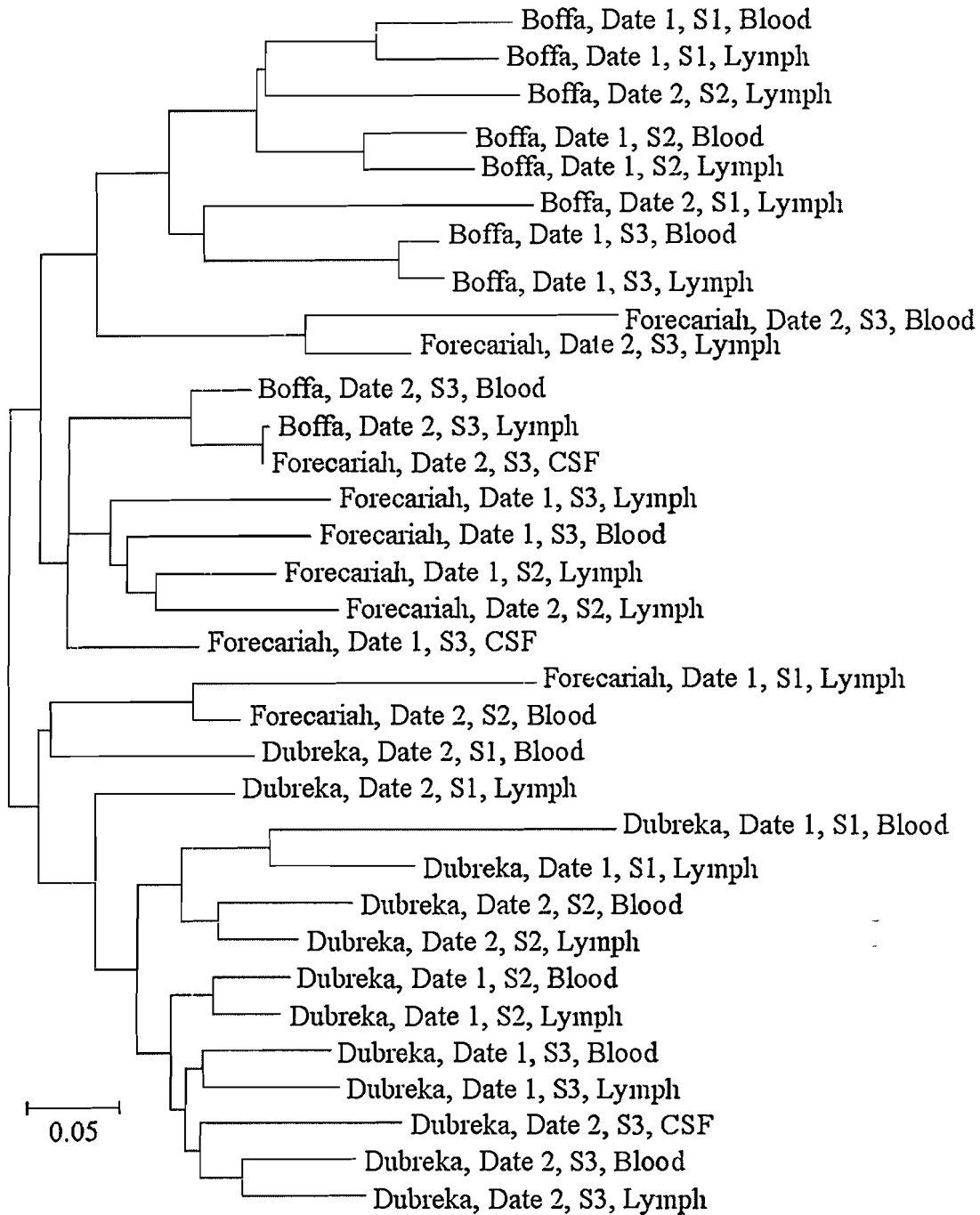


Fig. 1. Unrooted neighbor-joining tree describing the genetic apportioning between the different subsamples of *T. b. gambiense* in Guinea foci. Subsamples are defined according to geography (Dubreka, Boffa, and Forecariah), date of sampling (D1 and D2), patient's status according to disease phase: S1 (phase 1 HAT patients), S2 (early phase 2 HAT patients) and S3 (advanced phase 2 HAT patients) and body fluid: blood, lymph (from cervical lymph nodes) and CSF (cerebrospinal fluid) as defined in the text.

and patient's disease status within which biological fluids are finally nested.

We know from Koffi et al. (2009) and the present study that significant differentiation occurs with time. Early phase HAT may correspond to more recent infections than advanced phases on average, leading to a genetic signature. We thus chose to consider each date × status combination as real subsamples for  $F_{IS}$  computation.

