

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE INTER - ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE
VETERINAIRES
(E.I.S.M.V.)



ANNEE : 2005

N°32

**EVALUATION DU DIAGNOSTIC PAR PCR DIRECTE ET PCR-ELISA
SUR LES ITS DES TRYPANOSOMES PATHOGENES DU BETAIL**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le **18 Juillet 2005**
devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de
Dakar
pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MEDECINE VETERINAIRE

(Diplôme d'Etat)

Par

BACHIR SOULEY KOUATO

Né le 15 Octobre 1975 à Niamey (Niger)

JURY :

Président :

M. Fafa CISSE

Professeur à la Faculté de Médecine, de
Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar

Directeur et Rapporteur de Thèse : **M. Ayayi Justin AKAKPO**

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

Membres :

M. Yamba Yalacé KABORE

Maître de Conférences Agrégé à l'E.I.S.M.V. de Dakar

Mme Rianatou Bada Alembedji

Maître de Conférences Agrégé à l'E.I.S.M.V. de Dakar

Co-directeur de Thèse :

M. Marc DESQUESNES

Chercheur au CIRDES de Bobo-Dioulasso



ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES ET MEDICINE VETERNAIRES DE DAKAR

**BP 5077 - DAKAR (Sénégal)
Tél. (221) 865 10 08 - Télécopie (221) 825 42 83**

COMITE DE DIRECTION

LE DIRECTEUR

▫ **Professeur François Adébayo ABIOLA**

LES COORDONNATEURS

- **Professeur Moussa ASSANE**
 Coordonnateur des Etudes

- **Professeur Malang SEYDI**
 Coordonnateur des Stages et
 de la Formation Post-Universitaires

- **Professeur Germain Jérôme SAWADOGO**
 Coordonnateur Recherches et Développement

Année Universitaire 2004-2005

PERSONNEL ENSEIGNANT

☞ PERSONNEL ENSEIGNANT EISMV

☞ PERSONNEL VACATAIRE (PREVU)

☞ PERSONNEL EN MISSION (PREVU)

PERSONNEL ENSEIGNANT CPEV (PREVU)

PERSONNEL ENSEIGNANT DEA- PA

PERSONNEL ENSEIGNANT

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PRODUCTIONS ANIMALES

CHEF DE DEPARTEMENT : Professeur Cheikh LY

SERVICE ANATOMIE-HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE

Serge N. BAKOU	Maître - Assistant
ISMAIL SY	Docteur Vétérinaire Vacataire
Moustapha AHAMET	Docteur Vétérinaire Vacataire
Galbert Simon NTEME ELLA	Docteur Vétérinaire Vacataire

SERVICE CHIRURGIE – REPRODUCTION

Papa El Hassane DIOP	Professeur
Alain Richi KAMGA WALADJO	Assistant
Mlle Nicole Edwige NEZZI	Monitrice

SERVICE ECONOMIE RURALE ET GESTION

Cheikh LY	Maître de Conférences agrégé
Kora Brice LAFIA	Moniteur

SERVICE PHYSIOLOGIE-PHARMACODYNAMIE-THERAPEUTIQUE

Moussa ASSANE	Professeur
Rock Allister LAPO	Assistant
Ibrahim Mahmat SALLE	Moniteur

SERVICE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Germain Jérôme SAWADOGO	Professeur
Yaméogo NONGASIDA	Assistant
Papa Serigne SECK	Moniteur
Alpha Amadou DIALLO	Moniteur

SERVICE ZOOTECHNIE-ALIMENTATION

Ayao MISSOHOU	Maître de Conférences Agrégé
Arsène ROSSILET	Assistant
Joachim TONONGBE	Moniteur

DEPARTEMENT DE SANTE PUBLIQUE ET ENVIRONNEMENT

CHEF DE DEPARTEMENT : Professeur LOUIS JOSEPH PANGUI

1. SERVICE HYGIENE ET INDUSTRIE DES DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALE (HIDAOA)

Malang SEYDI	Professeur
Mlle Bellancille MUSABYEMARIYA	Assistante
Khalifa Babacar SYLLA	Attaché de recherche
Sam Patrice MADJIKAM	Docteur Vétérinaire Vacataire
Olivier BAHORO-SARANZI	Moniteur

2. SERVICE MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-PATHOLOGIE INFECTIEUSE

Justin Ayayi AKAKPO	Professeur
Mme Rianatou ALAMBEDJI	Maître de Conférences Agrégée
Mlle Nadège DJOUPA MANFOUMBY	Docteur Vétérinaire Vacataire
Charles Olivier GOMSU DADA	Moniteur

3. SERVICE PARASITOLOGIE-MALADIES PARASITAIRES-ZOOLOGIE APPLIQUEE

Louis Joseph PANGUI	Professeur
Oubri Bassa GBATI	Assistant
Gael Darren MAGANGA	Moniteur

4. SERVICE PATHOLOGIE MEDICALE-ANATOMIE PATHOLOGIQUE- CLINIQUE AMBULANTE

Yalacé Yamba KABORET	Professeur
Yacouba KANE	Assistant
Mme Mireille KADJA WONOU	Assistante
Gana PENE	Docteur Vétérinaire Vacataire
Omar FALL	Docteur Vétérinaire Vacataire
Charles Benoît DIENG	Docteur Vétérinaire Vacataire
Mlle Ndéye Sokhna KEITA	Monitrice
Boubacar OUEDRAOGO	Moniteur

5. SERVICE PHARMACIE-TOXICOLOGIE

François Adébayo ABIOLA	Professeur
Félix Cyprien BIAOU	Maître - Assistant
Assiongbon TEKO AGBO	Attaché de recherche
Basile MIDINHOUEVI	Moniteur

DEPARTEMENT COMMUNICATION

CHEF DE DEPARTEMENT : Professeur YALACE YAMBA KABORET

SERVICES

BIBLIOTHEQUE

Mariam DIOUF Documentaliste

SERVICE AUDIO-VISUEL

Bouré SARR Technicien

OBSERVATOIRE DES METIERS DE L'ELEVAGE

Yao AKPO Docteur Vétérinaire Vacataire
Arsène MEBA MEFOUA Moniteur

DEPARTEMENT SCOLARITE

El Hadj Mamadou DIENG Vacataire
Franckline ENEDE Monitrice

PERSONNEL VACATAIRE (Prévu)

BIOPHYSIQUE

Mme Sylvie SECK GASSAMA Maître de Conférences Agrégée
Faculté de Médecine et de Pharmacie
UCAD

BOTANIQUE

Antoine NONGONIERMA Professeur
IFAN – UCAD

AGRO-PEDOLOGIE

Modou SENE Directeur de Recherche
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie
(ENSA THIES)

ZOOTECNIE

Abdoulaye DIENG Docteur Ingénieur
Enseignant à ENSA - THIES

Léonard Elie AKPO

Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

Kalidou BA

Docteur Vétérinaire
(Ferme NIALCOULRAB)

H I D A O A

NORMALISATION ET ASSURANCE QUALITE

Mme Mame S. MBODJ NDIAYE Chef de la division Agro-Alimentaire

PERSONNEL EN MISSION (Prévu)

ANATOMIE

Mohamed OUASSAT

Professeur

I.A.V. Hassan II (Rabat)
(Maroc)

TOXICOLOGIE CLINIQUE

A. EL HRAIKI

Professeur

I.A.V. Hassan II (Rabat)
(Maroc)

PATHOLOGIE MEDICALE

Marc KPODEKON

Maître de Conférences Agrégé
Université d'ABOMEY-CALAVI
(Bénin)

PARASITOLOGIE

Sahidou SALIFOU

Maître de Conférences Agrégé

Université d'ABOMEY-CALAVI
(Bénin)

BIOCHIMIE

Georges Anicet OUEDRAOGO

Professeur

Université de BOBO-DIOULASSO
(Burkina Faso)

HYDRAULIQUE PASTORALE

Oumarou DAWA

Docteur Vétérinaire

Inspecteur Général à Yaounde
(Cameroun)

PATHOLOGIE INFECTIEUSE

Mohamed BOUSLIKHANE

(I.A.V.) Rabat
(Maroc)

Institut Agronomique et Vétérinaire

REPRODUCTION

Hamidou BOLY

(Burkina Faso)

Institut de Recherche Agronomique
Ouagadougou

PERSONNEL ENSEIGNANT CPEV (Prévu)

MATHEMATIQUES

Sada Sory THIAM

Maître-Assistant

Faculté des Sciences et Techniques UCAD

PHYSIQUE

Issakha YOUM

Maître de Conférences

Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

Travaux Pratiques

André. FICKOU

Maître-Assistant

Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

CHIMIE ORGANIQUE

Abdoulaye SAMB

Professeur

Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

CHIMIE PHYSIQUE

Serigne Amadou NDIA YE

Maître de Conférences

Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

T.P. CHIMIE

Rock Allister LAPO

Assistant

EISMV - DAKAR

BIOLOGIE VEGETALE

Kandiourab NOBA

Maître-Assistant

Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

BIOLOGIE CELLULAIRE

Serge N. BAKOU

Maître - Assistant

EISMV - DAKAR

EMBRYOLOGIE ET ZOOLOGIE

Karamoko DIARRA

Maître de Conférences

Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

PHYSIOLOGIE ANIMALE

Moussa ASSANE

Professeur

EISMV – DAKAR



ANATOMIE COMPAREE DES VERTEBRES

Cheikh T. BA

Professeur
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**BIOLOGIE ANIMALE (T.P.)**

Serge N. BAKOU

Maître - Assistant
EISMV - DAKAR

Oubri Bassa GBATI

Assistant
EISMV - DAKAR**GEOLOGIE****FORMATIONS SEDIMENTAIRES**

Raphaël SARR

Faculté des Sciences et Techniques

Maître de Conférences
UCAD**HYDROGEOLOGIE**

Abdoulaye FAYE

Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**TRAVAUX PRATIQUES**

Mlle Franckline ENEDE

Monitrice

PERSONNEL ENSEIGNANT du D.E.A. – P.A.

Coordination des stages et formation post – universitaires.

Responsable du D.E.A. – PA : Professeur Malang SEYDI

MODULES

1- ZOOTECHNIE – ALIMENTATION

Responsable :

Ayao MISSOHOU

Maître de Conférences
EISMV-Dakar

Intervenants :

François A. ABIOLA

Professeur
EISMV - Dakar

Moussa ASSANE

Professeur
EISMV - Dakar

Yamba Y. KABORET

Professeur
EISMV - Dakar

Germain J. SAWADOGO

Professeur
EISMV – Dakar

Ayaho MISSOHOU

Maître de Conférences
EISMV - Daka

Serge N. BAKOU

Maître - Assistant
EISMV - Dakar

Arsène ROSSILET

Assistant
EISMV - Dakar

Abdoulaye DIENG

Ingénieur
ENSA- Thiès

Alpha BA

Docteur Vétérinaire
Ferme NIACOULRAB

Gana PENE

Docteur Vétérinaire Vacataire

2. SYSTEME DE PRODUCTION – ENVIRONNEMENT

Responsable :

Yamba Y. KABORET

Professeur
EISMV - Dakar

Intervenants :

Moussa ASSANE

Professeur
EISMV Dakar

Yamba Y. KABORET

Professeur
EISMV - Dakar

Léonard Elie AKPO	Maître de Conférences Faculté de Sciences et Techniques UCAD
Ayaho MISSOHOU	Maître de Conférences EISMV - Dakar
Abdoulaye DIENG	Ingénieur ENSA- Thiès
Oumarou DAWA	Docteur Vétérinaire Inspecteur Général MINEPIA à Yaoundé (Cameroun)
Moussa FALL	Docteur Vétérinaire
Lamine GUEYE	Docteur Vétérinaire

3- REPRODUCTION – AMELIORATION GENETIQUE

Responsable :

Papa El Hassan DIOP	Professeur EISMV- Dakar
---------------------	----------------------------

Intervenants :

Moussa ASSANE	Professeur EISMV Dakar
Papa El Hassan DIOP	Professeur EISMV - Dakar
Serge N. BAKOU	Maître - Assistant EISMV - Dakar
Alain Richi KAMGA WALADJO	Assistant EISMV - Dakar
Racine SOW	Chercheur à I.S.R.A. Dakar

4. ECONOMIE – STATISTIQUES- EPIDEMIOLOGIE

Responsable :

Cheikh LY	Maître de Conférences EISMV – Dakar
-----------	--

Intervenants :

Cheikh LY	Maître de Conférences EISMV – Dakar
Justin Ayayi AKAKPO	Professeur EISMV – Dakar
Mohamed BOUSLIKHANE	Professeur IAV – Rabat
Adrien MANKOR	Docteur Vétérinaire Chercheur

5. HYGIENE ET INDUSTRIE DES DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALE (HIDAOA)

Responsable :

Malang SEYDI

Professeur
EISMV - Dakar

Intervenants :

Malang SEYDI

Professeur
EISMV - Dakar

Rianatou BADA ALAMBEDJI

Maître de Conférences
EISMV - Dakar

Youssef KONE

Maître de Conférences
Université Nouakchott

Issakha YOUM

Maître de Conférences
Faculté de Sciences et Techniques
UCAD

Bellancille MUSABYEMARIA

Assistante
EISMV – Dakar

Serigne K. H. A. SYLLA

Docteur Vétérinaire
Attaché de Recherche
EISMV – Dakar

Adboulaye DIAWARA

Ingénieurs de la Direction
de l'Élevage. Dakar

Ousseynou Niang DIALLO

Mme Bénédicte SISSOKO : Consultante Cabinet Afrique Management Conseil (AMC)

Dédicaces

*A Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux, Gloire à Toi,
pour l'immense grâce dont Tu nous a comblé*

Au Prophète Mouhammad, Salut et Bénédiction sur lui

*A mon père et ma mère, Vos prières, Vos conseils, Vos
encouragements, Votre soutien, votre confiance nous ont beaucoup
aidé et nous aiderons toujours.*

*Je vous dédie ce modeste travail en témoignage d'amour filial et
de reconnaissance sincère. Que le bon Dieu vous accorde santé et
longue vie.*

*A Aïssa Salifou, vous êtes pour moi plus qu'une tante, mais plutôt une
maman. Trouvez à travers ce travail l'expression de toute mon
affection et ma profonde reconnaissance*

A la famille KOUATO Ibrahim

A la famille Moundio DIAWARA

A ma grand mère, tu restes ma chérie de tout le temps

A mes oncles et tantes

A mes frères et sœurs, cousins et cousines

A la famille CHEFFOU Amadou

A la famille WANE Bintou

A la famille Abdoulmouni ISSAKA dit Maïnassara

A notre Parrain Ndiaga GUEYE

A notre Professeur accompagnateur Papa El Hassan DIOP, - et à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.

A mes condisciples de la Promotion Ndiaga GUEYE , nous avons partagé des moments de peine, de stress mais également de Joie.

A tous mes amis,

A l'Union des Scolaires Nigériens à Dakar

A l'Amicale des Etudiants Vétérinaires Nigériens à Dakar

A l'Amicale des Etudiants Vétérinaires à Dakar

Au Niger, ma patrie

Au Sénégal et au Burkina Faso, mes pays hôtes

Remerciements

Au Directeur et à tout le corps enseignant de l'EISMV de Dakar

Au Directeur Général, Directeur scientifique du CIRDES et au Coordonnateur du PROCORDEL, pour nous avoir octroyé la bourse de stage et nous avoir permis de réaliser nos recherches dans des bonnes conditions.

Au Dr. Marc DESQUESNES, pour la constante disponibilité, le soutien et surtout pour l'année quotidien

A M. Adrien ZOUNGRANA , pour l'encadrement technique et également pour les week end sacrifiés à la PCR-ELISA

A mes aînés de l'Ecole Vétérinaire de Dakar au CIRDES : Dr. Talaki, Sow, Adakal, Dao

Aux Docteurs Dia, Bengaly, Sophie, Belemsaga, Seyni pour vos judicieux conseils

A Mathias, Biton, Sylla, Léopold, Bila, Sakandé, Laurent Sawadogo, Youl

A mes camarades stagiaires du CIRDES : Mariam, Léon, Aïcha, Vitouley... pour les bons moments passés ensemble.

A Lafia, Saïdou Alzouma, Aboulamali (mon petit), Saadou Moussa , Dr SY, Marie Barma, ... pour votre aide précieuse aide dans la mise en forme de ce document, infiniment merci !

A tous ceux qui ont de près ou de loin, nous aidé et soutenu

A NOS MAITRES ET JUGES

A notre Maître et Président de jury, Monsieur Fafa CISSE

Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie et d'Odontostomatologie de Dakar ;

Vous nous faites un grand honneur d'accepter de présider notre jury de thèse malgré vos multiples occupations.

Veillez trouver ici l'expression de notre sincère gratitude et de notre profond respect.

A notre Maître, juge et Directeur de thèse, Monsieur Justin Ayayi AKAKPO

Professeur à l'EISMV de Dakar ;

Vous avez accepté d'encadrer ce travail malgré vos multiples occupations. Nous retiendrons de vous votre simplicité, votre rigueur scientifique et surtout votre passion pour un travail bien fait.

Veillez trouver ici, l'assurance de notre sincère reconnaissance et de notre profonde admiration. Hommages respectueux.

A notre Maître et juge, Monsieur Yamba Yalacé KABORE

Professeur à l'EISMV de Dakar ;

C'est avec plaisir et spontanéité que vous avez accepté de juger ce travail. Vos qualités humaines et professionnelles nous serviront de guide.

Recevez ici toute notre gratitude et notre grande considération. Hommages respectueux.

A notre maître et juge, Madame Rianatou BADA ALAMBEDJI

Professeur à l'EISMV de Dakar ;

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Votre abord facile et la spontanéité avec laquelle vous avez répondu à notre sollicitation nous ont beaucoup marquées.

Veillez accepter nos sincères remerciements et notre profonde gratitude.

A notre Co-Directeur de thèse, Monsieur Marc DESQUESNES

Chercheur au CIRDES de Bobo-Dioulasso ;

Ce travail est le vôtre, vous nous avez assisté de près et guidé avec rigueur. Vos qualités intellectuelles et humaines votre amour du travail bien fait sera le souvenir le plus vivant que nous garderons de vous.

Sincères remerciement et profonde gratitude.

« Par délibération, la Faculté de Médecine, de Pharmacie, d'Odonto-stomatologie et l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine vétérinaires de Dakar ont décidé que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner aucune approbation. »

Liste des Abréviations

ABTS[®] : [2-2'-Azino-bis-(3-ethyBenzaThiazoline-6-Sulfonic acid)]

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

BLAST : Basic Local Alignement Sequences Tools

BSA: Bovine Serum Albumine

PSG: Phosphate Sodium Glucose

BET : Bromure d'Ethidium

OMS Organisation Mondiale de la Santé

CIRDES Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide

OIE Office International des Epizooties

FAO Food and Agriculture Organization

PLTA Programme de Lutte contre la Trypanosomose Animale

PATTEC : PanAfrican Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign

GVS Glycoprotéines Variables de Surface

PCR Polymerase Chain Reaction

ELISA : Enzyme Liked Immuno Sorbent Assay

HCT: Hematocrit Centrifuge Technique

BCM: Buffy Coat Method

DEAE-cellulose: DiEthyl Amino-Ethyl-cellulose

Sommaire

Pages

Introduction	1
Première partie : Etude bibliographique	4
Chapitre I : Caractères généraux des trypanosomes du bétail en Afrique.....	5
Introduction	1
Première partie : Etude bibliographique	4
Chapitre I : Caractères généraux des trypanosomes du bétail en Afrique	5
1. Les <i>Trypanosomatidae</i>	5
1-1. Morphologie.....	5
1-2. Structure et physiologie.....	7
1-3. Classification.....	8
2. Les principaux trypanosomes pathogènes du bétail en Afrique.....	10
2-1. Sous genre <i>Nannomonas</i>	10
2-1-1. <i>Trypanosoma (Nannomonas) congolense</i>	10
2-1-2. <i>Trypanosoma (Nannomonas) simiae</i>	11
2-2. Sous genre <i>Duttonella</i> : <i>Trypanosoma vivax</i>	11
2-3. Sous genre <i>Trypanozoon</i>	12
2-3-1. <i>Trypanosoma (Trypanozoon) brucei</i>	12
2-3-2. <i>Trypanosoma (Trypanozoon) evansi</i>	13
2-3-3. <i>Trypanosoma (Trypanozoon) equiperdum</i>	14
2-4. Sous genre <i>Pycnomonas</i> : <i>Trypanosoma suis</i>	14
3. Cycle évolutif	14
3-1. Chez la glossine.....	14
3-2. Chez l'hôte mammifère.....	15
4. Les vecteurs et modes de transmission.....	17
4-1. Les vecteurs à transmission mécanique.....	17
4-1-1. Les tabanidés.....	17
4-1-2. Les Stomoxyinés.....	18
4-1-3. Les hippoboscidés.....	18
4-2. Les vecteurs à transmission cyclique : Les glossines.....	18

5. Pathogénie.....	21
6. Le génome des trypanosomes.....	22
6-1. L'ADN nucléaire.....	22
6-2. L'ADN kinétoplastique (ADNk).....	23
7. Propriétés antigéniques.....	23
7-1. Les antigènes invariants.....	24
7-2. Les antigènes variables de surface.....	24
7-3. Variation antigénique.....	24
 Chapitre II : Trypanosomose des animaux domestiques.....	 26
1. Importance.....	26
2. Etude clinique.....	27
2-1. Symptômes.....	27
2-2. Lésions.....	29
3. Epidémiologie.....	30
4. Diagnostic.....	32
4-1. Diagnostic sur le terrain.....	32
4-1-1. Diagnostic épidémiologique.....	32
4-1-2. Diagnostic clinique et diagnostic différentiel.....	33
4-2. Diagnostic au laboratoire.....	33
4-2-1. Diagnostic chez l'hôte mammifère.....	34
4-2-1-1. Méthodes directes.....	34
4-2-1-1-1. Méthodes parasitologiques.....	34
4-2-1-1-1-1. Examens microscopiques directs.....	34
4-2-1-1-1-2. Examens microscopiques après concentration.....	35
4-2-1-1-1-3. Inoculation à des animaux de laboratoire.....	36
4-2-1-1-2. Méthodes moléculaires.....	37
4-2-1-1-2-1. Rappel sur la structure de l'ADN.....	37
4-2-1-1-2-2. Technique d'hybridation moléculaire.....	38
4-2-1-1-2-3. L'amplification en chaîne par polymérase ou PCR....	39
4-2-1-1-2-3-1. Définition, principe et réalisation.....	39

4-2-1-1-2-3-2.	Autre techniques de PCR.....	41
4-2-1-1-2-3-3.	Principales propriétés de la PCR.....	41
4-2-1-1-2-3-3-1.	Sensibilité et spécificité.....	41
4-2-1-1-2-3-3-2.	Avantages et champs d'application.....	42
4-2-1-1-2-3-3-3.	Limites.....	43
4-2-1-2.	Méthodes indirectes ou séro-immunologiques.....	43
4-2-1-2-1.	Test d'agglutination.....	44
4-2-1-2-2.	Réaction de fixation du complément.....	44
4-2-1-2-3.	Test d'Immunofluorescence indirecte (IFI).....	45
4-2-1-2-4.	Test ELISA.....	45
4-2-2.	Diagnostic chez le vecteur.....	46
4-2-2-1.	Chez les insectes hématophages vecteurs mécaniques.....	46
4-2-2-2.	Chez les glossines.....	46
5.	Moyens de lutte.....	47
5-1.	Chimiothérapie et chimioprophylaxie.....	48
5-1-1.	Chimiothérapie.....	48
5-1-2.	Chimioprophylaxie.....	48
5-2.	Lutte antivectorielle.....	49
5-3.	Lutte génétique par gestion des troupeaux.....	50
 Deuxième partie : Etude expérimentale.....		53
 Chapitre I : Présentation du cadre d'étude.....		54
 Chapitre II : Matériel et méthodes.....		56
1. Matériel.....		56
1-1. Matériel de laboratoire.....		56
1-2. Matériel biologique.....		56
1-2-1.	Les souches de trypanosomes témoins (ADN purifiés).....	56
1-2-2.	Les échantillons de terrain.....	57
1-2-2-1.	Les couches de globules blancs du sang des bovins (buffy coats).....	57
1-2-2-2.	Les organes de mouche.....	57

1-2-2-3.	Le fragment cible (les ITS des trypanosomes).....	58
1-3.	Réactifs et solutions de travail.....	60
1-3-1.	Pour la PCR directe.....	60
1-3-1-1.	Les nucléotides (dNTP).....	60
1-3-1-2.	Les oligonucléotides (amorces).....	60
1-3-1-3.	Le tampon de la PCR.....	61
1-3-1-4.	La Taq polymérase.....	61
1-3-1-5.	Le Diméthylsulfoxyde (DMSO).....	62
1-3-2.	Pour la révélation par ELISA.....	62
1-3-2-1.	Les dNTP et Digoxigénine.....	62
1-3-2-2.	Les anticorps anti-digoxigénine conjugués à la peroxydase.....	62
1-3-2-3.	Les sondes marquées à la biotine et solution d'hybridation.....	63
1-3-2-4.	La streptavidine.....	65
1-3-2-5.	La solution de lavage et tampon de blocage.....	65
2.	Méthodes.....	65
2-1.	Préparation des échantillons.....	65
2-1-1.	Les échantillons d'ADN purifiés.....	65
2-1-2.	Traitement au chelex® des échantillons de terrain.....	66
2-2.	Principe de la PCR.....	66
2-3.	Protocole de PCR classique.....	67
2-3-1.	Réalisation du mélange réactionnel.....	67
2-3-2.	Programme d'amplification.....	68
2-3-3.	Electrophorèse et visualisation des produits PCR.....	69
2-4.	Protocole de PCR-ITS avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S.....	70
2-4-1.	Réalisation du mélange réactionnel.....	70
2-4-2.	Programme d'amplification.....	70
2-4-3.	Electrophorèse, visualisation et interprétation des produits PCR.....	71
2-5.	PCR-ELISA.....	72
2-5-1.	Principe et méthodes.....	72
2-5-2.	Protocole de PCR-ELISA.....	74
2-5-2-1.	Réalisation du mélange réactionnel.....	74
2-5-2-2.	Programme d'amplification.....	75

2-5-2-3.	Détection des produits PCR sur gel d'agarose.....	75
2-5-2-4.	Révélation des produits d'amplification par ELISA.....	75
2-5-3.	Choix des sondes.....	76
2-5-4.	Evaluation des sondes.....	76
2-5-5.	Optimisation de la technique.....	77
 Chapitre III : Résultats et discussion.....		79
1.	Résultas.....	79
1-1.	Méthodes parasitologiques.....	79
1-2.	PCR classique.....	79
1-2-1.	Les échantillons sanguins de bovins.....	80
1-2-2.	Les organes de mouche.....	81
1-3.	PCR-ITS.....	82
1-3-1.	Les échantillons sanguins de bovins.....	82
1-3-2.	Les organes de mouche.....	84
1-4.	Analyse comparative des résultats PCR classique / PCR-ITS.....	86
1-4-1.	Cas d'infections à <i>Trypanosoma vivax</i>.....	86
1-4-1-1.	Buffy coats de bovins.....	86
1-4-1-2.	Organes de mouche.....	87
1-4-2.	Cas d'infections au genre <i>Nannomonas (Trypanosoma congolense)</i>.....	88
1-4-2-1.	Buffy coat de bovins.....	88
1-4-2-2.	Organes de mouche.....	88
1-4-3.	Cas d'infections au genre <i>Trypanozoon (T. brucei)</i>.....	89
1-5.	PCR ELISA.....	90
1-5-1.	Résultats de l'évaluation des sondes.....	90
1-5-1-1.	Sur des ADN purifiés.....	90
1-5-1-2.	Sur des échantillons de terrain	92

2. Discussion.....	93
2-1. Evaluation comparative PCR-ITS / PCR classique.....	93
2-1-1. Sensibilité.....	93
2-1-2. Spécificité.....	95
2-2. Spécificité et sensibilité des sondes nucléiques pour la PCR-ELISA.....	97
2-2-1. Spécificité.....	97
2-2-2. Sensibilité.....	97
2-3. Etude de coût.....	99
2-4. Avantages de la PCR directe et de la PCR-ELISA sur les ITS.....	102
Conclusion et recommandations.....	104
Références bibliographiques	107
Annexes	

dNTP : désoxy Nucléotide Triphosphate

dATP : désoxy Adénine Triphosphate

dCTP : désoxy Cytosine Triphosphate

dGTP : désoxy Guanine Triphosphate

dTTP : désoxy Thymine Triphosphate

Dig-dUTP : digoxigénine-11-2'-désoxyuridine

DMSO : Diméthylsulfoxyde

TAA : Trypanosomose Animale Africaine

Tv : *Trypanosoma vivax*

Tcs : *Trypanosoma congolense* type savane

Tcf : *Trypanosoma congolense* type forêt

Tb : *Trypanosoma brucei*

TBE : Tris Borate EDTA

Tm : melting Temperature

ITS : Internal Transcribed Spacer

Ig G : Immunoglobuline G

Ig M : Immunoglobuline M

CATT : Card Agglutination Trypanosomiasis Test

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1 : Les souches de trypanosomes utilisées.
- Annexe 2 : Amorces monospécifiques utilisées dans la PCR classique
- Annexe 3 : Caractéristiques des amorces Tryp 4R et Tryp 4S
- Annexe 4 : Caractéristiques des sondes retenues candidates pour le test ELISA
- Annexe 5 : Concentrations et volumes des réactifs pour la PCR classique
- Annexe 6 : Concentrations et volumes des réactifs pour la PCR avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S
- Annexe 7 : Concentrations et volumes des réactifs pour la PCR-ELISA
- Annexe 8 : Epreuve ELISA pour la révélation des produits d'amplification

LISTE DES FIGURES

	Pages
<u>Figure 1.1</u> : Schéma d'un trypanosome	6
<u>Figure 1.2</u> : Différents stades morphologiques des <i>Trypanosomatidae</i>	6
<u>Figure 2</u> : Ultrastructure des <i>Trypanosomatidae</i>	8
<u>Figure 3</u> : Classification des principaux trypanosomes des mammifères ...	9
<u>Figure 4</u> : <i>Trypanosoma congolense</i>	11
<u>Figure 5</u> : <i>Trypanosoma vivax</i>	12
<u>Figure 6</u> : <i>Trypanosoma brucei</i>	13
<u>Figure 7</u> : Cycle Biologique des <i>trypanosoma brucei sp</i>	16
<u>Figure 8</u> : Aire de répartition des glossines en Afrique.....	20
<u>Figure 9</u> : Structure de l'ADN	32
<u>Figure 10</u> Schéma de l'amplification par PCR nested de l'IST1 de l'ADN Ribosomal	41
<u>Figure 11</u> : Pièges et écrans pour la lutte contre les glossines	52
<u>Figure 12</u> : Localisation du CIRDES matérialisé par son logo sur la carte du Burkina Faso.....	55
<u>Figure 13</u> : Schéma d'une unité de transcription de l'ADNr	58
<u>Figure 14</u> : Schéma des ITS1 des principaux trypanosomes pathogènes.....	59
<u>Figure 15</u> : Les étapes de la PCR et cycle thermique.....	67
<u>Figure 16</u> : Symboles utilisés pour expliquer le principe de la PCR- ELISA	74
<u>Figure 17</u> : Résultats obtenus avec les amorces monospécifiques.....	80
<u>Figure 18</u> : Résultats obtenus avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S.....	83

<u>Figure 19</u> :	Cas d'infections à <i>T.v</i> et <i>T.c.s</i> détectées par les trois test de diagnostic	83
<u>Figure 20</u> :	Révélation sur gel d'agarose des produits PCR des échantillons d'ADN de références	89
<u>Figure 21</u> :	Révélation par ELISA des produits PCR des échantillons d'ADN	89
<u>Figure 22a</u> :	Photo d'un gel d'agarose.....	96
<u>Figure 22b</u> :	Photo d'un gel d'agarose	96

Introduction

La trypanosomose animale africaine (T.A.A) est une maladie parasitaire responsable d'une morbidité élevée et souvent d'une mortalité non moins importante chez le bétail. Cette maladie est à l'origine de pertes économiques considérables, elle entraîne notamment une forte chute de production de lait et de viande. De par ses conséquences néfastes, cette pathologie aggrave la pauvreté et l'insécurité alimentaire dans les pays où elle sévit de façon endémique. Particulièrement, dans les zones subhumides d'Afrique au sud du Sahara, la trypanosomose animale transmise par les glossines est un des obstacles majeurs au développement de l'élevage¹. L'enjeu de la lutte contre la TAA est de ce fait de taille, mais il existe un préalable : le diagnostic.

L'absence de signes pathognomoniques confère au diagnostic clinique, un caractère de simple suspicion. Le diagnostic de certitude de la trypanosomose, requiert forcément des techniques de laboratoire. De nos jours, le diagnostic de laboratoire de la TAA repose sur trois ensembles de techniques : parasitologiques, séro-immunologiques et moléculaires. Les techniques parasitologiques qui en révélant le parasite dans les liquides biologiques de l'hôte, sont des diagnostics de certitude, mais se heurtent à une insuffisance de sensibilité et de spécificité. Les méthodes sérologiques qui en mettant en évidence le plus souvent des anticorps, sont plutôt des diagnostics de présomption, car ces tests ne différencient pas les infections passées et guéries et les infections présentes.

Dans ce contexte, les outils de la biologie moléculaire ont apporté une révolution notoire dans les tests d'identification précise des trypanosomes. Il s'agit des sondes nucléiques et de l'amplification en chaîne par polymérase (ACP = PCR en anglais). La technique d'hybridation moléculaire par les sondes nucléiques a été appliquée chez les glossines (Gibson et al., 1988 ; Masiga D. K. et al., 1996) et les bovins (Nyeko et al., 1990). Elle tend à être remplacée par la technique de PCR.

¹ On estime que cette maladie menace plus de 48 millions de bovins dans les pays infestés par les glossines, le petits nombre de zones exemptes de glossines est surpeuplé par plus de 170 millions de bovins (FAO, 2002)

Depuis les travaux précurseurs de **Mooser et al. (1989)**, la PCR est de plus en plus utilisée pour le diagnostic des TAA. Comparativement aux méthodes parasitologiques et séro-immunologiques, cette technique bénéficie d'un gain substantiel en spécificité, sensibilité et rapidité (**Solano et al., 1997 ; Desquesnes et Davilà, 2002**). Dans cette technique, plusieurs régions de l'ADN ont servi de marqueurs moléculaires dont entre autre les séquences de l'ADN satellite (**Moser et al., 1989 ; Masiga et al., 1992 ; Lefrançois et al., 1999**), les mini exons de l'ADN nucléaire (**Desquesnes et Davilà, 2002**), la SSU-rDNA (**Geysen et al., 2002**) et les ITS (**Mc Laughlin et al., 1996 ; Desquesnes et al., 2001 ; Desquesnes et al., 2002 ; Guèye, 2003**).

Excepté les régions de l'ADN ribosomal, les autres marqueurs moléculaires ont permis le développement d'une PCR basée sur l'utilisation de couple d'amorces spécifiques d'espèces. Avec ces dernières la PCR demeure encore délicate à être utilisée comme outil de diagnostic de routine. Le coût de la PCR est en effet élevé (1\$ US par réaction) et la diversité des espèces pathogènes peut conduire chez les bovins par exemple à la réalisation de cinq réactions différentes pour un même échantillon. Pour lever cette contrainte économique de la PCR, l'utilisation des amorces polyspécifiques amplifiant l'ITS1 est actuellement l'une des options les plus explorées. Ainsi, à l'aide d'un couple unique d'amorces, la PCR permet l'identification et la distinction de toutes les espèces pathogènes de trypanosomes du bétail¹.

