

MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS
SECONDAIRE, SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE
BOBO-DIOULASSO (UPB)

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL
(IDR)



N° d'ordre :.....
CENTRE INTERNATIONAL DE
RECHERCHE-DEVELOPPEMENT SUR
L'ELEVAGE EN ZONE SUBHUMIDE
(CIRDES)

INSTITUT DE RECHERCHE POUR
LE DEVELOPPEMENT
(IRD)



MEMOIRE DE DEA

Présenté par : **Oumou CAMARA (Maître ès sciences)**

Option : Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques (BA/MSB)

Thème

**PCR et surveillance épidémiologique de la Trypanosomose Humaine
Africaine dans le foyer de Dubréka, Guinée**



Soutenu le 23 avril 2010, devant le Jury :

Président : - Pr Georges A. OUEDRAOGO, UPB / IDR

Membres : - Pr Adrien M. G. BELEM, UPB / IDR

- Dr Vincent JAMONNEAU IRD / CIRDES

DEDICACES

Dédicaces

- ✓ A mon père et ma mère grâce à qui j'ai vu le jour et sans qui rien de ce qui a été fait n'aurait pu l'être
- ✓ en la mémoire de feu Mr et Mme Diallo née Kadiatou Camara pour tous les efforts consentis au début de mon cursus scolaire
- ✓ A tous mes frères et sœurs Mamadou, Maïmouna et Binta Camara qui me soutiennent sans cesse et m'encouragent dans tous mes projets.
- ✓ A ma Tante chérie qui n'a jamais ménagé d'efforts pour que je puisse faire des études
- ✓ A la mémoire de mon frère feu Sékou Oumar Keita et ma petite sœur jumelle feu Fatoumata Camara ; que leur âme repose en paix et que DIEU le tout puissant puisse les accueillir dans son paradis

REMERCIEMENTS

Que toutes les personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail reçoivent ici ma profonde gratitude.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements :

- **Au Pr. Abdoulaye S. GOURO**, Directeur Général du CIRDES qui a bien voulu m'accepter au sein de son institution ;
- **Au Pr. Georges OUEDRAOGO**, de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, Responsable du DEA de Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques pour avoir accepté que je participe à ce DEA
- **Au Pr. Adrien Marie Gaston BELEM**, de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, Responsable des enseignements du troisième cycle et mon directeur de mémoire, pour avoir accepté de m'encadrer. Je tiens à vous remercier pour la confiance placée en moi.

Je remercie particulièrement :

- **Dr. Vincent JAMONNEAU**, chercheur IRD, basé au CIRDES, mon maître de stage qui a bien voulu m'accueillir dans son équipe de recherche et accepter de diriger ce travail avec compétence et rigueur de part ses grandes qualités scientifiques, une très bonne maîtrise de l'outil moléculaire et une bonne connaissance du terrain. Je suis plus qu'heureuse d'avoir eu un maître de stage dont la disponibilité et la grandeur d'esprit m'ont permis de travailler dans une ambiance très chaleureuse. Votre sens de l'humour reste un atout inconditionnel dans vos rapports humains et m'a permis d'être à mon aise chaque fois que je devais discuter avec vous. Recevez toute ma gratitude à travers ce mémoire.
- **Dr. Mamadou CAMARA**, coordinateur du PNLTHA de Guinée, pour m'avoir accueilli dans son équipe et encadré pendant ma maîtrise. Je vous remercie surtout de m'avoir fait partager vos connaissances sur la maladie du sommeil et de m'avoir donné goût aux expériences de terrain. Ces premiers pas ont été à l'origine de ce travail.
- **Dr. Issa SIDIBE**, Directeur Scientifique du CIRDES et responsable du PATTEC au Burkina Faso, d'avoir facilité mes travaux de recherche
- **Dr. Zakaria BENGALY**, chercheur au CIRDES, Chef de l'Unité de Recherche sur les Bases Biologiques de la lutte Intégrée (URBIO) pour m'avoir accepté dans son unité de Recherche et pour avoir toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager.
- **Dr. Bruno BUCHETON**, chercheur IRD basé au CIRDES, mon co-encadreur de stage de DEA. Je vous exprime du fond du cœur toute notre gratitude pour votre disponibilité et les connaissances que vous m'avez transmises.
- **Dr. Fabrice COURTIN**, chercheur IRD basé au CIRDES, pour m'avoir offert de très belles cartes pour la présentation de ma zone d'étude et des sujets étudiés.

- **Dr. Philippe SOLANO**, chercheur IRD basé au CIRDES, pour vos compétences et votre démarche collaboratrice avec le PNLTHA Guinée, en témoignent le nombre d'articles et de projets communs IRD-CIRDES / PNLTHA Guinée.
- **Dr. Thierry de MEEUS**, chercheur IRD basé au CIRDES, pour la qualité des enseignements dispensés dans le cadre du DEA, et pour les conseils en termes d'informations techniques et scientifiques.
- **Mr. Hassane SAKANDE**, technicien à l'URBIO, pour sa disponibilité constante dans la réalisation de ce travail tant sur le terrain qu'au laboratoire.
- **Sanon René dit « Doyen » et SKJ**, ce travail c'est en partie vous qui l'avez effectué sur le terrain et je vous en suis plus que reconnaissante. Votre sympathie, votre solidarité n'ont d'égaux que votre connaissance du terrain et votre volonté à lutter contre la maladie du sommeil.
- **Toute l'équipe « Trypano » du PNLTHA de Guinée**, en commençant par le coordinateur adjoint Dr Diaby, mes deux mamans très affectueuses et dynamiques, Dr Frédéric, Blo (le volcan en ébullition), Farace, Moïse, Doyen Kasterman, Alpha, Kalifa, Emile, Dr. Sylla, OC.
- **Mon koro Louis N'Dri, Bamoro Coulibaly** (vieux pingouin) de l'équipe « Trypano » de l'Institut Pierre Richet de Côte d'Ivoire.
- Tous les autres techniciens du CIRDES en général et de l'URBIO en particulier.
- Tous les autres chercheurs et tout le personnel du CIRDES, merci pour votre soutien.
- **Tous les étudiants** en Thèse, en DEA en Master etc, Somda Bienvenu, Jacques Kaboré, Ousmane Traoré, Dama Emilie, Ernest Salou, Akoudjin Massouroudini, Claude Toukam, Aristide Semporé et particulièrement Hamidou Ilboudo qui m'a initié à la PCR ainsi qu'à tous les stagiaires en DEA et en thèse du CIRDES pour tous les merveilleux moments passés ensemble durant mon stage.
- **Mes camarades de promotion du DEA** plus particulièrement Esther Hein, Annicet Dikoumba et Naba Noel qui ont le plus subi mes caprices,.
- Tous les parents et amis dont le soutien et les prières nous restent inestimables.

Pour les aspects logistiques, administratifs et financiers, je tiens à remercier :

- Le projet **FSP/REFS** du Ministère français des Affaires Etrangères et l'OMS pour avoir financé tous les aspects terrain et laboratoire de cette étude.
- L'Ambassade de France en Guinée à travers le service de coopération et d'action culturelle (**SCAC**) pour la bourse qui ma permis d'effectuer ce DEA à Bobo-Dioulasso. Merci à Bernard Jean, Pascal Delattre et Christophe VanHecke, l'ancienne équipe, et Tobie Nathan, Patrick Perrin et Brigitte Féraud, la nouvelle équipe qui a accepté de prolonger mon financement.
- Annick Giraudeau, responsable de l'équipe Campus France à Ouagadougou, pour tout le soutien apporté.

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

SOMMAIRE

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS	II
SOMMAIRE	IV
RESUME	VI
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I. Historique de la THA et situation actuelle.....	4
I.1. Les premières descriptions de la maladie.....	4
I.2. Identification de l'agent pathogène.....	5
I.3. Evolution de la maladie au cours du 20 ^{ème} siècle.....	6
I.4. Situation actuelle de la THA.....	7
II. L'agent pathogène de la THA : le trypanosome, un parasite	9
II.1.Taxonomie	9
II.2.Morphologie et cycle évolutif	11
II.3 Manifestations cliniques	13
II.4 Le diagnostic	15
II. 4. 1. Examens sérologiques	17
II. 4. 2. Examens parasitologiques	18
II.5 Le diagnostic de phase et le traitement.....	19
DEUXIEME PARTIE: PROBLEMATIQUE	21
I. Nécessité d'améliorer le diagnostique de la THA.....	21
II. Apport de l'outil moléculaire dans le diagnostic de la THA.....	22
TROISIEME PARTIE: MATERIELS ET METHODES	24
I. Zone d'étude : le foyer de Dubréka (Guinée).....	24
II. Prospection médicale	26
III. Echantillonnage	28
IV. Extraction d'ADN	28
V. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	29
VI. Aspects éthiques	32
QUATRIEME PARTIE : RESULTATS	33
I. Résultats de la prospection médicale.....	33
II. Résultats des tests diagnostiques effectués sur le terrain.....	34

III. Résultats de la PCR	38
CINQUIEME PARTIE : DISCUSSION.....	40
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	45
ANNEXES.....	A
Annexe 1. Questionnaire épidémiologique et clinique	A
Annexe 2. Protocole d'extraction d'ADN à partir de sang total par le kit DNeasy.....	C
Annexe 3. Résultats recensement / cartographie.....	D
Annexe 4. Résultats bruts de tous les tests effectués sur les 39 malades et 39 séropositifs	F

RESUME

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil qui demeure un grave problème de santé publique en Afrique Subsaharienne est une maladie parasitaire due à *Trypanosoma brucei* ssp. Après une situation dramatique à la fin des années 1990 (300 000 à 500 000 cas selon l'OMS), les importants efforts de lutte déployés ces dernières années semblent avoir permis de contenir le fléau (14 000 nouveaux cas en 2008). Le contexte actuel vise l'élimination de la maladie à l'échelle du continent. La lutte contre la THA repose en grande partie sur le dépistage par prospections médicales et le traitement des malades. Le diagnostic clinique de la maladie étant difficile, on a recours à des tests sérologiques permettant un dépistage de masse, et des tests parasitologiques permettant la mise en évidence du parasite, étape indispensable pour décider l'administration d'un traitement long et toxique. Cependant, les équipes de terrain doivent faire face à une situation plus complexe que la dichotomie malade/non-malade et notamment à des sujets positifs en sérologie sans confirmation parasitologique. Ces sujets appelés séropositifs (S+) ne reçoivent pas de traitement alors qu'ils sont suspectés d'être infectés. Ces dernières années, des méthodes d'amplification en chaîne par Polymérase (PCR) développées afin d'améliorer le diagnostic de la THA ont montré leur intérêt dans l'étude du phénomène de séropositivité sans confirmation parasitologique. L'objectif de cette étude était de voir si l'utilisation de la PCR pouvait apporter des éléments de réponses à la question : que représentent les sujets séropositifs et comment doivent-ils être pris en compte dans les stratégies de lutte en Guinée, pays le plus touché par la THA en Afrique de l'Ouest ? Cette étude a été menée dans le foyer de Dubréka en zone de mangrove sur le littoral guinéen. Les résultats ont montré que 1/3 des S+ étaient positifs à ce test. Ils prouvent une fois de plus que les S+ peuvent constituer un réservoir de parasites et contribuer au maintien de l'endémie dans un foyer, et surtout qu'ils doivent être pris en compte dans les stratégies de lutte. Malheureusement, la toxicité des médicaments existants interdit de traiter à tort un sujet, et la PCR qui est un test indirect (détection de l'ADN) ne peut toujours pas être utilisé comme outil de décision thérapeutique. Des recherches doivent être poursuivies et nous suggérons de mettre en place un suivi à long terme de tous les séropositifs détectés lors des prospections médicales afin d'étudier l'évolution de ce statut et de mieux le caractériser pour pouvoir enfin savoir comment le considérer en terme de lutte. Les résultats de cette étude nous ont aussi permis

de faire d'autres propositions toujours dans le souci d'optimiser les stratégies de lutte dans les foyers de Guinée, notamment d'effectuer un recensement de population avant une prospection médicale afin d'en évaluer la réelle efficacité, de légèrement modifier le schéma de dépistage actuellement utilisé et de mettre en place des activités de lutte anti-vectorielle dans les zones les plus touchées par la maladie.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribonucléique

BC: Buffy-Coat

BET : Bromure d'éthidium

CATT: Card Agglutination Test for Trypanosomiasis

CIRDES: Centre International de Recherches Développement sur l'Élevage en zone Subhumide

CTC: Centrifugation en Tubes Capillaires

DEA: Diplôme d'Études Approfondies

DEAE cellulose : Diethylaminoethyl Cellulose

dNTP : di Nucléotide Tri Phosphate

IPR: Institut Pierre Richet

IRD: Institut de Recherche pour le Développement

LCR: Liquide Céphalo-Rachidien

LiTat: Lille Trypanozoon antigen types

mAECT: miniature Anion Exchange Centrifugation Technique

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PCR: Polymerase Chain Reaction

PNLTHA : Programme National de Lutte contre la THA

QBC: Quantitative Buffy Coat

SCAC : Section de Coopération et d'Action Culturelle

SNC: Système Nerveux Central

TBE : Tris Borate EDTA

THA: Trypanosomoses Humaines Africaines

UA: l'Union Africaine

UPB : Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

URBIO: Unité de Recherche sur les Bases Biologiques de la Lutte Intégrée

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution de la THA en Afrique au cours des siècles derniers (source www.who.org).....	7
Figure 2 : Nombre de cas de THA reportés en Afrique de l'Ouest de 2000 à 2008 (Cecchi et al., 2009) 8	8
Figure 3 : Distribution des cas de THA dépistés activement (prospections médicales) en Afrique de l'Ouest de 2000 à 2008 (Cecchi et al., 2009).....	8
Figure 4 : Taxonomie des trypanosomes de mammifères (source : Vickermann, 1985).....	10
Figure 5 : <i>T. b. gambiense</i> en culture in vivo chez le rongeur (observation x1000).....	12
Figure 6 : Constituants fondamentaux d'un trypanosome (source : www.sleeping-sickness.com)	12
Figure 7 : Cycle évolutif de <i>Trypanosoma brucei</i>	13
Figure 8 : Aspects cliniques de la THA.....	16
Figure 9 : Illustration du CATT effectué sur sang total (CATT/sg)	18
Figure 10 : Illustration de la mAECT	19
Figure 11 : Carte de la Guinée et localisation de la zone d'étude (Dubréka).....	25
Figure 12 : Image satellite de la zone de Dubréka (cartographie, Fabrice Courtin).....	25
Figure 13 : Illustration du CATT effectué sur plasma (CATT/pl)	28
Figure 14 : Schéma général de la PCR et les 3 étapes thermiques du cycle d'amplification	30
Figure 15 : Représentation spatiale des localités et populations recensées et répartition des malades (T+) dépistés au cours de la prospection médicale (cartographie, Fabrice Courtin)	35
Figure 16 : Représentation spatiale des localités et populations recensées et répartition des séropositifs (S+) identifiés au cours de la prospection médicale (cartographie, Fabrice Courtin)	36
Figure 17 : Résultats du CATT/pl pour les 39 T+ et 39 S+ identifiés lors de la prospection	37
Figure 18 : Résultats des tests parasitologiques sur les 39 T+	37
Figure 19 : Résultats du diagnostique de phase sur les 35 sujets qui ont été traités	38
Figure 20 : Révélation d'une PCR sur gel d'agarose	38
Figure 21 : Résultats PCR sur les 39 T+ et 39 S+	39
Figure 22 : Résultats PCR et CATT/pl sur les sujets S+.....	39

INTRODUCTION

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil est une maladie parasitaire à transmission vectorielle. Elle est causée par des protozoaires flagellés sanguicoles de l'espèce *Trypanosoma brucei* qui se compose de trois sous-espèces : *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*), responsable de la forme chronique de la THA en Afrique de l'Ouest et Centrale, *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*) agent de la forme aiguë de la THA en Afrique de l'Est et *Trypanosoma brucei brucei* (*T. b. brucei*), non pathogène pour l'homme, responsable de la nagana chez les animaux. La transmission aux hôtes mammifères, homme et animal, est assurée par un insecte vecteur hématophage, la glossine (genre *Glossina*) ou mouche tsé-tsé.

Elle reste un problème majeur de santé publique en Afrique Subsaharienne où elle se place en termes de disability adjusted life years lost (DALYs, somme de la perte d'années de vie par mortalité prématurée et d'années de vie productive par incapacité) au troisième rang des parasitoses derrière le paludisme et la shistosomose (Cattand, 2001 ; Fèvre *et al.*, 2008). Elle existe sous forme épidémique ou endémique dans plus de 260 foyers répartis dans 36 pays. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 60 millions de personnes vivent dans des régions à risque (exposées aux mouches tsé-tsé), parmi lesquels moins de 4 millions sont sous surveillance régulière (OMS, 2002). A la fin des années 1990, l'OMS estimait entre 300 000 et 500 000 le nombre de personnes atteintes. Face à cette situation dramatique, les importants efforts de lutte déployés ces dernières années semblent avoir permis de contenir le fléau puisque les derniers chiffres annoncés par l'OMS font état de 14 000 nouveaux cas en 2008 (Simarro *et al.*, 2008). C'est dans ce contexte encourageant que l'OMS et l'Union Africaine (UA) viennent de lancer des importantes campagnes d'élimination de la THA et des glossines à l'échelle du continent. La Guinée a fait partie de ces pays endémiques touchés par la réémergence de la THA à la fin du 20^{ème} siècle. Elle est actuellement le pays le plus touché par la maladie en Afrique de l'Ouest avec 620 malades dépistés de 2002 à 2008 par le Ministère de la Santé (Programme National de Lutte de contre la THA, PNLTHA) principalement sur le littoral (Camara *et al.*, 2005 ; Simarro *et al.*, 2008). C'est donc dans ce pays de la sous-région que doivent se concentrer les efforts de lutte.