$F_{IS}$  showed strongly negative values in all subsamples and across all loci with an overall mean and 95% confidence interval of  $F_{IS} \sim -0.615 [-0.757, -0.505]$ , i.e. the same value as obtained

previously in Guinea (Koffi et al., 2009), i.e.  $F_{IS} = -0.62 [-0.7, -0.35]$  with data where very few single picked individuals were observed.

#### 4. Discussion

All samples analyzed in this study were isolated using biological fluids (blood, lymph node and CSF) which avoid expensive, time and work consuming techniques usually used for *in vivo* or *in vitro* trypanosome isolation. It appeared that due to the low number of parasites obtained from these fluids direct amplification from body

fluids leads to technical problems. Indeed, many allelic dropouts seemed to occur. It is clear that such an issue will require our attention for further studies. It however appeared that the best body fluid to use is the lymph from the cervical lymph node, at least in Guinea, while the two others provided too many amplification failures, especially so the CSF where more than half of the data were missing. This can be attributed to the very low parasitaemia usually found in Guinea in blood and CSF, while trypanosomes seem to accumulate in lymph nodes (Camara et al., 2005).

Our decision to recode apparent homozygotes as missing data because potentially heterozygotes with a missing allele, provided an  $F_{IS}$  estimate rigorously identical to the one computed by Koffi et al. (2009) in Boffa and Dubreka samples isolated with classical techniques. It is thus probable that this decision led to more accurate estimates than with the raw data as also confirmed by the supplementary experiments that dismissed most homozygous genotypes. Nevertheless, we also undertook the differentiation tests (fluids, status and date) with the raw data and the results expectedly appeared the same.

Data analysis did not show any significant genetic differentiation between strains found in different biological fluids. This result can hardly be a consequence of low power of the tests as we indeed found 6% of significant tests during the procedure. We can thus safely conclude that no particular kind of strain is specific to any kind of body fluid. A bottleneck, as the one found between infection and invasion of salivary glands of tsetse flies (Oberle et al., 2010), would probably have been detected between blood and cerebrospinal strains through differentiation tests. Here, cerebrospinal fluid strains seem to be representative of what can be found in blood.

In the present study, microsatellite loci did not detect mixed infection in a given biological sample. This could come from the fact that over-represented genotypes are preferentially amplified compared to the others. Nevertheless, multiplying isolation attempts in time or using various isolation techniques, mixed infections of at least two genotypes in human were observed (MacLeod et al., 1999; Jamonneau et al., 2003; Koffi et al., 2007). Mixed infections were also observed in the present study (different trypanosome strains circulating in different fluids of the same patient) in at least four occasions. The role of such mixed infections in the diversity of responses to parasitic infections has been proved in Chagas disease (Lauria-Pires and Teixeira, 1997; Franco et al., 2003; Mantilla et al., 2010) or in animal trypanosomiasis (Masumu et al., 2009). Mixed infections have been suspected to be associated with low parasitaemia in asymptomatic HAT patients (Jamonneau et al., 2004). Additional studies will be required to explore this phenomenon further.

Differentiation between patients with different disease stages probably comes from an interaction with temporal differentiation. Indeed, it is probable that early stage (S1) patients were infected by more recent strains than intermediate stage (S2) or late stage (S3) patients. The duration of the first period may indeed last several years (MacLean et al., 2007). We however cannot totally exclude the possibility that some genotypes might be more likely and/or quickly lead to one stage of the disease or the other. But in that case, we would have likely found some significant differences between strains from different body fluids. This hypothesis is thus not better supported than the time dependent differentiation hypothesis.

Temporal differentiation appears weaker than in Koffi et al. (2009), which is not unexpected as the maximum temporal distance in our data was of approximately 11–16 months while it was at a minimum of 24 in Koffi et al. (2009). The likely interaction between patient's status and date of sampling, combined with the technical problems are probably important factors to explain the variance found for both signals hence explaining the absence of highly significant  $P$ -values. Nevertheless, this confirms that both

time and patient status indeed influence genetic apportioning and probably interact. This should really be taken care of in further studies.

### Acknowledgements

We are particularly grateful to the technicians of the HAT NCP of Guinea for their help and CIRDES HAT team. This work was supported by the Institut de Recherche pour le Développement, the French Ministry of Foreign Affairs (FSP/REFS Project) and the World Health Organization. Annette MacLeod is a Wellcome Trust Research Fellow. The authors thank Li Teulsé Négal for his strong support.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.meegid.2011.04.011.