Au CIRDES, des amorces (Tryp 4R et Tryp 4S) pour la PCR directe sur les ITS de l'ADNr des trypanosomes, ont été mises au point et nécessitent d'être évaluées et validées. D'autre part pour la PCR-ELISA, des sondes d'ADN spécifiques aux ITS des principales espèces pathogènes ont été dessinées. Il conviendra d'adapter la technique de PCR sur les ITS à la PCR-ELISA, puis de l'évaluer et éventuellement de la valider pour le diagnostic.

Il résulte donc de nos travaux, l'évaluation de deux nouvelles techniques de diagnostic, à savoir la PCR directe et la PCR-ELISA sur les ITS des trypanosomes. Nous

¹ Sans toutefois pouvoir distinguer les espèces à l'intérieur du sous genre *Trypanozoon* (**Desquesnes et al., 2001**).

avons présenté dans une première partie, une revue bibliographique portant sur les généralités des trypanosomoses animales. Dans cette partie nous avons évoqué d'une part les caractères généraux des trypanosomes, la pathologie liée à ces parasites et les moyens de lutte et d'autre part les différentes méthodes de diagnostic de cette maladie. La deuxième partie intitulée « étude expérimentale » est consacrée à la présentation des protocoles de travail utilisés. Les résultats qui en découlent seront discutés afin d'aboutir à des recommandations et perspectives pour l'amélioration et l'utilisation optimale de ces nouvelles techniques de diagnostic.

Première partie : Etude bibliographique

Chapitre I : Caractères généraux des trypanosomes du bétail en Afrique

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés qui vivent dans le plasma sanguin, la lymphe et divers tissus de leurs hôtes. Ils se présentent sous une grande variété de forme et de taille suivant les genres. Ils sont principalement transmis par des insectes piqueurs, vecteurs à transmission cyclique (glossines) ou mécaniques (taons, stomoxes, etc.). Les trypanosomes appartiennent à la grande famille des *Trypanosomatidae* qui comporte plusieurs genres de parasites.

1. Les *Trypanosomatidae*

1-1. Morphologie

La forme la plus connue des *Trypanosomatidae* est celle des trypanosomes qui est illustrée par la figure 1.1. Les trypanosomes se présentent sous la forme d'une cellule plate, élancée et fusiforme avec une membrane ondulante plus ou moins enroulée autour du corps, d'où le nom de *trypanosoma* qui signifie « corps en vrille ». La membrane ondulante comporte à sa marge externe un filament constituant le flagelle qui chez certaines espèces se prolonge au-delà du corps en « flagelle libre ». La position du flagelle caractérise la variation de forme au cours du cycle évolutif pendant lequel le protozoaire passe par différents stades (fig. 1.2).

La taille des *Trypanosomatidae* varie de 2-3 μm pour les plus petits tels que les *Leishmania* à 120 μm chez certains trypanosomes de reptiles ou de mammifères.

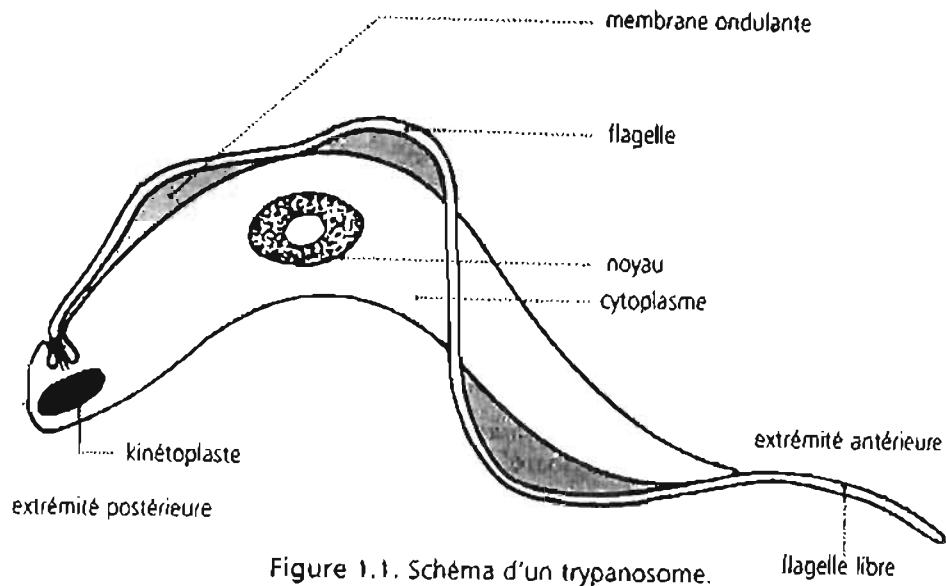


Figure 1.1. Schéma d'un trypanosome.

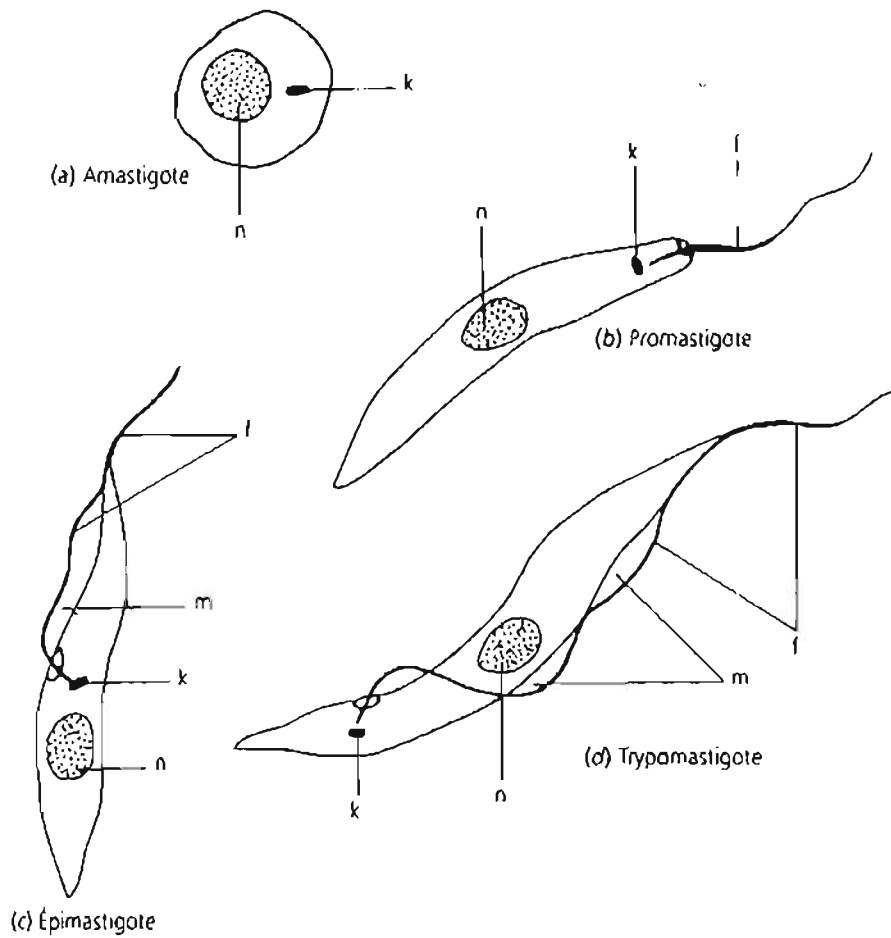


Figure 1.2 : Différents stades morphologiques des *Trypanosomatidae* (Itard, 2000)

k : Kinétoplaste, n : Noyau, m : Membrane ondulante, f : Flagelle.

1-2. Structure et physiologie

Comme tous les protozoaires, les *trypanosomatidae* sont des êtres vivants unicellulaires autonomes. Le corps cellulaire comprend une masse de cytoplasme qui contient des organites et des inclusions variés (fig. 2). La périphérie du cytoplasme est limitée par une paroi cellulaire. La microscopie électronique a permis d'affiner les connaissances sur la structure des *trypanosomatidae*.

Le noyau est entouré d'une double membrane perforée, il apparaît au microscope optique comme une vésicule sphérique ou ellipsoïde. Il renferme le karyosome ou nucléole et des granules de chromatine doublant la face interne de la membrane. La position du noyau est variable selon les formes ou stades évolutifs du parasite. Dans les formes trypanomastigotes, il est situé au centre ou dans la moitié antérieure. Le noyau contient de l'acide désoxyribonucléique (ADN) qui contrôle l'activité métabolique et les caractères morphologiques du parasite. On reconnaît, en plus d'autres structures classiques telles que l'appareil de golgi, le réticulum endoplasmique, les lysosomes.

Dans la cellule des *Trypanosomatidae*, on a aussi des structures particulières telles :

- La membrane ou périplasma constituée de trois couches dont l'interne et l'externe sont plus denses que la médiane.
- Le kinétoplaste situé près du corps basal du flagelle et à l'intérieure d'une grande mitochondrie, s'étend sur toute la longueur du corps du parasite.
- Le flagelle servant à la locomotion, est formé d'un axonème avec 9 paires de microtubules périphériques entourant deux microtubules centraux et d'un bâtonnet para-axial formé d'un réseau de filaments.

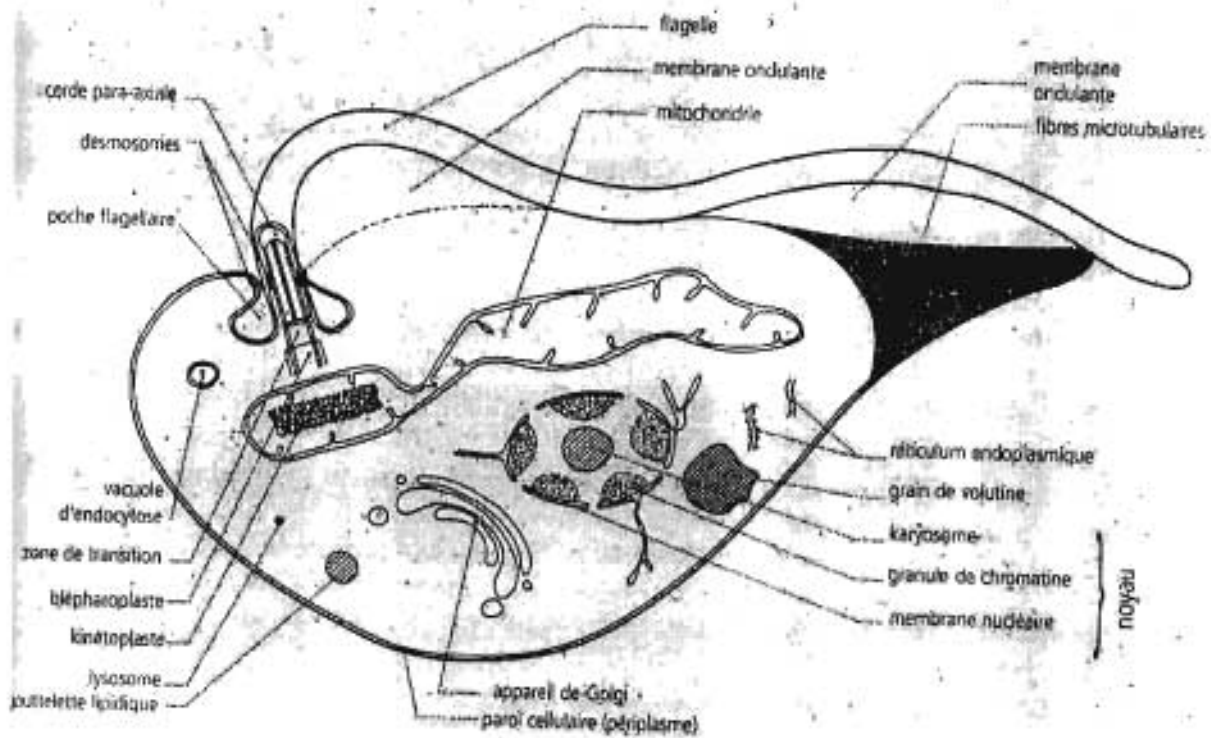


Figure 2 : Ultrastructure des *Trypanosomatidae* (Itard, 2000)

La nutrition des *Trypanosomatidae* s'effectue suivant un processus commun à de nombreuses cellules : l'endocytose. La reproduction se fait presque exclusivement par division asexuée ou scissiparité.

1-3. Classification

La famille des *Trypanomastidae* appartient au sous règne des *Protozoa*, à l'embranchement des *Sarcomastigophora*, à la classe des *Zoomastigophora* et à l'ordre des *Kinetoplastida*. Le genre *Trypanosoma* est l'un des principaux représentants de cette famille subdivisée en deux sections : *Stercoraria* et *Salivaria*. (Hoare, 1972) (fig. 3).

Les trypanosomes de la section des *Salivaria* (pour la plupart pathogènes du bétail) ont une évolution antérograde, c'est à dire qu'ils accomplissent leur cycle évolutif dans les portions antérieures du tube digestif (intestin moyen, proboscis et glandes salivaires) de leurs vecteurs. Leur transmission se fait cycliquement par inoculation avec la salive lors

de la piqûre par les glossines. Par contre les trypanosomes de la section des *Stercoraria* ont une évolution postérograde. Leur cycle évolutif s'effectue dans les portions postérieures de l'intestin du vecteur où se retrouvent les épimastigotes et les métatrypanosomes infectants. Par conséquent, leur transmission se fait par contamination par les souillures fécales et parfois cycliquement par les *Tabanidae*. A l'exception du trypanosome américain responsable de la maladie de Chagas (*T. cruzi*), les trypanosomes de la section des *Stercoraria* sont en majorité peu ou non pathogènes, en particulier pour le bétail, c'est le cas du sous genre *Megatrypanum* (*T. theileri*) qui interfère très souvent dans le diagnostic des trypanosomes.

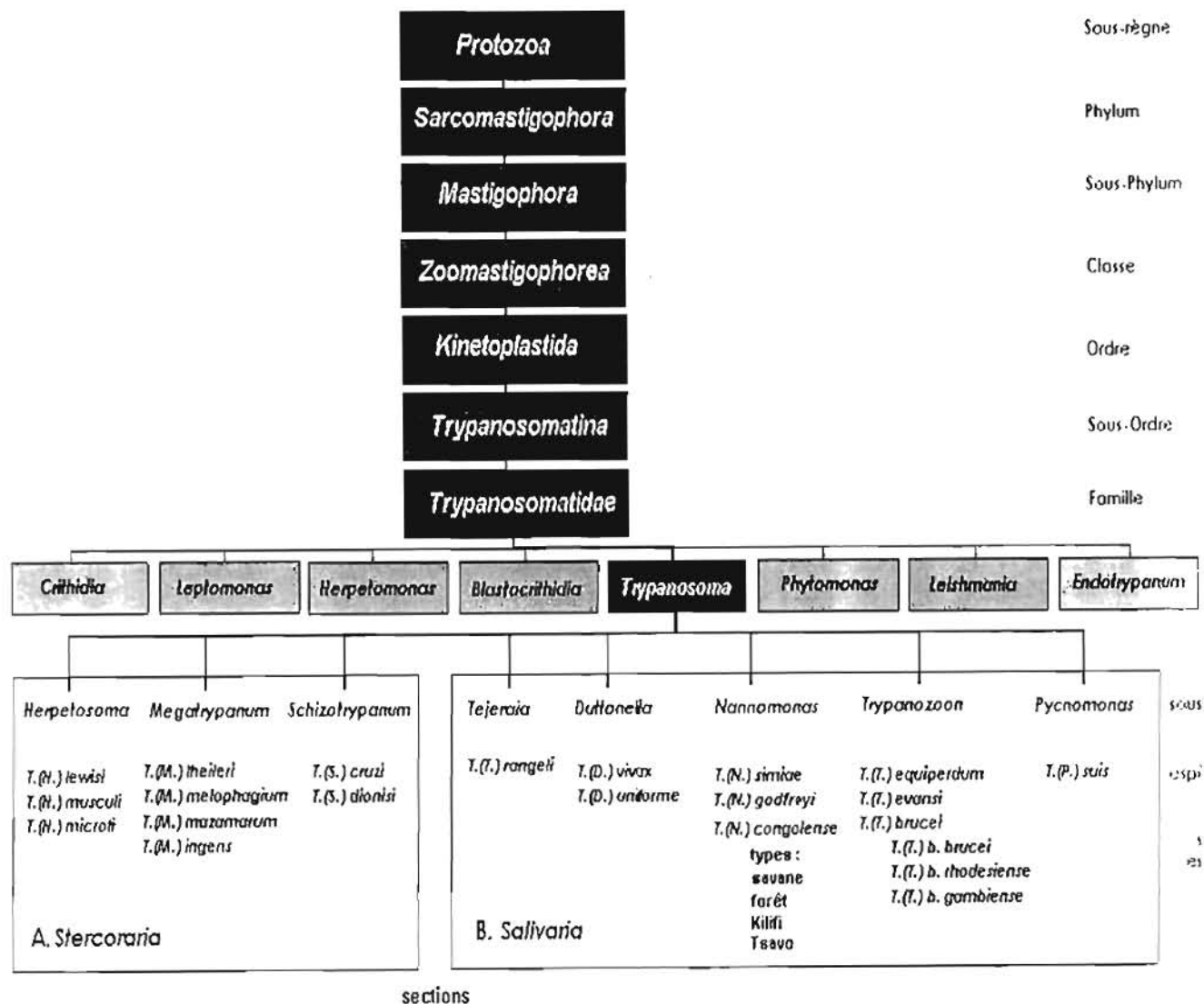


Figure 3 : Classification des principaux trypanosomes des mammifères. Source : OMS (1991)

2. Les principaux trypanosomes pathogènes du bétail en Afrique

La trypanosomose est une maladie dont l'étiologie est souvent complexe, du fait qu'elle est causée par plusieurs espèces de trypanosomes appartenant à la section des *Salivaria*. En Afrique au sud du Sahara, les parasites fréquemment rencontrés sont ceux des sous genres *Nannomonas* pour *T. congolense* et *T. simiae*, *Duttonella* pour *T. vivax*, *Trypanozoon* pour *T. brucei*, *T. evansi*, *T. equiperdum* et du sous genre *Pycnomonas* pour *T. suis*.

2-1. Sous genre *Nannomonas* (Hoare, 1964)

2-1-1. *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* (Broden, 1904)

Trypanosoma congolense est l'agent principal de la Nagana, par sa fréquence, sa pathogénicité et ses conséquences sur la productivité (Sidibé, 1996). IL est présent de façon endémique dans toute la zone de répartition des glossines confinées en Afrique (Moolo et al., 1999). Ce parasite a été découvert par Broden en 1904 dans du sang de mouton et d'âne à Léopolville en République Démocratique du Congo.

T. congolense est un petit trypanosome monomorphe et sans flagelle libre dans le sang des hôtes mammifères. Les outils de la biologie moléculaire ont permis de distinguer différents types de *T. congolense* (Majiwa et al., 1985), il s'agit du type « savane » rencontré dans les régions sèches d'Afrique de l'ouest et de l'est ; le type « forêt » rencontré dans les régions humides ou forestières ; le type « kilifi » (Kenya et Ouganda) et le type « tsavo » isolé au Kenya. La pathogénicité de ces parasites est variable selon l'espèce, voire le groupe de trypanosome rencontré (Bengaly, 2003).

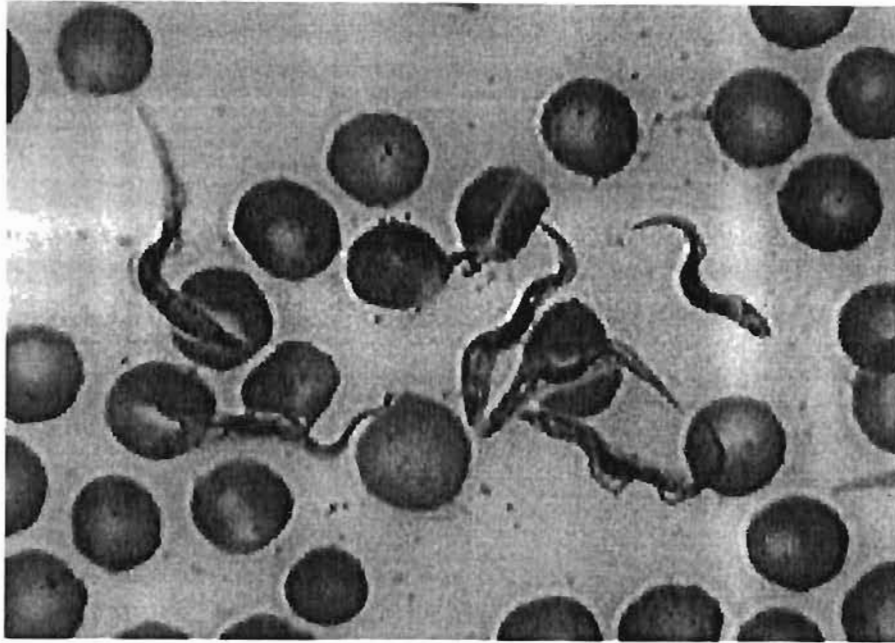


Figure 4 : *Trypanosoma congolense* (cliché : I. Sidibé)

2-1-2. *Trypanosoma (Nannomonas) simiae* (Bruce, 1912).

Isolé pour la première fois chez un singe au Nyassaland en 1912 par Bruce (Hoare, 1972) *T. simiae* a une morphologie proche de *T. congolense*, mais est pléomorphe. C'est le parasite spécifique aux *Suidae*, avec une pathogénicité très élevée pour le porc chez lequel la maladie est fatale en général. Le dromadaire est aussi très sensible à ce parasite.

2-2. Sous genre *Duttonella* (Chalmers, 1918) : *Trypanosoma vivax*

Trypanosoma vivax fut pour la première fois décrit en Afrique par Ziemann en 1905, chez une chèvre au Cameroun. Il est de taille moyenne et est reconnu en Afrique comme étant le plus virulent des trypanosomes pathogènes du bovin (Itard, 2000). *Trypanosoma vivax* est largement répandu en Afrique tropicale, dans toute l'aire de répartition des glossines. Il peut être transmis cycliquement et mécaniquement par les glossines et mécaniquement par d'autres insectes piqueurs comme les tabanidés, les stomoxes (Solano et al., 1997). Chez les bovins, il est à l'origine d'une infection asymptomatique ou chronique, aiguë ou suraiguë.

On rencontre également dans le sous genre *Duttonella*, *Trypanosoma uniforme* très semblable à *T. vivax*, mais plus court. Il est contrairement à *T. vivax* peu fréquent et moins virulent.

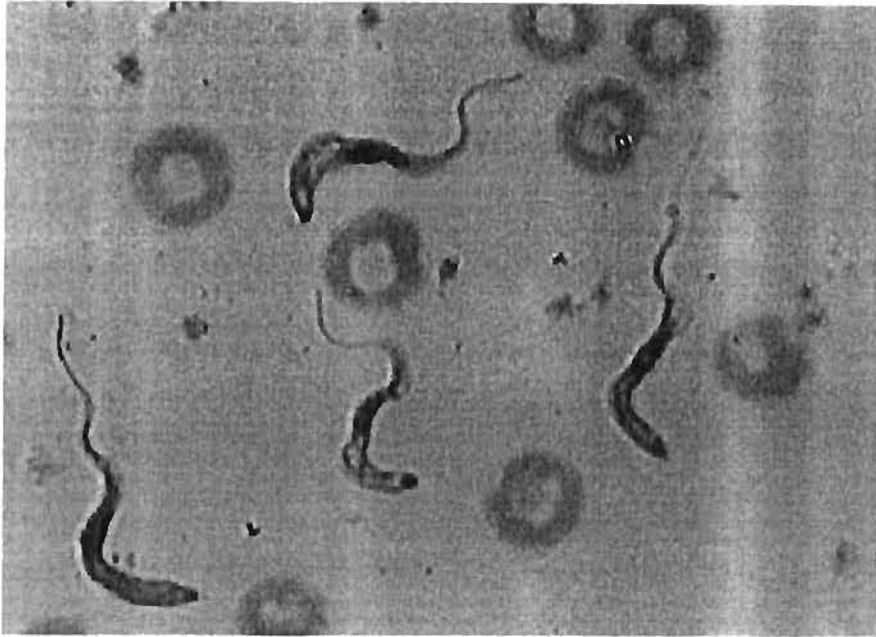


Figure 5 : *Trypanosoma vivax* (cliché : I. Sidibé)

2-3. Sous genre *Trypanozoon* (Lühe, 1906)

2-3-1. *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei* (Plimmer et Bradford, 1899)

Trypanosoma brucei est extrêmement polymorphe et se présente sous une forme courte dépourvue de flagelle, une forme intermédiaire avec un flagelle court et une forme longue à flagelle (plus fréquente). *T. brucei* est actuellement subdivisé en trois sous espèces qui sont morphologiquement très proches :

- *T. brucei brucei* est l'agent de la nagana, il est non pathogène pour l'homme, les équidés sont les hôtes les plus sensibles. Son importance pathologique est relativement moindre chez le bétail en comparaison avec *T. vivax* et *T. congolense*. Il infecte facilement les rongeurs de laboratoire.

- *T. brucei gambiense* est pathogène pour l'homme en Afrique occidentale et centrale où il sévit généralement de façon chronique. Contrairement à *T. brucei brucei*, il infecte difficilement les rongeurs de laboratoire.

- *T. brucei rhodesiense* est l'agent de la maladie du sommeil chez l'homme en Afrique orientale et australe. Il provoque une infection plus virulente et plus aiguë que *T. brucei gambiense*. Il est aussi facilement infectant pour les rongeurs de laboratoire.

Les sous espèces de *T. brucei* sont toutes transmises cycliquement par les glossines.

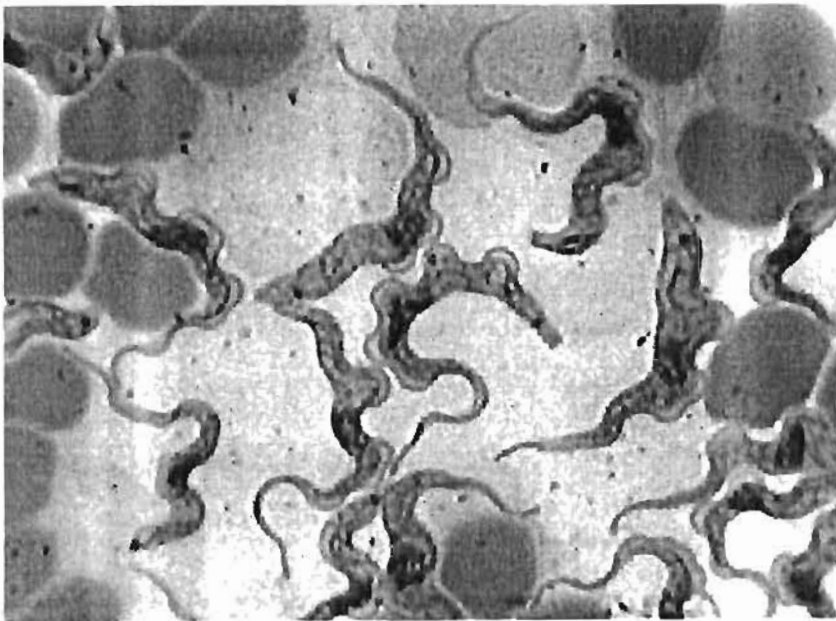


Figure 6 : *Trypanosoma brucei* (cliché : D. Cuisance)

2-3-2. *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* (Steel, 1885 ; Balbiani, 1888).

Trypanosoma evansi est le premier trypanosome pathogène à être découvert chez des équidés et des camélidés. Il est responsable chez ces espèces d'une maladie dénommée « surra ». Il possède la plus large distribution géographique de tous les trypanosomes pathogènes (Oumanwara et al., 1999). *T. evansi* est uniquement transmis mécaniquement par des insectes piqueurs (taons le plus souvent, stomoxes...) autres que les glossines. Ceci serait dû à l'absence de maxicercles au niveau de l'ADN kinétoplastique de *T. evansi* et qui le rend incapable de se développer cycliquement chez un insecte vecteur (Ventura et al., 1997).

2-3-3. *Trypanosoma (Trypanozoon) equiperdum* (Doflein, 1901).

T. equiperdum est naturellement un parasite des équidés, principalement des chevaux. Il est à l'origine d'une maladie vénérienne appelée la dourine. Cette maladie existe depuis plusieurs centaines d'années en Afrique du nord qui constitue vraisemblablement son berceau d'origine (Itard, 2000). La dourine est la seule affection à trypanosome à être transmise directement (par le coït) d'un équidé malade à un équidé sain, sans intervention d'un insecte vecteur.

2-4. Sous genre *Pycnomonas* (Hoare, 1964) : *Trypanosoma suis*

Ce sous genre ne comprend qu'une seule espèce qui est *Trypanosoma (Pycnomonas) suis*. Il n'a été signalé jusqu'à présent que chez les *Suidae* domestiques et sauvages et uniquement en Afrique tropicale de l'est (Tanzanie et Burundi) (Itard, 2000). Chez le porc domestique, *T. suis* provoque une infection chronique chez l'adulte, et une infection aiguë chez le jeune. Il est transmis par les glossines et son cycle de transmission est tout à fait comparable à celui de *T. brucei*.

3. Cycle évolutif

3-1. Chez la glossine

La contamination des glossines se fait lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté, repas au cours duquel les glossines absorbent des formes trypomastigotes courtes. Ces dernières subissent des transformations et des réplifications au niveau de l'appareil digestif de la mouche, pour donner des formes allongées (trypomastigotes procycliques). Si l'on prend l'exemple de *T. brucei*, celles-ci subissent à leur tour des transformations en perdant notamment leur membrane de glycoprotéine. Elles migrent par la suite vers les glandes salivaires de la mouche par un mécanisme qui n'est pas encore très bien connu. A ce niveau les trypomastigotes procycliques se fixent sur les parois du labre par leur flagelle, et se transforment en épimastigotes. Ensuite les épimastigotes se transforment à leur tour en trypomastigotes métacycliques avec l'apparition du manteau antigénique de nature

glycoprotéique. Ces formes infectantes matures se détachent des cellules épithéliales salivaires et restent dans la salive par laquelle elles seront transmises à l'hôte lors du prochain repas sanguin. (fig. 7)

Chez la glossine, la durée et le siège du cycle évolutif sont variables d'un trypanosome à l'autre.

► Dans le cas de *T. congolense*, la durée du cycle est en moyenne de 12 à 14 jours, il commence au niveau de l'intestin moyen de la mouche pour finir au niveau des pièces buccales (trompe puis hypopharynx).

► Chez *T. vivax*, le cycle dure 5 à 13 jours, il se déroule essentiellement au niveau du proboscis. La méthode d'identification actuelle de *T. vivax* chez une glossine repose sur la mise en évidence d'une infection uniquement localisée au niveau du proboscis. Il a été toutefois, mis en évidence la présence de ce parasite dans le proboscis, mais aussi dans l'intestin de glossine par **Nyeko (1990)** ; **Moolo et Gray (1989)** ont également observé *T. vivax* dans la région œsophagienne des glossines. Par conséquent le diagnostic parasitologique d'espèce par localisation des trypanosomes n'est pas un diagnostic de certitude (**CIRDES, 2001**).

► Le cycle de *T. brucei* est le plus complexe et sa durée est relativement longue, elle varie de 20 jours à 1 mois. Une fois ingérées, les formes trypomastigotes se retrouvent dans l'intestin moyen, puis le cycle de développement continue au niveau de la trompe, de l'hypopharynx et s'achève dans les glandes salivaires. On retrouve, alors dans les glandes salivaires les métatrypanosomes ou trypomastigotes métacycliques qui restent dans la salive, jusqu'au repas sanguin infectant l'hôte.

3-2. Chez l'hôte mammifère

Les trypanosomes pathogènes africains sont transmis par la salive des vecteurs, d'où leur appartenance au groupe des *Salivaria*. Lors du repas sanguin, la glossine injecte à l'hôte des formes métacycliques infectieuses présentes dans ses pièces buccales. Les trypomastigotes métacycliques se multiplient au point d'inoculation pendant plusieurs jours. Ils sont par cette action, à l'origine d'une réaction inflammatoire appelée chancre

d'inoculation. Puis les trypanosomes migrent vers le ganglion de drainage en empruntant la voie lymphatique avant d'être dans la circulation générale.

La période prépatente varie de 1 à 3 semaines. Cette durée est fonction de l'espèce et de la souche de trypanosome, du nombre de trypanosomes injectés et de certaines conditions favorisantes comme l'état immunitaire de l'hôte (Clausen et al., 1993). Dans le cas de trypanosomose, la parasitémie évolue chez l'animal infecté par « vagues ».

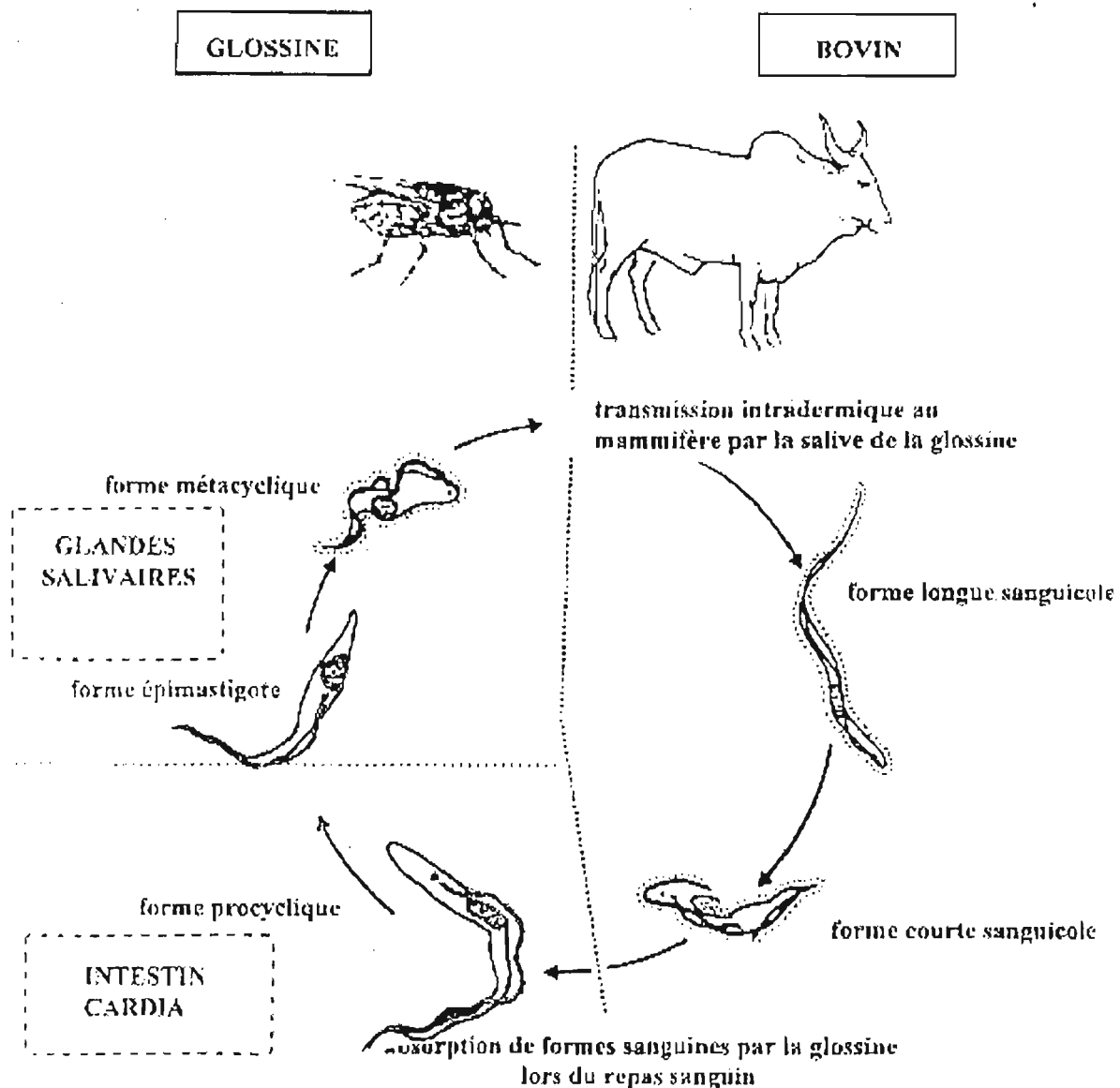


Figure 7 : cycle biologique de *Trypanosoma brucei* sp.