Historiquement, la lutte contre la THA a reposé essentiellement sur le dépistage et le traitement des malades. Le diagnostic clinique de la maladie étant difficile (Jannin *et al.*, 1993 ; Sternberg, 2004), des tests parasitologiques (diagnostic direct) qui visent à rechercher la présence du parasite dans les liquides biologiques (sang, lymphes et Liquide Céphalo-Rachidien) ou des tests sérologiques (diagnostic indirect) qui cherchent à mettre en évidence l'infection parasitaire, ont été développés. Lors du dépistage de terrain, le diagnostic indirect est utilisé pour déterminer les individus sur lesquels porteront les examens du diagnostic direct dont seul le résultat positif (mise en évidence du parasite) peut justifier l'administration d'un traitement (OMS, 1998). Le diagnostic est donc d'une importance cruciale (i) au niveau individuel, car il permet d'assigner un statut de «malade» à la personne examinée, et (ii) au niveau de la population, car les stratégies de lutte contre cette maladie qui touche des populations rurales dans des régions souvent difficiles d'accès reposent en partie sur une détection précoce.

Mais les techniques actuellement utilisées manquent souvent de sensibilité et / ou de spécificité. Le manque de sensibilité des méthodes parasitologiques étant dû aux faibles parasitémies sanguines, des techniques de centrifugation/concentration comme la minicolonne échangeuse d'anions (mAECT) (Lanham & Godfrey 1970), actuellement la méthode la plus sensible (Chappuis *et al.*, 2005), sont utilisées. Mais les équipes de dépistage doivent toujours faire face à une situation plus complexe que la dichotomie malade/non-malade et notamment à des sujets positifs en sérologie sans confirmation parasitologique (Garcia *et al.*, 2000) que l'on nomme classiquement individus séropositifs et qui ne reçoivent pas de traitement. Ces sujets séropositifs sont suspectés de constituer un réservoir humain de parasites et de contribuer au maintien de l'endémie dans un foyer (Garcia *et al.*, 2006).

Ces dernières années, des techniques moléculaires basées sur la détection d'ADN de trypanosomes par Polymerase Chain Reaction (PCR) ont été évaluées afin d'améliorer le diagnostic de la THA (Chappuis *et al.*, 2005). Ces méthodes toujours difficiles à mettre en œuvre sur le terrain et restreintes à la recherche ont déjà montré leur intérêt dans l'étude du phénomène de séropositivité sans confirmation parasitologique, notamment en Côte d'Ivoire (Koffi *et al.*, 2006). En tant que membre du PNLTHA Guinée, l'objectif principal de cette étude qui fait l'objet de mon stage de DEA était de voir dans quelles mesures

l'utilisation de la PCR pouvait apporter des éléments de réponses à la question : que représentent les sujets séropositifs sans confirmation parasitologique et comment doivent-ils être pris en compte dans les stratégies de lutte en Guinée ? Répondre à ces questions permettra de contribuer à une meilleure compréhension de l'épidémiologie de la THA et à optimiser la surveillance épidémiologique dans les foyers de Guinée.

Dans ce mémoire, suite à quelques généralités sur la THA, nous développerons les aspects liés à nos questions de recherche. Nous décrirons alors la méthodologie appliquée ainsi que les résultats obtenus qui seront enfin discutés.

PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Historique de la THA et situation actuelle

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

1.1. Les premières descriptions de la maladie

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

1.2. Identification de l'agent pathogène

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

En 1903, une enquête effectuée par Kermorgant fait ressortir qu'à l'époque, la Casamance (Sénégal), le pays lobi et le Yatenga (Haute-Volta, actuel Burkina-Faso), le Wasulu (Guinée) et l'intérieur de la Côte d'Ivoire, étaient particulièrement concernés par la maladie du sommeil. A partir de 1908, on rapporte d'Afrique de l'Est, des cas de maladie du sommeil remarquables par leur sévérité et leur courte durée. Stephens & Fantham (1910) étudient une souche isolée sur un des premiers cas reconnu de cette nouvelle forme de maladie et constatent qu'elle diffère de *T. gambiense* par sa grande virulence pour les animaux de laboratoire. Ils nomment ce nouvel agent pathogène *Trypanosoma rhodesiense* (découvert en Rhodésie). En 1912, Kinghorn et Yorke démontrent le rôle de *Glossina morsitans* dans la

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

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

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

L'élimination presque totale de la maladie a conduit au cours de ces années 60 à l'abandon du dépistage de masse actif, et il n'est pas surprenant, que suite à la rupture des systèmes de contrôle, la maladie ait « ré-émergée » et soit redevenue un problème majeur de santé publique. La reprise de l'endémie se fait progressivement à partir de 1970 dans la plupart des foyers historiques. Certains pays réussissent à maintenir un contrôle sur la maladie mais de nombreux autres, ayant abandonné toute surveillance effective, doivent faire face à une situation redevenue épidémique et dramatique. C'est notamment le cas pour la République Démocratique du Congo (RDC, ex-Zaire), l'Angola, l'Ouganda ou le Sud-Soudan (figure 2).

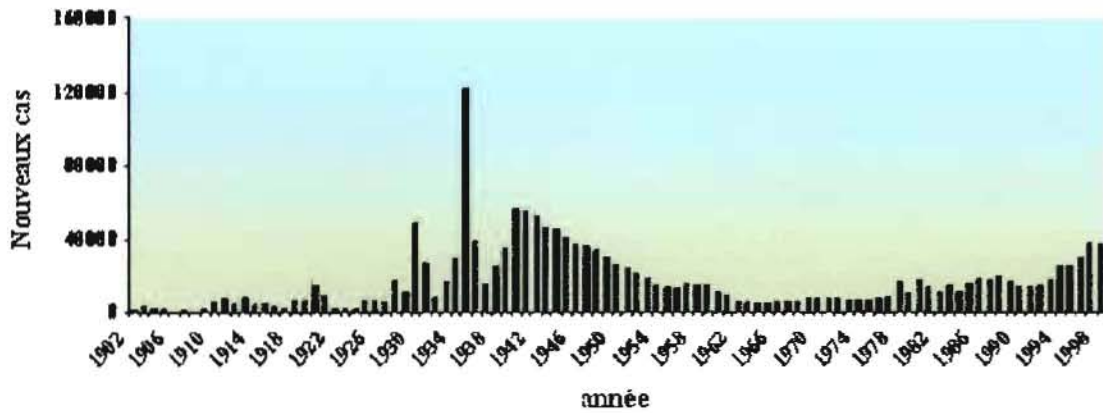


Figure 1 : Evolution de la THA en Afrique au cours des siècles derniers (source www.who.org)

1.4. Situation actuelle de la THA

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

Actuellement, on estime que 60 millions de personnes sont exposées au risque de contracter la THA, parmi lesquels moins de 4 millions sont sous surveillance régulière (OMS, 2002). Au début des années 2000, le nombre de personnes infectées était estimé entre 300 000 et 500 000 par l'OMS. En 2004, après un effort considérable de surveillance en Afrique Centrale notamment, environ 25 000 cas ont été rapportés et l'OMS en 2005 annonçait la possibilité d'élimination de la maladie du sommeil (Jannin, 2005). En 2008, 14 000 nouveaux cas ont été reportés (Simarro *et al.*, 2008). Si cette situation semble de plus en plus encourageante, ces chiffres ne reflètent que partiellement la réalité du fait de nombreuses zones à risque qui demeurent sans surveillance comme dans certains pays d'Afrique de l'Ouest : Libéria, Sierra Léone, Ghana ou Guinée Bissau. Les données les plus récentes de

surveillance épidémiologiques dans la sous-région ouest-africaine montrent que la Guinée et la Côte d'Ivoire sont les deux pays les plus touchés (Cecchi *et al.*, 2009). Par exemple, en Guinée et en Côte d'Ivoire, les récentes prospections médicales (2000 à 2008) ont permis de dépister plusieurs centaines de malades notamment dans les foyers de Boffa et Dubreka en Guinée (Camara *et al.*, 2005), et dans les foyers de Bonon, Sinfra, Oumé en Côte d'Ivoire (Kaba *et al.*, 2006) comme illustré sur la figure 3 (Cecchi *et al.*, 2009)

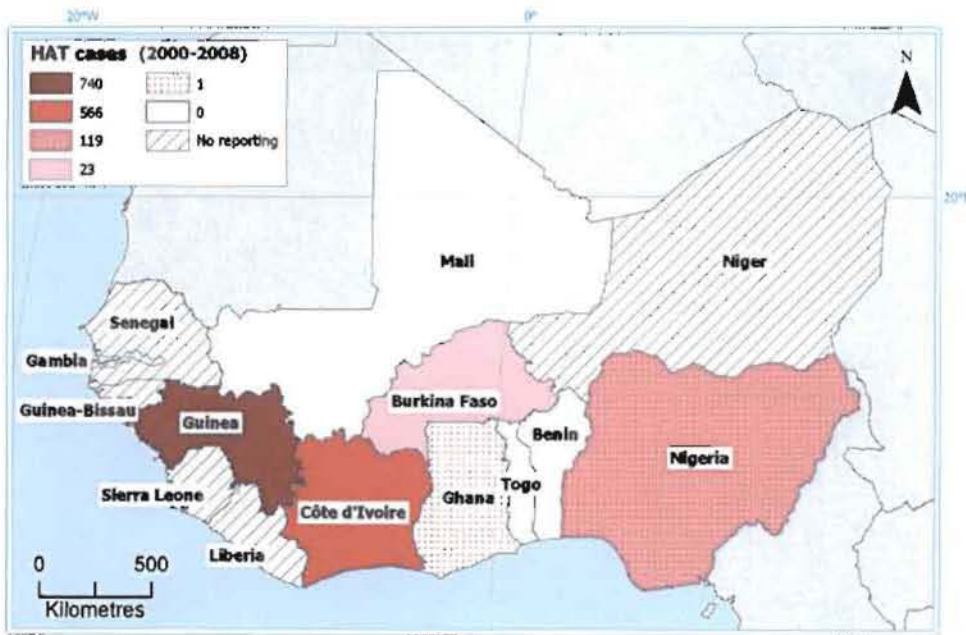


Figure 2 : Nombre de cas de THA reportés en Afrique de l'Ouest de 2000 à 2008 (Cecchi *et al.*, 2009)



Figure 3 : Distribution des cas de THA dépistés activement (prospections médicales) en Afrique de l'Ouest de 2000 à 2008 (Cecchi *et al.*, 2009)

II. L'agent pathogène de la THA : le trypanosome, un parasite

Après avoir décrit le parasite responsable de la THA (taxonomie, morphologie et particularités biologiques), nous décrivons son cycle épidémiologique et les acteurs qui le composent.

II.1. Taxonomie

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

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

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

"antérograde". Les parasites infestants sont dans la partie antérieure du tube digestif. L'infestation de l'hôte vertébré se fait par piqûre d'un insecte. Cette section regroupe 5 sous-genres: *Tejeraia*, *Duttonella* (*Trypanosoma vivax*), *Nannomonas* (*Trypanosoma congolense*), *Pycnomonas* et *Trypanozoon*.

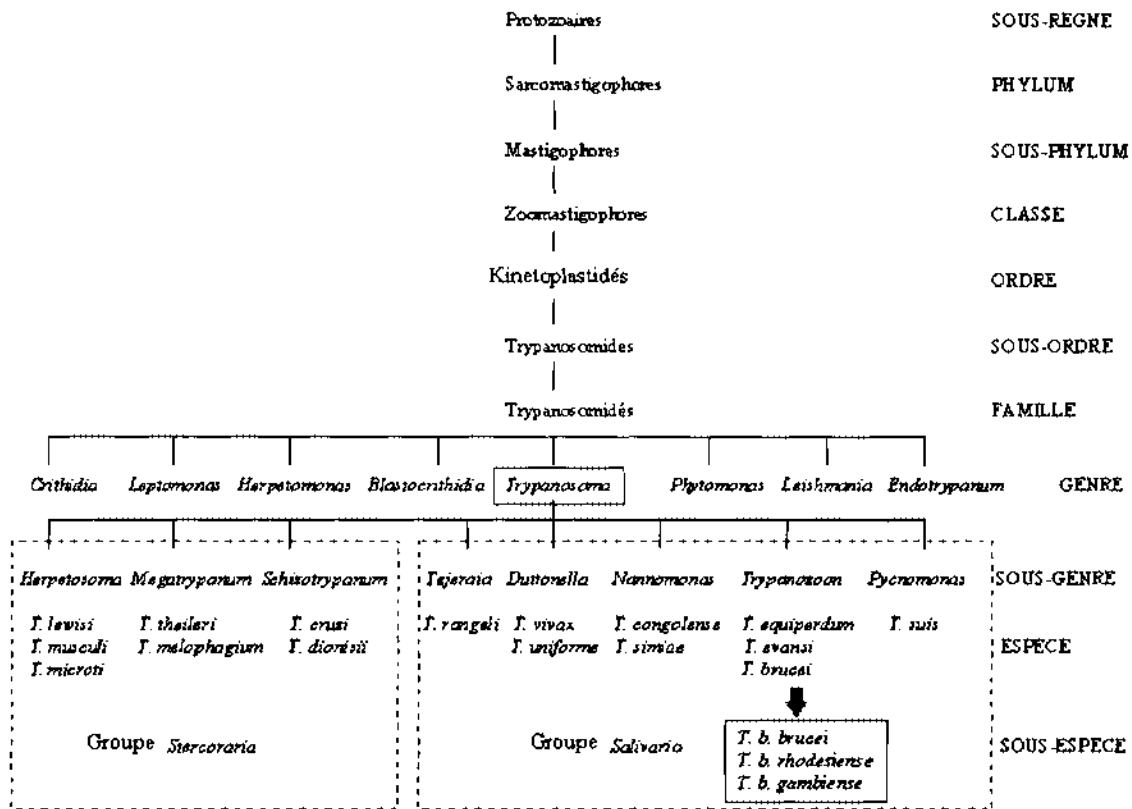


Figure 4 : Taxonomie des trypanosomes de mammifères (source : Vickermann, 1985).

Dans le cadre de notre étude, nous nous intéressons uniquement au sous-genre *Trypanozoon* Lühe 1906 qui regroupe les trypanosomes pathogènes pour l'homme. Le sous-genre *Trypanozoon* regroupe trois espèces qui sont *T. evansi*, *T. equiperdum* et *T. brucei* ssp., toutes indistinguables morphologiquement. *T. brucei* ssp. se subdivise classiquement en 3 sous-espèces sur des critères cliniques, d'hôtes, et de distribution géographique. On distingue donc :

- *T. b. brucei* (Plimmer & Bradford, 1899) : agent pathogène responsable de la "Nagana" sur toute l'aire de répartition des glossines (Afrique intertropicale), chez l'animal, mais réputé

non pathogène pour l'homme. Cette maladie provoque des ravages dans les troupeaux domestiques de bétail (Fèvre et al., 2008) et cause ainsi un grave handicap économique.

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

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

II.2. Morphologie et cycle évolutif

Les trypanosomes sont des cellules fusiformes, leur taille varie selon l'espèce. *T. brucei* ssp., mesure de 12 à 42 μm de long sur 2 à 3 μm de large (voir photo figure 5). Il se multiplie essentiellement par division binaire longitudinale. En microscopie optique, outre les constituants fondamentaux de la cellule (noyau, cytoplasme et membrane), les trypanosomes se caractérisent par la présence d'un kinétoplaste (organite cytoplasmique) et d'un flagelle rattaché à la paroi du corps par une membrane ondulante (figure 6). Le kinétoplaste est situé dans la partie postérieure de la cellule, près du corps basal du flagelle, à l'intérieur de la grande mitochondrie qui s'étend sur toute la longueur du corps cellulaire, il

contient de l'ADN extra nucléaire. Le flagelle, dirigé vers l'avant, naît d'un corps basal situé à l'intérieur de la poche flagellaire et assure la mobilité du trypanosome.