### References

- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Biteau, N., Bringaud, F., Gibson, W., Truc, P., Baltz, T., 2000. Characterization of Trypanozoon isolates using a repeated coding sequence and microsatellite markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105, 185–201.
- Bucheton, B., MacLeod, A., Jamonneau, V., Human host determinants influencing *Trypanosoma brucei gambiense* infections outcomes. *Parasite Immunol. (Oxf.)*, in press.
- Camara, M., Kaba, D., KagbaDouno, M., Sanon, J.R., Ouendeno, F.F., Solano, P., 2005. Human African trypanosomiasis in the mangrove forest in Guinea: epidemiological and clinical features in two adjacent outbreak areas. *Med. Trop. (Mars.)* 65, 155–161.
- Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W.F., 1967. Phylogenetic analysis: model and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.* 19, 233–257.
- Courtin, F., Jamonneau, V., Camara, M., Camara, O., Coulibaly, B., Diarra, A., Solano, P., Bucheton, B., 2010. A geographical approach to identify sleeping sickness risk factors in a mangrove ecosystem. *Trop. Med. Int. Health* 1–9.
- De Meeüs, T., Renaud, F., Mouveroux, E., Reynes, J., Galeazzi, G., Mallié, M., Bastide, J.M., 2002. Genetic structure of *Candida glabrata* populations in AIDS and non-AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2199–2206.
- De Meeüs, T., McCoy, K.D., Prugnolle, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Boussès, S., Renaud, F., 2007. Population genetics and molecular epidemiology or how to “débusher la bête”. *Infect. Genet. Evol.* 7, 308–332.
- De Meeüs, T., Guégan, J.F., Teriokhin, A.T., 2009. MultiTest V.1.2, a program to binomially combine independent tests and performance comparison with other related methods on proportional data. *BMC Bioinform.* 10, 443.
- Dieringer, D., Schlötterer, C., 2002. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol. Ecol. Notes* 3, 167–169.
- Franco, D.J., Vago, A.R., Chiari, E., Meira, F.C.A., Galvão, L.M.C., Machado, C.R.S., 2003. *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp. Parasitol.* 104, 54–61.
- García, A., Courtin, D., Solano, P., Koffi, M., Jamonneau, V., 2006. Human African trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics. *Trends Parasitol.* 22, 405–409.
- Gibson, W.C., 1986. Will the real *Trypanosoma brucei gambiense* please stand up. *Parasitol. Today* 2, 255–257.
- Gibson, W.C., 2007. Resolution of the species problem in African trypanosomes. *Int. J. Parasitol.* 37, 829–838.
- Goudet, J., Raymond, M., De Meeüs, T., Rousset, F., 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144, 1933–1940.
- Goudet, J., 2003. Fstat (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Hedrick, P.W., 1999. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53, 313–318.
- Hedrick, P.W., 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59, 1633–1638.
- Hoare, C.B., 1972. *The Trypanosomes of Mammals*. A Zoological Monograph. Blackwell, Oxford.
- 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 the isolation method. *Infect. Genet. Evol.* 3, 143–149.
- 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, 693–702.
- Koffi, M., Solano, P., Denizot, M., Courtin, D., Garcia, A., Lejon, V., Büscher, P., Cuny, G., Jamonneau, V., 2006. Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: a potential human reservoir of parasites? *Acta Trop.* 98, 183–188.
- Koffi, M., Solano, P., Barnabé, C., De Meeüs, T., Bucheton, B., N'Dri, L., Cuny, G., Jamonneau, V., 2007. Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei* ssp by microsatellite typing: new perspectives for the molecular epidemiology of human African trypanosomiasis. *Infect. Genet. Evol.* 7, 675–684.
- Koffi, M., De Meeüs, T., Bucheton, B., Solano, P., Camara, M., Kaba, D., Cuny, G., Ayala, F.J., Jamonneau, V., 2009. Population genetics of *Trypanosoma brucei gambiense*, the agent of sleeping sickness in Western Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 209–214.
- Lauria-Pires, L., Teixeira, A.R.L., 1997. Superinfections with genetically characterized *Trypanosoma cruzi* clones did not aggravate morbidity and mortality in BALB/c mice. *J. Parasitol.* 83, 819–824.
- Lejon, V., Lardon, J., Kenis, G., Pinoges, L., Legros, D., Bisser, S., N'Siesi, X., Bosmans, E., Büscher, P., 2002. Interleukin (IL)-6, IL-8 and IL-10 in serum and CSF of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness patients before and after treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 329–333.
- MacLean, L., Odiit, M., MacLeod, A., Morrison, L., Sweeney, L., Cooper, A., Kennedy, P.G.E., Sternberg, J.M., 2007. Spatially and genetically distinct African trypanosome virulence variants defined by host interferon- $\gamma$  response. *J. Infect. Dis.* 196, 1620–1628.