4. Les vecteurs et modes de transmission

Les trypanosomoses, à l'exception de la dourine sont des maladies à transmission vectorielle. Leur transmission se fait soit cycliquement par le biais d'un vecteur cyclique (les glossines), soit mécaniquement par l'intervention d'un insecte hématophage.

4-1. Les vecteurs à transmission mécanique

Les vecteurs les plus fréquemment incriminés sont des tabanidés et des stomoxyinés, plus rarement des hippoboscidés. Cette transmission mécanique est surtout connue pour *T. vivax* et *T. evansi* qui se retrouvent parfois dans les zones situées hors de l'aire de répartition des glossines (Itard, 2000 ; Desquesnes et Dia, 2003). La transmission a lieu à la faveur d'un repas interrompu sur un hôte infecté et achevé dans les instants qui suivent sur un hôte non infecté. Le parasite ne peut survivre chez ce vecteur qu'un temps très court (quelques secondes à quelques minutes), il est donc nécessaire que l'intervalle entre ces deux repas soit le plus bref possible (Desquesnes et Dia, 2004).

4-1-1. Les tabanidés (taons)

Les tabanidés appartiennent à l'ordre des diptères. A la différence des glossines, seules les femelles des taons sont hématophages. Ils constituent une famille très importante, tant du point de vue numérique (plus de 4000 espèces connues) que du point de vue médical et vétérinaire (Itard, 2000). Ils mesurent entre 5 et 25 mm de long et sont de couleur variable selon le genre. Il existe de très nombreuses espèces de tabanidés qui ont été classées en trois sous familles (*Pangoniinae*, *Chrysopsinae* et *Tabaninae*) divisées en tribus, genres et sous genres. Les genres *Tabanus*, *Chrysops*, *Atylotus* et *Hematopota* sont les 4 principaux ayant un intérêt vétérinaire (Itard, 1981). Les taons ont une répartition mondiale. Ils assurent la transmission mécanique de *T. evansi* et de *T. vivax* et sont aussi responsables de la transmission cyclique de *T. theileri* (Desquesnes et al., 2005). L'importance économique et médicale résulte de la quantité de sang prélevé par piqûre et de la considérable diminution du temps de pâture provoquée par leur

harcèlement d'une part et d'autre part de la transmission d'agents pathogènes (trypanosomes, et autres comme certains arbovirus, bactéries, helminthes, etc.)

4-1-2. Les Stomoxyinés

Ce sont des diptères, ayant l'aspect de la mouche domestique, mais dont les pièces buccales sont adaptées à la piqûre. Comme les glossines, les deux sexes sont hématophages. Ils mesurent entre 3 et 10 mm de longueur. La plupart des stomoxyinés sont particulièrement abondants dans les régions chaudes et humides soudano-sahéliennes. Ils constituent une sous famille dont les principaux genres sont : les *Stomoxys*, *Haematobia* et *Haematobosca*. En Afrique subsaharienne, ils assurent le relais de la transmission de la trypanosomose (*T. evansi* et *T. vivax* en particulier) et d'autres pathologies comme l'habronémose, la fièvre charbonneuse, la dermatophilose, etc.

4-1-3. Les Hippoboscidés

Appartenant également à l'ordre des diptères, les hippoboscidés sont des parasites externes, hématophages dans les deux sexes. Ils sont caractérisés morphologiquement par un corps élargi dorso-ventralement, un tégument épais et élastique, des pattes étalées avec des épines fortes. *Melophagus ovinus* (parasite des ovins, permanent en régions tempérées) et *Hippoobosca equi* (parasite des équidés) sont les représentants connus de cette famille. Les hippoboscidés sont relativement peu impliqués dans la transmission mécanique de la trypanosomose (Itard, 2000). Ils peuvent par ailleurs provoquer une forte irritation chez leur hôte en cas d'abondance et comme tous les insectes hématophages, ils peuvent aussi transmettre des agents pathogènes.

4-2. Les vecteurs à transmission cyclique : les glossines

Les glossines ou mouches tsé-tsé sont des insectes hématophages (mâle et femelle), appartenant à l'ordre des diptères, à la famille des Muscidés, à la sous famille des *Glossininae* et à l'unique genre *Glossina*. Ils vivent exclusivement dans la zone intertropicale africaine notamment entre le 15°N et le 30°S de latitude (Itard, 2000). (Fig.

8). Les glossines occupent une superficie d'environ 10 millions de Km² et affectent plus de 37 pays (OIE, 2000). Leur morphologie générale est celle des mouches. Elles diffèrent cependant de la plupart des autres Muscides par l'adaptation de leurs pièces buccales à la piqure. Une mouche tsé-tsé mesure entre 6 et 16 mm de longueur, en excluant la trompe (proboscis) et en général le mâle est plus petit que la femelle. Ces mouches sont de couleur variable, du marron au jaunâtre jusqu'au gris, mais jamais métallique (Itard, 2000).

Les glossines rencontrées en Afrique occidentale appartiennent aux 3 grands groupes connus qui sont :

- le sous genre *Austenina* (groupe *Fusca*) (Townsend, 1921), ce sont des glossines de grande taille (11 à 16 mm), les espèces de ce groupe ont une importance économique mineure, car ils ont une répartition généralement en dehors des zones à vocation pastorale ;
- le sous genre *Nemorhina* (groupe *Palpalis*) (Robineau-Desvoidy, 1830) qui regroupe les glossines de taille moyenne (8 à 11 mm) ou petite (6 à 8 mm), qui vivent dans les végétations situées à proximité des points d'eau. Elles sont également connues sous le nom de tsé-tsé riveraines ;
- le sous genre *Glossina s. str.* (groupe *Morsitans*) (Zempt, 1935), les espèces de ce groupe sont de taille moyenne (8 à 11 mm) et fréquentent préférentiellement les régions de savanes d'où leur nom de tsé-tsé des savanes. Ces glossines jouent un rôle important dans la transmission des trypanosomoses animales.

Les glossines se comportent comme de véritables hôtes intermédiaires et revêtent de ce fait une importance capitale dans l'épidémiologie des trypanosomoses en Afrique. Elles assurent exclusivement la transmission des trypanosomes typiquement africains. Le degré d'infection au sein d'une population de glossines varie en fonction de plusieurs facteurs dont les espèces de trypanosomes et de glossines en présence, le nombre de repas, l'âge et le sexe des glossines en présence et la saison (Itard, 1981). En Afrique de l'ouest, les glossines du sous genre *Nemorhina (palpalis)* sont les plus impliquées dans la transmission de *T. vivax* comparativement aux infections à *T. brucei gambiense*. Par contre, *T. congolense* est le plus souvent transmis par les glossines des savanes (sous genre *Glossina s. str.*). Ces relations entre les trypanosomes et les glossines témoignent de

l'existence d'une différence de capacité vectorielle (qui est le nombre de nouvelles infections qu'un insecte peut disséminer quotidiennement chez un hôte).

Mis à part la transmission cyclique et mécanique, il existe d'autres modes de transmission dont l'importance est variable selon les conditions épidémiologiques, la présence et ou l'abondance des différents types de vecteurs. On peut ainsi avoir une transmission par les mouches suceuses, une transmission iatrogène par piqûre et une transmission in utero ou congénitale. La transmission vénérienne est le principal mode de transmission de *T. equiperdum*, quant à la transmission oro-digestive, elle concerne principalement les trypanosomes du genre *Trypanozoon*.

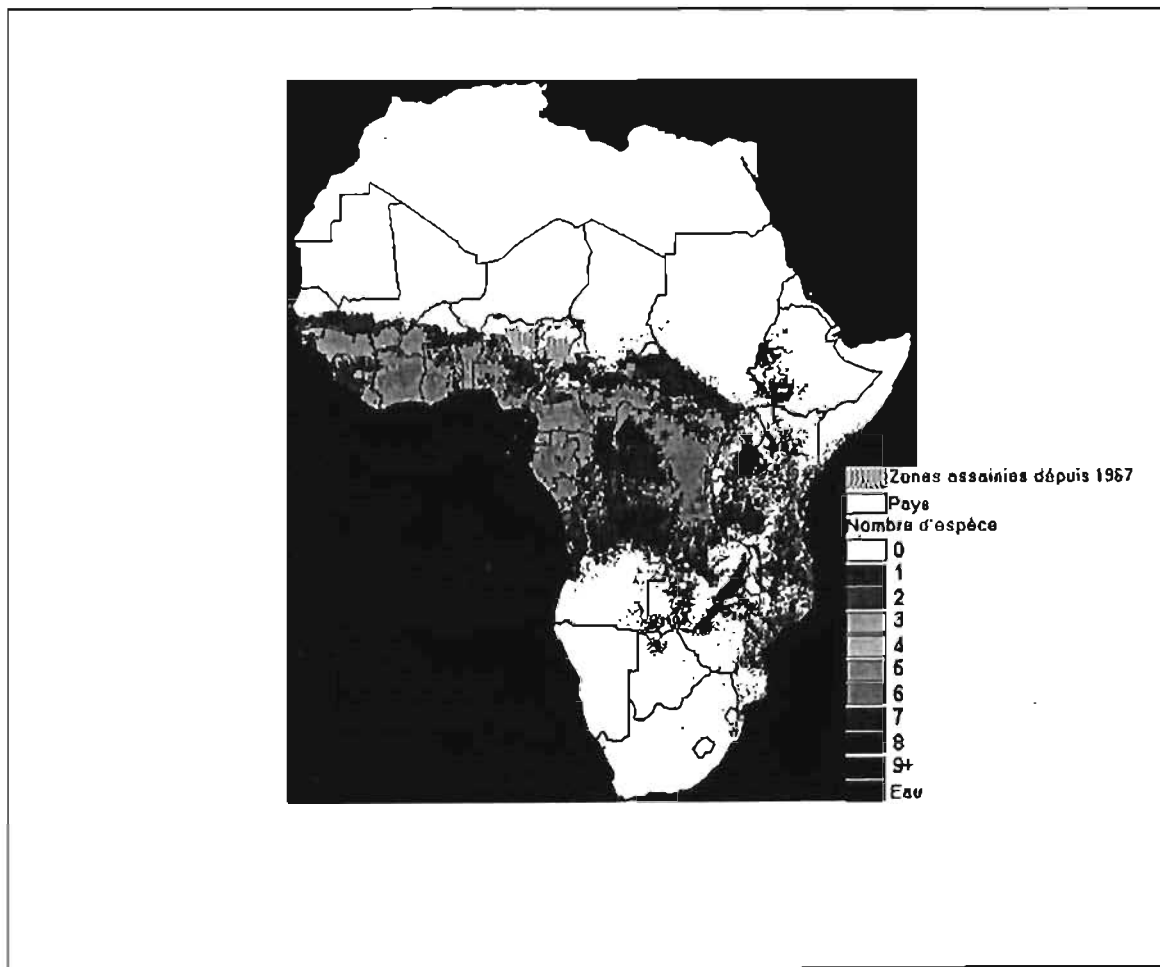


Figure 8 : Aire de répartition des glossines en Afrique

Source : FAO / PATT (1998)

5. Pathogénie

La pénétration des trypanosomes chez l'hôte mammifère est à l'origine de la formation au point d'inoculation d'un trypanome qui est une réaction inflammatoire sous la forme d'un furoncle suivi d'une ulcération : c'est le chancre d'inoculation observé plus visiblement chez l'homme. La pathologie liée à la présence du parasite est principalement due à une action inflammatoire et nécrotique, une action toxique, une action anémiante et hémolytique et une action immunodépressive.

Ainsi après la disparition du chancre d'inoculation au bout de 3 à 15 jours (Itard, 2000) les trypanosomes passent dans la circulation générale. Les facteurs parasitaires sont sécrétés par les trypanosomes vivants ou libérés par la lyse massive des parasites qui fait suite à chaque vague de parasitémie. Il y a alors libération de catabolites toxiques tels que le tryptophol (produit de dégradation du tryptophane et qui est très toxique), l'indole-éthanol, etc. La présence des parasites dans l'organisme induit chez l'hôte mammifère une carence de substances (glucose, pyruvate, acides aminés) utilisées par les trypanosomes. Leur présence dans les vaisseaux sanguins provoque une inflammation vasculaire notamment avec *T. congolense*, tandis que *T. brucei* provoque des lésions nécrotiques dans les tissus conjonctifs et parenchymateux. En outre, les parasites produisent des substances très anémiantes qui sont des toxines hémolytiques associant l'indole-éthanol à des phospholipases. L'interaction initiale entre le parasite et le système immunitaire de l'hôte trouble l'équilibre du réseau des cytokinines, entraînant des phénomènes d'hypersensibilité de type III. Les kinines libérés après la lyse des trypanosomes ont une action sur la perméabilité vasculaire et sont impliqués dans le déterminisme des œdèmes. On signale également un état sévère d'immunodépression qui a des origines multiples dont entre autres des facteurs toxiques et des facteurs immunitaires (par exemple les immuns complexes bloquant l'activité des macrophages). Cette immunodépression est responsable d'une plus grande sensibilité des animaux aux affections intercurrentes. Aux périodes avancées de la maladie, les trypanosomes franchissent la barrière méningée et passent dans le liquide céphalo-rachidien, provoquant ainsi des symptômes nerveux observés le plus fréquemment chez l'homme. Enfin la mort survient en l'absence de traitement et suite à une défaillance du système immunitaire de l'animal.

La pathogénicité des trypanosomes est variable selon l'espèce de trypanosome. D'après des études menées par **Sidibé et al. (2002)** *T. congolense* est le plus pathogène pour le bétail en Afrique et plus précisément *T. congolense* type savane qui possède une pathogénicité supérieure aux autres types. Le type forêt a une pathogénicité moindre avec élimination du parasite 3 mois après. Le type kilifi est par contre non pathogène pour le bétail (**Bengaly, 2003**).

6. Le génome des trypanosomes

L'organisation du génome des trypanosomes a pu être étudiée par l'analyse électrophorétique en champ pulsé (Pulse Field Gel Electrophoresis =PFGE) du matériel génomique (**Sidibé, 1996**). Le matériel génétique des trypanosomes porté par l'ADN est localisé dans le noyau (ADN nucléaire) et dans le kinétoplaste (ADN kinétoplastique).

6-1. L'ADN nucléaire

Les chromosomes observés dans le noyau se répartissent en 3 catégories selon la taille.

✓ Les mini-chromosomes sont les plus nombreux (une centaine) et leur la taille varie de 50 et 250 Kb. Selon Garside et al. (1994) (**in Sidibé, 1996**) dans le sous genre *Nannomonas* *T. simiae* possède les plus petits mini-chromosomes (50 à 100 Kb), suivi par les types savane et forêt de *T. congolense*. Le type kilifi en possède les plus gros (100 à 250 Kb).

✓ Les chromosomes intermédiaires au nombre de 20 à 50 sont de taille comprise entre 250 et 700 Kb.

✓ Les gros chromosomes, dont la taille est supérieure à 1000 Kb, sont au nombre de 15 à 20.

Selon Michels et al. (1991) (**in Sidibé, 1996**) le génome d'une cellule haploïde des trypanosomes est de $3,7.10^7$ Pb. Près de 12% des ADN sont formés de séquences hautement répétées, 20% de séquences moyennement répétées et enfin 68% de séquences non répétées.

6-2. L'ADN kinétoplastique (ADNk)

Le kinétoplaste, partie fortement dilatée du système mitochondrial est très riche en ADN qui se présente sous la forme de 20 à 50 maxicercles et d'une dizaine de minicercles. Ils sont disposés en longs filaments enroulés en spirales sur plusieurs rangées, et représentent deux types d'ADN différents (Itard, 2000).

✓ Les minicercles, d'une taille d'environ 1 Kb, sont formés d'une région conservée de 100 à 150 Pb et d'une région variable de 850 à 900 Pb. Une séquence de 12 nucléotides présente sur la région conservée est hautement préservée d'une espèce à l'autre, voire d'un genre de *kinetoplastidae* à l'autre. Certains auteurs (N'Tambi et Englund, 1985 cités par Sidibé, 1996) ont montré que cette séquence est à l'origine de la réplication des minicercles et l'ont appelée « la séquence universelle des minicercles ». Les minicercles sont néanmoins très variables au sein d'une même espèce et varient même au sein d'un stock.

✓ Les maxicercles, d'une taille en moyenne 20 fois supérieure à celle des minicercles, mais d'un nombre réduit (20 à 50), les maxicercles se retrouvent chez tous les trypanosomes de la section des *Salivaria*, à l'exception de *T. evansi* (Simpson, 1987 in Sidibé, 1996). Ils sont formés d'une région variable de 3 à 6 Kb et d'une région conservée de 17 Kb. Cette dernière porte les gènes codant pour les ARN ribosomiques des mitochondries et les gènes codant pour certaines protéines impliquées dans les phénomènes d'oxydation mitochondriale. Les maxicercles sont d'un intérêt non moins important, car ils peuvent être utilisés comme outil de diagnostic.

7. Propriétés antigéniques

Chez les formes sanguines des trypanosomes des mammifères, la couche externe du périplasme est composée de glycoprotéines constituant les antigènes de surface. Outre ces antigènes de surface, les trypanosomes possèdent des antigènes internes ou antigènes somatiques. En plus, chez les trypanosomes il existe une grande variation antigénique.

7-1. Les antigènes invariants

Les antigènes somatiques dits invariants ou « communs » sont constitués par les protéines de structure (protéines du cytosquelette, de la membrane) ou des molécules impliquées dans le métabolisme du parasite telles que les enzymes. Ces antigènes sont communs à tous les stades du cycle parasitaire, à toutes les souches d'une même espèce et même pour quelques-uns à toutes les espèces de trypanosomes. Libérés dans le plasma, ils peuvent par formation d'immuns complexes, exercer des effets pathogènes chez l'animal infecté. Cette réaction antigène-anticorps, trouve une large application dans le diagnostic sérologique de la trypanosomose, (tests d'agglutination direct, de précipitation, de fixation du complément, etc.).

7-2. Les antigènes variables de surface

Les glycoprotéines variables de surface (GVS) forment une enveloppe ou manteau. Ces molécules sont toutes identiques chez un organisme donné, ainsi que chez tous les parasites issus d'un même clone ; mais différentes chez deux variants issus du même organisme. Leur apparition est observée dès le stade métacyclique chez la glossine et se maintient tout au long du processus infectieux chez l'hôte mammifère. La chaîne protéique d'une glycoprotéine de surface, dont le poids moléculaire est d'environ 65000 daltons est constituée d'environ 500 acides aminés. Cette chaîne polypeptidique est formée d'un peptide signal, d'une région variable (d'environ 360 acides aminés) suivie d'une région d'homologie. La GVS est la seule structure antigénique exposée à la surface des trypanosomes sanguins et des métacycliques, c'est donc contre elle que sont dirigés les anticorps qui sont neutralisants, donc protecteurs.

7-3. Variation antigénique

Les séquences des acides aminés qui constituent la chaîne protéique d'une GVS sont codées par des gènes différents, d'un variant à l'autre. Les régions hypervariables sont situées dans les deux tiers N-terminaux de la molécule correspondant à sa partie externe. On distingue globalement des types antigéniques dominants variants «majeurs» qui

s'expriment en début d'infection et des variants tardifs dits « mineurs » qui apparaissent ultérieurement. Chez l'animal infecté, chaque vague de parasitémie est due à l'émergence d'un variant différent.

Au tout début d'une infection par le trypanosome, les lymphocytes B du mammifère produisent des anticorps capables de se lier aux GVS particulières qu'ils reconnaissent sur l'enveloppe de surface de cette première population de parasites. Ces anticorps tuent environ 99 % de cette population initiale. Mais quelques individus qui ont activé un gène codant une GVS différente échappent à la destruction. La multiplication de ce nouveau variant aboutit à l'émergence d'une nouvelle population de parasites antigéniquement distincte de la première.

L'apparition séquentielle des variants antigéniques au cours du processus, permet continuellement au trypanosome d'échapper au système immunitaire de l'hôte. C'est ce phénomène de variation antigénique qui rend illusoire la mise au point d'un vaccin contre les formes sanguines des trypanosomes africains. Par contre, chez les formes métacycliques du vecteur, le nombre de variants antigéniques exprimés est relativement limité. On a espéré pouvoir à partir de ce répertoire antigénique plus limité, produire un vaccin contre les variants exprimés par la population de métacycliques qui forme la première vague de parasitémie chez le mammifère infecté. Cette protection s'est malheureusement révélée relative et partielle, donc non effective (**Itard, 2000**).

Chapitre II : Trypanosomose des animaux domestiques

Après une présentation générale des trypanosomes, nous aborderons dans ce chapitre une étude de la maladie due à ces protozoaires chez les animaux domestiques, particulièrement en Afrique. Il conviendra de rappeler d'abord l'importance de la maladie avant d'entamer une étude épidémiologique de la trypanosomose animale. Nous passerons en revue les méthodes de diagnostic de la trypanosomose tant sur le terrain qu'au laboratoire en mettant un accent particulier sur les outils de la biologie moléculaire (technique d'hybridation moléculaire et PCR). Enfin, dans ce chapitre nous ferons un exposé des différentes composantes des moyens de lutte contre cette parasitose.

1. Importance

Les trypanosomoses sont des maladies parasitaires dont l'importance médicale et socio-économique est considérable. Nous distinguons des répercussions directes liées à l'incidence de la maladie et aussi des répercussions indirectes imputables aux trypanosomoses.

Les répercussions directes sont en rapport avec :

- la mortalité qui survient très souvent en phase aiguë de la maladie,
- la morbidité surtout élevée dans les zones subhumides (liée à la présence des glossines),
 - le nombre d'espèces affectées, toutes les espèces animales sont sensibles, y compris l'homme. En Afrique la trypanosomose humaine infecte entre 300 et 500 mille personnes et l'issue est en général fatale en l'absence de traitement. Les mortalités annuelles (chez l'homme) sont estimées à environ 10% (FAO, 2002).
 - On note en plus une énorme chute de production, chez le bétail infecté la trypanosomose occasionne 10 à 40 % de perte en production laitière et 5 à 30% de perte en production de viande (Sidibé, 2001).

Les répercussions indirectes provoquées par cette maladie sont essentiellement d'ordre économique. La FAO estime que les pertes économiques dues aux trypanosomoses seraient de l'ordre de 1 à 1,5 milliards de dollars US par an, elles représentent à elles seules, le ¼ des pertes économiques attribuées aux pathologies animales en Afrique. Le coût des opérations de lutte demeure considérable. Selon **Abiola (2001)**, les ventes de trypanocides correspondent à entre 20 et 25% (selon les pays) des produits vétérinaires commercialisés. Le coût du traitement chez l'homme est estimé à environ 38,5 millions de dollars US (**Pangui, 2001**). En outre, il faut noter les conséquences néfastes de la maladie sur l'élevage, par exemple la présence de la trypanosomose rend difficile l'introduction des races améliorées (très sensibles) dans les pays infestés. Les répercussions sont également défavorables sur l'agriculture, la maladie du sommeil chez l'homme en est une illustration, car touchant essentiellement le monde rural et de ce fait conduit à une diminution de la main d'œuvre agricole.

Au regard de l'importance médicale et socio-économique indéniable de la trypanosomose, il est nécessaire de bien connaître la maladie, à travers d'une part ses symptômes et lésions pouvant conduire au diagnostic clinique et au diagnostic différentiel et d'autre part à travers son épidémiologie et les moyens de lutte à préconiser.

2. Etude clinique

2-1. Symptômes

Les trypanosomoses sont des affections à évolution généralement chronique, la durée et la symptomatologie sont variables suivant l'espèce de mammifère affectée et l'agent pathogène en cause. Les formes classiques sont le nagana qui regroupe les affections dues aux trypanosomes « animaux » typiquement africains, le surra et la dourine.

☞ Le Nagana

C'est l'ensemble des trypanosomoses des animaux domestiques dues aux principaux trypanosomes pathogènes à savoir *T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. simiae* et *T. suis*,

tous transmis par les glossines. La maladie se caractérise par une évolution par accès ou « crises » après une période d'incubation variable d'une à quelques semaines. L'évolution est en étroite relation avec les parasitémies successives.

Dans la forme chronique qui est la plus courante, les accès se manifestent par des poussées fébriles correspondant aux vagues de parasitémie élevée. Ces accès sont séparés par des intervalles d'apyrexie durant la période de faible parasitémie. La forme chronique se caractérise surtout par des crises plus atténuées et plus espacées, pouvant conduire à une auto-stérilisation apparente (**Itard, 2000**). En plus de l'hyperthermie, les symptômes observés sont l'anémie avec un hémocrite très souvent inférieur à 25% ; une hypertrophie des nœuds lymphatiques (pré scapulaires, pré cruraux) ; des œdèmes ; une conjonctivite purulente ou parfois une opacification de la cornée associée à une kératite ; des symptômes nerveux rencontrés surtout chez les équidés et se traduisent par l'affaiblissement du train postérieur, la parésie voire la paralysie ; l'amaigrissement qui est un symptôme presque constant à une période avancée de la maladie. Dans la phase ultime de la maladie, l'animal meurt en état de cachexie profonde. On observe en plus, dans les formes chroniques, des avortements et une chute voire un tarissement de la sécrétion lactée chez les femelles ; une stérilité chez les mâles ; des retards de croissance chez les jeunes ; les animaux apparaissent en général fatigués avec des poils piqués, avec une altération complète de l'état général, précédant très souvent la mort en l'absence de traitement. Parfois la guérison survient après une longue convalescence.

Les formes aiguës et suraiguës, rarement observées sont caractérisées par une évolution rapide. Dans la forme suraiguë le premier accès est mortel. On a dans la forme aiguë plusieurs accès de 3 à 6 jours séparés par des phases de rémissions d'une semaine, la mort survient en 7 à 8 semaines.

☛ Le Surra

C'est une trypanosomose due à *T. evansi*. La virulence de ce dernier est surtout marquée pour les camélidés et les équidés. Les jeunes sujets et les femelles gestantes font une maladie aiguë qui se manifeste par une asthénie, une fièvre, un amaigrissement

précédant la dégradation de l'état général avec une chute de poils et des larmolements. Des avortements et parfois des œdèmes sont aussi observés. L'évolution de la maladie est rapide vers une cachexie suivie de la mort après une prostration prolongée. La forme chronique survient chez les adultes et se manifeste par une fièvre intermittente, une anémie et un amaigrissement progressif.

☛ La Dourine

Elle ne sévit naturellement que chez les équidés et elle est due à *T. equiperdum*. C'est une maladie vénérienne uniquement transmise par le coït d'où les noms de « mal de coït » ou de « syphilis du cheval » parfois employés. Elle évolue le plus souvent sous une forme chronique qui se caractérise deux semaines après l'infestation par des œdèmes chauds et douloureux localisés au fourreau et au scrotum chez l'étalon et à la vulve chez la jument. La fièvre est modérée, mais les symptômes cutanés, ganglionnaires et nerveux apparaissent en moyenne un mois après le coït infectant. En phase terminale de la maladie, on note un amaigrissement prononcé, des œdèmes en régions déclives et la mort survient suite à des complications respiratoires.

La dourine peut rarement se présenter chez le cheval sous une forme aiguë d'évolution rapide, ou sous une forme atypique dans laquelle la phase des plaques cutanées et celle des œdèmes sont très discrètes.

2-2. Lésions

On distingue des lésions générales qui sont celles de l'anémie et de la cachexie, surtout observées dans les formes chroniques. Dans les formes aiguës on a des phénomènes congestifs et hémorragiques sous forme de pétéchies, d'ecchymoses diffuses.

Les lésions locales intéressent presque tous les organes. On note une hypertrophie ganglionnaire se présentant sous la forme d'une hyperplasie réticulaire avec des nodules hémorragiques. Au niveau du foie et de la rate, on a une hépato-splénomégalie. On a également des lésions de myocardite avec des foyers de nécrose. Les poumons, le foie, les

reins, le cœur sont infiltrés par des macrophages, des neutrophiles ou des lymphocytes. Les lésions de la moelle osseuse se caractérisent par une hypertrophie du tissu érythropoïétique et une prolifération des globules rouges. Les lésions oculaires sous formes de kératite, d'uvéite et parfois de conjonctivite purulente sont également fréquentes.

Il n'existe donc pas de lésions caractéristiques de la trypanosomose et ces lésions sont en général de type inflammatoire, souvent accompagnées de phénomènes de dégénérescence et de nécrose.

3. Epidémiologie

La trypanosomose est une maladie qui frappe le bétail, mais aussi la faune de mammifères sauvages qui constitue un immense réservoir des trois principaux trypanosomes (*T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei*). Ainsi certains animaux réceptifs (faune sauvage et bétail trypanotolérant) présentent une moindre sensibilité à la nagana et jouent le rôle de réservoir. La réceptivité du réservoir sauvage influence le maintien d'une espèce de trypanosome et sa prévalence chez le bétail dans une région donnée. Ce phénomène constitue un obstacle majeur aux opérations de lutte. Les sources d'infection sont donc les animaux domestiques ou sauvages cliniquement malades de trypanosomose ou les porteurs sains.

Les trypanosomoses dues aux trypanosomes typiquement africains sont enzootiques à l'intérieur de l'aire de distribution des glossines. La prévalence des infections est particulièrement élevée chez les bovins (supérieure à 70%), les adultes sont régulièrement infestés, tandis que les jeunes s'infestent entre 6 mois et 2 ans (**Desquesnes, 2003**). Par ailleurs, la prévalence et l'incidence sont toujours plus élevées chez les bovins de races trypanosensibles (Zébus : *Bos indicus*) que chez les animaux trypanotolérants (Taurins : *Bos taurus*) exposés à la même pression « glossinienne »¹ (**Clausen et al., 1993**). Chez les animaux exotiques provenant des pays du nord, le taux de prévalence parasitaire peut atteindre 100% si aucun traitement trypanocide n'est administré (**Bengaly, 2003**). Il faut

¹ La pression glossinienne comme le produit de la densité apparente des glossines et du taux d'infection chez ces glossines.

aussi noter que dans les régions où les trois trypanosomes pathogènes des bovins sont présents, *T. congolense* prédomine chez les adultes, mais sa prévalence est faible chez les jeunes animaux (Desquesnes et al., 1999). On note cependant des variations saisonnières qui peuvent être dues, d'une part à l'augmentation du contact hôte / vecteurs et d'autres part à certaines conditions favorisantes telles que l'insuffisance de l'abreuvement et de l'alimentation, le stress et les maladies intercurrentes. Ces facteurs engendrent une élévation des incidences des infections et des cas cliniques. En revanche, la capacité vectorielle des glossines pour les trypanosomes demeure constante, d'où une relative stabilité des situations enzootiques.

Les épizooties de trypanosomoses ne peuvent être rencontrées que dans des populations majoritairement très sensibles à l'agent pathogène. Il s'agit par exemple le cas d'une brutale mise en contact d'hôtes indemnes avec des vecteurs très compétents, ces cas sont à l'origine de l'apparition des flambées épizootiques localisées.

On peut aussi rencontrer d'autres situations épidémiologiques de la trypanosomose, telles que des situations enzoo- épizootiques (cas de la trypanosomose hémorragique due à *T. vivax*) ; des cas sporadiques qui sont rares ; mais également des foyers indemnes observés dans les régions défavorables à l'ensemble des vecteurs des trypanosomes (cas des zones désertiques ou arides).

Contrairement à la transmission cyclique, la transmission mécanique de la trypanosomose est très fragile du point de vue épidémiologique (Desquesnes, 2003). La promiscuité des individus et ou des espèces dans un élevage ou à un point d'abreuvement est la condition nécessaire à la transmission mécanique des trypanosomes par les insectes hématophages. La probabilité de transmission est plus ou moins élevée selon divers paramètres concernant l'hôte infectant, le vecteur potentiel, l'hôte réceptif et les relations entre hôtes et vecteurs. Les trypanosomoses transmises mécaniquement varient également selon les saisons. Mais les foyers de trypanosomoses transmises par les insectes autres que les glossines, peuvent connaître des incidences de 100 % en quelques jours, même lorsque l'abondance des vecteurs mécaniques est modérée (Desquesnes et al., 2005). Il est donc important de souligner le rôle multiple des insectes piqueurs (autres que les glossines)

dans l'épidémiologie des trypanosomoses, leurs effets directs (comme les lésions cutanées, la spoliation sanguine, le stress) provoquent une immunodépression du bétail qui révèle une réapparition clinique de la maladie et accroît la réceptivité et la sensibilité des animaux sains ; leurs effets indirects est principalement la transmission mécanique des trypanosomoses.

Nous retiendrons, que les situations épidémiologiques des trypanosomoses du bétail varient essentiellement selon la pression « glossinienne », les interactions hôtes / vecteurs, la présence et où l'abondance des insectes hématophages, la race bovine et la présence de réservoir sauvage ou domestique.

4. Diagnostic

4-1. Diagnostic sur le terrain

4-1-1. Diagnostic épidémiologique

La trypanosomose est une maladie qui frappe le bétail et la faune de mammifères domestiques et sauvages. Elle touche principalement les bovins, en particulier les zébus, les taurins trypanotolérants (N'Dama, Baoulé, etc.) supportent mieux l'infection et développent des formes chroniques. Les ovins et les caprins sont souvent moins touchés que les bovins.

La présence des glossines (qui sont les principaux vecteurs) renforce la suspicion de cette maladie à caractère enzootique dans ces zones infestées. Dans les régions où les glossines sont absentes, la trypanosomose animale peut être transmise par des insectes hématophages vecteurs mécaniques, dont la densité fluctue avec les variations saisonnières.

4-1-2. Diagnostic clinique et diagnostic différentiel

Sur le terrain, le diagnostic est difficile et aléatoire, en raison de l'absence des signes caractéristiques de la maladie. Il convient néanmoins de penser à la trypanosomose lorsqu'en zone d'enzootie, on observe chez un animal de l'hyperthermie, de l'anémie, des œdèmes, des hypertrophies ganglionnaires, de la conjonctivite ou de la kératite, de l'amaigrissement. Lorsque l'animal présente des poils piqués, de l'abattement, une augmentation du pouls et du rythme respiratoire. En phase finale d'infection chronique l'animal est cachectique.

L'ensemble des signes cliniques des trypanosomoses peut être confondu avec ceux d'autres hémoparasitoses et certaines helminthoses. Un diagnostic différentiel est donc nécessaire. Ainsi la trypanosomose doit être distinguée :

- ☞ chez les bovins des microfilarioses, des theilérioses pathogènes et des piroplasmoses (babésioses), des helminthoses gastro-intestinales, de la cowdriose, du charbon bactérien, de certaines carences nutritionnelles ;
- ☞ chez les équidés de l'anémie infectieuse, de l'exanthème vésiculeux, de l'anarsaque, etc. ;
- ☞ chez le dromadaire des strongyloïdoses gastro-intestinales, de l'échinococcose, de la fièvre charbonneuse... ;
- ☞ chez le porc des fièvres septicémiques virales ou bactériennes, des helminthoses.

Il est aussi utile, pour une forte présomption de distinguer les symptômes propres à chaque espèce animale et à chaque trypanosome. Mais le diagnostic de certitude ne pourra être établi qu'après des examens complémentaires de laboratoire.

4-2. Diagnostic au laboratoire

Le diagnostic au laboratoire est le seul moyen sûr de détection des trypanosomes, il constitue de ce fait une étape primordiale, voire indispensable à toute stratégie de lutte contre la trypanosomose animale. On distingue d'une part, des techniques directes (techniques parasitologiques et moléculaire) qui visent la mise en évidence du parasite, de son pouvoir pathogène et de l'une des composantes du parasite (ADN, antigènes). D'autre

part, on dispose des techniques indirectes basées sur la recherche des témoins (anticorps) qui traduisent la présence des trypanosomes dans l'organisme. Pour permettre la réalisation des enquêtes épidémiologiques, il est nécessaire d'effectuer le diagnostic aussi bien chez l'hôte mammifère que chez les vecteurs.