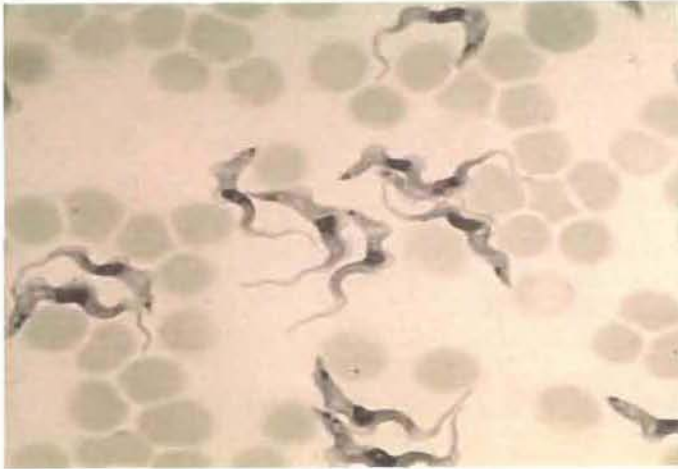


Figure 5 : *T. b. gambiense* en culture in vivo chez le rongeur (observation x1000)

(source : www.sleeping-sickness.com)

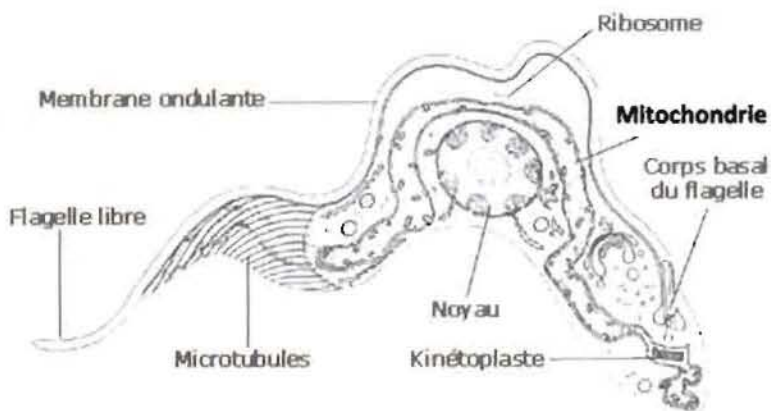


Figure 6 : Constituants fondamentaux d'un trypanosome (source : www.sleeping-sickness.com)

Le cycle de vie de *T. brucei* (figure 7) s'effectue chez un hôte mammifère vertébré, et chez un hôte vecteur, un insecte hématophage du genre *Glossina*. Inoculés chez l'hôte vertébré par la piqûre de l'insecte vecteur, les parasites se multiplient d'abord dans le

collagène dermique et passent ensuite dans la circulation générale par voie sanguine ou lymphatique avec un séjour plus ou moins prolongé dans les nœuds lymphatiques. Après cette période lymphatico-sanguine plus ou moins longue (qui peut durer plusieurs années), les trypanosomes finissent par envahir le liquide céphalo-rachidien et les centres nerveux pour des raisons et par des mécanismes encore mal connus. L'insecte vecteur qui se contamine lors d'un repas sanguin par piqûre d'un mammifère infesté. Après passage dans l'intestin, les parasites remontent dans les glandes salivaires et se différencient en formes infectantes, prêtes à être inoculées chez l'hôte mammifère à l'occasion d'un nouveau repas sanguin.

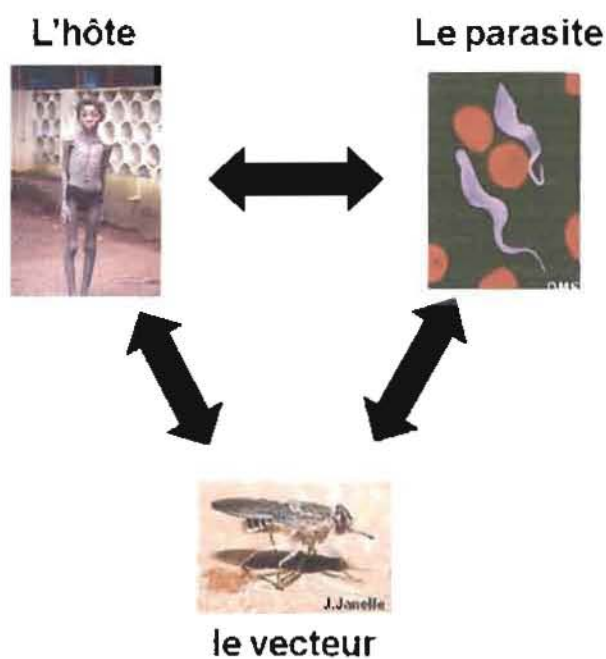


Figure 7 : Cycle évolutif de *Trypanosoma brucei*

II.3 Manifestations cliniques

Les signes et symptômes qui caractérisent la maladie du sommeil sont en général les mêmes pour la forme chronique gambienne et pour la forme aiguë rhodésienne, la différence étant l'évolution plus ou moins rapide vers l'atteinte neurologique puis la mort (Sternberg, 2004). La maladie évolue chez l'homme en deux phases ou périodes: la première

période (phase lymphatico-sanguine) durant laquelle le parasite se multiplie dans le sang et dans la lymphe, et la deuxième période (phase méningo-encéphalitique) qui correspond au passage du parasite dans le LCR puis à l'envahissement du système nerveux central (SNC). La classification actuelle (OMS, 1998 ; 2002) du stade de la maladie repose sur les modifications des résultats de l'examen du LCR.

Chez l'homme, l'inoculation du trypanosome se caractérise cliniquement par l'apparition d'une lésion cutanée (chancres d'inoculation), rougeâtre et douloureuse (furoncle non-purulent) au niveau de la piqûre infestante. Cette lésion est le témoin de la multiplication du trypanosome *in situ*, qui envahit alors le système lymphatique puis sanguin. Elle est fréquemment observée dans l'infection à *T. b. rhodesiense* mais rare dans l'infection à *T. b. gambiense*. Ensuite, au cours de la première période, les symptômes les plus couramment rapportés sont la fièvre, les céphalées, l'asthénie et des douleurs musculaires et articulaires. Ces symptômes apparaissent de façon cyclique (on parle de pics fébriles) et sont témoins de la production de vagues successives de parasites et de réponses immunitaires (Donelson & Turner, 1985). Des signes plus spécifiques tels que l'envahissement des différents viscères comme le foie, la rate et le cœur, et l'hépatosplénomégalie ainsi que des troubles cardio-vasculaires sont rencontrés. Des signes cutanés, spécifiques ou non, sont très fréquents (prurit, éruptions cutanées et trypanides). Les adénopathies cervicales (signes de Winterbottom) apparaissent pendant cette période, en réponse à l'envahissement ganglionnaire, et témoignent de l'activité intense du système immunitaire (voir Figure 8). D'autres signes cliniques comme des œdèmes (des membres ou de la face) ou des troubles endocriniens (aménorrhée, impuissance) apparaissent aussi en cours de première période et s'aggravent au cours de la deuxième période.

La plupart des signes cliniques décrits pour la première phase persistent lors de la deuxième phase: certains signes ont tendance à s'effacer tels que les adénopathies, l'hépatosplénomégalie ou les signes cutanés. Les troubles du sommeil (insomnies nocturnes, somnolences diurnes, hypersomnie permanente, figure 8), les troubles moteurs, les troubles sensitifs (hyperesthésie, paresthésie), les troubles du tonus (hypertonie, hypotonie), les troubles de la coordination, les réflexes anormaux (réflexes ostéo-tendineux, archaïques et cutanés), les troubles neuro-endocriniens (stérilité et perte de libido, trouble de la soif) et l'altération de l'état mental (conscience ralentie, confusion mentale, désorientation, coma,

agressivité, indifférence, euphorie, dépression) sont autant de signes fréquemment rencontrés et qui caractérisent l'atteinte neurologique spécifique de la deuxième période. Cette énumération n'est pas exhaustive et tout signe neurologique insolite doit alerter sur un risque de trypanosomose (Gentilini, 1993). En l'absence de traitement, l'état général du malade se dégrade et il s'achemine plus ou moins rapidement vers la cachexie sommeilleuse terminale (état grabataire) puis sombre dans le coma (figure 8) et meurt d'encéphalopathie.

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

Les signes cliniques manquent de spécificité et leur fréquence est variable selon les individus et les foyers. Ils peuvent orienter le diagnostic, mais ne permettent pas de l'établir (Jannin *et al.*, 1993), surtout dans le cas de la forme chronique gambienne pour laquelle la phase lymphatico-sanguine est parfois totalement asymptomatique (Garcia *et al.*, 2006).

II.4 Le diagnostic

Le traitement de tous les malades, associé à une lutte antivectorielle devrait théoriquement permettre une élimination de la maladie. Mais le traitement de tous les malades nécessite leur dépistage exhaustif. Nous venons de voir que du fait d'une importante diversité clinique, il est difficile d'établir un diagnostic de la THA à partir d'un examen clinique seul. On a alors recours à des méthodes de diagnostic direct ou indirect.



Adénopathies cervicales



Troubles du sommeil



Trypanides



Coma somnolent

Figure 8 : Aspects cliniques de la THA

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

sujets confirmés porteurs de trypanosomes, le ou les tests du diagnostic de phase sur le LCR, qui conditionnent le traitement à administrer

II. 4. 1. Examens sérologiques

Parmi les méthodes sérologiques, le Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT *T. b. gambiense*, Magnus *et al.*, 1978) est actuellement le plus utilisé en matière de dépistage de masse (figure 9). Il répond à toutes les exigences d'un test de terrain: très simple d'emploi, bon marché et de lecture immédiate. Le réactif du test CATT est une suspension lyophilisée de trypanosomes sanguicoles fixés, stabilisés et colorés au bleu de Coomassie. Ils appartiennent à un sérotype bien défini et sélectionné: le Litat 1.3, qui permet d'obtenir une réactivité optimale dans les différents foyers de THA. Le test ne nécessite qu'une goutte de sang, et en présence d'anticorps spécifiques, les parasites forment des agglutinats macroscopiques colorés et visibles à l'œil nu. Néanmoins, le test CATT effectué sur sang total (CATT/sg) recommandé par l'OMS (OMS 1998) pour le dépistage de masse présente, comme tous les tests sérologiques, des inconvénients. Des études ont montré qu'il manquait de sensibilité et de spécificité: manque de sensibilité dans le cas d'infections précoces (les anticorps recherchés ne circulent pas encore dans le sang) ou d'infections ne produisant pas les anticorps (Dukes *et al.*, 1992); manque de spécificité souvent attribué à des réactions croisées avec d'autres trypanosomes ou d'autres parasites humains (Noireau *et al.*, 1986), à la persistance d'anticorps durant plusieurs mois, voire plusieurs années après traitement (Diallo *et al.*, 1996). Afin d'augmenter la spécificité du test, un CATT sur dilutions successives de plasma (CATT/pl) est effectué sur tous les individus positifs au CATT/sg (voir détails dans matériels et méthodes). Le seuil de dilution retenue pour dire qu'un CATT/pl est positif c'est à dire que les examens parasitologiques doivent être effectués, varie selon les Programmes Nationaux de lutte. Par exemple, il est classiquement de 1/4 en Côte d'Ivoire et de 1/8 en Guinée. Cependant ce seuil est toujours très discuté.

De nouvelles techniques ont été développées ces dernières années pour améliorer le diagnostic sérologique, comme le Latex/*T. b. gambiense* (Büscher *et al.*, 1991), mais les résultats de l'évaluation (Penchenier *et al.*, 2003) montrent que les mêmes problèmes demeurent. Actuellement, des résultats prometteurs ont été obtenus par une méthodes de

détection d'anticorps (par ELISA) dans la salive des patients, qui présente en plus l'avantage d'un prélèvement non invasif (Lejon *et al.*, 2006), mais cette technique est encore en cours d'évaluation.

Quoiqu'il en soit, en cas de positivité de l'un de ces tests, le parasite devra être mis en évidence par une méthode directe pour décider du traitement (OMS, 1998).

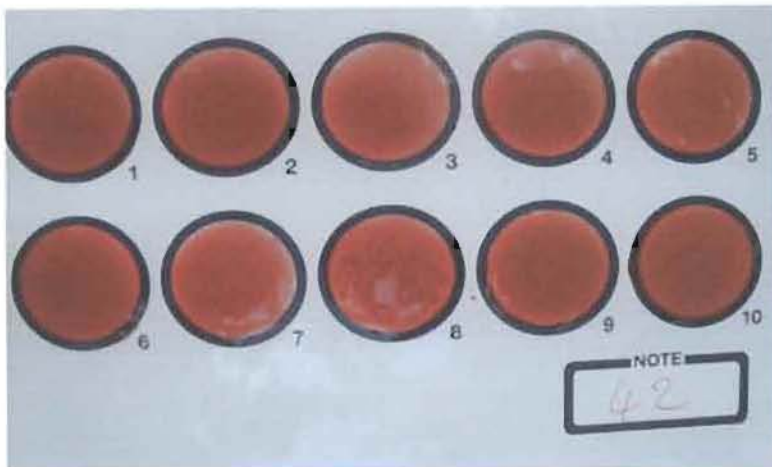


Figure 9 : Illustration du CATT effectué sur sang total (CATT/sg)

Sur cette photographie, le cercle 8 montre une agglutination qui signe un test CATT/sg positif

II. 4. 2. Examens parasitologiques

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

les meilleurs résultats (Lumsden *et al.*, 1979; Dukes *et al.*, 1984; Büscher *et al.*, 2009) au laboratoire comme sur le terrain (sensibilité = 100 trypanosomes/ml). Elle a été mise au point par Lanham & Godfrey (1970), miniaturisée par Lumsden *et al.* (1977) et adaptée au terrain par Lumsden *et al.* (1979) et consiste à séparer les trypanosomes des éléments figurés du sang sur DEAE cellulose (Figure 10). Les parasites sont visualisés au microscope avec un objectif à grande focale. La mAECT se fait classiquement à partir de sang total. Les résultats récents obtenus lors d'une étude à laquelle j'ai participé montrent que l'utilisation du buffy coat au lieu du sang total permet d'augmenter la sensibilité du test (Camara *et al.*, sous presse).

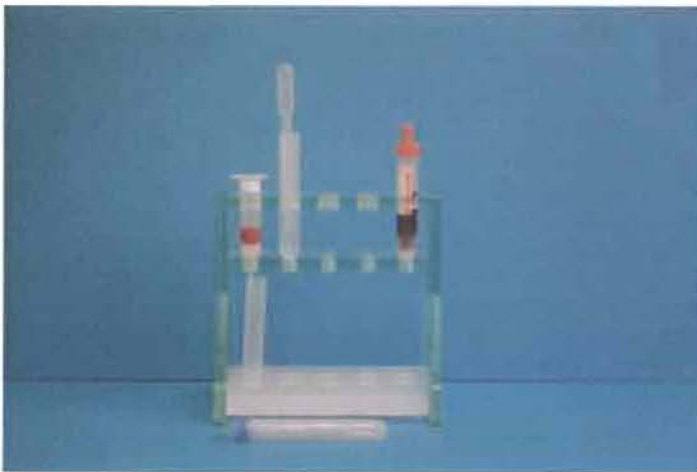


Figure 10 : Illustration de la mAECT

II.5 Le diagnostic de phase et le traitement

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

Le seuil de la cytorachie défini par l'OMS est actuellement controversé car la

présence de 5 cellules/ml de LCR ne traduit pas forcément la présence du parasite dans le SNC. Plusieurs auteurs proposent de passer ce seuil à 20 cellules/ml (voir Chappuis *et al.* 2005). Ainsi en Guinée, le programme national a défini 3 phases : la première phase (absence de trypanosome et cytorachie ≤ 5), la seconde phase précoce (absence de trypanosome et cytorachie comprise entre 6 et 20), et la seconde phase avancée (présence du parasite ou cytorachie > 20). La seconde phase précoce est alors traitée de la même façon que la première phase (voir ci-dessous).

L'ensemble des méthodes de traitement actuelle de la THA sont détaillées dans une récente revue (Fèvre *et al.*, 2006). Classiquement, un malade en première phase ou en seconde phase précoce sera traité à la pentamidine dans le cas d'une infection à *T. b. gambiense*. Un malade en seconde phase avancée sera généralement traité au mélarsoprol ou à l'éflornithine. Les thérapeutiques utilisées pour les malades en première période sont considérés peu toxiques et ne provoquent quasiment pas d'effets secondaires. En revanche, le mélarsoprol, un dérivé arsenical hautement toxique, est responsable d'environ 10% d'encéphalopathies réactives, dont la moitié sont mortelles. La fréquence et la gravité de ces effets secondaires soulignent l'importance des tests biologiques permettant le diagnostic précis de phase de la THA. L'éflornithine beaucoup mieux tolérée par les patients est malheureusement un traitement onéreux encore trop peu utilisé.