- 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. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102, 237–248.
- MacLeod, A., Tweedie, A., McLellan, S., Taylor, S., Cooper, A., Sweeney, L., Turner, C.M.R., Tait, A., 2005. Allelic segregation and independent assortment in *T. brucei* crosses: Proof that the genetic system is Mendelian and involves meiosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 143, 12–19.
- Mantilla, J.C., Zafra, G.A., Macedo, A.M., González, C.I., 2010. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. *Hum. Pathol.* 41, 610–613.
- Masumu, J., Geysen, D., Van den Bossche, P., 2009. Endemic type of animal trypanosomiasis is not associated with lower genotype variability of *Trypanosoma congolense* isolates circulating in livestock. *Res. Vet. Sci.* doi:10.1016/j.rvsc.2009.03.003.
- 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 *Trypanosoma* stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Trop. Med. Parasitol.* 33, 113–118.
- Morrison, L.J., McCormack, G., Sweeney, L., Likeufack, A.C.L., Truc, P., Turner, C.M., Tait, A., MacLeod, A., 2007. Use of multiple displacement amplification to increase the detection and genotyping of *Trypanosoma* species samples immobilized on FTA filters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 1132–1137.
- Morrison, L.J., Tait, A., McCormack, G., Sweeney, L., Black, A., Truc, P., Likeufack, A.C.L., Turner, C.M., MacLeod, A., 2008. *Trypanosoma brucei gambiense* Type 1 populations from human patients are clonal and display geographical genetic differentiation. *Infect. Genet. Evol.* 8, 847–854.
- 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.
- Nei, M., Chesser, R.K., 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann. Hum. Genet.* 47, 253–259.
- Oberle, M., Balmer, O., Brun, R., Roditi, I., 2010. Bottlenecks and the maintenance of minor genotypes during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1001023.
- R-Development-core-team, 2008. R: A Language and Environment for Statistical Computing. In: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>. ISBN 3-900051-07-0.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. Genepop (Version-1.2) – population-genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86, 248–249.
- Robertson, A., Hill, W.G., 1984. Deviations from Hardy–Weinberg proportions – sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* 107, 703–718.
- Rougeron, V., De Meeüs, T., Hide, M., Waleckx, E., Bermudez, H., Arevalo, J., Ilanos-Cuentas, A., Dujardin, J.C., De Doncker, S., Le Ray, D., Ayala, F.J., Bañuls, A.L., 2009. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10224–10229.
- Rousset, F., 2004. Genetic Structure and Selection in Subdivided Populations. Princeton University Press, Princeton.
- Simo, G., Cuny, G., Demonchy, R., Herder, S., 2008. *Trypanosoma brucei gambiense*: study of population genetic structure of Central African stocks using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Exp. Parasitol.* 118, 172–180.
- Simo, G., Njiokou, F., Tume, C., Lueong, S., De Meeüs, T., Cuny, G., Asonganyi, T., 2010. Population genetic structure of Central African *Trypanosoma brucei gambiense* isolates using microsatellite DNA markers. *Infect. Genet. Evol.* 10, 68–76.
- Sternberg, J.M., MacLean, L.A., 2010. Spectrum of disease in Human African trypanosomiasis: the host and parasite genetics of virulence. *Parasitol. Int.* 137, 2007–2015.
- Takezaki, N., Nei, M., 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144, 389–399.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Teriokhin, A.T., De Meeüs, T., Guegan, J.F., 2007. On the power of some binomial modifications of the Bonferroni multiple test. *Zh. Obshch. Biol.* 68, 332–340.
- Tibayrenc, M., 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* 28, 85–104.
- 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, 52–55.
- Valadares, H.M., Pimenta, J.R., de Freitas, J.M., Duffy, T., Bartholomeu, D.C., Oliveira, R.d.P., Chiari, E., Moreira, M.C., Filho, G.B., Schijman, A.G., Franco, G.R., Machado, C.R., Pena, S.D., Macedo, A.M., 2008. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int. J. Parasitol.* 38, 839–850.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358–1370.
- Whitlock, M.C., 2005. Combining probability from independent tests: the weighted *Z*-method is superior to Fisher's approach. *J. Evol. Biol.* 18, 1368–1373.
- Wright, S., 1965. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to system of mating. *Evolution* 19, 395–420.