4-2-1. Diagnostic chez l'hôte mammifère

4-2-1-1. Méthodes directes

4-2-1-1-1. Méthodes parasitologiques

Le principe général de ces techniques est la mise en évidence des parasites dans un liquide biologique de l'hôte. Il peut porter sur un prélèvement de sang, de ganglion lymphatique, de liquide céphalo-rachidien (forme nerveuse de la maladie), de sécrétions génitales, sur un calque d'organe. Les prélèvements sont réalisés selon les cas, à l'état frais ou sur du matériel biologique fixé ou ayant été congelé. La récolte des prélèvements doit être effectuée aussi proprement possible, en évitant au maximum les souillures.

4-2-1-1-1-1. Examens microscopiques directs

Il s'agit de rechercher les parasites à l'état frais ou après fixation, soit directement dans le sang (le plus souvent), soit après enrichissement. L'observation microscopique immédiate d'une goutte de sang est la méthode classique, mais de nos jours elle est peu employée du fait de sa faible sensibilité. Le frottis sanguin fixé au méthanol et coloré au giemsa permet d'identifier, sur les critères de morphologie et de morphométrie, le sous genre auquel appartiennent les trypanosomes. Selon le contexte épidémiologique en examen de routine, le diagnostic d'espèce peut être déduit. La méthode de coloration la plus usitée est la méthode panoptique qui associe deux colorants: le May-Grünwald et le Giemsa (Itard, 2000). Le frottis peut être également coloré au Giemsa dilué après fixation au méthanol. Cette technique permet des études morphologiques détaillées et l'identification des différentes espèces de trypanosomes (OIE, 2000).

4-2-1-1-1-2. Examens microscopiques après concentration

Ces examens regroupent un ensemble de méthodes plus sensibles que l'observation directe des parasites et repose sur le principe de la concentration des parasites avant l'examen microscopique. En effet, la concentration des trypanosomes facilite grandement leur recherche, surtout lorsque la parasitémie est faible. Elle est obtenue soit par centrifugation d'un volume donné de sang total, soit après filtration des trypanosomes, soit après lyse des hématies.

► La technique qui donne pour une application pratique sur le terrain les meilleurs résultats est la centrifugation différentielle en micro tubes à hématocrite de l'interface globules / plasma. Il s'agit de la technique de centrifugation hématocrite (HCT ou test de WOO) (Woo, 1970), elle est rapide et économique, de plus elle fournit une évaluation de l'état d'anémie de l'animal. La sensibilité est variable selon l'espèce, par exemple pour *T. vivax* on a jusqu'à 1250 trypanosomes / ml de sang (Desquesnes et Tresse, 1996). Par ailleurs, une double micro centrifugation améliore considérablement la sensibilité de cette méthode en permettant de déceler des infections très légères (CIRDES, 2001).

La méthode de MURRAY (BCM= Buffy Coat Method) est aussi une variante de la technique de centrifugation hématocrite, dans laquelle on coupe le tube capillaire par une pointe diamant ½ mm au-dessous de la couche leucocytaire appelée buffy coat où se concentrent les trypanosomes constituant l'interface entre le plasma au-dessus et les hématies en dessous. Un examen exhaustif de ce matériel est réalisé à l'état frais (ou après fixation et coloration) entre lame et lamelle au microscope à fond noir (Murray et al., 1977) ou à contraste de phase. A partir des critères de morphologie et de morphométrie, on arrive toujours à identifier le sous genre auquel appartient le parasite.

Toutefois, la sensibilité relative des méthodes de Woo et Murray est assez controversée selon les auteurs et les espèces parasitaires, elles sont généralement voisines et de l'ordre de 100 à 1000 parasites / ml (Desquesnes, 2003).

► La lyse des globules rouges par un détergent (Dodécyl Sulfate de Sodium) nécessite des manipulations nombreuses et des temps d'incubation et de centrifugation relativement longs, pour un faible gain de sensibilité. Elle est aussi difficilement réalisable sur le terrain. Elle n'est donc pas couramment utilisée.

► La séparation des trypanosomes par filtration du sang sur colonne de DEAE (Diethyl amino-ethyl)-Cellulose repose sur les propriétés électrostatiques de la DEAE cellulose à un pH choisi de fixer les cellules sanguines et non les trypanosomes (Lanhan et Godfrey, 1970). C'est une technique très sensible, très utile au laboratoire pour préparer de grandes quantités de trypanosomes, mais difficilement applicable au diagnostic sur le terrain (Itard, 2000). En revanche la technique dite « miniature anion exchange centrifugation technique » (mAECT) permet de réaliser des diagnostics avec une sensibilité plus élevée que celle de l'HCT, mais elle est plus longue que cette dernière.

4-2-1-1-1-3. Inoculation à des animaux de laboratoire

Pour la culture in vivo, la technique la plus couramment utilisée est l'inoculation intra péritonéale ou en sous cutané de matériel biologique infecté à des animaux sensibles. L'animal de choix est la souris sûrement indemne d'infection. L'inoculation par voie scrotale chez le lapin permet de faire le diagnostic de la dourine. La culture in vivo est une méthode très sensible, surtout pour le sous genre *Trypanozoon*, elle est par contre inopérante avec *T. vivax* qui n'infecte pas les rongeurs. La culture du parasite in vivo ne peut être pratiquée de façon courante sur le terrain, en raison du nombre d'animaux et des matériels nécessaires à sa mise en application.

La culture in vitro n'a pas d'application pratique pour le diagnostic des trypanosomes animaux, sauf pour la mise en évidence de *T. theileri*. L'hémoculture est alors la méthode de choix. Le diagnostic est rarement effectué car le parasite est peu pathogène.

4-2-1-1-2. Méthodes moléculaires

Le diagnostic des trypanosomes auparavant basé sur différentes observations microscopiques et sérologiques chez l'hôte mammifère ou chez le vecteur, a été depuis les années 1980 amélioré avec les outils de la biologie moléculaire basés sur la détection de l'ADN (Desquesnes et Davilà, 2002). Ces nouvelles techniques de détection et d'identification offrent en effet une sensibilité et une spécificité jusqu'à présent inégalables. Des sondes d'ADN spécifiques d'espèces de trypanosomes ont été élaborées et utilisées dans les tests de diagnostic de la trypanosomose (Kukla B. A et al., 1987 ; Dickin S. K et al., 1989). De nos jours, la technique d'hybridation moléculaire par les sondes nucléiques tend à être supplantée par la technique de PCR. Cette dernière considérée comme la plus sensible et la plus spécifique, fut mise en place au CIRDES en 1993 afin de pouvoir diagnostiquer de manière fiable les trypanosomes pathogènes du bétail, aussi bien chez l'hôte mammifère que chez les glossines vectrices (Duvallat et al., 1994 ; Desquesnes et Tresse, 1996).

4-2-1-1-2-1. Rappel sur la structure de l'ADN

L'ADN, acronyme d'acide désoxyribonucléique est une longue molécule que l'on retrouve chez tous les organismes. Ces molécules sont formées de deux chaînes parallèles de nucléotides enroulées en hélice et reliées par leurs bases azotées. Chaque nucléotide renferme un groupement phosphoré, un sucre (désoxyribose) et une base azotée. Quatre bases ont été identifiées : l'Adénine (A) et la Guanine (G) appartiennent à la famille des Purines; la Thymine (T) et la Cytosine (C) sont de la famille des Pyrimidines. Un brin d'ADN est formé de la répétition ordonnée de ces quatre bases. Deux brins anti- parallèle d'ADN sont dits complémentaires car toujours étroitement reliés entre eux par des liaisons faibles (de type hydrogène) formées entre les bases complémentaires. Il y a deux liaisons entre A et T et trois liaisons entre G et C. Ainsi une molécule double brin composée uniquement (ou en majorité) de G-C nécessitera plus d'énergie pour être ouverte, qu'un ADN de même taille composé de A-T. Ceci explique pourquoi la température de fusion de l'ADN varie en fonction de sa taille (exprimée en nombre de bases, généralement en Kilobase Kb ou en Mégabase Mb) et son rapport $(A+T) / (C+G)$.

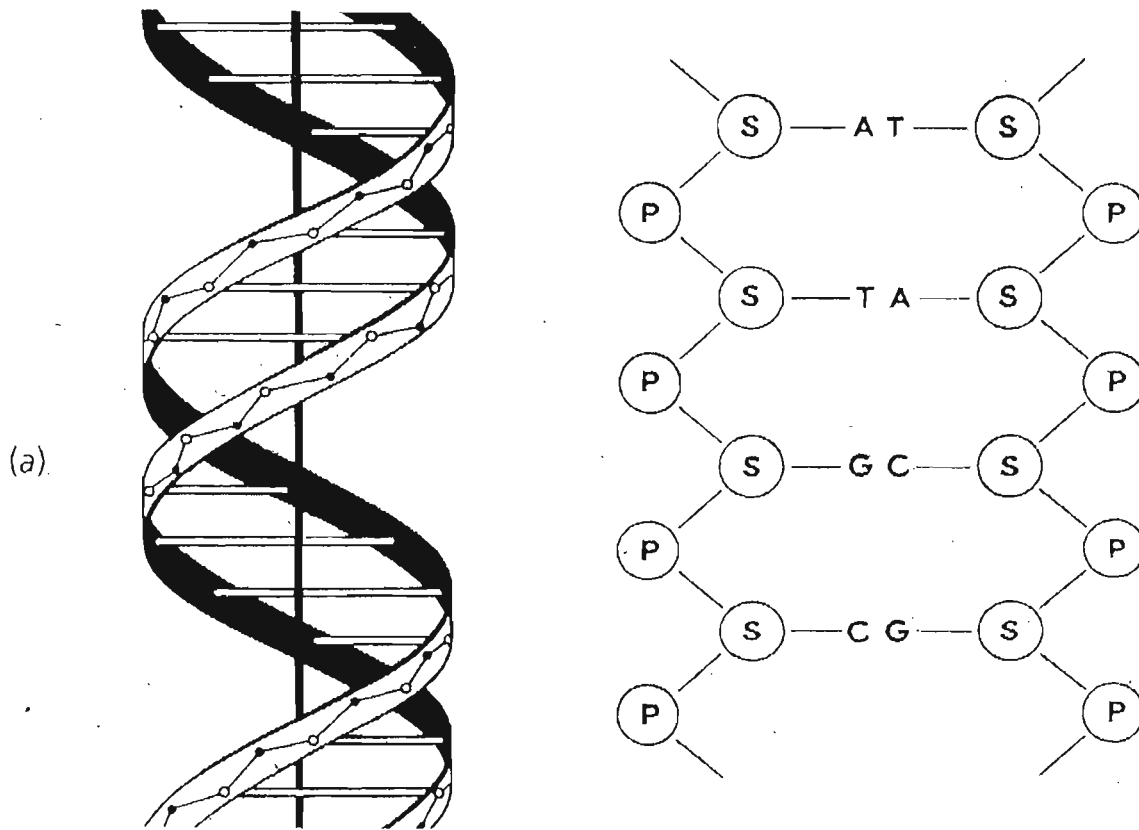


Figure 9 : structure de l'ADN

4-2-1-1-2-2. Technique d'hybridation moléculaire

Deux chaînes monocaténares d'acides nucléiques peuvent former un duplex, grâce à l'établissement de liaisons hydrogène entre des paires de bases purines -pyrimidines (A-T ou A-U ; C-G). Cette association surtout quand elle s'opère *in vitro* est dite hybridation et n'est possible que si les séquences des 2 chaînes sont complémentaires. Tel est le principe de la technique de diagnostic par les sondes nucléiques.

Une sonde nucléique est un fragment d'acides nucléiques (ADN ou ARN) capable de reconnaître dans une préparation, une séquence nucléotidique spécifique complémentaire à la sienne et de former avec celle ci une molécule double brin ou duplex stable au cours d'une réaction dite d'hybridation. La spécificité de la réaction d'hybridation est fonction de la séquence nucléotidique choisie comme sonde (Kodjo et al., 1993). On distingue, d'une part les sondes radioactives ou sondes chaudes qui sont des acides nucléiques

marqués avec des isotopes radioactifs (P^{32} et H^3). D'autre part, on a les sondes dites froides car ne comportant aucun élément radioactif. Le système de détection est alors basé sur une enzyme qui s'est révélée par sa capacité à transformer un substrat (incolore en général) en un produit facilement détecté (le plus souvent coloré). La phosphatase alcaline est l'enzyme la plus utilisée. De nos jours, on emploie de plus en plus les oligonucléotides comme sondes. Ce sont de simples brins d'acides nucléiques d'une longueur de 15 à 35 nucléotides synthétisés par des machines suivant la séquence du gène à chercher. Ils sont marqués soit à l'une des extrémités avec un nucléotide modifié, soit directement avec l'enzyme servant à la détection.

L'hybridation moléculaire est utilisée depuis longtemps en recherche fondamentale, afin de déterminer le degré de parenté entre les génomes d'êtres biologiques, isoler des gènes, établir leurs séquences ou analyser leur fonctionnement. Ces outils ont été adaptés pour permettre de faire des distinctions très fines dans les populations de parasites. Pour les trypanosomes, les travaux de l'ILRAD et de l'université de Bristol (U K), principalement ont permis de développer des sondes reconnaissant les différentes espèces ou sous espèces (Itard, 2000).

4-2-1-1-2-3. L'amplification en chaîne par polymérase ou PCR

4-2-1-1-2-3-1. Définition, principe et réalisation

La PCR est une technique permettant l'amplification sélective *in vitro* des séquences d'ADN. Elle fut découverte en avril 1983 par Kary Mullis et développée par Henri A. Herlich et ses collaborateurs de la compagnie CETUS (Californie, USA) en décembre 1985 (Larzul, 1993). Cette nouvelle technique de diagnostic permet d'amplifier en quelques temps (quelques heures) un fragment connu d'ADN : le recopier en plusieurs millions d'exemplaires. La PCR rend ainsi possible la détection d'une molécule d'ADN aussi petite que 100 paires de nucléotides présente à un seul exemplaire dans un prélèvement biologique même en quantité infime.

Le principe de la PCR se fonde sur l'utilisation de manière répétitive de la propriété des ADN polymérase de pouvoir synthétiser un brin d'acide nucléique complémentaire qu'à partir d'un couple d'amorces (**Etienne, 1996**). La PCR est en effet dérivée de la technique dite « d'extension des amorces », au cours de laquelle des courtes séquences d'ADN (oligonucléotides) sont utilisées comme des amorces par l'enzyme de réplication qui est l'ADN polymérase. Cette enzyme permet de repérer le fragment d'ADN ou de gène précis, puis de le multiplier rapidement (**Higuchi, 1989**).

Cette polymérisation est artificiellement obtenue en imposant des cycles thermiques à un mélange constitué de l'ADN matriciel (issu de l'échantillon à tester), des dNTP (désoxynucléotides triphosphate, c'est à dire les dATP, dCTP, dGTP et dTTP), d'un tampon adéquat, d'un couple d'amorces et de la Taq polymérase¹. La PCR est en fait, la répétition de 3 étapes thermiques réalisées successivement dans un même tube. Les étapes d'un cycle thermique sont :

- une étape de dénaturation des acides nucléiques, au cours de laquelle on a la séparation en deux simples brins de l'ADN;
- une étape d'hybridation, pendant laquelle les amorces oligonucléotidiques viennent s'hybrider sur leur séquences complémentaires;
- enfin une étape d'élongation durant laquelle, il y a extension des amorces (dans le sens 5' ► 3') par l'ADN polymérase en enfilant les dNTP pour constituer le brin complémentaire.

A la fin du premier cycle d'amplification, le nombre de brins d'ADN a doublé, à partir de 2 brins d'ADN initiaux on obtient 4 séquences après un cycle, 8 après 2 cycles, 2ⁿ après n cycles. Après 20 cycles une seule séquence cible d'ADN est amplifiée plus d'un million de fois. Cette valeur est purement théorique et correspond à un rendement idéal de 100 % pour chaque réaction. Le rendement initialement décrit pour les réaction d'élongation était de l'ordre de 50 à 60 % (**Saiki et al., 1985**).

¹ La découverte d'une eubactérie thermophile vivant dans les sources chaudes (70-75°C) du Yellowstone National Park, *Thermus aquaticus* et l'utilisation par la suite de sa polymérase : la Taq polymérase, stable jusqu'à des températures proches de 100°C, sont à l'origine du développement de cette technique (**Tagu, 1999**).

4-2-1-1-2-3-2. Autres techniques de PCR

De nos jours la PCR a considérablement évolué et pour le diagnostic des trypanosomoses animales, de nouveaux types de PCR ont été mis au point pour améliorer la sensibilité et la spécificité de cette nouvelle technique, il s'agit entre autres de :

☞ la PCR dite « Nested PCR » fait intervenir une seconde PCR réalisée en utilisant des nouvelles amorces situées à l'intérieur du fragment nucléotidique obtenu avec le premier couple d'amorces. Le fragment à amplifier lors de la seconde PCR est plus court, ce qui réduit par conséquent les hybridations non spécifiques (fig. 11);



Figure 10 : Schéma de l'amplification par PCR nested de l'ITS 1 de l'ADN Ribosomal

☞ la PCR ELISA est une technique dont les produits d'amplification sont révélés par un test ELISA à la place d'une électrophorèse sur gel d'agarose. Cette méthode a été mise au point pour identifier les trypanosomes à la suite d'une amplification des ADN satellites (Kosum et al.; 2002 ; Masaké et al., 2002; Sow, 2004).

4-2-1-1-2-3-3. Principales propriétés de la PCR

4-2-1-1-2-3-3-1. Sensibilité et spécificité

La PCR offre une extrême sensibilité permettant de détecter une molécule d'ADN aussi petite que 100 paires de nucléotides, présente à un seul exemplaire dans un prélèvement biologique. Cette sensibilité dépend de plusieurs paramètres, dont la répétitivité de la séquence amplifiée et les techniques de préparation des échantillons. Cependant, la sensibilité de la PCR reste limitée, voire insuffisante par essence, lorsque

les agents infectieux ne circulent pas ou circulent à des taux unitaires inférieures au volume de l'échantillon traité. Le cas est fréquent pour les trypanosomes pour lesquels les périodes aparasitémiques constituent une limite biologique à l'application de la PCR sur le sang frais ou ses dérivés.

En dehors de sa sensibilité, la PCR se distingue des autres techniques de diagnostic par sa grande spécificité d'espèces. Cette dernière dépend de la stabilité du complexe d'hybridation entre l'amorce et l'ADN cible. Différents facteurs s'associent pour former cette stabilité, parmi lesquels on la taille des amorces, la température de fusion et d'hybridation des amorces, la durée de l'étape d'hybridation et la concentration des réactifs. Au cours de la PCR, la synthèse des produits spécifiques entre en compétition avec la synthèse des produits non spécifiques. Ces produits parasites générés au cours d'étapes d'hybridation / extension à basse température sont nuisibles à l'amplification des séquences spécifiques (Saiki, 1989).

4-2-1-1-2-3-3-2. Avantages et champs d'application

La PCR est une technique qui possède de nombreux atouts. Tout d'abord une quantité très faible de matériel initial est nécessaire pour réaliser la PCR. La purification des séquences nucléiques n'est pas nécessaire, la PCR pouvant être effectuée sur un lysat cellulaire. (Larzul, 1993). L'amplification s'effectuant sur des courtes régions d'ADN, cette technique peut s'appliquer à l'ADN partiellement dégradé. Il faut en plus noter la simplicité et la rapidité de la technique.

Décrite dans la publication initiale pour le diagnostic d'une anomalie génétique (Saiki et al., 1985), la PCR a vu son champ d'application s'étendre de manière considérable tant pour le diagnostic qu'en recherche fondamentale. Comme le matériel de départ peut être pratiquement amplifié à l'infini, toutes les méthodes d'analyse de l'ADN peuvent être envisagées. Il peut s'agir de séquençage après clonage des produits amplifiés (Saiki et al., 1985); de séquençage direct des produits PCR. L'utilisation d'amorces appropriées (qui sont physiquement incorporées dans la séquence cible) permet d'effectuer des substitutions de nucléotides, des insertions, des délétions sur le produit

d'amplification, facilitant ainsi les études de mutagenèse. Par conséquent, de par sa capacité à amplifier et à modifier une séquence d'ADN, la PCR est devenue l'outil de base des laboratoires de génétique moléculaire.

4-2-1-1-2-3-3-3. Limites

Paradoxalement les limites de la PCR sont dues à son extrême sensibilité. Par ses qualités exceptionnelles la PCR pose des problèmes méthodologiques importants. La réaction produit donc de manière exponentielle des produits d'amplification qui sont autant de contaminant potentiels. Seule l'observation de conditions de travail extrêmement rigoureuses décrites par Kwok et Higuchi permettent de minimiser les risques de faux positifs (**Higuchi., 1989**). Par ailleurs, des problèmes de reproductibilité pour un même échantillon d'une PCR à l'autre ont été rapportés surtout lorsqu'il s'agit d'une séquence rare. Une PCR dite « anémique » a aussi été évoquée (**Mullis et al., 1986**). Il s'agit d'une PCR au cours de laquelle la synthèse des séquences spécifiques entre en compétition avec celle des produits non spécifiques.

4-2-2. Méthodes indirectes ou séro-immunologiques

Les tests sérologiques utilisent la réponse immunitaire des animaux infectés qui élaborent des anticorps selon les mêmes modalités que dans les infections bactériennes ou virales. On peut procéder soit par détection des antigènes circulants, soit par détection des anticorps. Les immunoglobulines M (Ig M) sont précoces et correspondent à la première parasitémie. Par contre les immunoglobulines G (Ig G) sont plus tardives et persistent plusieurs mois en l'absence de traitement, et leur recherche est le but des méthodes de diagnostic sérologiques. Ces techniques, en dépit de leur manque de sensibilité et de spécificité, constituent néanmoins un bon outil épidémiologique pour l'évaluation de la présence des trypanosomes dans une zone donnée.

4-2-1-2-1. Test d'agglutination

Il consiste à mettre en présence dans un tube capillaire, le sérum suspect et une suspension de parasites lysés, puis à observer les micro agglutinations à l'œil nu ou au microscope. Le diagnostic est réalisable sur le terrain, mais l'antigène est très instable (Desquesnes, 2003). Cette méthode est utilisée pour les infections à *T. brucei*, il a donné de mauvais résultats avec *T. congolense* et *T. vivax* (Itard; 1981).

Le test d'agglutination sur carte (CATT= Card Agglutination Trypanosomiasis Test) est une variante du test d'agglutination utilisant des parasites entiers colorés et initialement mis au point pour le diagnostic de la maladie du sommeil chez l'homme (à *T. brucei gambiense*). Ce test a été adapté par la suite à la détection de *T. evansi* (chez les ruminants et le porc), avec une sensibilité comparable au test de fixation du complément (Bajyana Songa et al., 1987). L'hémagglutination indirecte est une méthode décrite par Gill (1971), c'est un test pratique pour des diagnostics individuels, mais elle présente quelques inconvénients dont la conservation des hématies tannées, et l'existence fréquente de faux positifs.

4-2-1-2-2. Réaction de fixation du complément

Initialement mise au point pour le diagnostic de la dourine et du surra (Itard, 1981), la réaction de fixation du complément a été adaptée aux autres trypanosomes animaux comme *T. congolense*, *T. brucei* et *T. vivax*. La technique est lourde, peu spécifique d'espèce et donne parfois des réponses interspécifiques (ou hétérologues) plus fortes que les réponses intraspécifiques (ou homologues), notamment en cas d'infections successives avec les diverses espèces présentes en Afrique (Staack et Lohding, 1979). En plus la réaction de fixation de complément ne permet pas de distinguer les infections dues à *T. equiperdum* et *T. evansi* (Gardiner et Mahmoud, 1990). Pour toutes ces raisons la réaction de fixation du complément est de moins en moins pratiquée sur le terrain pour le diagnostic des trypanosomes (Desquesnes et al., 2001).

4-2-1-2-3. Test d'Immunofluorescence Indirect (IFI)

La réaction d'immunofluorescence indirecte, très employée pour le diagnostic de la trypanosomose humaine, s'est ajoutée plus récemment aux méthodes de diagnostic des trypanosomoses animales. Le test d'immunofluorescence indirecte est très intéressant pour les enquêtes épizootologiques de masse (en raison de sa commodité et sa rapidité d'exécution), et la détection des cas chroniques ou des porteurs asymptomatiques. On reproche à cette méthode, outre les difficultés de lecture, sa faible sensibilité. Il est difficile avec ce test de faire la différence entre les espèces de trypanosomes, les titres antigéniques homologues n'étant pas toujours nettement plus élevés que les antigènes hétérologues, on constate en plus des réactions croisées entre les différents trypanosomes des mammifères.

4-2-2. Test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

La méthode immuno-enzymatique de dosage des anticorps ou ELISA a été adaptée et employée au diagnostic de nombreuses maladies infectieuses et parasitaires. Dans le cas des trypanosomoses animales, l'ELISA indirecte a apporté une grande amélioration pour la sensibilité du diagnostic. Cette technique consiste en une reconnaissance et une liaison entre les Ig G et les antigènes. La sensibilité et la reproductibilité de l'ELISA indirecte pour la détection des anticorps dirigés contre les trypanosomes sont approuvées et constituent un bon outil pour les surveillances séro-épidémiologiques (**Desquesnes, 1997**). Les tests ELISA par détection d'antigènes, à travers le récent développement des anticorps monoclonaux (au détriment d'anticorps polyclonaux), ouvraient une nouvelle voie pour un diagnostic sensible et spécifique des trypanosomes africains. Mais ils n'ont pas abouti à des tests fiables. Seule l'ELISA indirecte est donc largement utilisée pour les enquêtes épidémiologiques.

Cependant, les tests immuno enzymatiques ne permettent pas de faire la différence entre une infection active et une infection passée, à cause de la persistance des anticorps plusieurs mois après le traitement (**Geysen et al., 2002**). Ces tests sont aussi peu spécifiques et donnent parfois des réactions faussement positives, en raison de très fortes

réactions croisées qui sont notées par exemple entre antigènes de *Trypanozoon* et les anticorps dirigés contre *T. congolense* et *T. vivax* (Desquesnes et al., 1999).

4-2-2. Diagnostic chez le vecteur

4-2-2-1. Chez les insectes hématophages vecteurs mécaniques

Le diagnostic de la présence de trypanosomes chez les insectes hématophages peut être réalisé par examen parasitologique. Cet examen s'est révélé très peu spécifique et sensible (Hoare, 1972). Un diagnostic plus spécifique et sensible peut être réalisé par PCR sur les pièces buccales ou l'intestin des taons (Solano et al., 1996).

L'étude de la transmission mécanique par les insectes hématophages montre qu'ils transmettent les trypanosomes immédiatement après leur contamination. Alors seule la mise en évidence de trypanosomes (ou d'ADN de trypanosomes) dans les pièces buccales d'un insecte capturé au moment du changement d'hôte indiquerait « insecte infectant » et aurait une signification épidémiologique. En définitive, le diagnostic de la présence de trypanosomes chez les insectes vecteurs mécaniques présente un intérêt limité en raison de la difficulté de capture des insectes et également du coût onéreux.

4-2-2-2. Chez les glossines

Dans le cas des vecteurs à transmission cyclique comme les glossines en Afrique, le transport des trypanosomes est permanent à la suite de l'infection. Le diagnostic parasitologique chez les glossines a longtemps été réalisé par examen microscopique (Desquesnes, 2003). La technique de salivation sur lame permet d'identifier rapidement les mouches porteuses de trypanosomes salivaires. Elle est facile à mettre en œuvre, mais ne permet pas d'identifier précisément l'espèce de trypanosomes en cause (Itard, 2000). La dissection des organes où s'effectuent la multiplication et la transformation des trypanosomes (intestin moyen, glandes salivaires, proboscis) permet d'identifier les mouches infectées et avec une bonne précision les espèces de trypanosomes qui se fixent

dans le proboscis. La diagnose des trypanosomes sera effectuée en se basant sur leur présence dans l'un ou l'autre des organes disséqués. Ainsi les trypanosomes découverts uniquement au niveau du proboscis sont du sous genre *Duttonella* (*T. vivax*) ; s'ils sont trouvés dans l'intestin moyen et le proboscis, ils appartiennent au sous genre *Nannomonas* (*T. congolense*) et s'ils sont trouvés en plus dans les glandes salivaires, ils sont du sous genre *Trypanozoon* (*T. brucei*). Des trypanosomes trouvés uniquement dans l'intestin moyen sont dits immatures, mais il peut aussi s'agir de *T.grayi* ou *T.varani* respectivement parasite du crocodile et du varan (Itard, 1981). On note cependant de nombreuses exceptions telles que les infections mixtes, les infections anciennes avec disparition des formes intestinales, les infections très récentes avec seulement des trypomastigotes intestinaux.

Le diagnostic parasitologique chez les glossines s'est révélé peu spécifique d'espèce (Lefrançois et al., 1998), il est alors préférable de réaliser ces examens par PCR avec des amorces spécifiques (Majiwa et al., 1994 ; Solano et al., 1996). En effet, les outils de la biologie moléculaire ont apporté une caractérisation spécifique et une sensibilité inégalables (Solano et al., 1999). La dissection des mouches et leur analyse par PCR permettent d'évaluer la situation épidémiologique dans les régions où elles sont capturées (Lefrançois et al., 1998). Des études menées par Solano et al. (1995) en Côte d'Ivoire ont permis de caractériser par PCR les différentes espèces et sous espèces de *Nannomonas* chez le vecteur *Glossina longipalpis* ainsi que les infections mixtes et immatures dont l'identification était difficile, voire impossible avec les méthodes parasitologiques.

5. Moyens de lutte

Devant l'importance socio-économique et médicale des trypanosomoses animales, l'enjeu de la lutte contre ces maladies est de taille. Les moyens de lutte s'articulent sur trois éléments qui découlent de l'épizootiologie des trypanosomoses, il s'agit des parasites, des hôtes mammifères et des vecteurs. La chimiothérapie et la chimioprophylaxie, la lutte antivectorielle et enfin l'élevage du bétail trypanotolérant sont les composantes de la lutte contre ces parasitoses.

5-1. Chimiothérapie et chimioprophylaxie

5-1-1. Chimiothérapie

Ce traitement vise à détruire les trypanosomes chez l'animal malade et de ce fait à réduire le risque de propagation de la maladie à l'échelle du troupeau. Le dépistage précoce de ces maladies se révèle alors d'une importance fondamentale. Cette méthode repose sur l'emploi des médicaments trypanocides. En médecine vétérinaire, cinq familles chimiques différentes de médicaments trypanocides sont utilisées de façon plus ou moins intensive (Itard, 2000). Ce sont la Suramine, la Mélarsamine, les sels de Phénanthridine, l'Acéturate de Diminazène et les sels de la Quinapyramine. Notons qu'en Afrique subsaharienne, le marché des trypanocides est évalué à plus de 10 milliards de Fcfa (Biaou et al., 2002). En Afrique de l'ouest les principaux trypanocides utilisés chez les ruminants sont le Bérénil® (Acéturate de diminazène) qui est surtout curatif, le Trypamidium® (Chlorure d'isométymidium) réputé trypanocide de « longue action » et est préventif, et dans une moindre mesure le Vériben®, le Véridium®, et autres.

Toutefois, mis à part le problème de chimiorésistance, l'administration de ces produits chimiques qui se fait par voie parentérale, est parfois à l'origine de troubles généraux ou locaux de gravité et d'importance variables selon le produit utilisé et l'état général de l'animal.

En outre, dans la chimiothérapie des trypanosomoses, on utilise en Afrique la phytothérapie, c'est à dire l'utilisation de certaines plantes ayant des propriétés trypanocides, c'est le cas par exemple de *Cassia siberiana*, mais l'efficacité de ces médicaments n'est pas encore confirmée du fait des travaux d'expérimentation en cours.

5-1-2. Chimioprophylaxie

A défaut d'une méthode de protection faisant intervenir des phénomènes immunitaires (l'emploi des vaccins), la chimioprophylaxie des trypanosomoses consiste à l'emploi des médicaments trypanocides à activité préventive en vue de la protection

pendant une certaine durée des animaux exposés à l'affection. La durée de protection varie essentiellement en fonction de l'espèce animale à traiter, du produit utilisé et de la dose à administrer.

Cependant, ces mesures de chimioprophylaxie connaissent des limites surtout dans les conditions d'élevage africain traditionnel. En effet, les traitements préventifs ont tendance en général, à sélectionner des souches résistantes du fait de leur élimination lente. Il est donc très important, voire impératif de respecter l'intervalle entre deux traitements et de faire suivre ces traitements, d'un traitement curatif à l'aide d'un trypanocide d'une autre catégorie chimique différente (on utilise à cet effet, le plus souvent l'acéturate de diminazène).

5-2. Lutte antivectorielle

Cette lutte est principalement destinée à interrompre le cycle de transmission des trypanosomes. Elle se justifie non seulement par le nombre d'espèces animales sensibles, mais aussi par la présence et l'importance des populations réservoir sauvages ou domestiques souvent incontrôlables (**De La Rocque et Dia, 2001**). En plus, l'existence de souches de trypanosomes chimiorésistantes vis à vis des trypanocides usuels a redonné à la lutte contre les vecteurs toute son importance. Cette lutte est surtout dirigée contre les glossines qui en sont les vecteurs majeurs.

Ainsi, outre les barrières d'isolement (méthodes abandonnées pour leur nocivité sur l'environnement) destinées à empêcher la réinvasion par des glossines immigrantes des régions assainies, la lutte contre les glossines se distingue en deux grandes catégories :

- La lutte indirecte, qui vise la modification du milieu où vivent les glossines et à le rendre impropre à leur survie. Cette lutte repose sur :
 - l'action sur l'habitat de glossines à travers l'éclaircissement forestier (appelé également prophylaxie agronomique ou lutte écologique) ;
 - l'action sur les hôtes nourriciers par destruction du gibier, donc de supprimer les réservoirs de trypanosomes.

Ces méthodes de lutte ne sont plus utilisées à cause de leur inefficacité, de leurs inconvénients multiples sur l'environnement et de leur coût élevé.

➤ La lutte directe, vise à détruire directement l'insecte à l'aide de moyens:

- chimiques, par pulvérisation d'insecticides (tels que le DDT autrefois utilisés, l'endosulfan, les pyréthrinoides de synthèse) par voie terrestre ou aérienne, l'imprégnation du pelage des animaux domestiques hôtes par des insecticides ;

- mécaniques, par pose de pièges de capture (comme le piège biconique de Challier et Laveissière, le piège monoconique ou Vavoua de Challier et Laveissière, le piège NZI de Mihok et le piège Tetra), par pose de pièges et d'écrans imprégnés d'insecticides (fig. 9) ;

- biologiques, par l'utilisation des prédateurs et des hyperparasites des glossines ;

- génétiques, par perturbation des mécanismes physiologiques fondamentaux, en particulier ceux de la reproduction [on peut par exemple, introduire dans la population de glossines, des individus mâles préalablement stérilisés par l'action d'agents physiques (rayonnements gamma) ou chimiques, qui entreront en compétition, pour l'accouplement avec les mâles normaux de l'espèce correspondante].

5-3. Lutte génétique par gestion des troupeaux

Il s'agit de l'élevage du bétail trypanotolérant. Ce bétail est composé de certaines races bovines d'Afrique occidentale qui sont aptes à vivre et à se multiplier dans des régions infestées de glossines. Ce phénomène de trypanotolérance s'observe chez les taurins (*Bos taurus taurus*) avec comme exemple la race N'Dama, Kouri, Baoulé, lagune, Somba, etc. ; et chez les petits ruminants de petite taille. Cette méthode se heurte malheureusement à des limites majeures, telles que le risque d'introduction des maladies contagieuses (peste bovine, PPCB, etc.) ou de rendre sensibles aux souches locales de trypanosomes les animaux transplantés, mais surtout c'est leur petite taille et leur faible productivité qui freinent leur utilisation par les éleveurs.