DEUXIEME PARTIE: PROBLEMATIQUE

I. Nécessité d'améliorer le diagnostique de la THA

Nous avons vu que le diagnostic est d'une importance cruciale (i) au niveau individuel, car il permet d'assigner un statut de «malade» pour la personne examinée, et (ii) au niveau de la population, car les stratégies de lutte contre cette maladie touchant des populations rurales dans des régions souvent difficiles d'accès reposent en grande partie sur la détection précoce et le traitement des malades. Cependant, il est reproché aux techniques actuellement utilisées de manquer souvent de sensibilité et/ou de spécificité :

- manque de sensibilité des examens parasitologiques du fait de parasitémies faibles et fluctuantes (Truc *et al.*, 1998), manque de sensibilité des méthodes indirectes dans le cas d'infections précoces (les anticorps ou antigènes recherchés ne circulent pas encore dans le sang, Noireau *et al.*, 1987) ou d'infections ne générant pas les anticorps ou antigènes recherchés (Dukes *et al.*, 1992) ;
- manque de spécificité des méthodes sérologiques souvent attribué d'une part à des réactions croisées avec d'autres trypanosomes (suite à une infection transitoire par exemple à *T. congolense*, Noireau *et al.*, 1986) ou d'autres parasites humains (Diallo *et al.*, 1996), et d'autre part à des persistances d'anticorps ou d'antigènes plusieurs mois, voire plusieurs années après traitement.

Ainsi, dans leur pratique quotidienne les équipes de lutte contre la THA sont en permanence confrontées à des situations bien plus complexes que la dichotomie malade/non malade. En effet, dans les foyers actifs de THA, trois types de sujets sont rencontrés : (1) des sujets sains (dont le test de diagnostic indirect est négatif) ; (2) des sujets malades (dont le test utilisé pour le diagnostic direct a montré des trypanosomes), et (3) des sujets porteurs d'anticorps (diagnostic indirect positif) chez qui le trypanosome n'a pas été mis en évidence lors du diagnostic direct (Ginoux & Frézil, 1981 ; Garcia *et al.*, 2000 ; Jamonneau *et al.*, 2000) que l'on nomme classiquement individus séropositifs. Ces sujets qui ne sont pas considérés comme malades, ne reçoivent aucun traitement. Il peut s'agir pour certains d'entre eux de fausses séropositivités en relation avec des trypanosomes animaux (*T. b. brucei*) ou d'autres parasitoses, mais également de sujets porteurs de parasites pathogènes pour l'homme à des niveaux extrêmement faibles, avec ou sans signe clinique,

pouvant jouer le rôle de réservoir de trypanosomes humains. Pour certains de ces sujets la séropositivité va décroître et s'annuler avec le temps, confirmant ainsi une réaction croisée (Simarro *et al.*, 1999 ; Garcia *et al.*, 2000). Pour d'autres, la recherche répétée de parasites durant quelques semaines va finir par s'avérer positive et permettre de porter le diagnostic de maladie du sommeil et d'initier un traitement. Enfin, il restera une catégorie de sujets qui maintiendront leur séropositivité dans le temps et ne révéleront aucune parasitémie. Ces individus sont le plus souvent laissés en place sans traitement.

Ce problème n'épargne pas les équipes mobiles du PNLTHA de la Guinée, pays le plus touché par la maladie en Afrique de l'Ouest et où des prospections médicales sont régulièrement menées depuis la fin des années 1990 (Camara *et al.*, 2005). Par exemple, dans les foyers du littoral, ces sujets séropositifs représentent 0,2 à 0,3% de la population totale visitée, et jusqu'à 1% dans certains villages. Une particularité des foyers guinéens est que la quasi-totalité des malades sont porteurs d'adénopathies cervicales et qu'ils sont dépistés à l'examen microscopique du suc ganglionnaire. Les mAECT effectuées à partir du sang de ces sujets montrent des parasitémies souvent faibles et sont même parfois négatives (Camara *et al.*, sous presse). Les sujets séropositifs sans confirmation parasitologique n'ont en général pas de ganglions, le dépistage au suc ganglionnaire est donc impossible, et la mAECT est négative. Afin de rendre la lutte plus efficace, les efforts de recherche se sont en partie concentrés sur l'amélioration des tests de dépistage.

II. Apport de l'outil moléculaire dans le diagnostic de la THA

Afin d'améliorer la sensibilité de ces méthodes parasitologiques, notamment pour détecter les faibles parasitémies souvent rencontrées chez les patients atteints de THA, des techniques basées sur la détection d'ADN de trypanosomes par PCR (Polymerase Chain Reaction ou amplification en chaîne par polymérase) ont été récemment développées et évaluées dans le domaine de la recherche (Jamonneau *et al.*, 2004; Chappuis *et al.*, 2005).

Quel que soit le protocole utilisé, et avec différents types d'amorces pour *T. brucei s.l.*, la PCR semble être généralement beaucoup plus sensible que les techniques parasitologiques (sensibilité proche de 100% et une limite de détection allant de 1 à 40 trypanosomes par ml de sang en conditions expérimentales). La mAECT, considérée

actuellement comme l'examen parasitologique le plus sensible, donne une limite de détection de 100 trypanosomes par ml de sang (OMS, 1998). Appliquée au LCR, la PCR s'est avérée plus sensible que la double centrifugation (DC) couramment utilisée pour révéler la présence de trypanosomes dans le LCR, et semble aussi permettre un diagnostic de rechute très précoce à la différence des techniques classiquement utilisées (Truc *et al.*, 1999).

Les amorces couramment utilisées (TBR1-2 par exemple) sont spécifiques de *T. brucei* ssp., ce qui permet d'éviter les fausses positivités dues à d'autres parasitoses (filarioses, paludisme) ainsi que celles dues à une présence transitoire d'autres trypanosomes (*T. congolense*). Ces avantages font de la PCR un test spécifique. A la différence des autres techniques indirectes qui peuvent rester positives pendant plusieurs années après traitement (persistance des anticorps ou des antigènes dans le sang), plusieurs observations tendent à indiquer que l'observation d'une PCR positive représente réellement une infection active : la persistance de l'ADN de trypanosomes morts dans le sang n'excéderait pas 1 à 2 jours (Chappuis *et al.*, 2005).

En tant que membre du PNLTHA Guinée, l'objectif principal de cette étude était de voir dans quelles mesures la PCR pouvait apporter des éléments de réponses à la question : que représentent les sujets séropositifs sans confirmation parasitologique et comment doivent-ils être pris en compte dans les stratégies de lutte en Guinée ?

TROISIEME PARTIE: MATERIELS ET METHODES

I. Zone d'étude : le foyer de Dubréka (Guinée)

La République de Guinée est située en Afrique de l'Ouest sur la façade Atlantique (figure 11). Le pays s'organise en quatre grandes Régions Naturelles. Il s'agit de la Haute-Guinée savanicole, de la Moyenne Guinée abritant le Fouta Djalon montagneux, de la Guinée Forestière et enfin de la Guinée Maritime. La Région Naturelle de Guinée Maritime occupe une bande d'environ 150 km de largeur entre les contreforts du plateau du Fouta-Djalou à l'Est et l'océan Atlantique à l'Ouest. Cette région se caractérise par un climat très contrasté, puisque malgré l'existence d'une saison sèche qui s'étend sur 5 mois (décembre à avril), la pluviométrie est supérieure à 2000 mm/an allant jusqu'à 4 500 mm/an dans l'impluvium de Coyah. En 2000, la Guinée Maritime regroupait 36% de la population du pays, soit 2,5 millions d'habitants parmi lesquels 1,4 millions de ruraux (Rossi *et al.*, 2000). La Guinée Maritime connaît une évolution démographique spectaculaire (croissance d'environ 3% an), du fait de l'accroissement naturel de la population régionale et d'une migration massive en provenance de l'intérieur du pays. Ces dernières années, cette région littorale s'est fortement urbanisée, notamment à travers l'extension de la capitale Conakry, mais aussi du fait du développement de grandes villes industrielles (Kamsar, Fria) ou commerciales (Kindia) qui attirent des populations de l'ensemble du pays. L'attraction urbaine est également sensible dans certains centres secondaires tels que Forécariah et Dubréka, qui profitent du commerce suscité par la monétarisation du marché de poissons, de sel et de bois (Rossi *et al.*, 2000).



Figure 11 : Carte de la Guinée et localisation de la zone d'étude (Dubréka)

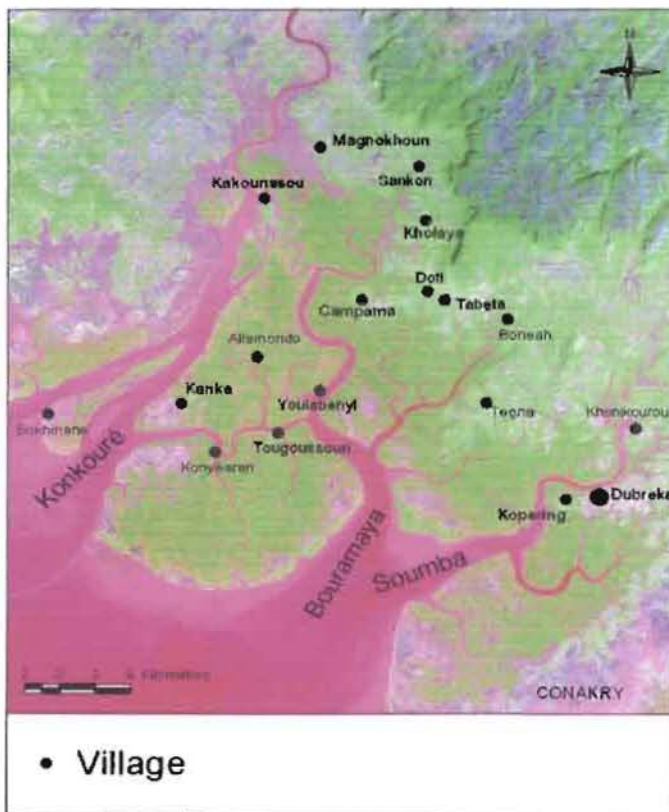


Figure 12 : Image satellite de la zone de Dubréka (cartographie, Fabrice Courtin)

La préfecture de Dubreka située à 50 km au Nord-Ouest de la capitale Conakry (figures 11 et 12), constitue notre zone d'étude. Elle se situe dans la Baie de Sangareya, zone de mangrove située entre terre et mer qui est soumise à l'influence continentale des fleuves Konkouré, Bouramaya et Soumba ainsi qu'à l'influence maritime orchestrée par le jeu des marées (figure 12) et qui se caractérise par un réseau de chenaux qui méandres entre une végétation halophile, les palétuviers. C'est ce milieu riche, varié, complexe mais aussi parfois hostile que l'homme exploite depuis des centaines d'années. Elle est bordée à l'Est par les préfectures de Coyah et de Kindia, à l'Ouest par la préfecture de Boffa, au Nord par celle de Fria et au Sud par l'océan Atlantique. Le peuplement est dominé par les Soussou et constitué par une minorité de Peul. Il existe également quelques peuplements Ballantes et Temne respectivement originaires de Guinée-Bissau et de Sierra Leone.

Le foyer de Dubréka représente encore aujourd'hui, le foyer le plus actif de Guinée. Plusieurs prospections médicale menée de 1997 à 2008 par le PNLTHA de Guinée en collaboration avec l'équipe IRD/CIRDES de Bobo-Dioulasso et IPR de Bouaké ont permis de dépister des centaines de malades et identifier des centaines de séropositifs. Son espace végétatif favorise la transmission et la diffusion de la maladie dans toute la zone de mangrove, notamment au niveau des estuaires et des chaînes de mangroves où les populations pratiquent de nombreuses activités de subsistance (riziculture, extraction de sel, pêche, coupe du bois....) qui impliquent des déplacements quotidiens ou saisonniers des populations.

II. Prospection médicale

Lors de notre étude, nous avons considéré l'ensemble de la préfecture de Dubréka (figure 12). Une cartographie et un recensement exhaustif de la population de la zone (îles et continent) à été effectué famille par famille. Un numéro individuel de recensement a été attribué à toute personne recensée. Ces étapes permettent d'avoir une idée précise du nombre de personnes qui peuplent la zone et de leur répartition, d'identifier des centres de regroupement (centres de prospection) et de définir le programme de prospection (tel jour dans tel village). Elles permettent aussi lors de la prospection médicale d'avoir une idée très précise sur la part et la localisation de la population présente et de rechercher et sensibiliser

les absents pour les convaincre d'accepter le dépistage et (ii) de connaître à l'issue de la prospection la part de la population testée et sa distribution. Lors de ces étapes préliminaires à la prospection médicale active, la population est aussi sensibilisée afin de la convaincre de l'intérêt du dépistage de la THA et qu'il concerne tous les individus vivants dans la zone. Les étapes de sensibilisation sont extrêmement importantes auprès de ces populations qui vivent dans des zones rurales parfois très reculées.

Le schéma de prospection médicale utilisé est celui retenu par le PNLTHA Guinée, inspiré de celui préconisé par l'OMS. L'ensemble de la population présente le jour de la prospection est recensée et du sang (70 µl) est prélevé par ponction digitale dans un tube hématocrite hépariné pour chaque sujet, dans le but de réaliser le test sérologique de screening de masse : le CATT sur sang total (CATT/sg) (voir Généralités II.4.1). Les individus positifs à ce test (agglutination visible, signe d'une réaction antigènes / anticorps recherchés) sont prélevés au pli du coude (5 ml de sang sur tube Vacutainer® hépariné) pour effectuer un CATT sur dilutions successives de plasma (CATT/pl) plus spécifique que le CATT/sg. On note alors la dernière dilution qui donne un résultat positif (présence d'une agglutination). Une illustration est donnée sur la figure 13. Classiquement en Guinée, les tests parasitologiques: mini Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT, Lumsden et *al.*, 1979) et la recherche microscopique des trypanosomes dans le suc ganglionnaire (étalé à l'état frais entre lame et lamelle) prélevé en cas de présence d'adénopathies cervicales, sont effectués pour tous les sujets CATT/pl $\geq 1/8$. Dans notre étude, étant données les discussions sur ce seuil de positivité, nous avons décidé de passer ce seuil à $1/4$. Les sujets positifs aux tests parasitologiques sont confirmés malades (T+), les individus positifs au CATT/pl mais négatifs en parasitologie sont qualifiés de séropositifs (S+). Le diagnostic de phase est alors effectué pour le choix du traitement à administrer.

Deux types de sujets ont été inclus dans l'étude :

- Malades (T+): sujets ayant un CATT/sg positif, un CATT/pl $\geq 1/4$ et un test parasitologique positif
- Séropositifs (S+): sujets ayant un CATT/sg positif, un CATT/pl $\geq 1/4$ sans confirmation parasitologique

Pour tous les sujets T+ et S+, un questionnaire épidémiologique et clinique a été rempli (voir annexe 1). Ces sujets ont été géo référencés.

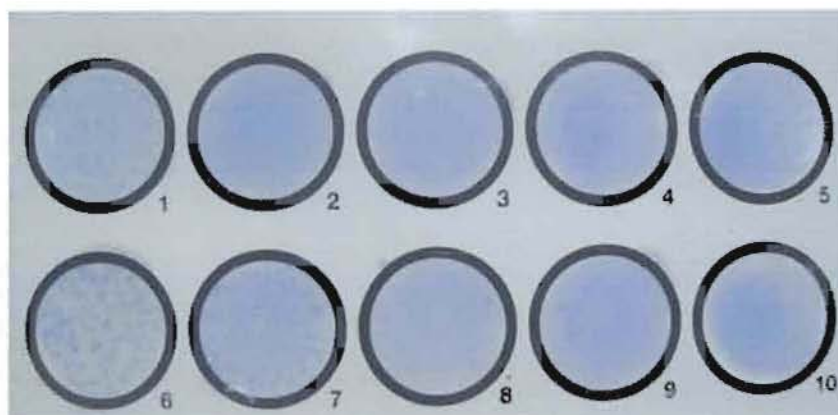


Figure 13 : Illustration du CATT effectué sur plasma (CATT/pl)

Les cercles 1 à 5 correspondent au CATT/pl effectué sur dilutions successives du plasma (1 = dilution 1/2, 2 = dilution 1/4 ; 3 = 1/8, 4 = 1/16 et 5 = 1/32) d'un sujet précédemment positif au CATT/sg (suspect sérologique A). Les cercles 6 à 10 concernent un deuxième suspect sérologique B. On voit que pour le sujet A, la dernière dilution montrant une agglutination est la dilution 1/4 (cercle 2), le résultat est noté CATT/pl = 1/4. Pour le B, CATT/pl = 1/8.

III. Echantillonnage

Pour tous les sujets T+ et S+ inclus dans notre étude, 1 ml de sang total a été échantillonné dans un tube de Nunc 1,5 ml. Tous les échantillons ont été conservés à -20°C sur le terrain puis à -80°C au CIRDES avant utilisation au laboratoire pour la PCR.

IV. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN s'est faite à partir des échantillons de sang prélevés sur le terrain. Nous avons utilisé un kit d'extraction commercial : le kit DNeasy® (DNeasy Tissue kit, description du protocole en annexe 2). Le kit DNeasy® est une technique permettant d'obtenir de l'ADN purifié (étapes de déprotéinisation avec la protéinase K, et purification à l'aide de différents tampons). En résumé, on distingue quatre grandes étapes:

L'étape I : lyse des cellules et élimination d'une grande partie des composés cellulaires. Il reste alors les acides nucléiques (dont l'ADN) et d'autres constituants protéiques ou ioniques qu'il va falloir éliminer pour une purification optimale de l'ADN.