## RÉSUMÉ : Épidémiologie moléculaire de la maladie du sommeil en Afrique de l'Ouest

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil est une affection parasitaire à transmission vectorielle due à un euglénozoaire kinétoplastidé de l'espèce *Trypanosoma brucei*. La complexité de l'évolution clinique de la maladie est fréquemment évoquée allant de formes asymptomatiques à des formes aiguës. D'autre part, une diversité de réponses aux tests de dépistage (sains, trypanosomés, séropositifs) est rencontrée sur le terrain. Cette diversité de réponses à l'infection pourrait être due à la diversité génétique du parasite, qui est rencontré dans les différents fluides biologiques humains (sang, liquide céphalo-rachidien et suc ganglionnaire) et qui est responsable des différents stades de la maladie (phase précoce, phase intermédiaire et phase avancée). L'analyse de la biologie des populations de ce parasite peut être envisagée à l'aide de marqueurs moléculaires tels que les ADN microsatellites. Nous avons ainsi, à partir de prospections médicales menées en Côte d'Ivoire et en Guinée, caractérisé les trypanosomes directement à partir des différents fluides biologiques de sujets séropositifs et de sujets trypanosomés à différentes phases de la maladie. Il ressort de cette étude que certains sujets séropositifs sont porteurs de *T. b. gambiense* groupe I et pourraient agir comme réservoir de parasites et participer à la transmission et au maintien de la maladie en zone d'endémie. Ces sujets séropositifs requièrent donc une attention particulière dans les stratégies de lutte contre la maladie. En dépit de la mise en évidence d'infections mixtes, les résultats obtenus avec les microsatellites montrent, malgré de nombreux échecs d'amplification par PCR dus à la faible quantité d'ADN de trypanosomes présents dans les fluides biologiques, qu'il n'y a pas de différenciation génétique entre les souches trouvées dans différents fluides biologiques. Une différenciation génétique existe cependant entre souches de patients à des stades différents ou entre souches prélevées à des dates différentes. Cela montre que les trypanosomes présents dans chaque fluide biologique sont représentatifs du foyer et à ce titre, le suc ganglionnaire, où les échecs d'amplification sont les moins nombreux en Guinée, doit être préféré dans cette région d'Afrique. Cela implique aussi que les aspects spatio-temporels ainsi que le stade de la maladie doivent être contrôlés pour étudier la structure fine des populations de trypanosomes, ainsi que les techniques d'amplification par PCR, dont le succès à partir de souches amplifiés directement des liquides biologiques est aléatoire.

**Mots-clés :** Génétique des populations, *Trypanosoma brucei gambiense*, Afrique de l'Ouest, marqueurs microsatellites, séropositifs, épidémiologie, Maladie du sommeil.

## ABSTRACT: Molecular epidemiology of sleeping sickness in West Africa

Human African trypanosomiasis (HAT) is a parasitic disease caused by the kinetoplastid euglenozoa *Trypanosoma brucei*. The complexity of the clinical evolution of the disease is frequently mentioned ranging from asymptomatic to acute forms with a diversity of responses to the diagnostic tests (healthy subjects, HAT cases and seropositive subjects) encountered in the field. This diversity of responses to infection is partly due to the genetic diversity of the parasites that can be found in different biological fluids (blood, cerebrospinal fluid and lymph node). The population biology of such a parasite can be assessed through the study of molecular markers as microsatellite loci. From medical survey conducted in Côte d'Ivoire and Guinea, we have characterized the trypanosomes present in the different biological fluids of seropositive subjects and HAT patients from different stages of the disease (earlier stage, intermediate stage and late stage). It appears from this study that seropositive subjects are carriers of *T. b. gambiense* group I and may thus act as a reservoir of parasites. These seropositive subjects therefore require special attention in control campaign. The results obtained with microsatellites markers showed no genetic differentiation between trypanosomes found in the different biological fluids. However, we were able to show that a genetic differentiation exists between the strains from patients at different phase of the disease and between strains sampled at different dates. Consequently, the trypanosomes found in any of the three body fluids is representative of those circulating in the focus, the strains found in the lymph nodes proving, in Guinean foci, the most successful DNA amplifications due to a higher parasite concentration in that fluid in that part of Africa. Our results also show that the spatio-temporal scales and the stage of the disease are parameters that will have to be taken into account if precise population genetic studies are in order. We have also demonstrated the unstable nature of DNA amplification directly from body fluids, which will require to be improved by further studies.

**Key-words:** Population genetic, *Trypanosoma brucei gambiense*, West Africa, Microsatellites markers, Seropositives, epidemiology, Sleeping sickness.

[jacqueskabore@yahoo.fr](mailto:jacqueskabore@yahoo.fr)