Dans les situations de très forte pression glossinienne, on peut préconiser la gestion quotidienne des parcours pendant les moments où l'activité des glossines est nulle où elles sont au repos, pour éviter le contact entre hôtes et vecteurs (Dia, 2003).



piège biconique



piège monoconique



piège pyramidal



écran piège



piège N'Zi



écran bleu imprégné d'insecticide

Figure 11 : Pièges et écrans pour la lutte contre les glossines (clichés : M. Desquesnes)

Deuxième partie : Etude expérimentale

Chapitre I : Présentation du cadre d'étude

Nos travaux se sont déroulés au Centre International de Recherche Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES) de Bobo-Dioulasso. Bobo-Dioulasso est la deuxième ville du Burkina Faso et est le chef lieu de la province de Houet située au sud ouest du pays. Cette ville est dans la zone subhumide avec un climat de type soudanien. On y trouve une végétation favorable au développement des glossines qui sont les principaux vecteurs de la trypanosomose animale.

Le CIRDES est une institution sous-régionale qui compte six pays membres : le Bénin, le Burkina Faso, la Côte d'ivoire, le Mali, le Niger et le Togo. Il a pour mandat de mener des activités de recherche-développement pour améliorer la santé des animaux domestiques et accroître leur productivité, en vue de satisfaire aux besoins croissants des populations, notamment en lait et en viande. Le centre s'investit à atteindre ses objectifs en accordant une importance particulière aux maladies à transmission vectorielle, notamment la trypanosomose animale et la cowdriose, à la conservation des ressources génétiques animales, à la préservation de l'environnement et enfin à la formation des cadres. Ces activités se déroulent aux seins de trois unités de recherches et une cellule de formation :

- l'unité de recherche sur la production animale (URPAN) ;
- l'unité de recherche sur l'élevage et l'environnement (UREEN) ;
- l'unité de recherche sur les bases biologiques de la lutte intégrée (URBIO) ;
- la cellule de communication et de formation (CCFOR).

L'URBIO, unité héritière de presque l'ensemble des activités du CRTA, constitue la pièce maîtresse du centre. C'est au sein de cette unité que nous avons entrepris nos travaux durant 9 mois, d'août 2004 en mai 2005.



Figure 12 : Localisation du CIRDES matérialisé par son logo sur la carte du Burkina Faso

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Matériel

1-1. Matériel de laboratoire

Pour les besoins du diagnostic par PCR, le CIRDES est équipé d'un laboratoire où l'on retrouve en plus des autres salles, une salle de préparation du mélange réactionnel, une salle d'amplification de l'ADN, une salle d'électrophorèse et une salle de visualisation du gel. Le matériel nécessaire à la PCR y est retrouvé :

- Les pipettes à volume variable (10 μ l à 1000 μ l), les pipettes multicanaux, les tubes eppendorf et les embouts jetables ;
- le vortex et microcentrifugeuses ;
- Balance, pH mètre, bain marie, et diverses verreries de laboratoires ;
- les hottes aspirantes ;
- les thermocycleurs (M J Research Inc, PTC 200TM, M J Research Inc, PTC 500TM machine à gradient Biometra®) ;
- les cuves à électrophorèse et un four micro-onde de 900 Watts micrologic® ;
- la caméra à lampe UV couplée à un moniteur muni d'une imprimante.

Lors de la révélation par ELISA, l'on dispose en plus des matériels ci dessus, des microplaques ELISA (Maxisorp®), un incubateur et un spectrophotomètre (lecteur de plaques ELISA) Labsystem Multiskan® MCC/340.

1-2. Matériel biologique

1-2-1. Les souches de trypanosomes témoins (ADN purifiés)

Pour la PCR, les témoins positifs sont constitués des ADN purifiés des différentes souches de trypanosomes pathogènes (*T. vivax*, *T. congolense* type savane, *T. congolense* type forêt et *T. brucei*) (annexe 1). Pour la mise au point de la PCR ELISA, les tests de spécificité et de sensibilité des sondes nucléiques sont d'abord réalisés avec ces échantillons.

1-2-2. Les échantillons de terrain

1-2-2-1 Couche des globules blancs du sang des bovins (Buffy Coat)

Sur le terrain, des prélèvements de sang sont effectués chez les animaux suspectés de trypanosomose. Un animal est suspect lorsque son hémocrite est inférieur ou égal à 25 % ou lorsqu'il présente les signes cliniques. Le sang est prélevé dans des tubes à hémocrite héparinés. Après centrifugation différentielle (**Murray et al., 1977**), le buffy coat est collecté dans des tubes eppendorfTM (de 0,5 ml ou 1,5 ml) contenant 30 µl d'eau distillée. Ces tubes portent une étiquette mentionnant le numéro de l'animal et la date du prélèvement. Une fiche indiquant les résultats de la parasitologie accompagne également ces échantillons.

1-2-2-2. Les organes de mouche

Les mouches sont capturées dans les zones infestées de glossines, à l'aide de pièges monoconiques ou biconiques. Au laboratoire, ces mouches sont disséquées sous loupe binoculaire pour la récolte des organes qui sont le proboscis, l'intestin moyen et les glandes salivaires. Ces organes sont introduits dans des tubes eppendorfTM contenant 30 µl d'eau distillée pour les proboscis et les glandes salivaires et 50 µl pour les intestins moyens. Ces tubes sont bien étiquetés avec mention de la date, d'un numéro et du nom de l'organe.

Au total, 425 échantillons de terrain, dont 311 buffy coats de bovins et 114 organes de mouche (71 proboscis, 32 intestins moyens et 11 glandes salivaires) ont été analysés en PCR classique et en PCR directe amplifiant les espaceurs internes transcrits de l'ADNr. La mise au point de la PCR ELISA a été faite avec d'une part des échantillons d'ADN de référence et d'autre part avec des échantillons de terrain positifs à la PCR utilisant le couple d'amorces Tryp 4R et Tryp 4S.

1-2-2-3. Le fragment cible (les ITS des trypanosomes)

Dans la PCR multispécifique, les segments à amplifier sont les espaceurs internes transcrits (Internal Transcribed Spacer : ITS) de l'ADN ribosomal (ADNr) des trypanosomes. L'ADN ribosomal est une séquence d'ADN codant pour l'ARN ribosomal (qui représente 80 % de l'ARN) et les segments de l'ADN séparant les différents gènes d'ADN ribosomaux. C'est généralement un locus étendu et complexe composé d'un grand nombre d'unités de répétition séparées l'une de l'autre par un espaceur interne transcrit. Chez les Kinétoplastides en général et en particulier chez les trypanosomes, l'unité de transcription de l'ADNr est composée à gauche des gènes 18S et à droite des gènes 28S avec au milieu l'ITS1 et l'ITS2 séparés par le gène 5.8S (absent chez les procaryotes).

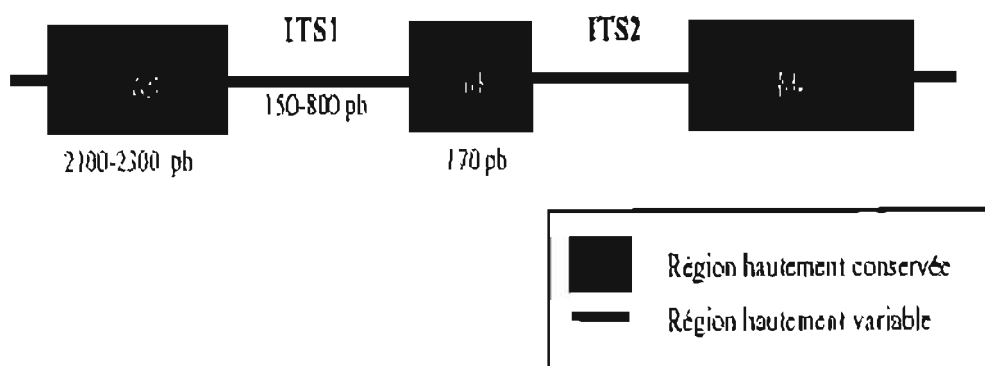


Figure 13 : Schéma d'une unité de transcription de l'ADNr

La particularité de cette portion du génome tient à la haute conservation des gènes 18S et 5.8S parmi les *Kinetoplastidae* et à la stabilité intra spécifique de l'ITS1. Les gènes 16S/18S sont regroupés en « Small Subunit » (SSU) et les gènes 23S/26S en « Large Subunit » (LSU). Les ITS sont alors des régions transcrites non codantes séparant les composantes individuelles des unités d'ADNr (SSU et LSU). Ils sont spécifiques d'une espèce de trypanosome et présentent une forte variabilité interspécifique. A partir d'un unique couple d'amorces, les ITS seront amplifiés et la taille des produits obtenus permettra de distinguer les différentes espèces de trypanosomes (fig. 14) (Desquesnes et al., 2001).

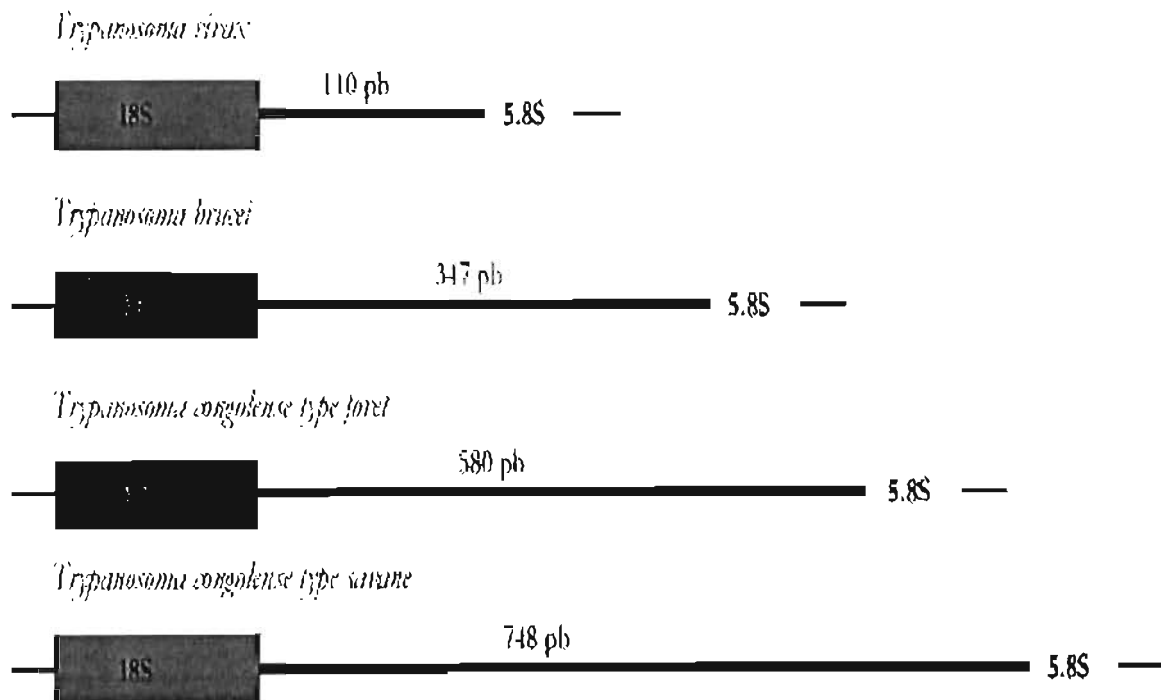


Figure 14 : Schémas des ITS1 des principaux trypanosomes pathogènes

1-3. Réactifs et solutions de travail

1-3-1. Pour la PCR directe

1-3-1-1. Les nucléotides (dNTP)

Ce sont les quatre désoxynucléotides triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Ils sont en large excès molaire dans le <<master mix>> ou mélange réactionnel. Ils sont disponibles de manière individuelle à une concentration de 200 μ M. La reconstitution des dNTP pour avoir la solution de travail, se fait en prenant 90 μ l d'eau distillée auxquels on ajoute 2,5 μ l de chacun des 4 nucléotides.

1-3-1-2. Les oligonucléotides (amorces)

Certaines indications président au choix du couple d'amorces pour la réaction PCR. Ainsi, les amorces doivent être rigoureusement spécifiques à la séquence d'ADN encadrant la région cible à amplifier. Les amorces ne doivent ni s'hybrider entre elles, ni s'autohybrider, d'où l'importance de la vérification des amorces pour leur complémentarité. La longueur d'une amorce doit être comprise entre 18 et 30 nucléotides et la composition en bases GC entre 45 et 60 %. Les amorces composant un couple doivent avoir des températures de fusion (T_m) voisines ou égales et leur taille doit être égale ou voisine avec à peu près le même pourcentage GC.

Pour la PCR monospécifique, des amorces ont été dessinées (**Masiga et al., 1992**) pour les principales espèces de trypanosomes pathogènes du bétail. Nous avons utilisé lors de nos travaux les couples d'amorces inscrits au tableau de l'annexe 2.

L'amplification des ITS des trypanosomes par PCR, est faite à l'aide du couple d'amorces Tryp 4R (Reverse) et Tryp 4S (Sens) (Annexe 3). Ces amorces présentent les caractéristiques de s'hybrider avec une homologie de 100% à l'ADN des trypanosomes pathogènes du bétail (**Desquesnes et al. 2001**).

Les séquences des amorces choisies sont envoyées à un laboratoire (Eurogentec) chargé de les synthétiser. Elles sont livrées sous forme lyophilisée avec des références comme la T_m , la quantité, le nombre de moles, la densité optique (DO). Ces amorces sont reconstituées pour avoir une solution de stock (à 500 μM), à partir de laquelle on réalise une dilution avec du Tris EDTA pour obtenir une solution de travail à 200 μM .

1-3-1-3. Le Tampon de la PCR

Le tampon habituellement utilisé est une solution commerciale (PCR Buffer, Quiagen®) composée de Tris à 10 mM, 1,5 mM de MgCl_2 et 50 mM de KCl. Il constitue le 1/10^e du volume individuel final pour chaque réaction.

Le Tris sert à tamponner le milieu réactionnel au niveau optimal pour l'activité de la Taq polymérase. L'ion Mg^{2+} est un cofacteur essentiel de la Taq polymérase. Ce cation bivalent interagit également avec les charges négatives de la chaîne d'ADN, limitant ainsi les forces de répulsion entre brin d'ADN et favorisant donc la stabilité de l'hybridation. Plus la concentration en MgCl_2 est importante, plus l'hybridation est facilitée que celle-ci soit spécifique ou non. Une trop forte concentration peut alors conduire à une augmentation des signaux non spécifiques. Enfin les ions K^+ sont également des cations monovalents capables d'interagir avec les liaisons hydrogène de l'ADN. Cette interaction va « piéger » les liaisons H_2 faibles présentes dans les zones de mésappariements et ainsi défavoriser les hybridations non spécifiques.

1-3-1-4. La Taq polymérase

On utilisait autrefois le fragment Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* pour la réaction PCR. Mais cette enzyme présente un inconvénient majeur du fait qu'on doit la renouveler à chaque cycle d'amplification (l'enzyme étant détruite à haute température lors de la dénaturation). De nos jours, on utilise la Taq polymérase qui est une enzyme provenant d'une bactérie thermophile : *Thermus aquaticus*. La Taq polymérase présente

en effet l'avantage de faire plusieurs cycles d'amplification à la fois. Le tampon et la Taq polymérase (à 5 U/ μ l) proviennent du même fournisseur qui est Quiagen®.

1-3-1-5. Le Diméthylsulfoxyde (DMSO)

Le DMSO aide à dépelotonner l'ADN et à le rendre ainsi plus accessible aux amorces. Il n'est pas utilisé dans le protocole d'amplification des ADN satellites des trypanosomes. Par contre le DMSO 5% s'avère nécessaire au protocole de PCR sur les ITS des trypanosomes. D'après des comparaisons faites entre le protocole ITS avec le DMSO et celui dépourvu de ce dernier et sans modifier les autres paramètres, il en ressort que les meilleurs résultats avec une sensibilité plus élevée ont été obtenus avec le protocole pourvu du DMSO à 5% du volume du mélange réactionnel (Guèye, 2003).

1-3-2. Pour la révélation par ELISA

1-3-2-1. Les dNTP et Digoxigénine

Pour la PCR-ELISA, les dNTP sont marqués avec de la digoxigénine, sous forme de **Digoxigénine-11-2' desoxyuridine-5' Triphosphate (DIG-dUTP)** qui est incorporé aux dNTP. Il s'agit d'un mélange de dNTP connu sous le nom de DIG-labeling mix, qui contient le dATP, le dCTP, le dGTP à une molarité de 2 mM ; le dTTP mélangé au DIG-dUTP avec respectivement 1,9 mM et 0,1mM. Ces dNTP sont dilués dans un tampon identique à celui de la PCR classique.

1-3-2-2. Les anticorps anti-digoxigénine conjugués à la peroxydase (Anti-Dig-Pod)

La détection des produits PCR contenant les dNTP marqués à la digoxigénine se fait à l'aide des anticorps anti-digoxigénine conjugués à la peroxydase connus sous

l'appellation d'anti-DIG-POD. La révélation de cette réaction digoxigénine-anti-DIG-POD se fait par l'ajout d'un substrat chromogène [ABTS® ou TMB substrate peroxydase + Peroxydase Solution B (H₂O₂)], qui donne une coloration verte pour un échantillon positif.

Ces anticorps sous forme lyophilisée sont d'abord reconstitués dans 250µl d'eau distillée dans un tube. Cette solution, sans être agitée, est laissée à la température ambiante pendant 15 minutes, puis diluée au 1/100^e avec le tampon de dilution du conjugué.

1-3-2-3. Les sondes marquées à la biotine et solution d'hybridation

Pour la mise au point de la PCR-ELISA, des sondes ont été dessinées à partir des ITS des principaux trypanosomes pathogènes du bétail (*T. vivax*, *T. congolense* type savane, *T. congolense* type forêt, et *T. brucei*). Des travaux antérieurs sur la recherche des sondes ont été réalisés au CIRDES. Le support de travail pour dessiner les sondes est le fichier (DNAsis) correspondant à l'alignement (en utilisant le BLAST) des échantillons d'une espèce et de la séquence disponible dans Genbank. Comme pour les amorces, plusieurs conditions sont à respecter lors du choix des sondes :

- ☞ d'abord le dessin des sondes doit se faire à l'intérieur des zones d'intra-taxon ;
- ☞ la sonde ne doit pas s'autohybrider, c'est à dire que les trois bases à l'extrémité 3' ne doivent pas s'hybrider sur une autre partie de la sonde ;
- ☞ les bases extrêmes ne doivent pas être complémentaires, en raison d'un appariement possible ;
- ☞ les ITS étant des séquences polymorphes, on y trouve de nombreux microsatellites (par exemple CACACA) et des séquences répétées (comme CCCCC), lors de l'élaboration des sondes, ces zones sont à éviter à cause de leur capacité d'hybridation non spécifique. Autrement dit la différence d'une séquence à l'autre, peut être d'une répétition et cela engendre une mauvaise hybridation ;

☞ le pourcentage GC¹ doit être supérieur à 60 %, afin d'assurer une hybridation plus stable ;

☞ l'homologie entre la sonde spécifique d'une espèce et les ITS des autres espèces doit être inférieure à 80 % ;

☞ la taille des sondes doit être comprise entre 20 et 30 pb.

☞ enfin, un dernier contrôle qui consiste à l'alignement des 7 bases en position 3' de la sonde d'une espèce donnée avec les différents ITS d'autres espèces a été réalisé à l'aide toujours du logiciel DNAsis. Les sondes présentant un alignement incomplet ou présentant un alignement total, mais dont l'homologie ne se prolonge pas, sont retenues candidates pour le test ELISA.

Ainsi, pour les 4 espèces de trypanosomes pathogènes, 3 sondes par espèces ont été choisies, il s'agit des sondes STV1, STV2, STV3 pour *T. vivax* ; STCS1, STCS2, STCS3 pour *T. congolense* type savane ; STCF1, STCF2, STCF3 pour *T. congolense* type forêt ; et STB1, STB2, STB3 pour *T. brucei* (Annexe 4). Ces sondes marquées à la biotine en position 5' ont été synthétisées par la société PROLIGO Primers & Probes.

La solution d'hybridation pour une sonde donnée se prépare à partir du tampon d'hybridation et de la sonde marquée à la biotine à une concentration de 7,5 pmol / ml. Le tampon d'hybridation utilisé (Masaké et al., 2002) est composé de : 6 x SSPE (Saline Sodium Phosphate-EDTA) avec 0,9 M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄.H₂O, 6 mM EDTA ; 5 x Denhardt'solution (1 g / l de chacun des produits suivants : ficoll, polyvinyle pyrrolidone et sérum d'albumine bovin) ; 0,1% de N-Lauroyl sarcosine (Sodium sarcosine) ; 0,02% de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate).

¹ Le pourcentage GC est calculé à l'aide du logiciel « Freqsq » sur Infobiogen.

1-3-2-4. La streptavidine

La streptavidine est une protéine de poids moléculaire d'environ 60000 Kd, isolée à partir d'une bactérie appelée *Streptomyces avidini*. Elle a une haute affinité pour la biotine. C'est cette interaction streptavidine / biotine qui est mise à profit pour la fixation des produits PCR dans les plaques ELISA.

1-3-2-5. La solution de lavage et tampon de blocage

La solution de lavage est composée d'un tampon PBS avec 1 ml de Tween-20 par litre de tampon. Le tampon de blocage est aussi composé de PBS-Tween-20 à 0,5 % et du BSA à 0,2 %. Le pH des tampons doit être vérifié et corrigé au besoin avant leur utilisation.

2. Méthodes

2-1. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est une étape préalable au bon déroulement de la réaction PCR, elle conditionne très souvent la sensibilité de cette réaction.

2-1-1. Les échantillons d'ADN purifiés

On procède d'abord à la culture des trypanosomes sur des hôtes mammifères sensibles. Sont habituellement utilisées des souris irradiées pour fragiliser leur système immunitaire et favoriser ainsi la multiplication rapide des parasites. Les prélèvements de sang s'effectuent à parasitémie très élevée. Le sang récolté est mélangé avec un tampon PSG (Phosphate Sodium Glucose), puis filtré sur une mini-colonne de DEAE-cellulose (Lahan et Godfrey, 1970). Le DEAE-cellulose ne laisse passer que les trypanosomes qui sont ensuite concentrés par centrifugation. Puis, les parasites sont lysés par congélation et

traités au chelex-100. Enfin, pour confirmer l'espèce, on teste ces échantillons avec des amorces monospécifiques.

2-1-2. Traitement au chelex-100®

Dans notre protocole de PCR, il n'y a pas d'extraction d'ADN à partir des échantillons de terrain. Les échantillons sont traités au chelex-100 à 5 %. Le rôle du chelex est ici de fixer les inhibiteurs de la PCR, en effet, les billes de chelex entraînent au fond du tube des éléments nuisibles à la réaction d'amplification.

Le traitement consiste à triturer d'abord soigneusement les échantillons, puis à introduire dans les tubes les mêmes volumes respectifs (30 µl) de chelex-100 à 5 %. Ces tubes sont agités avec le vortex, avant d'être chauffés à l'aide d'une plaque chauffante à 56°C pendant une heure et à 94°C durant 30 minutes. Les échantillons, une fois refroidis à 4°C sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation en PCR.

2-2. Principe de la PCR

La PCR permet d'amplifier par une réaction enzymatique répétée, un fragment cible d'ADN balisé par un couple d'amorces, une pour chaque brin. Cette réaction repose donc sur les propriétés de l'ADN polymérase favorisant l'extension de nouveaux brins d'ADN formés. Le procédé nécessite la succession de nombreux cycles avec 3 étapes, chacune se déroulant pendant un certain temps (en général très court) et à une température bien précise. Les 3 étapes sont :

- la dénaturation de l'ADN par ouverture de sa double hélice, l'ADN se trouve alors sous forme simples brins (à environ 94°C) ;
- l'hybridation des amorces sur l'ADN simple brin (de part et d'autre du fragment cible), l'une avec une séquence située en 3' sur un brin, l'autre avec une séquence également située en 3' sur l'autre brin (à environ 55°C) ;

➤ l'élongation au cours de laquelle, la Taq polymérase catalyse (à environ 72°C) à partir de chaque amorce la synthèse d'un brin d'ADN (dans le sens 5'►3') en respectant la complémentarité des bases.

L'amplification se fait de manière exponentielle et au bout de 20 cycles, il devrait avoir un million de copies de l'ADN cible. Ainsi, à partir d'un échantillon biologique, très souvent peu abondant, la PCR permet d'obtenir rapidement une quantité importante et exploitable d'un segment précis d'ADN.

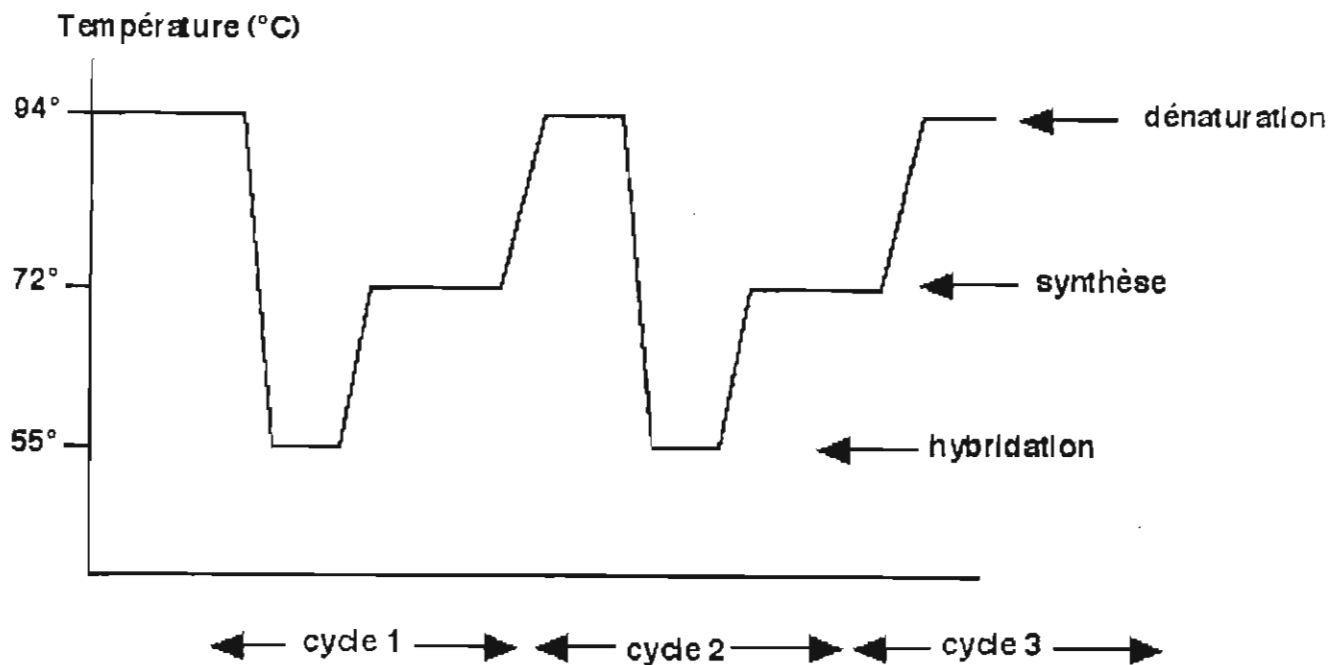


Figure 15 : Les étapes de la PCR et cycles thermiques

2-3. Protocole de PCR classique

2-3-1. Réalisation du mélange réactionnel

Le mélange des différents réactifs de la PCR est appelé « master mix » ou mélange réactionnel, à ce mélange est ajouté l'échantillon à tester. Le volume des différents constituants du mélange réactionnel dépend du nombre de réactions à effectuer. En PCR classique, un volume final de 10 µl de mélange réactionnel est reparti dans des tubes eppendorf de 0,2 ml, on y ajoute 1µl de l'échantillon à amplifier. La concentration et le volume individuel des différents réactifs sont inscrits dans le tableau de l'annexe 5. Le

volume total d'un réactif donné est obtenu en multipliant son volume individuel par le nombre de réactions. Pour palier l'incertitude sur le pipetage, on prépare une quantité de mix légèrement supérieure au nombre de réactions. Il est utile de rappeler que la Taq polymérase est ajoutée en dernière position (juste avant de distribuer le mélange réactionnel), en outre, une fois le mélange réalisé, les tubes sont brièvement agités avec le vortex.

2-3-2. Programme d'amplification

L'amplification se fait l'aide d'une machine appelée « Thermocycleur » programmable à différentes températures. Le protocole de la PCR classique utilise le thermocycleur MJ Research Inc, PTC 200™ (qui peut contenir les tubes eppendorf de 0,2 ml). Le programme d'amplification initialement dénommé « programme Diag », conformément aux étapes de la PCR est composé : d'une étape de préchauffage à 94°C pendant 30 secondes ; suivie d'un cycle composé d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une phase d'hybridation à 55°C pendant un minute et une phase d'élongation à 72°C pendant une minute. Ce cycle est répété 30 fois et se termine par une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes et une phase de réfrigération à 4°C.

Dans l'objectif de réduire les hybridations non spécifiques, une optimisation de ce programme a été réalisée sur la base de la température d'hybridation des amorces qui sont spécifiques d'espèce. En faisant la moyenne de la température de fusion des 2 amorces, des programmes d'amplification propres à chaque espèce ont été conçus pour les principaux trypanosomes pathogènes du bétail fréquemment rencontrés. Il s'agit des programmes « NRP » pour *T. brucei*, « TV » pour *T. vivax*, et « TCS » pour *T. congolense* type savane (Tableau 6). Dans ce dernier programme réalisé en « Hot Start », on effectue d'abord un préchauffage de l'amplificateur à 94°C pendant 3 minutes, avant de mettre les tubes dans la machine

Tableau 1 : Programmes d'amplification de la PCR monospécifique

Programmes	TV	NRP	TCS	
Etapes				
Préchauffage	94°C, 30 secondes		94°C 3 minutes	
Dénaturation	94°C, 30 secondes			
Hybridation	63°C 30 secondes	64°C 30 secondes	57°C 30 secondes	X 30
Elongation	72°C, 30 secondes			
Elongation finale	72°C, 5 minutes			
Réfrigération	4°C			

2-3-3. Electrophorèse et visualisation des produits PCR

Les produits PCR obtenus, sont migrés sur un gel d'agarose 1,5 %. On pèse 1,875 g d'agarose qui est dissout dans 125 ml de tampon TBE (Tris Borate-EDTA), puis chauffé pendant 2 minutes dans un four micro-onde. On laisse refroidir et on y ajoute 2,5 µl (10 mg / ml) de BET (Bromure d'Ethidium). Le mélange est coulé pour polymériser dans une cuve sur laquelle sont placés des peignes, dont les empreintes sur le gel constitueront les puits de dépôt des échantillons. Un µl de tampon de charge² (Loading buffer) est mélangé à 10 µl de produits PCR et déposé dans un puits du gel. De part et d'autre du gel, on dépose 3µl de marqueur de poids SL 100³ (Step Ladder 100, promega®) dont la taille des fragments d'ADN croit de 100 à 100 bases et va jusqu'à 2000 bases. La migration se fait dans une cuve remplie de TBE (on y rajoute après le dépôt du BET), à 120 V pendant une heure. La visualisation des produits PCR se fait sous lampe UV, relié à un dispositif photographique en liaison avec un ordinateur permettant de sauvegarder l'image sur disquette.

¹ Le tampon de charge ou tampon de dépôt est constitué de glycérol et d'un colorant (Xylène et bromophénol). Le glycérol entraîne l'échantillon au fond du puits et le colorant permet de visualiser le front de migration pendant l'électrophorèse.

² Le SL 100 permet de connaître la taille des produits obtenus pendant la lecture du gel.

2-4. Protocole de PCR-ITS avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S

2-4-1. Réalisation du mélange réactionnel

Comme pour la PCR classique, le volume final des différents réactifs du master mix dépend du nombre de réactions à effectuer. Par contre, dans le protocole de PCR-ITS, un volume de 11 μ l de mélange réactionnel est reparti dans des tubes de 0,5 ml. Le master mix ajouté à un volume de 3 μ l d'échantillon, constitue le mélange réactionnel prêt pour l'amplification, soit donc un volume final de 14 μ l. En plus, à la différence de la PCR monospécifique, ici on met dans le mélange réactionnel, le DMSO à 5% du volume total, le contrôle positif est constitué de 1 μ l d'ADN associé au master mix. Afin d'optimiser les résultats de l'amplification, certains paramètres ont été variés. Ainsi, une concentration de 0,3 μ M pour chacune des 2 amorces et une concentration de 0,4 UI / 10 μ l pour la Taq polymérase ont donné les meilleurs résultats (Annexe 6).

2-4-2. Programme d'amplification

Pour l'amplification des ITS, c'est le thermocycleur MJ Research Inc, PTC 500TM pouvant contenir les tubes de 0,5 ml qui est utilisé. Le programme d'amplification auparavant mis en œuvre est le programme T50. Ce dernier comporte une étape de préchauffage à 94°C pendant 2 minutes, un cycle composé d'une étape de dénaturation à 94°C durant 20 secondes, d'une étape d'hybridation des amorces à 50°C pendant 45 secondes, suivie d'une étape d'extension se déroulant à 72°C pendant 30 secondes. On effectue 38 cycles au bout desquels il y a une élongation finale à 72°C pendant 2 minutes et enfin une phase de réfrigération à 4°C.

Dans le but d'améliorer la sensibilité, mais aussi et surtout la spécificité de la réaction PCR avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S, l'optimisation du programme d'amplification a conduit à une variation en gradient de la température d'hybridation. Ainsi le programme intitulé **T4RS** a été finalement retenu et appliqué aux amorces Tryp 4R et Tryp 4S. Ce programme est composé d'abord d'une étape de préchauffage à 94°C pendant 2 minutes et de 40 cycles. Un cycle d'amplification comprend une étape de

dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, suivie d'une étape d'hybridation (à température variable) qui dure 45 secondes, puis une étape d'élongation à 72°C pendant 30 secondes. Les températures d'hybridation vont de 42°C à 50°C et croissent de 2 à 2°C, le nombre de cycles augmente avec l'augmentation de la température d'hybridation. On a pour 42°C et 44°C 2 cycles d'amplification, 6 cycles pour 46°C, 8 cycles avec une température d'hybridation de 48°C et enfin 22 cycles pour 50°C. A la fin des 40 cycles on a une étape d'élongation finale (à 72°C pendant 2 minutes) précédant une phase de réfrigération à 4°C.

2-4-3. Electrophorèse, visualisation et interprétation des produits PCR

Les produits PCR obtenus à la suite de l'amplification avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S sont migrés sur un gel d'agarose selon un processus analogue à celui de la PCR classique. Il existe néanmoins quelques différences, le gel d'agarose est dans ce cas de 2%. On pèse donc 2,5 g d'agarose dissout comme pour la PCR monospécifique dans 125 ml de tampon TBE. La migration par électrophorèse, se fait aussi à 120V, mais avec une durée un peu plus longue qui est en moyenne d'une heure 30 minutes. La visualisation des produits d'amplification sur gel d'agarose est identique à tous les protocoles de PCR.

L'interprétation des résultats est rendue possible par le marqueur de poids SL 100 déposé aux deux extrémités du gel. Les tailles des produits PCR avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S des principaux trypanosomes pathogènes du bétail sont au préalable connues (voir annexe 3). En effet, le SL 100 permet non seulement de connaître et ou de confirmer la taille des produits PCR, mais aussi d'identifier les témoins positifs (ADN des différentes espèces). Le résultat positif d'un échantillon donné se traduit par l'apparition d'une bande ou d'un signal au même niveau que le témoin positif d'une espèce donnée. On aura donc selon les cas une ou plusieurs bandes apparaissant à différents niveaux.