L'étape II : On utilise une colonne pour séparer les résidus protéiques obtenus par action de la protéinase K, et l'ADN. Les premiers sont entraînés à travers la colonne par l'éthanol et se retrouvent dans le collecteur alors que l'ADN est fixé par la colonne grâce à ses propriétés ioniques.

L'étape III : Le passage des tampons AW1 et AW2 dans la colonne permettent d'éliminer les derniers contaminants et inhibiteurs d'enzymes (pour optimiser le fonctionnement de la Taq polymérase dans les étapes de PCR, voir ci-dessous).

L'étape IV : l'ADN maintenant purifié est alors récupéré par le passage d'une solution AE sur la colonne, dans un volume final de 400 µl prêt pour la PCR.

V. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Principe de la PCR

Le principe de la méthode PCR consiste à amplifier sélectivement à l'aide d'un couple d'amorces une séquence particulière d'ADN par action répétée d'une ADN Polymérase (Taq polymérase). Le fragment d'ADN à amplifier est compris entre 2 séquences qui doivent être connues pour définir les amorces. Elles vont se fixer à l'ADN sur les séquences qui leur sont complémentaires et permettre ainsi le début de la polymérisation. Trois étapes thermiques, caractérisées par 3 températures différentes sont nécessaires à l'amplification (voir figure 14) :

- Une étape de dénaturation à 94°C, qui permet de séparer les 2 brins d'ADN.
- Une étape d'hybridation des amorces sur les séquences complémentaires de l'ADN dénaturé, généralement à 50-55°C, cette température dépend de la taille de l'amorce utilisée et de sa composition en base (55°C pour TBR1/TBR2). Les amorces oligonucléotidiques sont chacune complémentaire d'un des 2 brins d'ADN et encadrent la séquence à amplifier.
- Une étape de polymérisation ou d'extension à 72°C durant laquelle une polymérase thermostable, la Taq polymérase, catalyse l'extension des amorces spécifiques par une séquence exactement complémentaire des brins où elles se sont fixées.

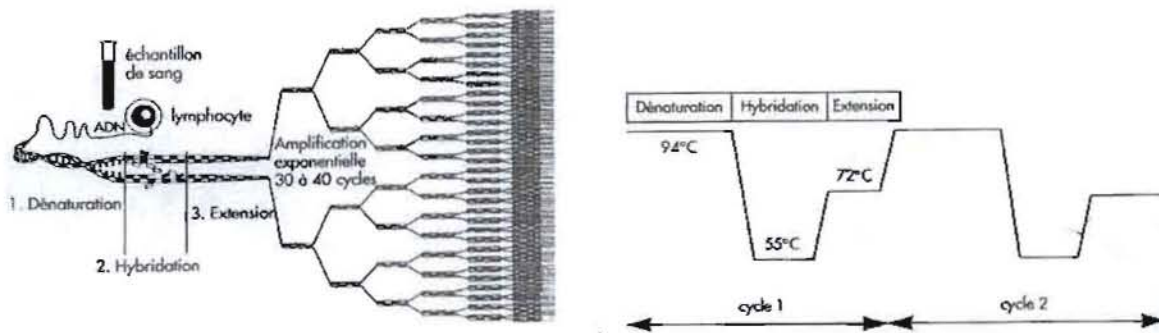


Figure 14 : Schéma général de la PCR et les 3 étapes thermiques du cycle d'amplification

Dans cette étude, la PCR a été réalisée selon la méthode décrite par Penchenier *et al.*, (1996 ; 2000). Les amorces utilisées, TBR1-TBR2 sont spécifiques de *T.brucei s.l.* (Moser *et al.*, 1989). Leur séquence est : 5'-GAATATTAACAATGCGCAG-3' pour TBR1 et 5'-CCATTATTAGCTTTGTTGC-3' pour TBR2

Composition du « mix » pour la PCR

La réaction PCR nécessite les réactifs suivants :

- Les amorces qui dans notre cas sont TBR1 et TBR2 spécifiques de *Trypanosoma brucei s.l.*
- Les dNTPs, ce sont les bases composant l'ADN : dATP, dTTP, dGTP, dCTP. Ils sont nécessaires à la formation du brin complémentaire.
- La Taq polymérase, c'est une enzyme issue de la bactérie *Thermus aquaticus* qui entre en jeu durant la phase d'élongation.
- De l'eau stérile
- Du tampon 10 X stérile auquel a été ajouté du Mg²⁺ nécessaire à la réaction

Les PCR sont réalisées dans un volume final de 50 µl, soit 10 µl d'échantillons d'ADN et 40 µl de mélange de réactifs (mix). Sous hotte stérile (sans ADN), il faut préparer le mix pour la PCR.

Le mix se réalise selon le plan suivant :

	Pour 1 éch.	Pour n éch.
TBR1 (20pM/ μ l) :	1 μ l	n X 1 μ l
TBR2 (20pM/ μ l) :	1 μ l	n X 1 μ l
dNTP (10mM) :	1 μ l	n X 1 μ l
Tampon 10X:	5 μ l	n X 5 μ l
Taq Polymerase (5U/ μ l):	0,1 μ l	n X 0,1 μ l
H ₂ O (qsp 20 μ l) :	31,9 μ l	n X 31,9 μ l
Total	40 μ l	n X 40 μ l

Sous la hotte, le mix est réparti dans le nombre de tubes eppendorf correspondant au nombre d'échantillons à tester. On y prépare aussi le témoin négatif : l'ADN est remplacé par de l'eau stérile (10 μ l). Ce témoin nous permettra de vérifier que notre expérience n'a pas été contaminée par de l'ADN étranger.

Amplification de l'ADN

Hors de la hotte 10 μ l de l'ADN des échantillons à tester sont ajoutés aux tubes contenant le mix. Dans le témoin positif on introduit 10 μ l d'ADN témoin de *T. brucei*. Ce témoin permet de voir si l'amplification s'est effectuée de manière correcte. S'il n'apparaît pas sur le gel, je saurais qu'un problème technique est survenu. Les conditions d'amplification pour TBR1/TBR2 sont les suivantes : une première étape à 92°C pendant 5 minutes permet une dénaturation totale de l'ADN, on effectue alors 40 cycles avec une étape de dénaturation (92°C, 30 s), une étape d'hybridation (55°C, 30 s) et une étape d'extension (72°C, 1 min). L'amplification se termine par une étape d'extension finale à 72°C pendant 10 minutes. L'amplification a été faite grâce à un thermocycleur PTC-100 programmable thermal controller qu'il faut programmer en fonction des amorces utilisées.

Révélation par électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse est une technique biochimique qui permet une séparation des molécules en se basant sur une de leur propriété chimique : leur charge électrique. Le principe consiste à déposer les molécules à séparer sur un gel aqueux (gel d'agarose dans notre cas) qui est placé dans un champ électrique créé par une tension continue. Le gel baigne dans un liquide conducteur qui permet au courant de passer. Les molécules vont alors se déplacer vers le pôle de signe opposé à leur charge, à une vitesse proportionnelle à leur taille (charge) et à la taille des pores du gel. A l'échantillon est ajoutée une molécule colorée choisie en fonction de ses propriétés pour être celle qui migrera le plus rapidement dans le mélange, et qui déterminera le temps de migration.

Dans le cadre de notre étude, pour séparer et identifier les fragments d'ADN amplifiés, une électrophorèse en gel d'agarose 2 % a été réalisée. Les fragments d'ADN sont détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium (BET), agent intercalant de l'ADN. Un marqueur moléculaire de taille (Eurogentec) est déposé sur chaque gel. La migration a été effectuée dans des cuves à électrophorèse dans lesquelles on place le gel une fois ce dernier solidifié. Elles ont été préalablement remplies de tampon TBE à 0,5X qui va permettre au courant de passer et donc à l'ADN de migrer. A la fin de la migration on peut ainsi visualiser en lumière UV des quantités très faibles d'ADN. Un système de capture de gel relié à un ordinateur permet de prendre des photos du gel et de les enregistrer. En cas de présence d'une bande à 177 pb, taille de la séquence spécifique recherchée la PCR est considérée positive.

VI. Aspects éthiques

L'échantillonnage de cette étude a été effectué à partir du tube de sang prélevé pour les examens sérologiques et parasitologiques selon les procédures du PNLTHA. Aucun prélèvement supplémentaire n'a été nécessaire. Les prélèvements ont été effectués par le personnel qualifié à cet effet. Tous les sujets inclus ont été informés dans leur dialecte des objectifs de l'étude et ont donné leur consentement pour y participer. Notre protocole a obtenu l'accord des comités d'éthique de l'OMS et de l'IRD.

QUATRIEME PARTIE : RESULTATS

I. Résultats de la prospection médicale

Les résultats du recensement par village et hameaux sont donnés en annexe 3. Au total, 63 localités ont été cartographiées pour 8 752 personnes recensées, dont 3 436 sur les îles et 5 316 sur le continent. Au total, 6171 ont été vues pendant la prospection médicale soit 70,5 % de taux de présentation. En tout, 39 malades ont été dépistés par les méthodes parasitologiques (prévalence = 0,63%) et 39 (0,63%) sujets séropositifs sans confirmation parasitologique ont été identifiés. Les résultats de la cartographie et du recensement ainsi que la répartition des malades et des séropositifs sont illustrés sur les figures 15 et 16.

On remarque une quasi-absence de malades et de séropositifs dans les localités situées face à l'océan. Cette espace, particulièrement salin, est défavorable à la présence des glossines, et la majorité de la population de ces villages pratiquent la pêche en mer. Les populations rassemblées dans ces villages ont donc peu de contact avec la mangrove. La plupart des malades et séropositifs se répartissent de façon assez homogène dans l'espace compris entre l'interface îles/continent au sud et les montagnes au nord. Les populations exploitant ces espaces sont particulièrement mobiles de par leurs activités quotidiennes (pêche, approvisionnement en eau, riziculture de bas fond, exploitation du bois), et les échanges journaliers et saisonniers entre les îles et le continent sont très importants. En fait, de manière générale, les populations d'un village sur le continent possèdent des rizières et/ou des zones d'extraction de sel en mangrove. C'est probablement lors des trajets entre le continent et les îles, le long des chenaux de mangroves (biotope très favorable à *Glossina palpalis gambiensis*) que les sujets se font contaminer. La séroprévalence et la prévalence observée sur le continent (1,36 et 0,71% respectivement) sont légèrement supérieures à celles observées sur les îles (1,11 et 0,53% respectivement). Cette différence peut-être attribuée aux populations insulaires du front de mer très peu touchées par la maladie. Si la distribution des malades est assez homogène, plusieurs localités ont montré des prévalences supérieures à 1%, jusqu'à 5,5% pour les villages de Campama sur le continent, tandis que les villages les plus touchés sur les îles sont ceux de Kanka et Kakounssou.

II. Résultats des tests diagnostiques effectués sur le terrain

Les résultats bruts des tests effectués sur le terrain sur les 39 T+ et 39 S+ sont donnés en annexe 4. La figure 17 montre que la proportion de malades positifs au CATT/pl 1/16 et 1/32 est supérieure à celle des séropositifs. Le contraire est observé pour le CATT/pl 1/4 et le CATT/pl 1/8. On remarque cependant que le CATT/pl 1/4 est positif pour 3 malades sur 39 (7,7%).

Les résultats des tests parasitologiques qui ont permis de dépister les 39 T+ sont donnés dans la figure 18. Au total, 29 sujets ont été positifs aux deux tests. Ces résultats confirment une tendance déjà plusieurs fois observée en Guinée avec 84,6% des sujets positifs à l'examen du suc ganglionnaire. Seulement 4 malades ont été négatifs à la mAECT. Trente quatre séropositifs (87,2%) ne présentaient pas d'adénopathies cervicales. La recherche des trypanosomes dans le suc ganglionnaire ponctionné sur les 5 autres sujets s'est avérée négative.

Les 39 malades dépistés ont été convoqués au centre de traitement de Dubréka. Malheureusement, 4 malades ont refusé le traitement malgré nos explications. Ainsi, le diagnostic de phase n'a été effectué que sur 35 malades. La simple centrifugation du LCR (SC) à été positive pour 9 sujets (25,7%). Les résultats du classement par phase en fonction de la cytorachie sont décrits sur la figure 19. Sur les 35 malades, seulement 2 (5,7%) ont été classés en phase 1 (PI, de 1 à 5 cellules/ μ l et absence de trypanosome dans le LCR), 20 (57,1%) en phase 2 précoce (PIIP, de 6 à 20 cellules / μ l), et 13 (37,1%) en phase 2 avancée (PIIA, plus de 21 cellules/ μ l). Les malades en PI et PIIP ont été traités à la pentamidine et ceux en PIIA au melarsoprol selon les recommandations du PNLTHA. Malheureusement, nous avons enregistré 2 cas d'encéphalopathies réactives mortelles. Les autres malades ont été traités efficacement, ils sont en cours de suivi post-thérapeutique afin de détecter d'éventuels cas de rechute.

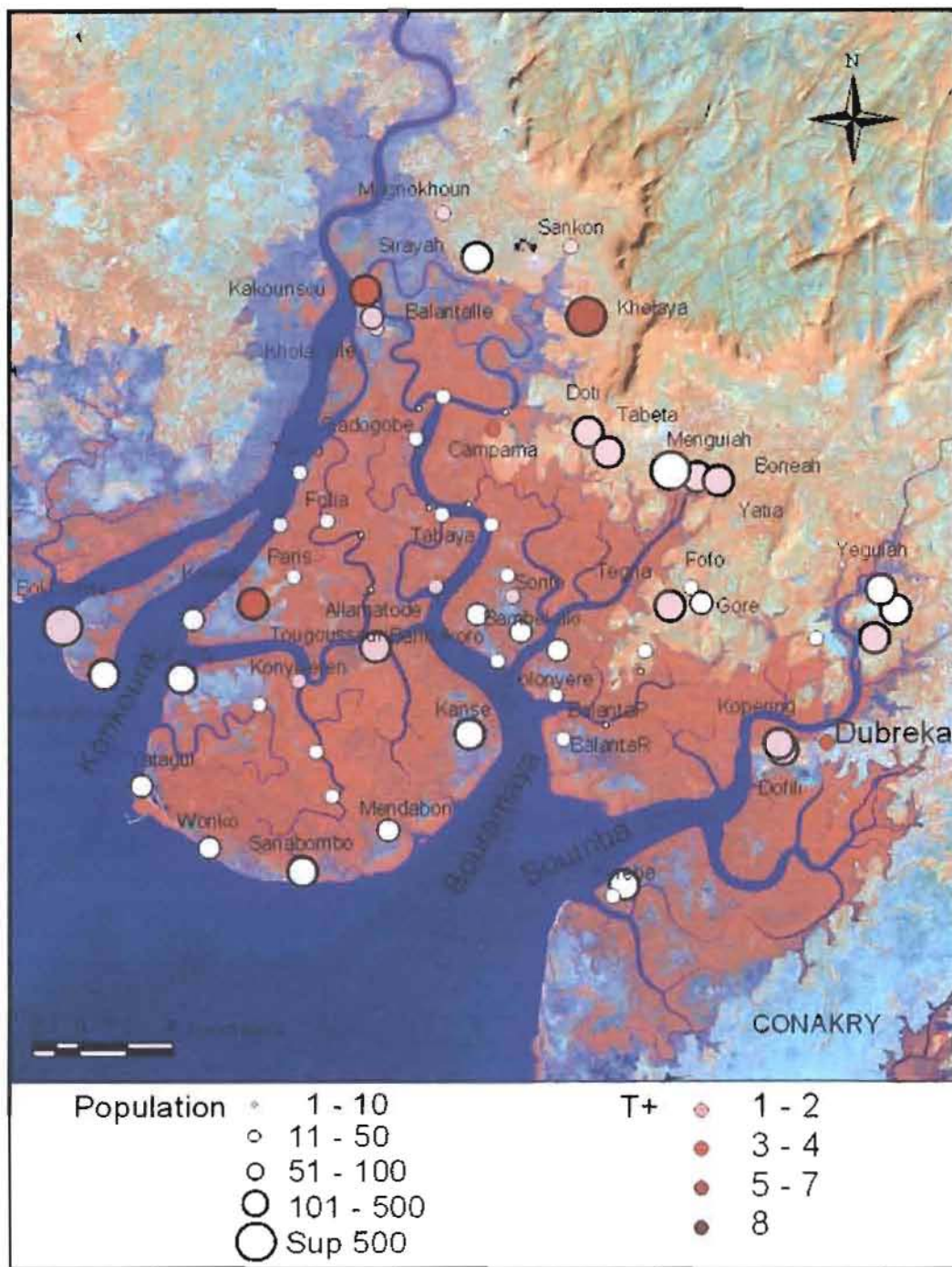


Figure 15 : Représentation spatiale des localités et populations recensées et répartition des malades (T+) dépistés au cours de la prospection médicale (cartographie, Fabrice Courtin)

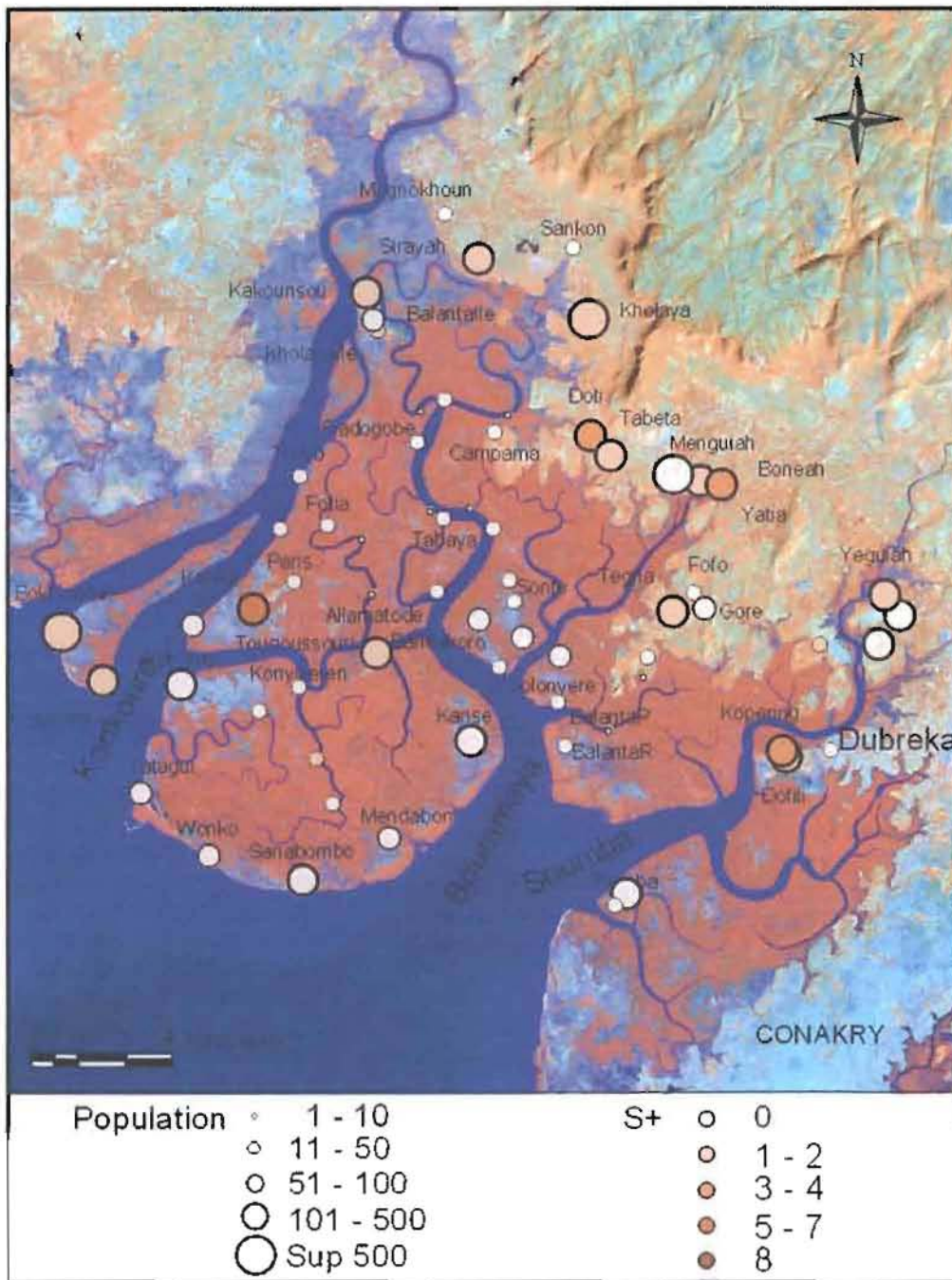


Figure 16 : Représentation spatiale des localités et populations recensées et répartition des séropositifs (S+) identifiés au cours de la prospection médicale (cartographie, Fabrice Courtin)

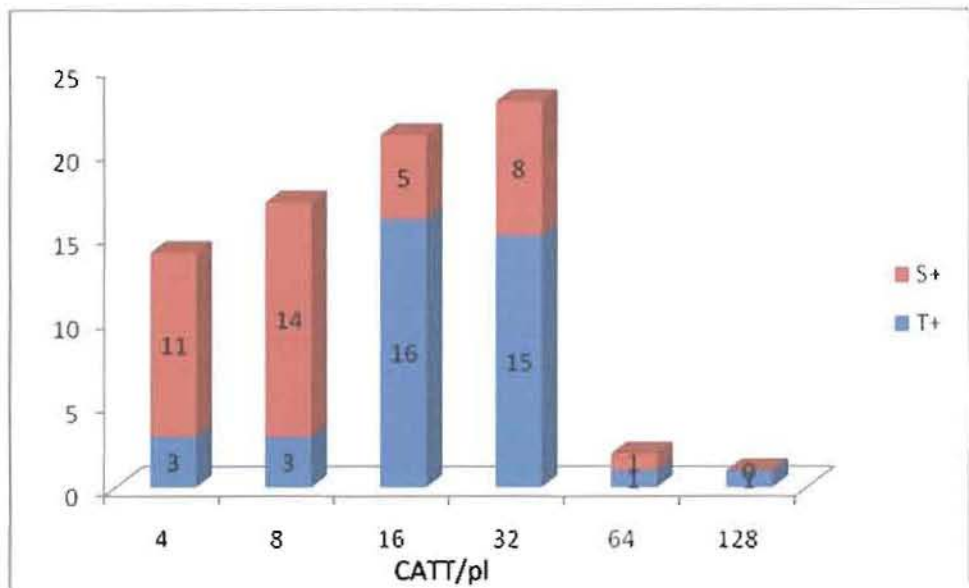


Figure 17 : Résultats du CATT/pl pour les 39 T+ et 39 S+ identifiés lors de la prospection

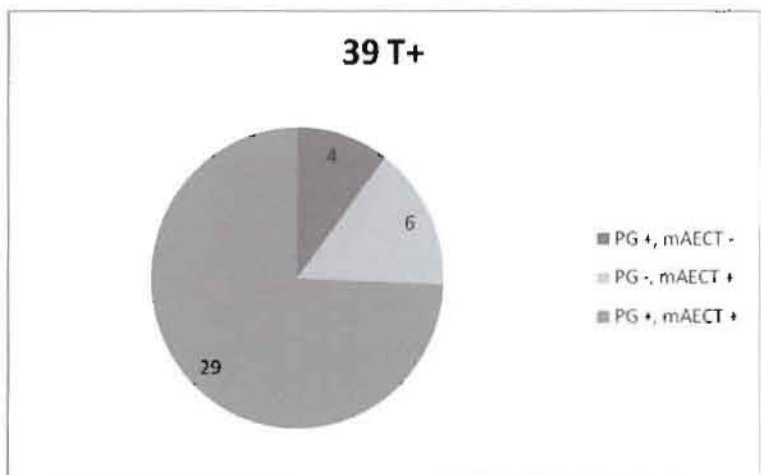


Figure 18 : Résultats des tests parasitologiques sur les 39 T+

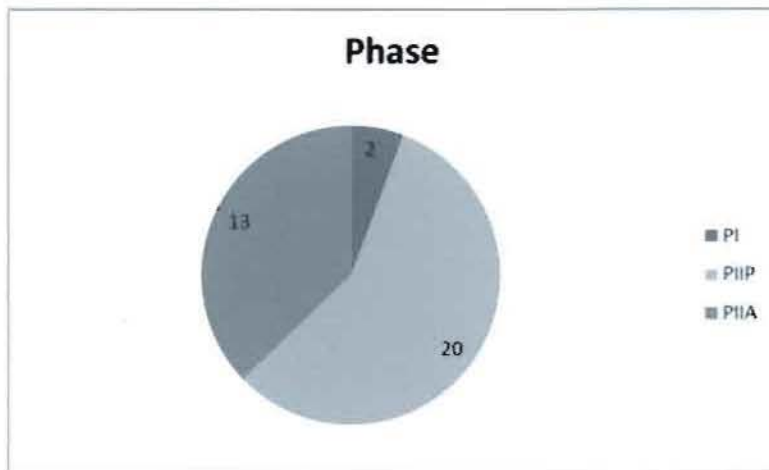


Figure 19 : Résultats du diagnostic de phase sur les 35 sujets qui ont été traités

III. Résultats de la PCR

Une illustration d'un gel PCR est donnée en figure 20. Les résultats bruts des PCR effectués au laboratoire sur les 39 T+ et 39 S+ sont donnés en annexe 4. Ces résultats illustrés sur la figure 21 confirment la très bonne sensibilité de la PCR qui est positive sur 37 des 39 malades (94,9%). Les 2 malades négatifs en PCR font partie des 4 malades négatifs à la mAECT. Parmi les S+, on observe un résultat PCR+ pour 13/39 sujets (33,3%). Curieusement, comparés aux résultats du CATT/pl (figure 22) on remarque que les résultats PCR+ concernant principalement les S+ positifs au CATT/pl $\frac{1}{4}$ (45,4%) et au CATT/pl $\frac{1}{8}$ (42,9%). Seulement 2 PCR sont positives sur les 14 sujets (14,3%) ayant un CATT/PI $\geq \frac{1}{16}$.

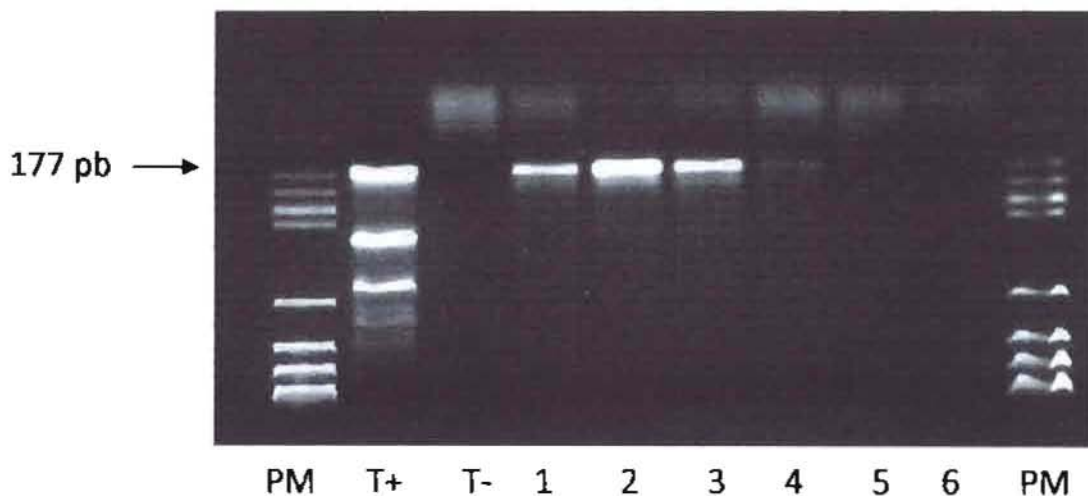


Figure 20 : Révélation d'une PCR sur gel d'agarose

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

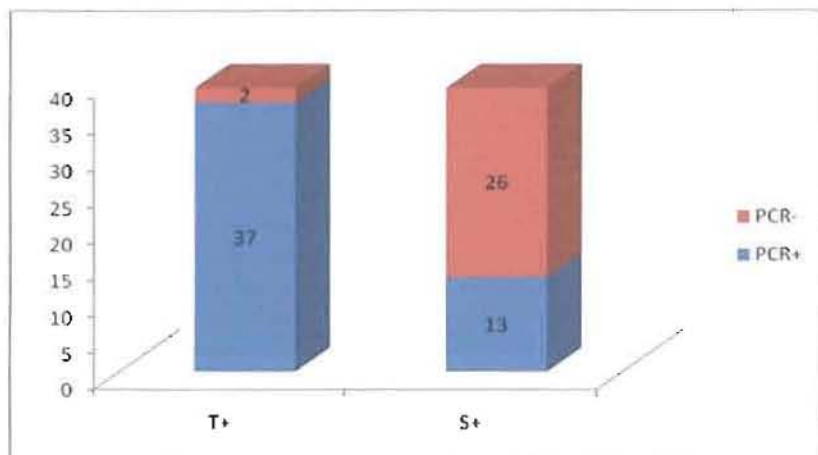


Figure 21 : Résultats PCR sur les 39 T+ et 39 S+

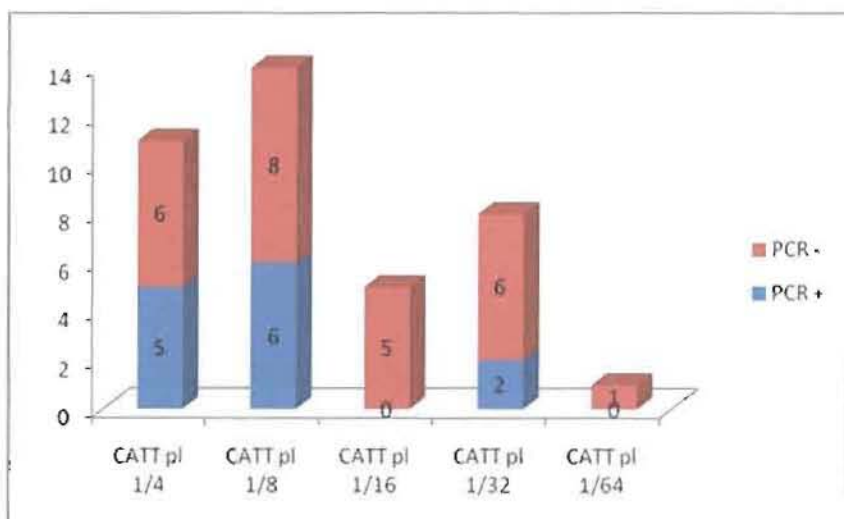


Figure 22 : Résultats PCR et CATT/pl sur les sujets S+

CINQUIEME PARTIE : DISCUSSION

A l'issue de nos recherches, nous avons analysées nos données en fonctions des objectifs que nous nous somme fixés, à savoir: (i) évaluer comment la PCR pourrait apporter une solution dans la prise en charge des sujets séropositifs et (ii) proposer des solutions au programme de lutte pour le contrôle de cette endémie sommeilleuse dans les foyers de Guinée principalement sur le littoral Guinéen.

La prospection médicale menée dans le cadre de cette étude a permis de confirmer la présence de la THA dans le foyer de Dubréka. En comparant nos résultats à ceux donnés dans Camara *et al.* (2005), la prévalence semble rester stable dans la zone de Dubréka (0,75% à 0,63%). Ces résultats montrent que la transmission du parasite est toujours active malgré les prospections médicales menées ces dernières années. La distribution spatiale des cas de THA observée lors de cette mission tend à montrer que la plupart les localités de la zone de mangrove sont concernées par la maladie. Les prochaines activités de dépistage doivent tenir compte de ce résultat et mettre en œuvre la logistique nécessaire pour prospector ces zones difficiles d'accès (certaines en pirogue uniquement).

Le recensement exhaustif de la population nous a permis d'avoir une idée précise de la proportion de la population visitée lors de la prospection médicale. Ce taux de 70,5% pourtant acceptable grâce à la sensibilisation menée pendant le recensement montre que presque 1/3 de la population n'a pas été visitée et que 16 malades sont restés dans la zone après notre passage si on tient compte de la prévalence obtenue sur la population examinée (0,63%). Le recensement avant prospection est donc d'une importance cruciale car il permet d'évaluer l'efficacité de la prospection. Si celle-ci a permis de dépister 39 malades et d'en traiter 35, il en reste 16 (parmi la population non vue) et 4 (malades refusant le traitement) dans la zone malgré les efforts importants de sensibilisation (pendant le recensement et juste avant la prospection). Ces résultats montrent les limites de cette méthode du dépistage actif pour venir à bout du réservoir humain de parasite et montrent qu'il est nécessaire de s'attaquer parallèlement à celui qui circule chez le vecteur en par une campagne de lutte anti-vectorielle. Une telle campagne est en train de se mettre en place dans notre zone étude. Nous espérons une baisse importante de prévalence dans les années à venir.

Nos résultats ont confirmé la bonne spécificité du CATT/pl. Dans cette étude, nous avons choisi un seuil de $\frac{1}{4}$ pour la positivité au CATT/pl et effectuer les tests parasitologiques, alors que ce seuil était précédemment fixé à $\frac{1}{8}$ par le PNLTHA. Cette démarche nous a permis de dépister 3 malades supplémentaires (7,7%). Nous suggérons donc, au risque de multiplier à tort les examens parasitologiques, de passer le seuil de sélection des individus sur lesquels portent les examens parasitologiques, actuellement de $\frac{1}{8}$ à $\frac{1}{4}$ dans le foyer de Dubréka. Nous suggérons aussi de tester la même démarche dans les autres foyers guinéens. Ces résultats montrent que lors des précédentes prospections médicales, des malades positifs au CATT/pl $\frac{1}{4}$ n'ont pas pu être dépistés. Ces malades en restant dans le foyer ont contribué au maintien de la transmission de la THA.