2-5. PCR ELISA

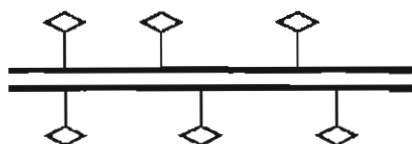
2-5-1. Principe et méthodes

La PCR-ELISA est une méthode d'amplification d'une séquence d'ADN cible qui repose sur les mêmes principes de la PCR, mais utilisant pour sa révélation l'hybridation d'une sonde d'ADN couplée à une réaction enzymatique. Le principe général du marquage (ici non radioactif) se fonde sur la fixation d'une molécule marqueur sur l'ADN sonde selon des modalités proches de celles utilisées pour le marquage immuno-enzymatique (Kodjo et al., 1993). Deux méthodes sont habituellement utilisées pour les analyses de PCR-ELISA.

➤ Dans la première méthode, les produits d'amplification obtenus avec des amorces marquées à la biotine, sont directement fixés au fond de la microplaque préalablement sensibilisée à la streptavidine. Puis les produits PCR sont hybridés par une sonde spécifique marquée à la digoxigénine ou à la fluorescéine. La présence de cette sonde est ensuite détectée par des anticorps anti-digoxigénine ou anti-fluorescéine, conjugués à l'enzyme d'un chromogène telle que la peroxydase ou la phosphatase alcaline. Après l'ajout du substrat (peroxyde pour la peroxydase et NADPH pour la phosphatase alcaline), il apparaît une coloration caractéristique pour les échantillons positifs.

➤ La deuxième méthode utilisée dans la présente étude, consiste à hybrider les produits PCR marqués à la digoxigénine, avec une sonde d'ADN spécifique (à l'ITS d'une espèce de trypanosome) marquée à la biotine et se trouvant fixée au fond d'une microplaque sensibilisée à la streptavidine. La révélation des produits PCR se fait à l'aide d'anticorps anti-digoxigénine conjugués à la peroxydase, après l'ajout du substrat (ABTS® ou TMB peroxydase+ H₂O₂). Cette méthode fait intervenir quatre étapes principales :

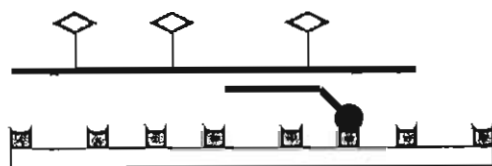
1). La première étape consiste au marquage des produits PCR avec la digoxigénine, en utilisant le DIG-Labeling-mix pendant la réaction d'amplification.



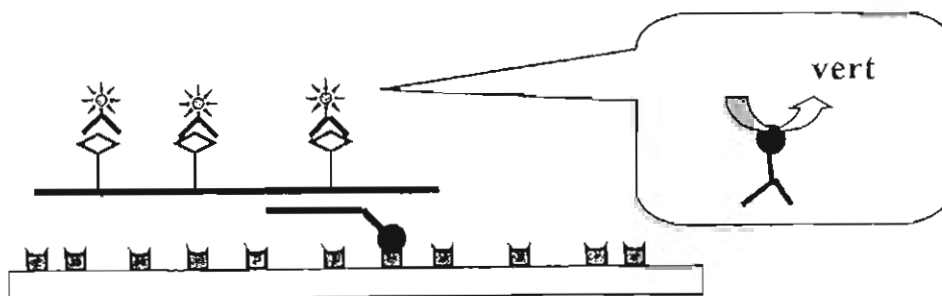
2). Dans la deuxième étape, les produits PCR sont dénaturés et hybridés avec une sonde spécifique marquée à la biotine. La sonde fixe spécifiquement une séquence interne de l'ADN cible.



3). A la 3^{ème} étape, l'ensemble sonde spécifique marquée à la biotine hybridée avec la séquence cible d'ADN, est immobilisé dans une microplaque sensibilisée à la streptavidine.



4). Enfin à la quatrième étape, les produits PCR marqués à la digoxigénine, hybridés et immobilisés dans la microplaque, sont détectés grâce à des anticorps anti-digoxigénine conjugués à la peroxydase (Anti-DIG-POD). La révélation se fait par l'ajout du substrat (ABTS[®] ou TMB peroxydase+H₂O₂). La lecture des microplaques se fait à 450 nm au spectrophotomètre.



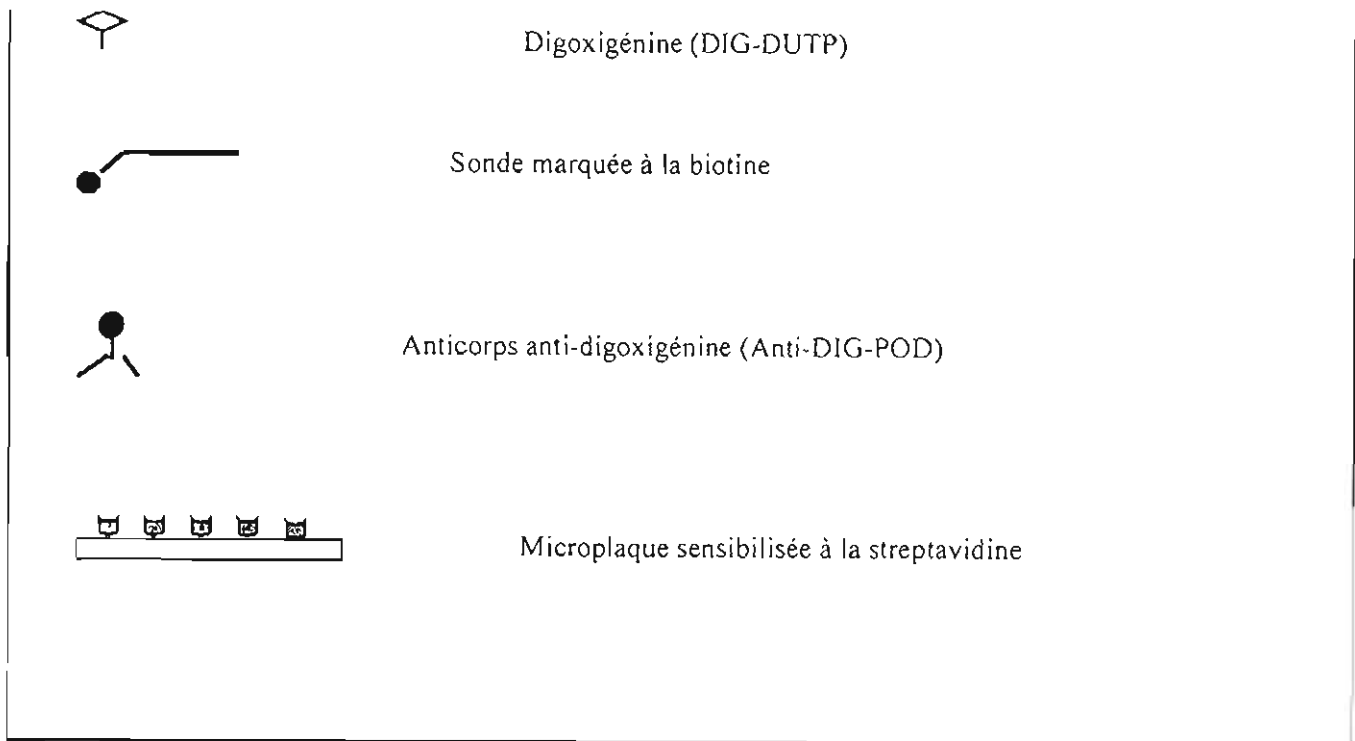


Figure 16 : Symboles utilisés pour expliquer le principe de la PCR-ELISA

2-5-2. Protocole de PCR ELISA

La détection des trypanosomes dans les échantillons biologiques (ADN et échantillons de terrain) par PCR ELISA s'effectue suivant une méthode qui comporte les étapes suivantes : la réalisation du mélange réactionnel, l'amplification de ce mélange, et enfin la révélation par ELISA des produits PCR hybridés avec les sondes. Afin de vérifier la taille attendue des produits PCR, la révélation par ELISA est précédée d'une détection des produits d'amplification sur gel électrophorétique. Cette étape est facultative dans le protocole de la PCR ELISA, elle n'est utilisée que pendant la phase expérimentale.

2-5-2-1. Réalisation du mélange réactionnel

A la différence de la PCR directe, le mélange réactionnel de la PCR-ELISA contient des dNTP marqués avec de la digoxigénine sous forme de 2'-desoxyuridine-5'triphosphate (DIG-dUTP). Les dTTP et les DIG-dUTP sont mélangés dans des proportions 19 / 1, avec 1,9 mM pour les dTTP et 0,1 mM pour les DIG-dUTP. Les dATP, dCTP et dGTP gardent la même molarité (0,2 mM) comme dans les autres protocoles de PCR.

Pour un volume final de 40 μ l, on reparti dans les tubes de 0,5 ml, 36 μ l de mélange réactionnel et 4 μ l d'échantillon de terrain. Pour le contrôle positif, on ajoute au mélange réactionnel 2 μ l d'ADN et 4 μ l d'eau distillée pour le contrôle négatif. Le volume individuel et la concentration des différents réactifs sont inscrits au tableau de l'annexe 7.

2-5-2-2. Programme d'amplification

Les tubes contenant le mélange (master mix et échantillon) sont agités brièvement avec le vortex, puis placés dans le thermocycleur (MJ Research Inc, PTC 500™). L'amplification se fait selon le programme T4RS décrit plus haut (cf. programme d'amplification pour la PCR-ITS).

2-5-2-3. Détection des produits PCR sur gel d'agarose

C'est une étape qui n'est pas indispensable dans le protocole de la PCR ELISA, mais elle est nécessaire, car elle permet de vérifier la taille attendue des produits d'amplification, elle permet en plus de détecter les éventuelles contaminations susceptibles d'interférer avec la révélation ELISA. L'électrophorèse est réalisée avec un gel d'agarose à 2 % dans les mêmes conditions décrites pour la PCR directe.

2-5-2-4. Révélation des produits d'amplification par ELISA

La détection des produits PCR marqués à la digoxigénine et hybridés avec les sondes se déroule suivant un protocole analogue à celui de la technique ELISA. Pour chaque échantillon à tester, on prévoit deux puits de la microplaque Maxisorp® sensibilisée à la streptavidine. Les étapes de cette opération sont décrites au niveau de l'annexe 8.

2-5-3. Choix des sondes

Dans un premier temps, on vérifie la capacité d'hybridation des sondes en testant 3 sondes d'une espèce donnée avec l'ADN de cette même espèce. Puis cette hybridation est effectuée avec un ensemble d'échantillons constitués d'ADN, de buffy coat et d'organes de mouche testés positifs à l'espèce correspondante aux 3 sondes. On réalise deux fois ces tests à l'issue desquels, les sondes présentant les meilleurs résultats sont choisies pour la suite des travaux. Les résultats doivent se traduire par une bonne sensibilité, c'est-à-dire le maximum d'échantillons révélés positifs, mais également des densités optiques relativement élevées à la lecture au spectrophotomètre. A l'issue de ces premiers essais les sondes STV2, STCS1 et STCS2, STCF1 et STB2 ont été retenues pour respectivement *T. vivax*, *T. congolense* type savane, *T. congolense* type forêt et *T. brucei*.

2-5-4. Evaluation des sondes

Avant l'utilisation des sondes retenues candidates pour le test ELISA, il convient de vérifier une fois encore leur efficacité. Il s'agit de procéder au contrôle de la spécificité et de la sensibilité des sondes sur des ADN purifiés et sur des échantillons de terrain, à savoir des buffy coats de bovins et des organes de mouche.

On réalise une PCR plurispécifique (utilisant le couple d'amorces Tryp 4R et Tryp 4S) amplifiant au total 10 échantillons d'ADN purifiés des principales espèces de trypanosomes pathogènes (4 ADN pour *T. vivax*, 4 pour *T. congolense* type savane, 1 pour *T. congolense* type forêt et 1 pour *T. brucei*). Les produits d'amplification sont hybridés avec toutes les sondes choisies et révélés par la technique ELISA. Ce test est ensuite effectué sur des prélèvements sanguins de bovins et des organes de mouches testés positifs (pour chacune des espèces de trypanosomes) à la PCR utilisant les amorces Tryp 4R et Tryp 4S.

Le signal à la révélation ELISA ne doit être positif que lorsque la sonde correspond à l'ADN de l'espèce pour laquelle elle a été dessinée ou à l'échantillon de terrain infecté par cette espèce. La sensibilité de la sonde est appréciée en fonction du nombre d'échantillons

détectés positifs par la technique ELISA et aussi en fonction de la valeur de la densité optique.

2-5-5. Optimisation de la technique

Dans le but d'améliorer la spécificité, mais aussi la sensibilité du test ELISA, certains paramètres, dont entre autre la température d'hybridation et le volume des produits d'amplification ont été variés.

La température optimale d'hybridation varie en fonction de la température de fusion (T_m), qui elle-même varie en fonction de la sonde. La température d'hybridation optimale doit être inférieure à au moins 5 à 10°C de la T_m . En dessous de ces valeurs, on observe fréquemment des hybridations non spécifiques qui sont à l'origine des faux positifs à la révélation ELISA. A l'étape d'hybridation du protocole de révélation des produits PCR, nous avons appliqué des températures allant de 37 à 63°C en fonction de l'espèce de trypanosome à détecter.

Tableau 2 : Températures d'hybridation des sondes utilisées pour la PCR ELISA

Sondes	Espèces	T_m	Température d'hybridation
STB2	<i>T. brucei</i>		
STCF1	<i>T. congolense</i> type forêt	62°C	52°C à 57°C
STCS1	<i>T. congolense</i> type savane	66°C	56°C à 61°C
STCS2			
STV2	<i>T. vivax</i>	73°C	63°C à 68°C

NB : Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une température de 60°C retenue pour toutes les sondes.

Par ailleurs, le volume des produits PCR s'est avéré comme un paramètre déterminant la sensibilité de la technique de révélation ELISA. Ainsi, pour *T. vivax* le volume des amplifias est passé de 5 à 7 µl, pour les autres taxons de trypanosomes le

volume reste égal à 5 μ l. Enfin, la fixation de la sonde marquée à la biotine (avec le tampon d'hybridation porté à une température de 60°C) dans la plaque avant d'y rajouter le mélange produit PCR / NaOH a considérablement amélioré les résultats du test.

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Résultats

1-1. Méthodes parasitologiques

Pour les techniques parasitologiques, nous ne disposons que des résultats des prélèvements sanguins de bovins (buffy coat). Sur les 311 buffy coat analysés, 308 résultats ont été fournis. Cette méthode totalise 106 cas positifs, soit 31,41(±5,30) % d'infections par les trypanosomes (*T. vivax* et *T. congolense* type savane).

Ainsi pour *T. vivax* 25 cas d'infections ont été détectés, soit 8,11(±3,05) %. 81 se sont révélés positifs à *T. congolense* type savane, soit un taux d'infection de 26,30(±4,96) %. La méthode de buffy coat n'a pu identifier aucune infection en dehors de ces deux taxons, et aucune infection mixte n'a été mise en évidence. (Tableau 4)

1-2. PCR classique

Sur l'ensemble des échantillons de terrain, la PCR monospécifique a identifié au total 168 signaux positifs, soit 39,53 (±4,65) %. Parmi ces échantillons positifs, 51 signaux positifs sont rapportés à *T. vivax*, ce qui correspond à une prévalence de 12(±3,09) %. La prévalence de *T. congolense* type savane est de 23,29(±4,02) %, soit 99 échantillons positifs. Pour *T. congolense* type forêt et *T. brucei*, on a observé respectivement 5 cas positifs (1,17 %) et 4 cas positifs (0,94 %). Les infections mixtes détectées sont au nombre de 9, dont 6 infections mixtes à *T. vivax* et *T. congolense* type savane, 2 infections mixtes à *T. vivax* et *T. brucei* et un cas d'infection par les 3 espèces de trypanosomes (*T. vivax*, *T. congolense* type savane et *T. brucei*). (Tableau 7)

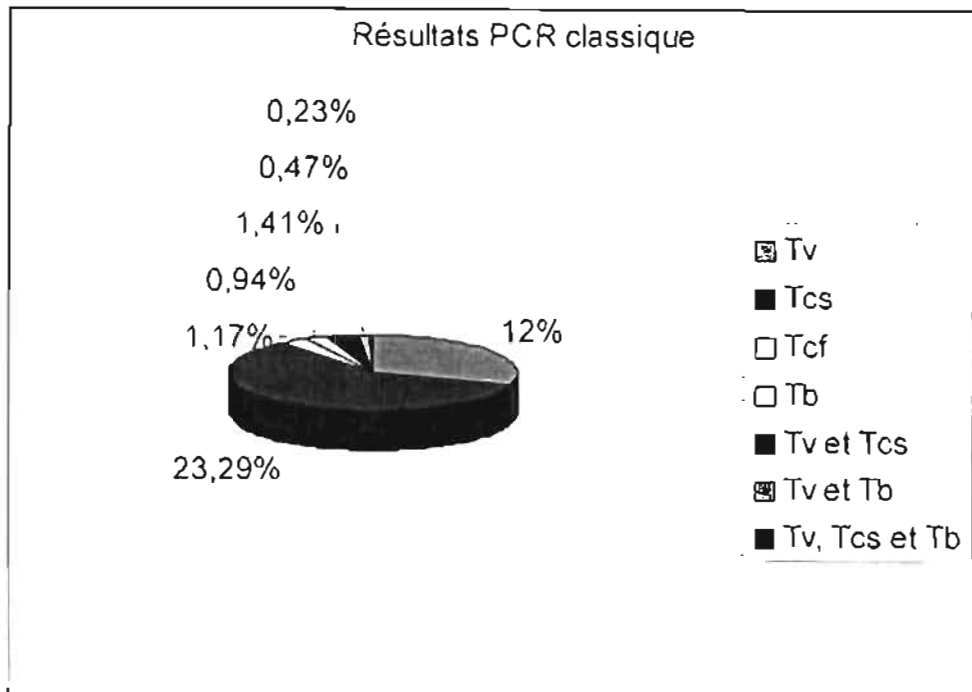


Figure 17 : Résultats obtenus avec les amorces monospécifiques

T v : *T. vivax*, T c s : *T. congolense* type savane, T c f : *T. congolense* type forêt, T b : *T. brucei*

1-2-1. Les échantillons sanguins de bovins

L'analyse en PCR classique des buffy coats de bovins utilise 3 couples d'amorces spécifiques à 3 espèces de trypanosomes pathogènes (*T. vivax*, *T. congolense* type savane, *T. brucei*). Sur les 311 buffy coats testés, la PCR monospécifique a détecté 129 cas positifs, soit un taux d'infection de 41,48(±5,47) %.

Pour *T. vivax* on a 27 signaux positifs soit 8,68 (±3,12) %; avec les amorces classiques de *T. congolense* type savane on a 94 cas positifs, soit une prévalence de 30,22(±5,10) % ; 1 seul cas (0,32 %) d'infection à *T. brucei* a été observé. On note en plus 6 cas d'infections mixtes à *T. vivax* et *T. congolense* type savane et 1 cas de triple infection parasitaire (à *T. vivax*, *T. congolense* type savane et *T. brucei*). (Tableau 4).

1-2-2. Les organes de mouche

La PCR classique a révélé sur les 114 organes de mouche, 39 cas positifs, soit 34,21(±8,71) %. Parmi ces organes, on compte 71 proboscis dont 26 ont donné des signaux positifs (soit 38,03 % du nombre de proboscis et 23,68 % de l'ensemble des organes de mouche). Sur les 32 intestins moyens, 12 sont révélés positifs et parmi les 11 glandes salivaires, 1 cas est détecté positif (tableau 3).

Pour *T. vivax*, la PCR classique a identifié 24 cas positifs qui correspond à 21,05 (±7,48) % sur les 114 organes de mouche, dont 19 cas positifs dans les proboscis et 5 cas d'infections intestinales. On observe 5 signaux positifs à *T. congolense* type savane, dont 4 au niveau des proboscis et 1 dans les intestins moyens. Pour *T. congolense* type forêt et *T. brucei*, il y a respectivement 5 cas positifs (4,38 %) et 3 cas positifs (2,63 %). Deux cas d'infections mixtes (à *T. vivax* et *T. brucei*) ont été observés sur les mouches.

Tableau 3 : Résultats positifs obtenus avec les organes de mouche en PCR classique

	<i>Organes de mouche positifs en PCR classique</i>				Total	%
	Proboscis	Intestins moyens	Glandes salivaires			
<i>T. vivax</i>	19	5	0	24	21,05 %	
<i>T c s</i>	4	1	0	5	4,38 %	
<i>T c f</i>	2	3	0	5	4,38 %	
<i>T. brucei</i>	1	1	1	3	2,63 %	
T v et T b	1	1	0	2	1,75 %	
Total	26	12	1	39	34,21 %	

1-3. PCR (ITS) avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S

La PCR utilisant le couple d'amorces Tryp 4R et Tryp 4S, vise la mise en évidence de 4 espèces de trypanosomes qui sont *T. vivax*, *T. congolense* type savane, *T. congolense* type forêt et *T. brucei*. Sur le total des échantillons de terrain analysés, la PCR plurispécifique a permis l'identification de 127 signaux positifs, soit donc 29,88(±4,35) %. Pour *T. vivax*, on totalise 97 cas positifs soit 22,82(±3,99) % ; 23 échantillons sont révélés positifs à *T. congolense* type savane, soit 5,41(±2,15) % de prévalence ; 1 signal positif a été observé pour *T. congolense* type forêt ; et pour *T. brucei* on compte 3 signaux positifs. On a également observé 3 cas d'infections mixtes, dont 1 infection à *T. vivax* et *T. congolense* type forêt et 2 infections à *T. vivax* et *T. congolense* type savane. (Tableau 7)

1-3-1. Les échantillons sanguins de bovins

Parmi les 311 buffy coats de bovins, la PCR-ITS a révélé toutes espèces de trypanosomes confondues 90 cas positifs, soit 28,94(±5,04) %. Les infections à *T. vivax* détectées par les amorces Tryp 4R et Tryp 4S sont de 66 cas, soit une prévalence de 21,22(±4,54) %. Ces amorces ont permis l'identification de 21 échantillons positifs à *T. congolense* type savane, soit 6,75(±2,78) % de l'ensemble des buffy coats ; une seule infection à *T. brucei* a pu être détectée ; aucune infection à *T. congolense* type forêt n'a pu être révélée dans ces prélèvements sanguins de bovins. En revanche 2 cas d'infections mixtes (à *T. vivax* et *T. congolense* type savane) ont été identifiés. (Tableau 4)

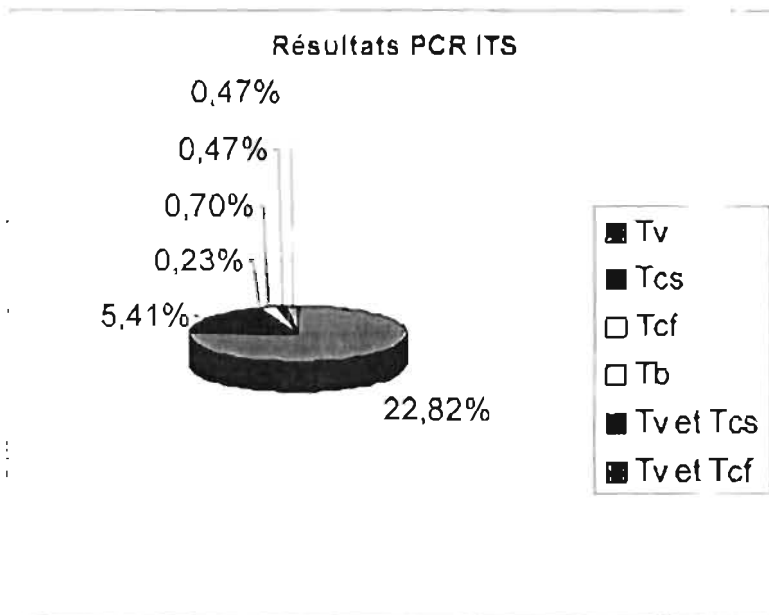


Figure 18 : Résultats obtenus avec les amorces Tryp 4R et Tryp4S

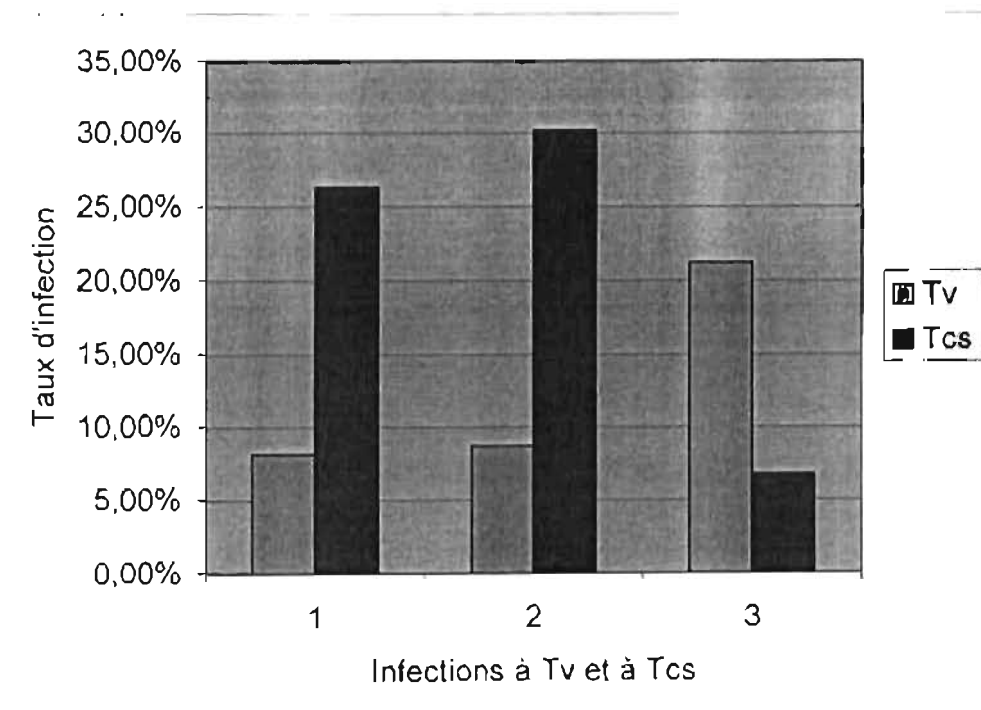


Figure 19 : Cas d'infections à *Tv* et à *Tc s* détectées par les 3 tests de diagnostic

1 : Méthodes Parasitologiques

2 : PCR classique

3 : PCR-ITS

1-3-2. Les organes de mouche

Les amorces Tryp 4R et Tryp 4S ont révélé sur les 114 organes de mouche, 37 cas positifs, soit 32,45(±8,59) %. Parmi les 71 proboscis, on observe 30 signaux positifs ; 7 cas se sont révélés positifs parmi les 32 intestins moyens ; aucun signal n'a été observé parmi les 11 glandes salivaires avec la PCR -ITS. On note une seule infection mixte à *T. vivax* et *T. congolense* type forêt.

Pour *T. vivax*, on a 31 cas détectés, soit 27,19(±8,16) % de prévalence, dont 27 signaux avec les proboscis et 4 cas d'infection intestinale. Pour les trypanosomes du genre *Nannomonas*, la prévalence est respectivement de 1,75 % pour *T. congolense* type savane (2 cas positifs), et de 0,32 % pour *T. congolense* type forêt. Pour le genre *Trypanozoon*, on a 2 signaux positifs (1,75 %) avec *T. brucei*. (Tableau 5)

Tableau 4 : Prélèvements sanguins de bovins positifs aux tests de diagnostic

	Echantillons positifs						K _{hi} ² (PCR classique / PCR-ITS)
	Méthodes Parasitologiques	%	PCR classique	%	PCR (ITS)	%	
<i>T. vivax</i>	25	8,11 %	27	8,68%	66	21,22 %	19,23*
<i>Tcs</i>	81	26,30 %	94	30,21 %	21	6,75 %	56,84*
<i>Tcf</i>	0		0		0		
<i>T. brucei</i>	0		1	0,32 %	1	0,32 %	
<i>Tv</i> et <i>Tcs</i>	0		6	1,93 %	2	0,64 %	
<i>Tv</i> et <i>Tb</i>	0		0		0		
<i>Tv</i> , <i>Tcs</i> et <i>Tb</i>	0		1	0,32 %	0		
Total	106	34,41 %	129	41,48 %	90	28,94 %	10,72*

* Différences significatives (p<0,01)

Tableau 5 : Résultats obtenus avec les organes de mouche en PCR-ITS

	Organes de mouche positifs avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S				%
	Proboscis	Intestins moyens	Glandes salivaires	Total	
<i>T. vivax</i>	27	4	0	31	27,19 %
<i>T c s</i>	1	1	0	2	1,75 %
<i>T c f</i>	1	0	0	1	0,32 %
<i>T. brucei</i>	0	2	0	2	1,75 %
<i>T v et T c f</i>	1	0	0	1	0,32 %
Total	30	7	0	37	32,45 %

Tableau 6 : Organes de mouches positifs en PCR classique et PCR-ITS

	Echantillons positifs				<i>Khi 2</i>
	PCR classique		PCR-ITS		
<i>T. vivax</i>	24	21,05%	31	27,19%	1,17
<i>T c s</i>	5	4,38%	2	1,75%	
<i>T c f</i>	5	4,38%	1	0,32%	
<i>T. brucei</i>	3	2,63%	2	1,75%	
<i>T v et T c f</i>	0		1	0,32%	
<i>T v et T b</i>	2	1,75%	0		
Total	39	34,21%	37	32,45%	1,31

Tableau 7 : Récapitulatif des résultats obtenus en PCR classique et en PCR-ITS

	1 Echantillons positifs				<i>Khi 2</i>
	PCR classique		PCR -ITS		
<i>T vivax</i>	51	12%	97	22,82%	17,31*
<i>T c s</i>	99	23,29%	23	5,41%	17,31*
<i>T c f</i>	5	1,17%	1	0,23%	
<i>T. brucei</i>	4	0,94%	3	0,70%	
<i>T v</i> et <i>T c s</i>	6	1,41%	2	0,47%	
<i>T v</i> et <i>T c f</i>	0		1	0,23%	
<i>T v</i> et <i>T b</i>	2	0,47%	0		
<i>T v, T c s</i> et <i>T b</i>	1	0,23%	0		
Total	168	39,53%	127	29,88%	8,72*

1-4. Analyse comparative des résultats PCR classique / PCR-ITS

1-4-1. Cas d'infections à *Trypanosoma vivax*

1-4-1-1. Buffy coat de bovins

Sur les 25 cas d'infections à *T. vivax* détectés par les méthodes parasitologiques, 12 échantillons sont révélés positifs à la fois en PCR monospécifique, et en PCR-ITS. La PCR classique a permis la confirmation de 13 échantillons parasitologiquement positifs à *T. vivax* ; les amorces Tryp 4R et Tryp 4S en ont confirmé 14, dont 2 identifiés en infection mixte avec *T. congolense* type savane en PCR classique. Ces amorces polyspécifiques ont identifié 52 signaux positifs à *T. vivax* parmi les échantillons négatifs par les techniques parasitologiques ; les amorces monospécifiques en ont détecté 10 échantillons (associés à 5 cas d'infections mixtes avec *T. congolense* type savane et 1 cas

d'infection mixte avec *T. congolense* type savane et *T. brucei*) et enfin 6 de ces échantillons ont été révélés positifs à la fois en PCR classique, et en PCR-ITS.

Sur les 27 infections du type *Duttonella* (*T. vivax*) identifiées en PCR classique, 18 ont pu être confirmées avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S. Parmi les 6 cas d'infections mixtes détectés en PCR classique, on a en PCR-ITS 3 signaux positifs à *T. vivax* ; 1 signal positif à *T. congolense* type savane et 2 négatifs. En outre, parmi les échantillons négatifs à *T. vivax* avec les amorces TVW 1 et 2, la PCR-ITS a révélé 45 signaux positifs (mis à part les infections mixtes) à cette espèce, cependant en PCR classique, 19 d'entre eux étaient positifs à *T. congolense* type savane.

1-4-1-2. Organes de mouche

Sur les 19 échantillons positifs à *T. vivax* au niveau des proboscis en PCR classique, 17 ont été confirmés positifs avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S. La même observation est faite pour les intestins moyens, car sur les 5 échantillons positifs à *T. vivax* avec les amorces monospécifiques, 3 ont également donné des signaux positifs en PCR-ITS.

Parmi les échantillons négatifs à *T. vivax* en PCR classique, 10 sont révélés positifs en PCR-ITS. Par contre, 4 échantillons ont donné des signaux positifs avec les amorces spécifiques à *T. vivax*, tandis qu'ils sont négatifs en PCR sur les ITS. On a observé en PCR classique, 2 cas d'infections mixtes (à *T. vivax* et *T. brucei*), en PCR-ITS l'un a donné un signal positif à *T. vivax* et l'autre un signal positif à *T. brucei*. Un seul échantillon présentant une infection mixte (à *T. vivax* et *T. congolense* type forêt) avec les amorces polyspécifiques, a été identifié positif à *T. congolense* type forêt en PCR monospécifique.

1-4-2. Cas d'infections au genre *Nanomonnas* (*Trypanosoma congolense*)

1-4-2-1. Buffy coat de bovins

Dans les cas d'infections à *T. congolense* type savane, parmi les 81 identifiés par la technique de buffy coat, 10 échantillons ont été confirmés positifs à *T. congolense* type savane, tant en PCR classique et en PCR-ITS. Sur ces mêmes échantillons positifs par les tests parasitologiques, 48 ont donné des signaux positifs avec les amorces TCS 1 et 2 (en PCR –ITS, 7 parmi ces échantillons sont positifs à *T. vivax*), contre 12 avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S. Parmi les échantillons négatifs à *T. congolense* type savane par la méthode de buffy coat, 41 sont testés positifs en PCR classique (sur ces échantillons, 12 sont positifs à *T. vivax* avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S) ; 9 en PCR-ITS et 7 à la fois en PCR classique et en PCR-ITS. Les 2 cas d'infections mixtes (à *T. congolense* type savane et *T. vivax*) observés en PCR-ITS, sont identifiés positifs à *T. congolense* type savane en PCR classique et par les méthodes parasitologiques.

Les amorces spécifiques de *T. congolense* type savane ont identifié 94 échantillons positifs à cette espèce de trypanosome, seulement 17 parmi ces échantillons ont également donné des signaux positifs en PCR plurispécifique. Parmi les échantillons qui n'ont donné aucun signal à *T. congolense* type savane en PCR classique, seulement 2 sont positifs en PCR-ITS. Inversement, parmi les échantillons négatifs à *T. congolense* type savane¹ en PCR-ITS, les amorces TCS 1 et 2 ont identifié 72 signaux positifs.

Aucune infection à *T. congolense* type forêt n'a été détectée dans les prélèvements sanguins de bovins lors de cette étude.

1-4-2-2. Les organes de mouche

Sur les 5 infections à *T. congolense* type savane révélées par la PCR monospécifique, aucune d'entre elles n'a été confirmée par les amorces polyspécifiques, il en est de même pour les 5 signaux positifs à *T. congolense* type forêt. Toutefois un cas d'infection mixte

¹ Parmi ces échantillons, on a 20 signaux positifs à *T. vivax* et 1 signal positif à *T. brucei* avec les amorces Tryp4RS

(à *T. congolense* type forêt et *T. vivax*) identifié par les amorces Tryp 4R et Tryp 4S, a donné un signal positif à *T. congolense* type forêt en PCR classique.