Les résultats parasitologiques ont confirmé la très bonne sensibilité de la mAECT avec seulement 4 malades négatifs à ce test. Il est possible que pour ces sujets que les parasitémies sanguines soient trop faibles pour être détectées par ce test. Nous confirmons la forte proportion de trypanosomés porteurs d'adénopathies cervicales infectées : plus de 80% dans les 3 foyers du littoral guinéen (Camara *et al.*, 2005 ; Camara *et al.*, sous presse) comparé à celle que l'on observe par exemple dans les foyers ivoiriens : 20% (Kaba *et al.*, 2006). Comment expliquer cette différence ? Elle peut être liée à des différences entre les populations de parasites ou de populations humaines entre les deux zones. Une étude récente de génétique des populations montrant que les souches de trypanosomes circulant en Guinée sont différentes de celles circulant en Côte d'Ivoire (Koffi *et al.*, 2009) semble en faveur de la première hypothèse. Les méthodes moléculaires (marqueurs microsatellites) appliquées aux ADN extraits dans le cadre de cette étude permettront d'apporter des précisions sur ces questions de recherche.

On confirme la très faible proportion de sujets en phase 1 de la maladie observée depuis plusieurs années dans les foyers guinéens (Camara *et al.*, 2005). Par exemple dans le foyer de Bonon en Côte d'Ivoire, Jamonneau *et al.* (2002) ont observé une proportion de phase 1 de 31,6%. Ceci peut-être du à une baisse de la transmission de la maladie : de moins en moins de nouveaux sujets se font infectés et les sujets dépistés le sont depuis plusieurs années et n'ont pas assisté aux précédentes prospections. Il est possible aussi que des souches particulièrement virulentes circulent dans le foyer et que les nouveaux sujets infectés par ces souches évoluent rapidement en phase 2 de la maladie. Une étude est en

cours pour caractériser la virulence des souches de parasites isolées ces dernières années dans le foyer de Dubréka.

Les résultats PCR ont confirmé la bonne sensibilité de ce test déjà décrites dans les études précédentes qui ont utilisé ce test comme méthodes diagnostic (Chappuis *et al.*, 2005). C'est le test qui s'est avéré le plus sensible de notre étude avec près de 95% de malades détectés. Les 2 sujets négatifs en PCR font partie des 4 sujets négatifs à la mAECT. Ce résultat semble confirmer que les parasitémies sanguines chez ces sujets sont particulièrement faibles, probablement < 1 trypanosome / ml qui est le seuil de détection de la PCR avec les amorces TBR1/TBR2 (Penchenier *et al.*, 1996).

Cette meilleure sensibilité est confirmée par les résultats obtenus sur les sujets S+. Aucun de ces 39 sujets n'a été positif aux tests parasitologiques, alors qu'1/3 d'entre eux sont positifs en PCR. Ces sujets semblent donc porteurs de trypanosomes qui ne sont pas détectés par les méthodes parasitologiques classiques, notamment parce que la plupart des sujets S+ ne présentent pas d'adénopathie (examen du suc ganglionnaire impossible), mais aussi parce que les parasitémies sanguines sont trop faibles pour être détectées par la mAECT. La question classique qui se pose maintenant est : que représente ce statut de séropositifs positifs en PCR ? Il est possible que ces sujets soient porteurs de souches de parasites peu virulentes à l'origine de parasitémies sanguines faibles non détectables par la mAECT. Il est possible que ces sujets soient particulièrement résistants à l'infection et qu'ils maintiennent des parasitémies faibles. Des recherches doivent continuer d'être menée pour tester ces 2 hypothèses. Concernant le rôle du parasite, il faudrait pouvoir comparer les souches circulantes chez les sujets S+ et celles circulantes chez les sujets T+. Cette comparaison est actuellement en cours en utilisant la PCR de marqueurs microsatellites polymorphes (Koffi *et al.*, 2009). Concernant le rôle de l'hôte, il faudrait caractériser et comparer la réponse immunitaire des malades et des séropositifs par des dosages de cytokines par exemple. Les plasmas de ces sujets sont disponibles et cette approche est en perspective. Le suivi de ces sujets à long terme permettrait aussi de voir l'évolution de leur statut dans le temps : seront-ils à un moment détectés par les méthodes parasitologiques ? Les tests PCR vont-ils se négativer ? Le statut de séropositif va-t-il se maintenir ? Un autre problème se pose : la PCR ne détecte pas directement le parasite, mais uniquement son ADN et peut être considérée comme un test indirect. Des recherches doivent être menées pour

savoir dans quelle mesure une PCR positive signe une infection active. Compte tenu de la toxicité des médicaments, il est nécessaire de répondre à cette question si on veut un jour utiliser la PCR comme outil d'aide à la décision thérapeutique. Les connaissances actuelles ne permettent pas encore de traiter un sujet sur la base d'un résultat positif en PCR.

Dans tous les cas, si ces sujets sont réellement porteurs de trypanosomes, ils constituent un réservoir potentiel de parasites dans les foyers. Ils pourraient contribuer au maintien de la transmission dans le temps et pourraient expliquer le maintien de l'endémie. Nos résultats montrent donc qu'une attention particulière doit être portée à ces sujets dans les stratégies de lutte du PNLTHA même si des questions subsistent sur leur rôle dans l'épidémiologie de la THA.

Au début de cette étude, le constat était que le foyer de THA de Dubréka était le plus actif d'Afrique de l'Ouest, et que l'endémie se maintient dans le temps. Notre étude a montré que ce maintien pouvait être du (i) aux limites de la méthode du dépistage actif (grâce au recensement), (ii) au fait que lors des activités précédentes, on utilisait le CATT 1/8 comme seuil de choix des sujets sur lesquelles portaient les examens parasitologiques, et (iii) au fait que des sujets séropositifs potentiellement porteurs de parasites restent non traités dans le foyer.

Cette étude nous permet alors de faire des propositions concrètes afin d'optimiser les stratégies de lutte contre la THA en Guinée :

- Effectuer un recensement de la population avant chaque prospection médicale afin d'évaluer son efficacité et identifier les zones où les taux de présentation de la population sont les plus faibles c'est-à-dire les zones où il reste le plus de malades après le passage de l'équipe.
- Effectuer les examens parasitologiques sur tous les sujets positifs au CATT/pl $\geq \frac{1}{4}$, afin de détecter plus de malades, au risque d'effectuer à tort ces examens à des sujets dont la positivité au CATT est plutôt due à une réaction non-spécifique de la THA.
- mettre en place un suivi à long terme (2 ans) de tous les séropositifs détectés lors des prospections médicales. Dès la détection d'un sujet et lors de ce suivi, nous suggérons d'effectuer un prélèvement de sang et de plasma à chaque visite. Une

extraction d'ADN pourra être effectuée à partir du tube de sang, à des fins diagnostiques mais aussi de caractérisation des trypanosomes circulant dans notre zone d'étude. Le tube de plasma pourra permettre d'effectuer des dosages sérologiques comme celui de la trypanolyse, un test qui semble prometteur dans le contexte de la surveillance épidémiologique de la THA (Jamonneau et al., sous presse).

- De mettre en place une lutte anti-vectorielle dans les zones de plus forte prévalence. A ce sujet, les données obtenues lors d'un recensement et celles issues des questionnaires épidémiologiques posées aux malades et séropositifs (données non-détaillées dans cette étude) peuvent être d'une grande utilité. En effet, ces données permettent d'identifier des activités et donc des zones particulièrement à risque : pêche, riziculture, extraction de sel et point d'approvisionnement en eau dans le cadre de notre étude, où il faudra accentuer la lutte pour la rendre plus efficace.

Ces propositions de stratégies de lutte devraient être appliquées à toutes les zones concernées par la THA en Guinée. Cette étude a une fois de plus montré le rôle de la recherche pour optimiser les stratégies de lutte. La solide collaboration qui existe depuis plusieurs années entre le PNLTHA Guinée (acteur de la lutte) et l'IRD/CIRDES (acteur de la recherche) et les avancées obtenues pour la lutte contre la maladie en témoignent. Cette étude menée dans le cadre de mon DEA m'a permis de prendre une place importante dans cette interface lutte / recherche, que je mettrai en application afin de répondre aux objectifs fixés par les perspectives de recherche de cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bailey J.W. & Smith D.H. (1992). The use of acridine orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**, 630.
- Brault J. & Lapin J. (1898). Notes sur l'étiologie de la pathogénie de la maladie du sommeil. *Archives of Parasitology*, **1**, 369.
- Bruce D. & Nabarro D. (1903). Progress report on sleeping sickness in Uganda. *Sleeping Sickness Commission of the Royal Society*, **2**, 39p.
- Bruce D., Hamerton A.E., Bateman H.R. & Machie F.P. (1909). The development of *Trypanosoma gambiense* in *Glossina palpalis*. *Proc. Roy. Soc.*, **81**, 405-414.
- Bruce D., Hamerton A.E., Bateman H.R. & Machie F.P. (1911). Further researches on the development of *Trypanosoma gambiense* in *Glossina palpalis*. *Proc. Roy. Soc.*, **83**, 513-527.
- Büscher P., Draelants E., Magnus E., Vervoort T. & Van Meirvenne N. (1991). An experimental latex agglutination test for antibody detection in human African trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, **71**, 267-273.
- Büscher P., Mumba Ngoyi D., Kaboré J., Lejon V., Robays J., Jamonneau V., Bebronne N., Van der Veken W. & Bieler S. (2009). Improved models of mini anion exchange centrifugation technique (mAECT) and modified single centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging. *Plos NTD*, **3**, e471.
- Camara M., Kaba D., Douno M.K., Sanon J.R., Ouendeno F.I. & Solano P. (2005). La trypanosomose Humaine Africaine en zone de mangrove en Guinée: caractéristiques épidémiologiques et cliniques de deux foyers voisins. *Méd. Trop.*, **65**, 155-161.
- Camara M., Camara O., Ilboudo H., Sakande H., Kaboré J., N'Dri L., Jamonneau V. & Bucheton B. Sleeping sickness diagnosis: use of Buffy Coat to improve sensitivity of the mini anion exchange centrifugation technique (mAECT). *Trop. Med. Int. Health*, sous presse.
- Cattand P., Miezán T.W. & de Raadt P. (1988). Human African trypanosomiasis: use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *Bull. W.H.O.*, **66**, 83-86.
- Cattand P. (2001). L'épidémiologie de la trypanosomiase humaine africaine: une histoire multifactorielle complexe. *Méd. Trop.*, **61**, 313-322.
- Cecchi G., Paone M., Franco J.R. et al. (2009). Towards the Atlas of human African trypanosomiasis. *Int. J. Health Geography* **8**, 15.
- Chappuis F., Loutan L., Simarro P., Lejon V. & Büscher P. (2005). Options for field diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *Clinical Microbiol. Rev.*, **18**, 133-146.
- Courtin F., Jamonneau V., Oké E., Oswald Y., Coulibaly B., Dupont S., Doumenge J.P., Cuny G. & Solano P. (2005). Towards understanding the presence/absence of Human African Trypanosomiasis in a focus of Côte d'Ivoire: a spatial analysis of the pathogenic system. *Int. J. Health Geographics*, **4**, 27.

- Diallo P., B. Truc P., Meda H. A & Kamenan A. (1996). Diagnostic sérologique de la trypanosomiase humaine africaine à *T. brucei gambiense*: obtention et utilisation d'antigènes bruts dans les tests ELISA et d'agglutination au latex. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **89**, 262-268.
- Donelson J. E. & Turner M. (1985). Les métamorphoses du trypanosome. *Pour la Science*, **4**, 14-23.
- Dukes P., Rickman L. R., Killick-Kendrick R., Kakoma I., Wurapa F., K. de Raadt P. & Morrow R. (1984). A field comparison of seven diagnostic techniques for human trypanosomiasis in the Luangwa valley, Zambia. *Trop. Med. Parasitol.*, **35**, 141-147.
- Dukes P., Gibson W.C., Gashumba J.K., Hudson K.M., Bromidge T.J., Kaukus A., Asonganyi T. & Magnus E. (1992). Absence of the LiTat 1.3 (CATT antigen) gene in *Trypanosoma brucei gambiense* stocks from Cameroon. *Acta Trop.*, **51**, 123-124.
- Dutton J.E. (1903). Notes sur un trypanosome trouvé dans le sang de l'homme. *Annales d'Hygiène et de Médecine Coloniale*, **6**, 355-363.
- Dutton J.E. & Todd J.L. (1906). The distribution and spread of sleeping sickness in the Congo Free State with suggestions on prophylaxis. Reports of the expedition the Congo, 1903-1905. *Liverpool School of Tropical Medicine, Mem XVIII*, 25-38.
- Fèvre E.M., Picozzi K., Fyfe J., Waiswa C., Odiit M., Coleman P.G. & Welburn S.C. (2005). A burgeoning epidemic of sleeping sickness in Uganda. *Lancet*, **366**, 745-747.
- Fèvre E.M., Picozzi K., Jannin J., Welburn S.C. & Maudlin I. (2006). Human African trypanosomiasis: Epidemiology and control. *Adv. Parasitol.*, **61**, 167-221.
- Fèvre E.M., Wissmann B., Welburn S.C. & Lutumba P. (2008). The burden of Human African Trypanosomiasis. *Plos NTD*, **2**, e333.
- Garcia A., Jamonneau V., Magnus E., Laveissière C., Lejon V., N'guessan P., N'dri L., Van Meirvenne N. & Büscher P. (2000). Longitudinal survey of positive Card Agglutination Trypanosomiasis test (CATT) but apparently a parasitemic individuals in Côte d'Ivoire: evidence for complex and heterogeneous population. *Trop. Med. Int. Health*, **5**, 786-793.
- Garcia A., Courtin D., Solano P., Koffi M. & Jamonneau V. (2006). Human African Trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics. *TRENDS in Parasitol.*, **22** (9), 405-409.
- Gentilini M. (1993). Médecine Tropicale. Cinquième édition. Flammarion médecine-sciences.
- Ginoux P.Y. & Frezil J.L. (1981). Recherche sur la latence clinique et la trypanotolérance humaine dans le foyer du couloir du fleuve Congo. *Cahiers O.R.S.T.O.M., Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, **XIX**, **1**, 33-40.
- Hide G. (1999). History of Sleeping Sickness in East Africa. *Clin. Microbiol. Reviews*, **12**, 112-125.

- Hoare C.A. (1972). The trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph. *Blackwell Scientific Publications, Oxford*, 749p.
- Jamonneau V., Garcia A., N'guessan P., N'dri L., Sanon R., Laveissière C., Frezil J. L. & Truc P. (2000). Clinical and biological evolution of Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **94**, 831-835.
- Jamonneau V., Garcia A., Oury B., Ravel S., Cuny G., Solano P., N'dri L., Sanon R., Frezil J. L. & Truc P. (2002). Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei* ssp. and clinical evolution of Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Trop. Med. Int. Health*, **7**, 610-621.
- Jamonneau V., Solano P., Koffi M., Denizot M. & Cuny G. (2004). Apport et limites du diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine. *Medecine/Sciences*, **20**, 871-875.
- Jannin J., Moulia-Pelat J.P., Chanfreau B., Penchenier L., Louis J.P., Nzaba P., Elfassi de la Baume F., Eozenou P. & Cattand P. (1993). Trypanosomiase humaine africaine : étude d'un score de présomption de diagnostic au Congo. *Bull. WHO*, **71**, 215-222.
- Jannin J.G. (2005). Sleeping sickness-a growing problem? *B. M. J.* **331**, 1242
- Kaba D., Dje N.N., Courtin F., Oke E., Koffi M., Garcia A., Jamonneau V. & Solano P. (2006). L'impact de la guerre sur l'évolution de la THA dans le Centre – Ouest de la Côte d'Ivoire. *Trop. Med. Int. Health*, **11**, 136-143.
- Kennedy P. G. (2006). Diagnostic and neuropathogenesis issues in Human African Trypanosomiasis. *Int. J. Parasitol.*, **36**, 505-512.
- Koffi M., Solano P., Denizot M., Courtin D., Garcia A., Lejon V., Büscher P., Cuny G. & Jamonneau V. (2006). Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: A potential human reservoir of parasites? *Acta Trop.*, **98**, 183-188.
- Koffi M., De Meeus T., Bucheton B. et al. (2009). Population genetics of *Trypanosoma brucei gambiense*, the agent of sleeping sickness in Western Africa. *PNAS* **106**, 209-214.
- Lanham S.M. & Godfrey D.G. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.*, **28**, 521-534.
- Lejon V., Jamonneau V., Solano P., Atchade P., Mumba D., Nkoy N., Bebronne N., Kibonja T., Balharbi F., Wierckx A., Boelaert M. & Buscher P. (2006). Detection of trypanosome-specific antibodies in saliva, towards non-invasive serological diagnosis of sleeping sickness. *Trop. Med. Int. Health*, **11** (5), 620-627.
- Lumsden W.H.R., Kimber C.D. & Strange M. (1977). *Trypanosoma brucei*: detection of low parasitaemias in mice by a miniature anion-exchanger/centrifugation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **71**, 421-424.
- Lumsden W. H. R., Kimber C. D., Evans D. A. & Doig S. J. (1979). *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitemias; adaptation for field use. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**, 312-317.