1-4-3. Cas d'infections au genre *Trypanozoon* (*T. brucei*)

Seulement 2 échantillons de terrain de bovins ont été différemment testés positifs à *T. brucei*, l'un par les amorces spécifiques au genre *Trypanozoon* et l'autre par les amorces polyspécifiques. En revanche, parmi les 3 organes de mouche, qui ont donné des signaux positifs à *T. brucei* en PCR classique, 1 a été confirmé par les amorces Tryp 4R et Tryp4S. Par ailleurs, sur les 2 cas d'infection mixte (à *T. brucei* et *T. vivax*) identifiés par les amorces monospécifiques, 1 échantillon (organe de mouche) a donné un signal positif à *T. brucei* en PCR-ITS.

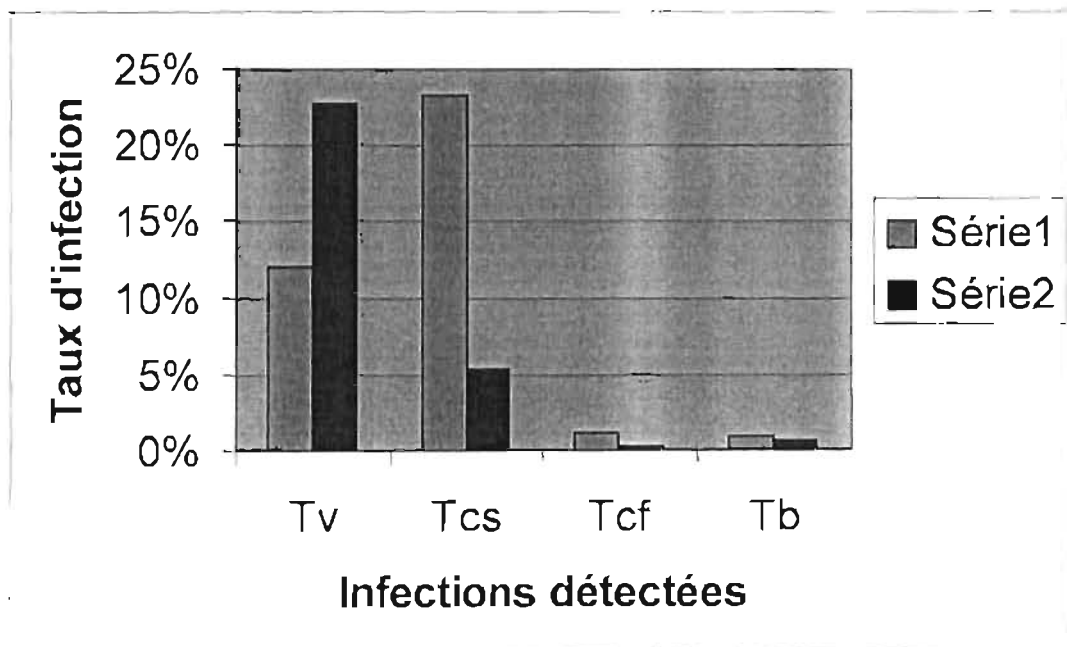


Figure 20 : Résultats comparés PCR classique / PCR-ITS

Série 1 : PCR classique

Série 2 PCR-ITS

1-5. PCR-ELISA

La PCR-ELISA n'a pas fait l'objet d'une évaluation à grande échelle comme la PCR directe. Par conséquent, ces résultats sont essentiellement ceux de l'évaluation des sondes aussi bien sur des ADN de référence des principaux trypanosomes pathogènes que sur des échantillons de terrain, à savoir des échantillons sanguins de bovins et des organes de mouche.

1-5-1. Résultats de l'évaluation des sondes

1-5-1-1. Sur des ADN purifiés

Le test préliminaire pour le choix des sondes a porté surtout sur la sensibilité des sondes à révéler les produits d'amplification par la technique ELISA. Par contre, la première évaluation de ces sondes sur des ADN de référence a mis en évidence outre la sensibilité, la spécificité de ces oligonucléotides. C'est ainsi que les 10 échantillons d'ADN purifiés ont été révélés de façon spécifique par les 5 sondes choisies (fig. 21).

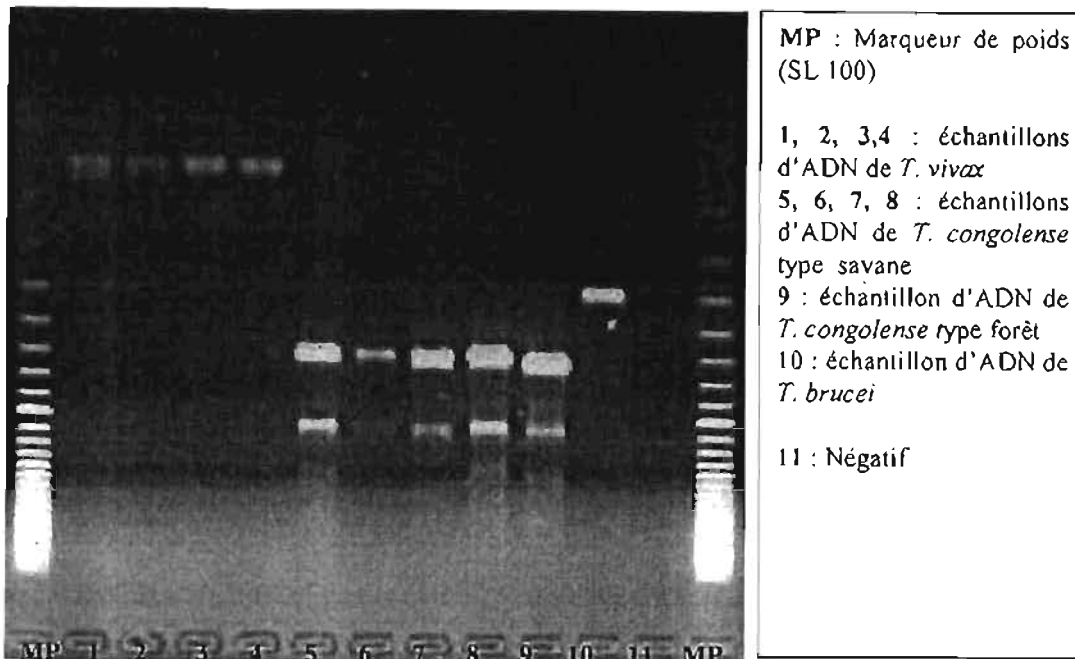


Figure 21 : révélation sur gel d'agarose des produits PCR des échantillons d'ADN de référence

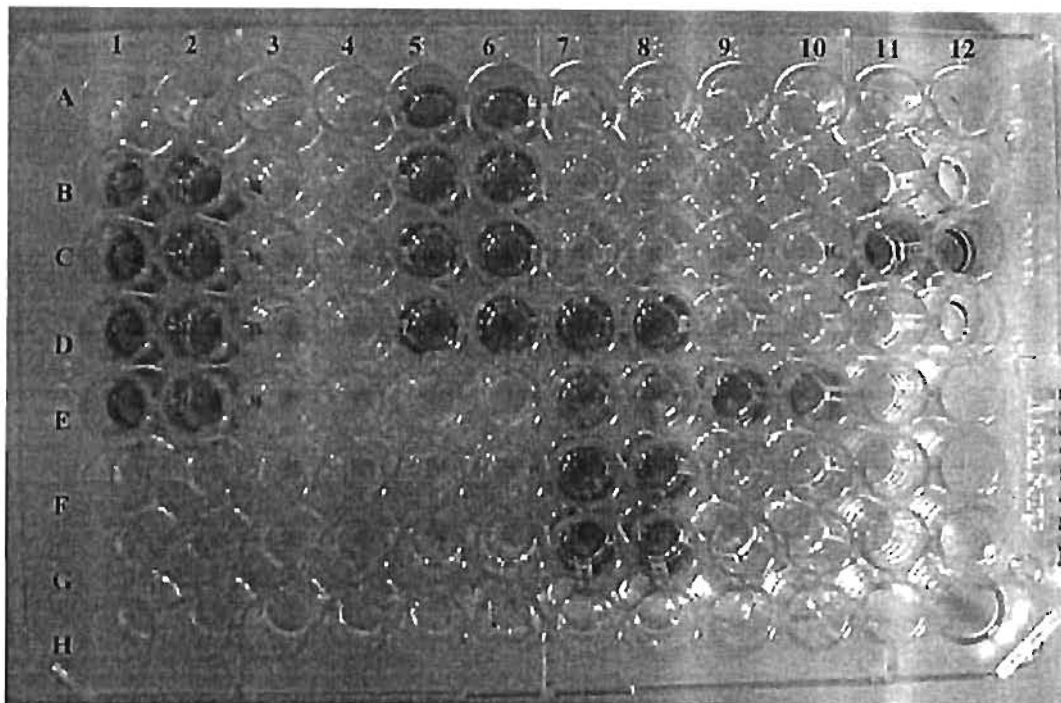


Figure 22 : révélation ELISA des échantillons d'ADN de référence

A1 & A2 : blanc, B1 & B2 : Tv Kanfiala, C1 & C2 : T v Sat 87 /CRTA, D1 & D2 : T v Folonzo, A5 & A6 et D7 & D8 : T c s Sat 87/ CRTA, B5 & B6 et E7 & E8 : T c s : Kigoni
 C5 & C6 et F7 & F8 : T c s Kar 83/CRTA /66, D5 & D6 et G7 & G8 : T c s B 317
 E9 & E10 : T c f Komoé, C11 & C12 : T b Folonzo

Néanmoins, à des températures d'hybridation inférieures à 56°C des réactions croisées sont observées entre les sondes dessinées pour le genre *Nannomonas* (*T. congolense*). Ces hybridations non spécifiques se traduisent par le fait que des sondes de *T. congolense* type savane donnent des signaux positifs avec l'ADN de *T. congolense* type forêt et réciproquement, la sonde de *T. congolense* type forêt donne des résultats positifs avec les ADN de *T. congolense* type savane. Aucune réaction non spécifique n'a été observée avec les sondes de *T. vivax* et de *T. brucei*.

1-5-1-2. Les échantillons de terrain

L'évaluation de la performance des sondes sur des échantillons de terrain a été comparativement à la précédente moins satisfaisante. En effet, la sensibilité de détection des trypanosomes dans les prélèvements sanguins de bovins et les organes de mouche s'est avérée inférieure au taux de détection par révélation sur gel d'agarose (fig. 22).

La sensibilité de la PCR-ELISA sur les ITS est selon les résultats des tests relative à l'espèce de trypanosome. Les plus faibles taux de révélation ont été obtenus avec des échantillons positifs à *T. vivax*, les échantillons de *T. congolense* sont moyennement révélés positifs par l'ELISA, la sonde STB2 de *T. brucei* donne régulièrement des signaux positifs (avec des densités optiques élevées) avec les échantillons de *T. brucei* testés, enfin on note la capacité des sondes à détecter des cas d'infections mixtes. Par ailleurs, les sondes se sont révélées très sensibles à des cas de contaminations des échantillons. Ainsi, au cours de nos manipulations, une contamination de l'échantillon négatif par *T. vivax* observée par le biais de la révélation sur gel d'agarose a conduit à un signal du contrôle négatif avec la sonde STV2 spécifique à *T. vivax*.

La spécificité des sondes sur les échantillons de terrain a été comme sur les ADN de référence améliorée en augmentant la température pendant l'étape d'hybridation du protocole de révélation ELISA. Une température de 60°C (pour toutes les sondes) associée aux autres conditions de l'optimisation a en effet fournit des résultats satisfaisants.

2. Discussion

2-1. Evaluation comparative PCR classique / PCR-ITS

2-1-1. Sensibilité

Le calcul du Khi 2 pour le total des échantillons positifs en PCR-ITS par comparaison au total des cas positifs détectés en PCR classique (tableau 7), montre qu'il y a bel et bien une différence entre ces deux techniques et la différence est significative au risque d'erreur 1%. Il ressort donc, au vu de ces résultats que les amorces monospécifiques sont globalement plus sensibles que le couple d'amorces Tryp 4R et Tryp 4S. Une des hypothèses que l'on peut avancer, est la faible répétition des séquences ITS1 dans le génome parasitaire (environ 200 exemplaires) relativement au nombre élevé de copies (un a plusieurs milliers) de séquences d'ADN satellite. Par contre, selon les travaux de **Desquesnes et al. (2001)**, la sensibilité de la PCR utilisant les amorces Tryp 4R et Tryp 4S était très voisine de celle obtenue avec les amorces monospécifiques en conditions comparables, mais seulement sur un nombre limité d'échantillons de terrain. Nous avons d'autre part observé que la sensibilité du diagnostic par PCR-ITS sur les buffy coats de bovins s'est avérée inférieure à celle observée avec les techniques parasitologiques (tableau 4). Toutefois, les amorces polyspécifiques offrent une sensibilité qui est relative à l'espèce de trypanosome détectée.

Ainsi pour les infections de type *Duttonella* (*T. vivax*), des meilleurs résultats ont été obtenus avec les amorces polyspécifiques. En effet, les cas positifs à *T. vivax* représentent presque les $\frac{3}{4}$ des signaux positifs détectés avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S. Avec les amorces monospécifiques TVW 1&2, la proportion des signaux positifs à *T. vivax* ne représentent que moins du $\frac{1}{3}$ des échantillons positifs. Cette sensibilité des amorces polyspécifiques est d'autant plus élevée pour *T. vivax* que le test de Khi 2 montre des différences significatives entre la détection de cette espèce par la PCR classique et par la PCR-ITS (tableau 7). Cependant, sur les organes de mouche analysés, le nombre de signaux positifs à *T. vivax* avec les amorces TVW 1&2 n'est que légèrement inférieur à celui obtenu avec les amorces polyspécifiques. Cette différence est du point de vu

statistique non significative (tableau 6). Contrairement aux amorces Tryp 4R et Tryp 4S, la sensibilité des amorces polyspécifiques Kin 1 et Kin 2 pour la détection de *T. vivax* est assez faible, car leurs séquences ne présentent que 80 % d'homologie avec celles du parasite (Desquesnes et al., 2001).

Pour les infections à *T. congolense* type savane, les amorces Tryp 4R et Tryp 4S ont donné approximativement le ¼ des résultats obtenus avec le couple d'amorces TCS 1&2 (23 signaux positifs en PCR-ITS contre 99 en PCR classique). Les différences très significatives données par le test de Khi 2 (tableau 7) traduisent une faiblesse notoire des amorces Tryp 4R et Tryp 4S dans la détection de *T. congolense* type savane. La technique parasitologique reste donc plus sensible que la PCR-ITS, car la méthode de buffy coat totalise 81 cas d'infections à *T. congolense* type savane sur 308 prélèvements sanguins de bovins. Toutefois, avec les amorces Kin 1 & 2, la détection de *T. congolense* type savane est assez bonne. Il faudrait donc envisager, que les amorces Tryp 4R et Tryp 4S ne présentent pas 100 % d'homologie avec toutes les souches de *T. congolense* type savane. Il y aurait ainsi une différence entre les séquences des souches de *T. congolense* type savane ayant servi au dessin de ces amorces avec les séquences des souches de cette espèce de trypanosomes sur le terrain.

Les résultats des analyses en PCR classique et en PCR-ITS, nous amènent à faire le constat selon lequel, un nombre assez important d'échantillons (21 buffy coats de bovins) positifs à *T. vivax* en PCR-ITS ont donné des signaux positifs à *T. congolense* type savane avec les amorces TCS 1 et 2. En somme, les amorces Tryp 4R et Tryp 4S présentent un avantage comparatif en gain de sensibilité pour la détection des infections à *T. vivax*, par contre, la sensibilité relative à la détection de *T. congolense* type savane de ce couple d'amorces est largement en dessous de celle donnée par les amorces classiques TCS 1 & 2.

L'interprétation des résultats concernant *T. congolense* type forêt et *T. brucei* semble être réservée du fait des faibles taux de détection des infections à ces espèces tant en PCR classique qu'en PCR-ITS. Cela peut s'expliquer par la faible prévalence de ces parasites dans les zones de prélèvements des échantillons. Dans ces zones de suivi du bétail, comme partout ailleurs la présence de *T. brucei* et de *T. congolense* type forêt chez les

bovins est rarement signalée. Toutefois, la sensibilité des amorces spécifiques de *T. congolense* type forêt (TCF 1&2) est au regard des résultats obtenus 5 fois supérieure à celle obtenue avec les amorces polyspécifiques. Les taux de détection de *T. brucei* avec les amorces classiques NRP 1&2 avoisinent légèrement ceux obtenus avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S. Enfin, Les résultats de la PCR classique obtenus dans la présente étude sont comparables et concordent avec plusieurs autres travaux, notamment ceux de Solano et al. (1994).

2-1-2. Spécificité

L'un des objectifs primordiaux de l'utilisation des amorces polyspécifiques est de pouvoir distinguer et identifier simultanément les principales espèces de trypanosomes pathogènes du bétail. En effet, les produits d'amplification de l'ADN de ces parasites peuvent être aisément distingués sur un gel d'agarose à 2 % et la taille de ces produits s'est révélée constante et est en accord avec les tailles attendues (Desquesnes et al., 2001). Pour *T. vivax*, la taille en paires de bases des produits PCR se situe entre 240 et 250 pb, pour les espèces du sous genre (*T. brucei*) elle est d'environ 480 pb et enfin pour *T. congolense* type savane et *T. congolense* type forêt, les tailles sont respectivement de 680 et 720 pb. Ces tailles sont en dessous de celles observées avec le couple d'amorces Kin 1 et Kin 2 (Desquesnes et al., 2001). Cependant, avec le couple d'amorces tryp 4R et Tryp 4S on note souvent l'existence de quelques produits non spécifiques dont la taille se situe aux environs de 500 pb, les résultats des PCR avec l'ADN de *T. theileri* infirment la suspicion selon laquelle ces produits émaneraient d'une infection par cette espèce. Toutefois, la présence de ces produits non spécifiques ne gêne aucunement pas la lecture des résultats.

Les oligonucléotides classiques offrent une spécificité totale, car aucune réaction croisée entre les trypanosomes n'a été signalée et en plus l'apparition des signaux non spécifiques est relativement moins fréquente.

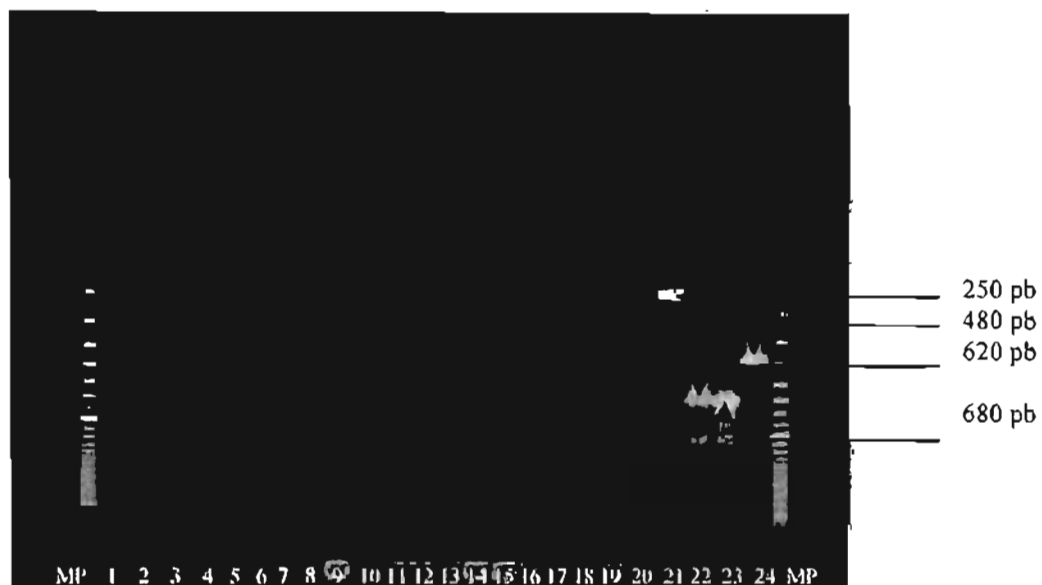


Figure 22a : Photo d'un gel d'agarose

MP : Marqueur de poids, 21 : Témoin positif à *T. vivax*, 22 : Témoin positif à *T. c. s*
 23 : Témoin positif à *T. cf.*, 24 : Témoin positif à *T. brucei*.
 2, 3, 4, 6 et 7 : échantillons positifs à *T. vivax*



Figure 22b : Photo d'un gel d'agarose

MP : Marqueur de poids, 21 : Témoin positif à *T. vivax*, 22 : Témoin positif à *T. c. s*
 23 : Témoin positif à *T. cf.*, 24 : Témoin positif à *T. brucei*.
 Entourés bleu : produits non spécifiques.

2-2. Spécificité et sensibilité des sondes nucléiques pour la PCR-ELISA

Il est d'abord utile de rappeler que l'une des difficultés de l'application de la PCR-ELISA est indéniablement la recherche des sondes spécifiques aux ITS des trypanosomes, car le dessin de ces sondes implique au préalable la connaissance de la séquence du fragment cible. L'obtention des sondes spécifiques aux ITS a été ainsi l'aboutissement d'un long processus allant du séquençage des produits d'amplification (avec des amorces polyspécifiques) à l'alignement inter espèces des séquences ITS identifiées afin de vérifier leur polymorphisme.

2-2-1. Spécificité

Les résultats de l'évaluation des sondes sur des ADN purifiés ont mis en évidence surtout la spécificité complète des oligonucléotides choisis pour le test ELISA. Deux caractéristiques illustrent la stabilité de l'hybridation de ces sondes avec leurs séquences cibles, il s'agit du pourcentage moyen (pour les 5 sondes retenues) de bases GC qui est de 64,48 % (> 60 %) et de la taille moyenne des sondes de l'ordre de 21 pb (> 20 et < 30 pb).

Nos résultats sur la spécificité des sondes sont similaires à ceux obtenus avec des sondes dessinées pour la détection des ADN satellites de *T. congolense* type savane (Sow, 2004), mais aussi avec les résultats des tests de spécificité des sondes pour la détection de *T. brucei* et de *T. vivax* (Masaké et al., 2002). Toutefois, dans le cas de notre travail, la spécificité totale des sondes n'a été observée qu'après optimisation de certains paramètres comme la température d'hybridation. Ainsi, pour des températures d'hybridation inférieures à 56°C, des réactions croisées sont observées entre les sondes dessinées pour les trypanosomes de l'espèce *T. congolense*. Ces hybridations non spécifiques peuvent probablement s'expliquer par le fait qu'en dessous de la température d'hybridation, une sonde a la capacité de s'hybrider avec une autre séquence ITS présente dans le milieu réactionnel. Cette hypothèse paraît certainement insuffisante pour justifier à elle seul ce phénomène d'hybridation non spécifique. La vérification de l'homologie entre les sondes et les séquences ITS d'une autre espèce s'avère intéressante, car pour éviter ces cas

d'hybridations non spécifiques, l'homologie entre un oligonucléotide donné et les séquences des ITS des autres espèces doit normalement être inférieure à 80 %.

2-2-2. Sensibilité

La sensibilité des sondes à détecter les produits d'amplification des échantillons de terrain est contrairement à toute attente en dessous de celle de la PCR directe, car l'objectif principal de la mise au point et de l'application de la PCR-ELISA est l'amélioration de la sensibilité du test d'identification des trypanosomes par PCR. L'évaluation de la sensibilité des sondes étant réalisée avec des échantillons dont le statut est connu par la révélation sur gel d'agarose, la détection de ces produits PCR par la technique ELISA devrait être théoriquement de 100 %.

Par ailleurs, l'on note une différence de sensibilité des oligonucléotides selon l'espèce de parasite à révéler. L'hypothèse la plus plausible qui expliquerait cette sensibilité relative au taxon de trypanosome s'appuie sur un des principes de la PCR-ELISA, à savoir le marquage des produits PCR.

En effet, pour la PCR-ELISA, les produits d'amplification sont au préalable marqués avec la digoxigénine (sous forme de digoxigénine-11-2'-dUTP). La digoxigénine est incorporée aux dNTP dans un mélange connu sous le nom de dig-labeling mix qui contient outre les dATP, dCTP et dGTP, les dTTP associés aux dig-dUTP dans une proportion de 19 / 1 (respectivement de dTTP et dig-dUTP), soit un mélange à 5 % de dig-dUTP. Ces derniers vont par le principe de la complémentarité des bases se lier aux bases AT de la séquence ITS cible. Ce sont donc ces complexes qui vont être révélés par le conjugué anti-dig-pod après l'ajout du substrat chromogène. Il faut en plus, notifier que le nombre de bases AT est variable selon la séquence ITS. Par exemple pour *T. vivax* dont le produit PCR est le plus court (240 à 250 pb), le nombre de bases AT calculé à l'aide du logiciel FREQSQ est en moyenne égal à 47, ce qui correspond à environ deux Uridine pouvant se fixer. Ceci explique fort probablement la faible sensibilité de la détection des échantillons positifs à cette espèce de trypanosome par ELISA. Par contre, pour *T. congolense* type savane et *T. brucei*, on a respectivement 8 (160 bases AT) et 7 (153 bases

AT) dig-dUTP pouvant être révélés, d'où leur sensibilité de détection relativement grande par rapport à celle de *T. vivax*.

2-3. Etude de coût

Pour la réalisation de la PCR-ELISA, il faut un ensemble de réactifs qui serviront d'une part à l'amplification des échantillons et d'autre part à la révélation ELISA. Le coût et la quantité de réactifs seront en premier lieu évalués en fonction du nombre de plaques ELISA utilisées, ce qui conduira au calcul du coût des réactifs par plaque. La plaque ELISA (Maxisorp®) pouvant permettre l'analyse de 45 échantillons (avec un blanc, un négatif et un positif), le coût par plaque ELISA sera divisé par 45 pour obtenir le coût d'analyse d'un échantillon pour une valence (c'est-à-dire la révélation d'une espèce de trypanosome). Avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S, 4 valences sont en jeu, à savoir *T. vivax*, *T. congolense* type savane, *T. congolense* type forêt et *T. brucei*, pour avoir ainsi le coût d'un diagnostic par PCR-ELISA sur les ITS, on multiplie par 4 le coût d'analyse d'un échantillon sanguin de bovin.

Pour la PCR directe, on estime d'abord les prix individuels par unité de consommable à partir des prix unitaires par conditionnement. Puis, on calcule la quantité ou le volume de réactif utilisé pour un gel d'agarose à 2 % sur lequel on peut avoir 39 échantillons amplifiés (avec 2 marqueurs de poids par portion de gel, 4 témoins positifs également par portion de gel et 1 témoins négatif pour le gel entier). Le coût par gel d'agarose d'un réactif donné est obtenu en multipliant son prix individuel / unité par la quantité ou le volume utilisé / gel. Le coût total par gel d'agarose divisé par 39 donne ainsi le prix approximatif de l'analyse d'un échantillon par PCR-ITS directe. Cette technique permettant d'identifier simultanément les 4 espèces de trypanosomes, le coût d'analyse d'un échantillon (buffy coat de bovin) équivaut au coût d'un diagnostic pour 4 valences, par contre pour la PCR classique ce coût est multiplié par 4 comme pour la PCR-ELISA.

Certains réactifs dont le prix de revient est très négligeable, n'ont pas été pris en compte dans cette estimation du coût, c'est le cas par exemple du DMSO, du tampon de

charge, du marqueur de poids (SL 100), du TBE et du tampon d'hybridation. Ceux-ci sont reconstitués à partir du mélange d'autres réactifs disponibles au laboratoire (cf. annexe). Le tampon utilisé en PCR est vendu avec la Taq polymérase (Quiagen®). Enfin, le coût à l'achat des produits comporte également le prix du transport qui représente 25 % du coût du consommable.

Ainsi, l'analyse d'un échantillon par PCR-ELISA avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S coûte approximativement 0,45 € soit environ 295,18 Fcfa pour une valence. Le diagnostic chez les bovins avec 4 valences coûterait 1,8 € soit 1180,72 Fcfa. Il en résulte que ce coût est relativement moins onéreux, car dans les mêmes conditions, le coût de l'analyse d'un échantillon par PCR-ELISA pour la détection de l'ADN de *T. congolense* type savane (Sow, 2004) a été estimé à 1993, 29 Fcfa, d'où une réduction de 812,57 Fcfa permise par la PCR-ELISA sur les ITS. Mais cette réduction du coût de la PCR-ELISA, se justifie entre autres par le fait que pour le besoin de notre étude, les réactifs sont achetés séparément. Par contre, dans le cas des travaux de Sow (2004), deux Kits PCR-ELISA (Dig-labeling et Dig-detection 5' Pack) qui sont des produits très chers ont été achetés. Toute chose égale par ailleurs, la PCR-ELISA sur les ITS des trypanosomes offre un avantage du point de vue coût par rapport à la PCR-ELISA pour la détection des ADN satellites, car à la différence de cette dernière, la PCR-ITS permet l'identification simultanée des principaux trypanosomes pathogènes du bétail.

L'appréciation du tableau 8, permet de déduire que le coût de la PCR-ELISA peut être davantage réduit, en diminuant la quantité utilisée de certains consommables comme les tubes eppendorf et les embouts jetables. En effet, si l'on prend l'exemple des tubes eppendorf pour une plaque, ils reviennent plus chers que l'ensemble des six premiers réactifs (la streptavidine, le conjugué anti-dig-pod, le dig-labeling mix, les sondes, le substrat chromogène et les amorces). Par conséquent, pour la révélation ELISA, avec l'utilisation des mêmes tubes ayant servi pour l'amplification et une réduction de moitié des embouts jetables, on aboutirait à un coût de 15,33 € par plaque soit donc 0,34 € (223 Fcfa) pour un échantillon analysé. Le coût global du diagnostic chez les bovins avec les 4 valences serait de 1,36 € soit environ 892 Fcfa.

Tableau 8 : Estimation du coût de l'analyse en PCR-ELISA pour une plaque

Produits	Quantité à l'achat	Coût à l'achat (€)	Nbre de plaques ELISA	Coût / plaque ELISA (€)
Streptavidine	5 mg / tube	537,5	200	2,68
Conjugué anti-dig-pod	50 U / tube	292,5	500	0,58
Dig-labeling mix	250 µl / tube (2 tubes)	397,5	250	1,59
Sonde oligonucléotidique (exemple sonde STV1)	89,14 µl (après reconstitution)	37,5	331	0,11
TMB peroxydase+ H ₂ O ₂	50 comprimés (1 mg / comprimé)	97,5	500	0,20
Amorces	200 µl / amorce (après reconstitution)	17,5	186	0,09
Taq polymérase	50 µl	53,35	11	4,85
Tubes eppendorf 0,5 ml	500 tubes	43,375	5	8,67
Embouts jetables	500 embouts	7,31	5	1,46
Gants à usage unique	100 paires	5,73	50	0,11
Chelex-100®	500 g	347,87	5555	0,06
Total				20,4

Pour la PCR directe avec le couple d'amorces polyspécifiques (Tryp 4R et Tryp 4S), le coût de l'analyse d'un échantillon est estimé à 0,72 € soit 472,30 Fcfa. Le coût de la PCR monospécifique a été estimé à 0,8 € (Kasbari, 2001), pour un diagnostic chez les bovins avec 4 valences, la PCR classique serait plus de 4 fois plus coûteuse que la PCR-ITS. Par ailleurs, la PCR-ELISA sur les ITS est 2,5 fois plus chère que la PCR-ITS directe. De ce fait, pour un diagnostic de routine, la PCR-ITS directe constitue une alternative qui doit être privilégiée par rapport à la PCR-ELISA.

Tableau 9 : Estimation du coût de l'analyse d'un échantillon en PCR-ITS

Produits	Prix unitaire (€) par conditionnement	Prix individuel (€) / unité	Qté ou volume utilisé / gel d'agarose	Coût total /gel d'agarose (€)
couple d'amorces	17,5 /200 µl (20 µM)	0,0875 / µl	16,8 µl	1,47
4 dNTP	270,536 /1000 µl (2500µM)	0,27 / µl	44,8 µl	12,10
Taq polymérase	53,35 /50 µl (250 UI)	1,067 / µl	3,2 µl	3,41
Agarose	1249 / 500 g	2,5 / g	2,5 g	6,25
Tubes eppendorf 0,5 ml	43,375 / 500 tubes	0,086 7 / tube	40 tubes	3,47
Embouts jetables	7,31 / 500 embouts	0,0146 / embout	97 embouts	1,41
Gants à usage unique	5,73 / 100 paires	0,057 / paire	2 paires	0,11
Chelex-100®	347,87 / 500 g	0,697 / g	0,078 g	0,05
Total				28,27

2-4. Avantages de la PCR directe et de la PCR-ELISA sur les ITS

L'intérêt premier des amorces polyspécifiques est sans aucun doute leur capacité à détecter et à identifier simultanément les principales espèces de trypanosomes. De cet avantage découlent d'autres arguments qui militent en faveur de ce nouveau moyen de diagnostic.

Ainsi, la réduction du nombre de réactions limite considérablement les cas de contamination surtout dans les laboratoires moins ou modestement équipés. Cette catégorie de laboratoires est malheureusement caractéristique des pays sous développés où la trypanosomose animale sévit de façon endémique. Du fait de la diversité des espèces de trypanosomes, pour réaliser un diagnostic final avec la PCR monospécifique, il est

nécessaire d'effectuer autant de réactions que de nombre d'espèce à identifier. Au demeurant, le coût de la PCR reste onéreux et limite son usage à des fins de diagnostic de routine. La mise au point d'une PCR unique par l'amplification des ITS présente alors un avantage tant du point de vue pratique qu'économique. La PCR-ITS favorise entre autres l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons, à moindre coût et en un temps réduit. En outre, les amorces polyspécifiques tiennent une importance de choix dans la connaissance épidémiologique des trypanosomoses animales en permettant d'une part la détection par exemple chez les insectes vecteurs (principalement les glossines) d'autres espèces de trypanosomes autres que les plus fréquemment rencontrées, d'autre part ces amorces constituent des outils les mieux adaptés à la détection des cas d'infections mixtes.

Quant à la PCR-ELISA sur les ITS, elle offre les mêmes avantages que la PCR-ITS directe. La particularité de la PCR-ELISA est qu'elle associe deux méthodes de diagnostic à savoir la PCR et la technique ELISA. Elle constitue de ce fait un excellent moyen pour l'amélioration de la sensibilité et de la spécificité des tests de détection des trypanosomes. Cette performance de la PCR-ELISA est illustrée par des travaux effectués sur les ADN satellites (**Kosum et al., 2002 ; Masaké et al., 2002 ; Sow, 2004**). En outre, cette technique rend la lecture des résultats plus objective et plus aisée grâce à l'utilisation du spectrophotomètre, comparativement à la révélation sur gel d'agarose où l'apparition des bandes est parfois moins nette voire illisible. La détection des produits d'amplification par ELISA est une technique facile à mettre en œuvre dans les laboratoires où l'on pratique conjointement la PCR et l'ELISA, elle ne nécessite donc aucun investissement supplémentaire. Contrairement à la révélation sur gel d'agarose, dans la PCR-ELISA aucun réactif cancérigène comme le BET n'est utilisé.

Conclusion

Les techniques d'amplification en chaîne par polymérase ou PCR occupent de nos jours une importance capitale dans le contrôle et le diagnostic de la trypanosomose animale africaine (TAA). Toutefois, en dépit de sa bonne sensibilité et spécificité, la PCR basée sur l'utilisation des couples d'amorces spécifiques d'espèces présente un sérieux handicap à cause de son coût onéreux. Ce qui réduit par conséquent son usage et affaiblit ainsi les efforts de lutte. Le développement d'une PCR unique amplifiant les ITS de l'ADNr des trypanosomes est une option prometteuse pour trouver un compromis entre un diagnostic sensible et spécifique d'une part et d'autre part un diagnostic accessible pour un coût raisonnable. Notre travail s'intègre dans cette dynamique et a consisté dans un premier temps à l'évaluation des amorces polyspécifiques (Tryp 4R et Tryp 4S) pour la PCR directe et dans un second temps à l'étude de la PCR-ELISA sur les ITS des trypanosomes.

Ainsi, pour la PCR directe, 425 échantillons de terrain dont 311 prélèvements sanguins de bovins (buffy coats) et 114 organes de mouche ont été analysés en PCR monospécifique et en PCR-ITS. Les amorces polyspécifiques ont détectés sur l'ensemble des échantillons 127 signaux positifs soit 29,88 %, par contre les amorces spécifiques d'espèce ont identifié 168 cas positifs soit 39,53 %. Pour les infections à *Trypanosoma vivax*, le couple d'amorces Tryp 4R et Tryp 4S totalise 97 cas positifs soit une prévalence de 22,82 %, tandis que les amorces TVW 1 et 2 ont identifié 51 cas soit 12 %. Avec les amorces TCS 1 et 2, 99 cas positifs soit 23,29 % sont rapportés à *Trypanosoma congolense* type savane, contre seulement 5,41 % représentant 23 échantillons révélés positifs à cette espèce en PCR-ITS.

Au regard de ces résultats, la PCR utilisant le couple d'amorces polyspécifiques demeurent globalement moins sensibles que la PCR monospécifique. Cette faible sensibilité est particulièrement observée dans la détection des trypanosomes du sous genre *Nannomonas* (*T. congolense*). En revanche, sur des ADN purifiés, aucune différence de sensibilité n'a été notée entre les amorces amplifiant les ITS1 et les amorces

monospécifiques. En plus, malgré la présence limitée du segment ITS1 dans le génome parasite comparativement à l'ADN satellite, la PCR-ITS bénéficie d'un gain de sensibilité dans la détection de *Trypanosoma vivax*. Ce qui constitue un avantage assez important, car *T. vivax* est une espèce non seulement transmise par la voie cyclique, mais aussi par la voie mécanique (Desquesnes et Dia, 2004), elle est de ce fait l'une des espèces la plus largement répandue en Afrique tropicale.

Pour la PCR-ELISA, les cinq sondes oligonucléotidiques spécifiques aux ITS des principales espèces de trypanosomes pathogènes du bétail ont identifié avec une spécificité totale les échantillons d'ADN de référence. Mais, la sensibilité de cette technique sur des échantillons de terrain s'est avérée inférieure à celle observée avec la révélation sur gel d'agarose. Par conséquent, la PCR-ELISA n'a pas fait l'objet d'une large évaluation sur des prélèvements sanguins de bovins et des organes de mouche.

Par ailleurs, l'application de la PCR-ELISA dans nos conditions reste limitée par son coût élevé. En effet, le coût de l'analyse d'un échantillon par PCR-ELISA sur les ITS a été estimé à 1,8 € (environ 1180 Fcfa) pour 4 espèces de trypanosomes détectées. Ce coût représente plus du double de celui de la PCR-ITS directe estimé à 0,72 € soit 472,30 Fcfa. Par conséquent, la PCR-ITS directe constitue une méthode de choix et à privilégier pour un diagnostic de routine.

Au vu de ce qui précède, il conviendra pour améliorer davantage les résultats des tests de PCR directe sur les ITS des trypanosomes :

- de poursuivre la recherche d'oligonucléotides plus adaptés à la détection des trypanosomes du genre *Nannomonas* (*Trypanosoma congolense*), dans le même ordre d'idée il serait utile d'associer le couple d'amorces Tryp 4R et Tryp 4S et le couple d'amorces TCS 1 et 2 afin d'avoir un diagnostic plus sensible et hautement spécifique de *Trypanosoma congolense* type savane ;
- d'améliorer le programme d'amplification en augmentant par exemple le temps d'élongation, ce qui permettra l'amplification des segments les plus longs tels que ceux de *Trypanosoma congolense* ;

➤ de poursuivre les investigations pour réduire les produits non spécifiques apparaissant au cours de la PCR-ITS, à cet effet l'évaluation de la PCR nested sur les ITS est une option à explorer.

Par ailleurs, dans le but de réduire davantage le coût de l'analyse par PCR-ELISA, mais aussi d'augmenter sa sensibilité, il serait important :

➤ d'envisager la réduction du volume du mélange réactionnel, d'effectuer avec plus de précautions les tests de révélation dans un seul puits de la plaque ELISA et d'utiliser pour la révélation des produits PCR les mêmes tubes ayant servi pour l'amplification des échantillons ;

➤ d'essayer la technique de PCR-ELISA avec d'autres modes de préparation d'échantillons, mais pour un coût raisonnable ;

➤ d'augmenter la proportion de dig-dUTP dans le dig-labeling mix, on pourrait par exemple ramener le mélange dTTP et dig-dUTP de 5 à 10 % ;

➤ de poursuivre l'évaluation de la PCR-ELISA sur les ITS des trypanosomes avec un grand nombre d'échantillons.

Références bibliographiques

1. **Abiola F. A., 2001.**
Le marché mondial des médicaments vétérinaires (145-149). In : Utilisation des trypanocides en Afrique Sub-saharienne .Actes du séminaires sous régional tenu du 06 au 09 février 2001.-Dakar : EISMV.-170p.
2. **Bajyana Songa E., Hamers-Casterman Hammers R., Pholpark M. et al., 1987.**
The use of card agglutination test for detection of *T. evansi* infection: a comparison with other trypanosomiasis diagnostic tests under field conditions in Thailand. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 67 :137-148.
3. **Bengaly Z., 2003.**
Pathogénicité comparée de trois types phylogénétiques distincts de l'espèce de *Trypanosoma congolense*. Thèse Doct. 3^e cycle : Parasitologie : université de Ouagadougou.
4. **Biaou C. F., Teko-Agbo A., Faure P. et Abiola F. A., 2002.**
Le marché des médicaments vétérinaires en Afrique de l'Ouest : Particularités et réglementations. Animalis. 1 : (3) : 34-39.
5. **Clausen P. H., Sidibé I., Bassinga A., Richard X., Bauer B. et Pohilt H., 1993**
Comparison of various tests for the serological diagnosis of *Trypanosoma equiperdum* infection in the horse. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 4: 243-246.
6. **CIRDES, 2001.**
Diagnostic et contrôle des hémoparasitoses animales et leurs vecteurs. Cours international tenu du 05 au 17 novembre 2001 au CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

7. Cuisance D., 1989.

Le piégeage des tsé-tsé.- Montpellier : CIRAD.-172p.-(Etude et synthèse de l'IEMVT).

8. De La Rocque S. et Dia, M. L., 2001.

Les moyens de lutte contre la trypanosomose animale.(38-44) In Utilisation des trypanocides en Afrique Sub-saharienne. Actes du séminaires sous régional tenu du 06 au 09 février 2001.-Dakar : EISMV.-170p.

9. Desquesnes M., 2003.

Revue des techniques de diagnostic des trypanosomoses. In Etudes épidémiologiques des trypanosomoses bovines et suivi-évaluation des campagnes de lutte, cours international de formation du 31 mars au 17 avril 2003.- 141p.

10. Desquesnes M., 1997.

Evaluation of simple PCR technique for the diagnostic of *Trypanosoma vivax* in serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme linked immunosorbent assay (Ag- ELISA). Acta tropica. 65: 139-141.

11. Desquesnes, M. et Dia M. L., 2004

Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by African tabanid *Atylotus fuscipes*. Vet. Par. 119 (1), 9-19.

12. Desquesnes M., et Dia M. L., 2003.

Trypanosoma vivax : Mechanical transmission in cattle by one of the most common African tabanids, *Atylotus agrestis*. Exp. Parasitol.-103 (1-2): 35-43.

Errata

Page	Paragraphe	Ligne	Lire	Au lieu de
Page de garde	Membres du jury		Yalacé Yamba KABORET	Yamba Yalacé K ABORÉ
2	1	8	Espaceurs..	Espceurs...
2	2	1	Séquences de l'ADNr	Régions de l'ADNr
26	3	9	La trypanosomose humaine touche...	La trypanosomose humaine infecte...
34	3	4	Étalement sanguin	Frottis sanguin
34	3	5	Sur la base de critères de ...	Sur les critères de ...
34	3	10	L'étalement sanguin	Le frottis sanguin
77	2	4	Tableau IV, page 82	Tableau IV, page 84
77	3	9	Tableau VII, page 84	Tableau VII, page 86
78	2	5	Tableau IV, page 82	Tableau IV, page 84
80	1	9	Tableau VII, page 84	Tableau VII, page 86
80	2	8	Tableau IV, page 82	Tableau IV, page 84
91	1	2	Tableau VII, page 84	Tableau VII, page 86
91	1	14	Tableau IV, page 82	Tableau IV, page 84
91	2	8	Tableau VII, page 84	Tableau VII, page 86
92	1	1	Tableau VI, page 83	Tableau VI, page 85
92	2	4	Tableau VII, page 84	Tableau VII, page 86
93	1	6	Solano et al., 1999	Solano et al., 1994
113	Référence n° 54		Oumanwara	Oumanwar

13. Desquesnes M. et Dávila A.R.M., 2002.

Application of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. Elsevier Veterinary Parasitology. 109 : 213-231.

14. Desquesnes M. et Tresse L., 1996

Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation des échantillons sanguins. Rev. Elev. Med. Vet. Pays trop. 49 : 322-327

15. Desquesnes M., Ravel S. et Cuny G., 2002.

PCR identification of *Trypanosoma lewisi*, a common parasite of laboratory rats. Kinetoplastid Biology and Disease.-BioMed Central.ed. 1
Accès Internet: <http://www.kinetoplastid.com/content/1/1/12>

16. Desquesnes M., Dia M. L., Acapovi G., Yoni W., 2005.

Les vecteurs mécaniques des trypanosomoses animales.-CIRDES.-Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

17. Desquesnes M., Mc Lauglin G., Zoungrana A., Dávila A.R.M., 2001.

Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. International journal of Parasitology 31: 610-614.

18. Desquesnes M., Michel J. F., De La Rocque S., Solano P., Millogo L., Bengaly Z. et Sidibé I., 1999.

Enquête parasitologique et sérologique (ELISA indirecte) sur les trypanosomoses des bovins dans la zone de Sidéradougou, Burkina Faso. Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop. 52 : 3-4.

19. Dia M. L., 2003.

Point sur la lutte contre les trypanosomoses animales africaine. In atelier de conseils et formation en appui à la production laitière, CIRDES, Bobo-dioulasso, Burkina Faso, 7-18 juin 2003.-Bobo-Dioulasso : CIRDES.-14p.

20. Dia M. L., 1997

Epidémiologie de la trypanosomose cameline à *Trypanosoma evansi* en Mauritanie. Thèse doct. : Parasitologie : Université de Montpellier I.

21. Dickin S. K. et Gibson W. C., 1989.

Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. Molecular and Biochemical Parasitology, 33: 135-142.

22. Duvallet G., Bengaly Z., Reifenberg J. M. et Argiro L., 1994.

De nouveaux outils pour le diagnostic et l'épidémiologie de la trypanosomose animale africaine. Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales. Paris : Ed. John libbey Eurotext ; AUPELF-UREF.- pp 19-29

23. Etienne J., 1996.

Biochimie génétique et biologie moléculaire.-3ème ed.- Paris : Ed. Masson.- 482p.

24. FAO, 2002.

Twenty-second Regional Conference for Africa. Programme Against African Trypanosomiasis (PAAT), Cairo, Egypt, 4-8 February 2002.

Accès Internet: www.fao.org/DOCREP/MEETING/004/Y06057f.htm

25. Gardiner P. R. et Mahmoud M. M., 1990.

Salivarian trypanosomes causing disease in livestock outside Sub-saharan Africa (1-66). In : Parasitic protozoa, New York: Academic Press.

26. Geysen G., Delespaux V. et Geerts S., 2002.

PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as easy method for species-specific diagnosis of Trypanosoma species in cattle. Veterinary Parasitology, 2449 : 1-10

27. Gibson W. C., Dukes P. et Gashumba J.K., 1988.

Species-specific DNA probes for the identification of African Trypanosomes in tsetse flies. Parasitology, 97: 1-11.

28. Gueye D. A., 2003.

Mise au point d'amorces polyspécifiques amplifiant l'ITS1 de l'ADN ribosomal par une PCR nested unique pour la détection des principaux trypanosomes africains pathogènes du bétail. DEA : Biologie Animale : Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

29. Higuchi R., 1989.

PCR technology (31-37). In principles and applications for DNA amplification.- Stockton: Stockton Press.

30. Hoare C. A., 1972.

The trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph.-Oxford: Blackwell Scientific Publications.-749 p.

31. Itard J., 2000

Trypanosomoses animales africaines. In Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Londres, New York, Paris. : Ed. TEC & DOC.-Ed. med. Int.-773p.

32. Itard, J., 1981

Les trypanosomoses animales africaines. In Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Paris : Ministère de la coopération et du développement, IEMVT.-717p.

33. Kasbari M., 2001.

Intérêts et limites de la PCR pour l'étude diagnostique et épidémiologique des trypanosomoses animales africaines. Thèse : Méd. Vét. : Lyon.

34. Kodjo A., Richard Y., Guérin V. et Sanglier J. J., 1993.

Principe de l'hybridation moléculaire, application au diagnostic microbiologique en médecine vétérinaire. Actualités scientifiques : L'information du biotechnicien 1, (3) : 9p.

35. Kosum C., Sintawee K. et Nopporn S., 2002.

PCR-ELISA for diagnostic of *Trypanosoma evansi* in animals and vector. Molecular and cellular probes. 16: 173-177.

36. Kukla B. A., Majiwa P. A. O., Young J. R., Moolo S. K., et Olé-Moiyoi O. K., 1987.

Use a specific DNA probes for detection and identification of trypanosomes infection in tsetse flies. Parasitology. 95 : 1-16.

37. Lanhan S. M. et Gdofrey D. G., 1970.

Isolation of *salivarian* trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. Exp. Parasitol. 28: 521-534.

38. Larzul, D., 1993

La PCR, un procédé de répliation in vitro.-Paris.-Lavoisier.-387p.

39. Lefrançois T., Solano P., Bauer B., Kaboré I., Touré S. M., Cuny G., et Duvallet, G., 1999.

Polymerase chain reaction characterization of trypanosomes in *Glossina morsitans submorsitans* and *G. tachinoides* collected on the game ranch of Nazinga, Burkina Faso. Acta Tropica. 72: 65-77.

40. Lefrançois T., Solano P., De La Rocque S., Bengaly Z., Reifenberg J. M., Kaboré I., et Cuisance D., 1998.
New epidemiological features on animal trypanosomosis by molecular analysis in pastoral zone of Sidéradougou, Burkina Faso : *Molecular Ecology*. 7 : 897-904.
41. Majiwa P. A. O., Masaké R. A. , Nantulya V. M. , Hamers R. et Mathyssens G., 1985.
Trypanosoma (Nannomonas) congolense: identification of two karyotype groups. *Embo. Journal*. 4, 12: 3307-3315.
42. Majiwa P.A.O., Thatthi R., Moolo S. K., Nyeko J.P.H., Otieno L.H., et Maloo S., 1994.
Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy coat samples from antigenic but aparasitaemic cattle. *Parasitology*. 108 : 1-10.
43. Masake R.A., Njuguna J.T., Brown C.C. et Majiwa P.A.O., 2002.
The application of PCR-ELISA of the detection *Trypanosoma brucei* and *T. vivax* infections in livestock. *ElsevierVeterinary Parasitology*, 105 : 179-189.
44. Masiga D.K., McNamara J.J. et Gibson W.C., 1996.
A repetitive DNA sequence specific for *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi*. *Veterinary Parasitology*. 62: 27-33
45. Masiga D. K., Smyth A. J., Hayes P., Bromidge T. J. et Gibson W. C., 1992.
Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. j. Parasitol.* 22: 909-918.
46. Mc Laughlin G. L., Ssenyonga S. S., Nanteza E. et al., 1996.
PCR based detection and typing of parasites (261-287). In *Parasitology for the 21st Century* CAB International. - Wallingford: CAB.

47. Moolo S. K. et Gray M. A., 1989.

New observations on the cyclical development of *Trypanosoma vivax* in Glossina. Acta Tropica. 4: 167-172.

48. Moolo S. K., Kabata J. M. et Giitre N. M., 1999.

Study on the mechanical transmission by tsetse fly *Glossina morsitans centralis* of *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma congolense*, and *Trypanosoma brucei brucei* to goats. Acta Tropica. 74: 105-108.

49. Mooser D. R., Cook G. A., Ochs D. E., Bailey C. P., Mckane M. R. et Donelson J. E., 1989.

Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. Parasitology. 99: 57-66.

50. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. et Erlich H., 1986.

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51: 263-273.

51. Murray M., Murray P. K, et McIntyre W. I. M., 1977.

An improved parasitological technique for the diagnostic of African trypanosomosis. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 71: 325-326.

52. Nyeko J. H. P., Ole-Moiyoi O. K. , Majiwa P. A. O., Otieno L. H. et Ociba P. M., 1990.

Charaterisation of trypanosomes isolates from cattle in Uganda by species-specific DNA probes reveals predominance of mixed infections. Insect. Sci. Appl., 11, 3, 271-280.

53. OIE, 2000.

Trypanosomosis (Tsetse-borne). Classified as an OIE List B (B113).

Accès Internet: <http://www.oie.int/>

54. Oumanwar S. R., Basagoudanavar J. R., S. H., Singh R. K. et Butchaiach G., 1999.

A simple and highly sensitive method to detect *Trypanosoma evansi* by DNA amplification from crude blood samples collected on filter papers. Journal of veterinary Parasitology. 13: 27-29.

55. Pangui L. J., 2001.

La trypanosomose, une contrainte majeure de l'élevage en Afrique Sub-saharienne (30-33). In Utilisation des trypanocides en Afrique Sub-saharienne, Actes du séminaire sous régional tenu du 06 au 09 février 2001, Dakar, Sénégal.-Dakar : EISMV.-170p.

56. Saïki R. K. , 1989.

Amplification of genomic DNA. In: A guide to methods and application. Harcourt. – Academic Press.-482p.

57. Saïki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G.T., Elirch H.A., et Arnheim N., 1985

Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Journal of Science. 230: 1350-1354.

58. Sidibé I., 1996.

Variabilité génétique de *Trypanosoma congolense*, agent de la trypanosomose animale : Implications taxonomiques et épidémiologiques. Thèse Doct. : Parasitologie : Université de Montpellier II.

59. Sidibé I., Bengaly Z., Boly H., Ganaba R., Desquesnes M. et Sawadogo L., 2002.

Differential pathogenicity of *Trypanosoma congolense* subgroups: Implication for the Strategic control of Trypanosomosis. Newsletter on Intergrated Control of phylogenic Trypanosomes and their vectors (6).

60. Sidibé S., 2001.

Impact économique des maladies sur l'élevage en Afrique subsaharienne (18-27).
In Utilisation des trypanocides en Afrique subsaharienne. Actes du séminaire sous régional tenu du 06 au 09 février 2001, Dakar, Sénégal.-Dakar : EISMV.-170p.

61. Solano P., Argiro L., Reifenberg J.M., Yao Y. et Duvallet G., 1995.

Field application of the polymerase chain reaction (PCR) to the detection and characterization of trypanosomes in *Glossina longipalis* (diptera: Glossinidae) in Côte d'ivoire. Molecular Ecology. 4: 781-785.

62. Solano P., Reifenberg J. M., Delafosse-Amsler S., Kaboré I., Cuisance D. et Duvallet G., 1996.

Trypanosome characterization by polymerase chain reaction in *Glossina palpalis gambiensis* and *G. tachinoides* from Burkina Faso. Med. Vet. Entomol. 10: 354-358.

63. Solano P., Cuny G., Duvallet G., Cuisance D., Ravel S., Sidibé I. et Touré S. M., 1997.

Les techniques de génétique moléculaire au service de l'épidémiologie des trypanosomoses. Intérêt de l'étude du polymorphisme des microsatellites des glossines. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 50, (4) : 297-301.

64. Solano P., Michel J. F., Lefrançois T., De La Rocque S. Sidibé I. Zoungrana A. et Cuisance D., 1999.

Polymerase chain reaction as a diagnosis tool for detecting trypanosomes in naturally infected cattle in Burkina Faso. Vet. Parasitol. 86 : 95-103.

65. Sow A. 2004.

Mise au point et validation de la PCR-ELISA pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma congolense* type savane (TCS). DEA : Biologie animale : Université Cheik Anta Diop de Dakar.

66. Staack C., et Lohding A., 1979.

The complement fixation test and African trypanosomiasis: Experimental infection and re-infection in cattle before after treatment. *Trop. Med. Parasitol.* 30: 13-18.

67. Ventura R. M., Gentilda F. T. et Marta M. G. T., 1997.

Molecular markers for characterization and identification of *Trypanosoma evansi*. *FAO animal Production and health Paper.* 135: 25-18.

68. Woo P. T. K., 1970.

The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Tropica.* 27: 384-386.

ANNEXES

Annexe 1 : Les souches de trypanosomes utilisées

Espèces	Code souches utilisées	Hôte et lieu d'isolement
<i>T. vivax</i>	TV. Folonzo/02/CIRDES/02	Bovin, Burkina Faso
	TV. Zaria 486	Bovin, Nigeria
	TV. Sat/87/CRTA/133.3	Bovin, Burkina Faso
	T V. Kanfiala	Bovin, Burkina Faso
<i>T. congolense</i> Type savane	TCS Kigoni/ILRAD/776	Bovin, Kenya
	TCS Sat/87/CRTA/125.1	Bovin, Burkina Faso
	TCS Folonzo/02/CIRDES/01.2	Bovin, Burkina Faso
	TCS Kar 83/CRTA/66	Bovin, Burkina Faso
<i>T. congolense</i> type forêt	TCF Komoé/87/CRTA/153	Bovin, Burkina Faso
<i>T. brucei</i>	T B Folonzo*	Bovin, Burkina Faso

* T B folonzo est dilué au 1/10^e avec de l'eau distillée.

Annexe 2: Amorces monospécifiques utilisées dans la PCR classique

Nom	Séquences	Nombre de bases	Taille des Produits PCR (pb)	Spécificité	Référence
TVW1	5'CTGAGTGCTCCATGTGCC AC-3'	20	150	<i>T. vivax</i>	Masiga et al. (1992)
TVW2	5'CCACCAGAACACCAACC TGA-3'	20			
TCS1	5'CGAGCGAGAACGGGCAC -3'	17	316	<i>T. congolense</i> Type savane	Masiga et al. (1992)
TCS2	5'GGGACAAACAAATCCCG C-3'	18			
TCF1	5'GGACACGCCAGAAGGTA CTT-3'	20	350	<i>T. congolense</i> Type forêt	Masiga et al. (1992)
TCF2	5'GTTCTCGCACCAAATCC AAC-3'	20			
NRP1	5'CGAATGAATATTAACA ATGCGCAGT-3'	26	177	<i>Trypanozoon</i> (<i>T. brucei</i>)	Moser et al. (1989)
NRP2	5'AGAACCATTTATTAGCTT TGTTGC-3'	24			

Source : Desquesnes et Davilà (2002)

Annexe 3 : Caractéristiques des amorces Tryp 4R et Tryp 4S

Amorce	Nbre De base	Séquences	Tm °C	Taille des produits PCR en pb				
				<i>T. vivax</i>	<i>T. brucei</i> <i>T. evansi</i> <i>T. equiperdum</i>	<i>T. congolense</i> type		
						savane	forêt	Kilifi
Tryp 4R	18	5'GCTGCGTTCTTC AACGAA-3'	46,60					
Tryp 4S	16	5'AAGTTCACCGA TATTG-3'	39,47	250	480	620	680	720

Source : Desquesnes et al. (2002)

Annexe 4: Caractéristiques des sondes retenues candidates pour le test ELISA

Espèce	Nom	Séquences	Taille en pb	T_m °C
<i>T. vivax</i>	STV1	5'-bTCGCGCCCGTCTCCCGGCCA-3'	21	73
	STV2	5'-bGGCCACCGGGGCGGGACAGCA-3'	21	73
	STV3	5'-bCCGCGCCCCGCGCGCAGGTGGA-3'	23	80
<i>T. congolense</i> Type savane	STCS1	5'-b TTGTGTGCTCGTGTGCGTACGGT - 3'	23	62
	STCS2	5'-bCCGCACGTGGTGGGGTGCT-3'	19	66
	STCS3	5'-bCCGCCCCGACGCTTATTGTGT-3'	20	64
<i>T. congolense</i> Type forêt	STCF1	5'-bACGCGTCTCCATGTCGCTG-3'	19	62
	STCF2	5'-bGTGTGCGCACCGGCTCGGCTCA-3'	22	71
	STCF3	5'-bGTGTTGGGAGAGGACAGAGGGCA- 3'	23	61
<i>T. brucei</i>	STB1	5'-bGCCGTTTGACATGGGAGATGAG-3'	22	58
	STB2	5'- bTATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCT-3'	25	61
	STB3	5'-bTGATGTGTTTCTATATGCCGT-3'	23	47

Annexe 5: Concentrations et volumes des réactifs pour la PCR classique

Réactifs et Echantillon	Volume Individuel (µl)	Concentration	Concentration Finale
Eau distillée	6,81	-	-
Tampon (10 mM Tris, 1,5 Mm Mgcl ₂ , 50 mM cl)	1,10	10 X	1X
DNTP	0,88	2500 µMoles	200 µM
Amorce 1	0,55	20 µM	1 µM
Amorce 2	0,55	20 µM	1 µM
Taq polymérase	0,11	5 UI / µl	0,5 UI / µl
Volume Master mix	10		
Echantillon / ADN	1		
Volume final	11		

Annexe 6 : Concentration et volumes des réactifs pour la PCR avec les amorces Tryp 4R et Tryp 4S

Réactifs et échantillon	Volume individuel (µl)	Concentration	Concentration finale
Eau distillée	7,28	-	-
Tampon (10 Tris, 1,5 mM MgCl ₂ , 50 Mm Kcl)	1,40	10X	1X
DNTP	1,12	2500 µMole	200 µM
Amorce 1 (Tryp 4R)	0,21	20µM	0,3 µM
Amorce 2 (Tryp 4 S)	0,21	20µM	0,3 µM
DMSO	0,70	Pur	5%
Taq Polymérase	0,08	5 UI / µl	0,4 UI / 10µl
Volume Master mix	11		
Echantillon	3		
Volume final	14		

Annexe 7 : Concentration et volume des réactifs pour la PCR ELISA

Réactifs et échantillon	Volume individuel (µl)	Concentration	Concentration finale
Eau distillée	24,8	-	-
Tampon (10 Tris, 1,5 mM MgCl ₂ , 50 Mm Kcl)	4	10X	1X
dNTP(DIG-Labeling mix)	4	2500 µMole	200 µM (dATP, dCTP et dGTP) 190 µM (dTTP) 10 µM (DIG-dUTP)
Amorce 1 (Tryp 4R)	0,5	20µM	0,3 µM
Amorce 2 (Tryp 4 S)	0,5	20µM	0,3 µM
DMSO	2	Pur	5%
Taq Polymérase	0,2	5 UI / µl	0,4 UI / 10µl
Volume Master mix	36		
Echantillon (ADN)	4 (2)		
Volume final	40		

Annexe 8 : Epreuve ELISA pour la révélation des produits d'amplification

☞ Sensibilisation des microplaques :

- ✓ Préparer une solution de 1 µg / µl par dilution de la streptavidine dans le tampon de sensibilisation (35 mM de Na H CO₃, 15 mM de Na₂CO₃ à pH = 9,6);
- ✓ Introduire dans chaque puits de la plaque Maxisorp® 100 µl de cette solution;
- ✓ Agiter et incuber la plaque à 37°C pendant deux heures ou laisser en chambre froide jusqu'au lendemain;
- ✓ Vider le contenu des puits et conserver à 4°C pour une utilisation rapide et à – 20°C pour une longue conservation.

☞ Blocage des sites libres :

- ✓ Sortir la plaque du réfrigérateur ou du congélateur et laisser à la température ambiante;
- ✓ Répartir 100 µl / puits le tampon de blocage;
- ✓ Incuber à 37°C pendant 30 minutes sous agitation permanente.

☞ Etape d'hybridation :

- ✓ Introduire dans un tube stérile de 250 µl :
 - 5 µl de produit PCR
 - 20 µl de la solution de dénaturation (NaOH 1 N), agiter brièvement les tubes avec le vortex et laisser pendant 10 minutes à 37°C.
 - Faire le mélange sonde et tampon d'hybridation, bien agiter cette solution d'hybridation avec le vortex, répartir 87 µl / puits de ce mélange et enfin chauffer à 60°C pendant une dizaine de minutes.
 - Ajouter dans les puits de la plaque 12 à 13 µl du mélange produits PCR et NaOH.
- ✓ Incuber la plaque à 60°C pendant une heure 30 minutes.

☞ Lavage :

- ✓ Vider le contenu de la microplaque,
- ✓ Laver 4 fois avec la solution de lavage,
- ✓ Tapoter légèrement la microplaque sur un linge sec et stérile afin d'absorber complètement le liquide de lavage. Casser les bulles d'air formés et bien essuyer la plaque.

☞ **Etape du conjugué :**

- ✓ Repartir dans chaque puits de la plaque 100 µl de la solution d'anticorps anti-DIG-POD,
- ✓ Incuber à nouveau sous agitation à 37°C durant 30 minutes.

☞ **Lavage :**

- ✓ Verser le contenu de la plaque,
- ✓ Laver comme précédemment.

☞ **Ajout du substrat :**

- ✓ Introduire dans chaque puits 100 µl de substrat (solution à volume égal de TMB peroxydase et de H₂O₂ ou une solution d'ABTS®),
- ✓ Incuber à 37°C pendant 10 à 15 minutes à l'abri de la lumière et avec agitation.

☞ **Lecture :**

- ✓ Mettre le spectrophotomètre en marche 15 minutes environ avant la lecture et sélectionner le programme de lecture.
- ✓ Pour arrêter la réaction (non indispensable), on reparti 100 µl / puits de l'acide sulfurique (H₂SO₄ 2 N),
- ✓ La lecture se fait à 450 nm et à l'aide du logiciel PROCOMM.



SERMENT DES VETERINAIRES DIPLOMES DE DAKAR

« Fidèlement attaché aux directives de Claude BOURGELAT, fondateur de l'enseignement vétérinaire dans le monde, je promets et je jure devant mes maîtres et mes aînés :

- d'avoir en tous moments et en tous lieux le souci de la dignité et de l'honneur de la profession vétérinaire ;
- d'observer en toutes circonstances les principes de correction et de droiture fixés par le code de déontologie de mon pays ;
- de prouver par ma conduite, ma conviction, que la fortune consiste moins dans le bien que l'on a, que dans celui que l'on peut faire ;
- de ne point mettre à trop haut prix le savoir que je dois à la générosité de ma patrie et à la sollicitude de tous ceux qui m'ont permis de réaliser ma vocation.



Que toute confiance me soit retirée s'il advient que je me parjure. »

LE (LA) CANDIDAT (E)

**VU
LE DIRECTEUR
DE L'ECOLE INTER-ETATS
DES SCIENCES ET MEDECINE
VETERINAIRES DE DAKAR**

**VU
LE PROFESSEUR RESPONSABLE
DE L'ECOLE INTER-ETATS DES
SCIENCES ET MEDECINE
VETERINAIRES DE DAKAR**

**VU
LE DOYEN
DE LA FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP
DE DAKAR**

**LE PRESIDENT
DU JURY**

**VU ET PERMIS D'IMPRIMER _____
DAKAR, LE _____**

**LE RECTEUR, PRESIDENT DE L'ASSEMBLEE
DE L'UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP
DE DAKAR**

Errata

Page	Paragraphe	Ligne	Lire	Au lieu de
Page de garde	Membres du jury		Yalacé Yamba KABORET	Yamba Yalacé KABORET
2	1	8	Espaceurs..	Espceurs...
2	2	1	Séquences de l'ADNr	Régions de l'ADNr
26	3	9	La trypanosomose humaine touche...	La trypanosomose humaine infecte...
34	3	4	Etalement sanguin	Frottis sanguin
34	3	5	Sur la base de critères de ...	Sur les critères de ...
34	3	10	L'étalement sanguin	Le frottis sanguin
77	2	4	Tableau IV, page82	Tableau IV, page 84
77	3	9	Tableau VII, page 84	Tableau VII. page 86
78	2	5	Tableau IV, page82	Tableau IV, page 84
80	1	9	Tableau VII, page 84	Tableau VII, page 86
80	2	8	Tableau IV, page82	Tableau IV, page 84
91	1	2	Tableau VII, page 84	Tableau VII, page 86
91	1	14	Tableau IV, page82	Tableau IV, page 84
91	2	8	Tableau VII, page 84	Tableau VII, page 86
92	1	1	Tableau VI, page 83	Tableau VI, page 85
92	2	4	Tableau VII, page 84	Tableau VII, page 86
93	1	6	Solano et al., 1999	Solano et al., 1994
113	Référence n° 54		Oumanwara	Oumanwar

Evaluation du diagnostic par PCR directe et PCR-ELISA sur les ITS des trypanosomes pathogènes du bétail

RESUME

Le développement d'une PCR unique amplifiant les espaceurs internes transcrits (Internal Transcribed Spacer : ITS) de l'ADN ribosomal des trypanosomes est une option prometteuse pour trouver un compromis entre un diagnostic sensible et spécifique d'une part et d'autre part un diagnostic accessible pour un coût raisonnable. Notre travail s'intègre dans cette dynamique et a consisté dans un premier temps à l'évaluation des amorces polyspécifiques (Tryp 4R et Tryp 4S) pour la PCR directe et dans un second temps à l'étude de la PCR-ELISA sur les ITS des trypanosomes.

Ainsi, pour la PCR directe, 425 échantillons de terrain dont 311 prélèvements sanguins de bovins (buffy coat) et 114 organes de mouche ont été analysés en PCR monospécifique et en PCR-ITS. Les amorces polyspécifiques ont détecté sur l'ensemble des échantillons 127 signaux positifs soit 29,88 %, par contre les amorces spécifiques d'espèce ont identifié 168 cas positifs soit 39,53 %. Pour les infections à *Trypanosoma vivax*, le couple d'amorces Tryp 4R et Tryp 4S totalise 97 cas positifs soit une prévalence de 22,82 %, tandis que les amorces TVW 1 & 2 ont identifié 51 cas soit 12 %. Avec les amorces TCS 1 & 2, 99 cas positifs soit 23,29 % sont rapportés à *Trypanosoma congolense* type savane, contre seulement 5,41 % représentant 23 échantillons révélés positifs à cette espèce en PCR-ITS. Au regard de ces résultats, la PCR utilisant le couple d'amorces polyspécifiques demeure globalement moins sensible que la PCR monospécifique. Cette faible sensibilité est particulièrement observée dans la détection des trypanosomes du sous genre *Nannomonas* (*T. congolense*).

Pour la PCR-ELISA, les sondes oligonucléotidiques spécifiques aux ITS des principales espèces de trypanosomes pathogènes du bétail ont identifié avec une spécificité totale les échantillons d'ADN de référence. Mais, la sensibilité de cette technique sur des échantillons de terrain s'est avérée inférieure à celle observée avec la révélation sur gel d'agarose.

Par ailleurs, l'application de la PCR-ELISA dans nos conditions reste limitée par son coût élevé. En effet, le coût de l'analyse d'un échantillon par PCR-ELISA sur les ITS a été estimé à 1,8 € (environ 1180 Fcfa) pour 4 espèces de trypanosomes détectées. Ce coût représente plus du double de celui de la PCR-ITS directe estimé à 0,72 € soit 472,30 Fcfa. Par conséquent, la PCR-ITS directe constitue une méthode de choix et à privilégier pour un diagnostic de routine.

Mots-clés : Diagnostic / PCR / PCR-ELISA / ITS / sensibilité / spécificité / trypanosomes

Adresse : Bachir SOULEY KOUATO

Email : souleyb@yahoo.fr Tel. 00227 73 43 71

BP : 5057 Niamey Niger.