- MacLean L., Chisi J., E. Odiit M., Gibson W.C., Ferris V., Picozzi K. & Sternberg J.M. (2004). Severity of Human African Trypanosomiasis in East Africa is associated with geographic location, parasite genotype, and host inflammatory cytokine response profile. *Inf. Immun.*, **72**, 7040-7044.
- Magnus E., Vervoot T. & Van Meirvenne N. (1978). A card agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, **58**, 169-176.
- Martin G., Leboeuf A. & Roubaud E. (1909). Rapport de la mission d'étude de la maladie du sommeil au Congo français, 1906-1908. *Masson Compagnie, Paris*, 721p.
- Mehlitz D. (1986). Le réservoir animal de la maladie du sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense*. *Etudes et Synthèses de l'Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 156p.
- Miezán T.W., Médá H.A., Doua F., Djé N.N., Lejon V. & Büscher P. (2000). Simple centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed Pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **94**, 293.
- Moser D.R., Cook G.A., Diane E.O., Bailey C.P., McKane M.R. & Donelson J.E. (1989). Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*, **99**, 57-66.
- Njiokou F., Laveissière C., Simo G. Nkinin S., Grebaut P. Cuny G. & Herder S. (2006). Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. *Inf. Genet. Evol.*, **6**, 147-153.
- Noireau F., Gouteux J.P. & Frézil J.L. (1986). Sensibilité du test d'agglutination sur carte (Testryp CATT) dans les infections porcines à *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* en République du Congo. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, **66**, 63-68.
- Noireau F., Gouteux J.P. & Duteurtre J.P. (1987). Diagnostic value of a card agglutination test (Testryp CATT) in the mass screening of human trypanosomiasis in the Congo. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **80**, 797-803.
- OMS (1998). Contrôle et surveillance de la trypanosomiase africaine. *Rapport d'un comité d'experts*. Série de Rapports techniques, 881.
- OMS (2002). Rapport OMS 2002, Genève, Suisse.
- Penchenier L., Dumas V., Grébaut P., Reifenberg J.M. & Cuny G. (1996). Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomiasis. *Parasite*, **4**, 387-389.
- Penchenier L., Simo G., Grébaut P., Nkinin S., Laveissière C. & Herder S. (2000). Diagnosis of human trypanosomiasis, due to *Trypanosoma brucei gambiense* in central Africa, by the polymerase chain reaction. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **94**, 392-394.
- Penchenier L., Grebaut P., Njiokou F., Eboo Eyenga V. & Büscher P. (2003). Evaluation of LATEX/*T. b. gambiense* for mass screening of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Central Africa. *Acta Trop.*, **85** (1), 31-37.

- Picozzi K., Fevre E., M. Odiit M., Carrington M., Eisler M., C. Maudlin I. & Welburn S. C. (2005). Sleeping sickness in Uganda: a thin line between two fatal diseases. *BMJ*, **331** (7527), 1238-1241.
- Plimmer H. G. & Bradford J. R. (1899). A preliminary note on the morphology and the distribution of the organism found in the tsetse fly disease. *Proceedings of the Royal Society of London*, B **65**, 274.
- Rossi G., Bazzo D., Lauffer M., Moreau N., Fontana A., Sow M. & Diallo I. (2000). Atlas Infogéographique de la Guinée Maritime, projet observatoire de la mangrove, Ministère de l'agriculture et de l'élevage, Ministère de la pêche et de l'aquaculture, CNRS, CNSHB, IRD, Edition IRD, 179 p.
- Simarro P.P., Ruiz J.A., Franco J.R. & Josenando T. (1999). Attitude towards CATT-positive individuals without parasitological conformation in the African trypanosomiasis (*T.b. gambiense*) focus of Quiçama (Angola). *Trop. Med. Int. Health* **4**, 858-861.
- Simarro P.P., Jannin J. & Cattand P. (2008). Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? *PLoS Med.*, **5**, e55.
- Simo G., Herder S., Njiokou F., Asonganyi T., Tilley A. & Cuny G. (2005). *Trypanosoma brucei* s. l.: Characterisation of stocks from Central Africa by PCR analysis of mobile genetic elements. *Exp. Parasitol.*, **110**, 353-362.
- Smith D.H. & Bailey J.W. (1997). Human African Trypanosomiasis in South-eastern Uganda: clinical diversity and isoenzymes profiles. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **7**, 851-856.
- Sternberg J.M. (2004). Human African Trypanosomiasis: clinical presentation and immune response. *Parasite Immunol.*, **26**, 469-476.
- Stephens J. W. W. & Fantham H. B. (1910). On the peculiar morphology of a trypanosome from a case of sleeping sickness and the possibility of its being a new species (*T. rhodesiense*). *Proceedings of the Royal Society of London*, **86**, 187.
- Truc P., Bailey J., W. Doua F., Laveissière C. & Godfrey D. G., (1994). A comparison of parasitological methods for the diagnosis of gambian trypanosomiasis in an area of low endemicity in Cote d'Ivoire. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **88**, 419-421.
- Truc P., Jamonneau V., N'Guessan P., Diallo P. B. & Garcia A. (1998). Parasitological diagnosis of African trypanosomiasis: a comparison of the QBC® and miniature anion-exchange centrifugation techniques. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **92**, 288-289.
- Truc P., Jamonneau V., Cuny G. & Frezil J.L. (1999). Polymerase Chain Reaction in African Trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bull. WHO*, **77**, 745-749.
- Woo P.T.K. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop.*, **27**, 384-386.

ANNEXES

Annexe 1. Questionnaire épidémiologique et clinique

Etat civile du malade Date :

Nom :N° dépistage :

Prénoms :.....Centre de Prospection:

Age :Sexe :Ethnie :Profession :

Nom du père :Nom de la mère :

Questionnaire épidémiologique :

- Activité :

 Activité principale :Activité secondaire :

 Lieu de travail :

- Originaire de la zone : OUI / NON si non provenance :

 Date d'arrivée :

- Lieu de résidence - permanente :

 - Temporaire :

 - voyages (3 dernière années) : OUI / NON

Si oui : où Durée du séjour :

- Fréquentez –vous les îles ?

- Si oui ; îles visitées :

- Présence d'animaux dans la concession : OUI / NON lesquels.....

.....

-Avez –vous déjà participé à une séance de dépistage ?.....quand ?:.....

 Lieu :.....résultat :

-Actuel ou ancien trypanosomé dans la famille proche :.....leur nombre

 - leur date de dépistage : la période de la maladie :

- lien de parenté :

- leur lieu de résidence :

Questionnaire clinique :

- adénopathies cervicales : OUI / NON Typique / Atypique

- Insomnie nocturne : OUI / NON ; somnolence diurne : OUI / NON

- Troubles de l'appétit : OUI / NON si OUI : Boulimie / Anorexie

- Troubles activité sexuelle : OUI / NON

si OUI préciser (aménorrhée, impuissance..) :

- Fièvre : OUI / NON ; maux de tête : OUI / NON ; amaigrissement : OUI / NON

- sensation de fatigue générale : OUI / NON ;

- troubles du comportement : OUI / NON (préciser) :

- troubles de la motricité : OUI / NON (préciser) :

- date d'apparition des premiers symptômes (fatigue, insomnies....) :

- Signes cutanées : Prurits OUI / NON, Trypanides OUI / NON

- autres signes à préciser :

- remarques particulières :

Annexe 2. Protocole d'extraction d'ADN à partir de sang total par le kit DNeasy

- Aliquoter 500 µl d'eau ultra pure dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml
- Ajouter 500 µl de sang dans chaque tube
- Vortexer 10 secondes toutes les 2 minutes pendant 10 minutes
- Centrifuger à 13000 g pendant 4 minutes
- Oter le surnageant
- Ajouter 1 ml de PBS au culot
- Vortexer pendant 10 minutes (resuspension du culot)
- Centrifuger à 13000 g pendant 4 minutes
- Oter le surnageant

Ces étapes ont permis une lyse des cellules et l'élimination d'une grande partie des composés cellulaires. Il reste dans le culot, les acides nucléiques (dont l'ADN) et d'autres constituants protéiques ou ioniques qu'il va falloir éliminer pour une purification optimale de l'ADN.

- Ajouter 200 µl de PBS dans chaque tube (resuspension du culot)
- Ajouter 20 µl de protéinase K et 200 µl de tampon AL (la protéinase K permet de dégrader les protéines en oligopeptides, le tampon AL permet d'optimiser l'action de la protéinase K)
- Vortexer vigoureusement et incuber à 70 °C pendant 10 minutes (pour favoriser l'action de la protéinase K)
- Numéroté les colonnes
- Ajouter 200 µl d'éthanol 100% et vortexer vigoureusement (l'éthanol va entraîner les résidus protéiques restants)
- Transférer la totalité dans les colonnes qui sont placées au dessus d'un collecteur
- Centrifuger pendant 2 minutes à 13000 g

Lors de cette étape, les résidus protéiques sont entraînés à travers la colonne par l'éthanol et se retrouvent dans le collecteur et l'ADN est fixé par la colonne grâce à ses propriétés ioniques.

- Jeter les collecteurs et récupérer les colonnes sur d'autres tubes collecteurs
- Ajouter 500 µl de tampon AW1 et centrifuger pendant 2 minutes à 13000 g
- Récupérer à nouveau les colonnes sur des tubes collecteurs
- Ajouter 500 µl de tampon AW2 aux colonnes et centrifuger pendant 5 minutes à 13000 g

Les tampons AW1 et AW2 permettent d'éliminer les derniers contaminants et inhibiteurs d'enzymes (pour optimiser le fonctionnement de la Taq polymérase dans les étapes de PCR)

- Les colonnes sont maintenant posées sur les tubes dans lesquels sera élué l'ADN. On y ajoute 200 µl de tampon AE et on laisse incubé pendant 3 minutes à température ambiante (le tampon AE permet de décrocher l'ADN)
- Centrifuger à 13000 g pendant 5 minutes (élution de l'ADN)
- Remettre 200 µl de tampon AE dans les colonnes et centrifuger à 13000 g pendant 5 minutes.

L'ADN maintenant purifié est ainsi récupéré dans un volume final de 400 µl de solution AE, prêt pour la PCR.

Annexe 3. Résultats recensement / cartographie

LOCALITE	Nrecensés	Nvisités	Nséropos	Nmalades
Balanta*	27	27	0	0
Boneah*	327	175	2	2
Borondo*	120	84	0	0
Campama*	46	72	0	4
Dofili*	114	92	1	2
Doti*	297	239	5	2
Fandje*	10	10	0	0
Fofa*	18	17	0	0
Gore*	79	76	0	0
Kholaya*	827	711	2	7
Khonikourou*	136	98	0	1
Kopering*	313	154	3	1
Menguiah*	1168	226	0	0
Sirayah*	474	302	2	0
Tabeta*	350	322	1	3
Tegna*	491	394	1	1
Yatia*	217	149	4	1
Yeguiah*	302	221	1	0
Arabanty	383	226	2	1
Bady	8	0	0	0
Balantalle	26	54	1	1
BalantaSonfe	22	28	0	0
Bambekaki	66	57	0	0
Bandakoro	53	40	0	0
Baguigan	28	20	0	0
Bengue	6	6	0	0
Bokhinene	828	678	2	1
Garakoumbaya	2	6	0	0
Hermakono	77	35	0	0
Kakounsou	152	144	1	3
Kampama	6	1	0	0
Kanka	287	233	7	3
Kanse	123	100	0	0
Kasognah	35	32	0	0
Katoumbaya	3	3	0	0
Kereba	123	69	0	0
Kholayalle	72	26	0	1
Khonibombo	207	185	1	0
Kisonki	22	34	0	0
Komboi	27	8	0	0
Konyikeren	39	33	0	1
Mendabon	61	109	0	0
Paris	16	9	0	0
Sanabombo	139	66	0	0

Siadogobe	13	5	0	0
Simamodia	16	11	0	0
Solonyere	33	21	0	0
Sonfe	25	59	0	1
Soryakaki	52	61	0	0
Tabaya	30	24	0	0
Tokyo	22	20	0	0
Tougoussouri	129	113	2	1
Wonko	66	52	0	0
Woyekhory	46	57	0	0
Yatagui	70	67	0	0
Youlabenyi	13	0	0	1
Kandiandi	21	21	0	0
Allamondo	6	6	0	1
Fofia	15	15	0	0
Allamatode	5	5	0	0
BalantaP	8	8	0	0
Panibanki	12	12	1	0
BalantaR	43	43	0	0
Total	8752	6171	39	39

* = Localités recensées sur le continent.

Toutes ces localités sont géo référencées, voir Fabrice Courtin (courtinfabrice@yahoo.fr)

Nrecensés = Nombre de personnes recensées

Nvisités = Nombre de personnes examinées pendant la prospection médicale

Nséropos = Nombre de sujets séropositifs sans confirmation parasitologique identifiés lors de la prospection médicale

Nmalades = Nombre de malades dépistés lors de la prospection médicale

Annexe 4. Résultats bruts de tous les tests effectués sur les 39 malades et 39 séropositifs

N°dépistage	Statut	CATTpl	PG	mAECT	SC LCR	Cytorachie	Phase	PCR
Arab/3/8/2	T+	128	+	+	-	72	IIA	+
Camp/1/1/9	T+	64	+	+	-	13	IIP	+
Tabe/2/1/9	T+	32	+	+	+	20	IIP	+
khol/18/1/8	T+	32	+	+	-	30	IIA	+
Khol58/1/2	T+	32	Abs	+	-	39	IIA	+
Khol/9/1/4	T+	32	+	+	-	8	IIP	+
Khol/42/1/9	T+	32	+	+	-	86	IIA	+
Bone/12/1/26	T+	32	+	+	-	5	I	+
Camp/1/2/3	T+	32	+	+	-	8	IIP	+
khol/31/1/5	T+	32	+	+	-	15	IIP	+
Dofi/7/1/1	T+	32	+	+	-	15	IIP	+
Dofi/10/1/9	T+	32	Abs	+	-	145	IIA	+
Kope/8/1/4	T+	32	+	+	-	7	IIP	+
Pmako 7	T+	32	Abs	+	-	238	IIA	+
Sonf/1/1/1	T+	32	+	+	-	18	IIP	+
kank/9/1/2	T+	32	+	+	-	52	IIA	+
Khol/49/1/9	T+	32	+	-	+	231	IIA	-
Tegn/32/1/19	T+	16	+	+	+	121	IIA	+
yati/1/1/2	T+	16	+	+	-	18	IIP	+
Bone/13/1/13	T+	16	+	-	-	10	IIP	-
Youl/5/3/3	T+	16	+	+	+	21	IIA	+
Bokh/36/1/1	T+	16	+	+	nf	nf	nf	+
camp/1/2/2	T+	16	+	+	-	18	IIP	+
Allam/1/1/1	T+	16	+	+	nf	nf	nf	+
Doti/13/3/4	T+	16	+	+	nf	nf	nf	+
Doty/13/1/22	T+	16	+	+	-	3	I	+
Kank/15/1/10	T+	16	+	+	-	162	IIA	+
kank/14/2/6	T+	16	+	+	-	21	IIA	+
Kako/12/1/31	T+	16	+	+	+	27	IIA	+
Khol/1/1/1	T+	16	+	+	-	14	IIP	+
Bala/4/1/1	T+	16	Abs	+	-	10	IIP	+
Tabe/7/1/3	T+	16	+	-	+	14	IIP	+
Tabe/3/3/7	T+	16	+	-	+	83	IIA	+
Camp/1/2/4	T+	8	+	+	-	9	IIP	+
Toug/8/1/3	T+	8	+	+	+	75	IIA	+
Kako/11/1/5	T+	8	Abs	+	+	58	IIA	+
Khol/22/1/3	T+	4	+	+	-	24	IIA	+
kony/2/1/1	T+	4	+	+	nf	nf	nf	+
Kako/14/1/9	T+	4	Abs	+	-	80	IIA	+
Doti/4/1/2	S+	64	-	-	nf	nf	nf	-

N°dépistage	Statut	CATPl	PG	mAECT	SC LCR	Cytorachie	Phase	PCR
Toug/3/1/1	S+	32	Abs	-	nf	nf	nf	+
Dofi/10/1/1	S+	32	-	-	nf	nf	nf	+
Khol/4/1/1	S+	32	Abs	-	nf	nf	nf	-
Arab/7/2/1	S+	32	Abs	-	nf	nf	nf	-
Doti/11/1/6	S+	32	Abs	-	nf	nf	nf	-
Pani/1/1/6	S+	32	-	-	nf	nf	nf	-
Kank/16/1/3	S+	32	Abs	-	nf	nf	nf	-
kank/5/1/1	S+	32	-	-	nf	nf	nf	-
Bone/15/1/1	S+	16	Abs	-	nf	nf	nf	-
Yati/3/1/8	S+	16	Abs	-	nf	nf	nf	-
Bone/20/1/3	S+	16	Abs	-	nf	nf	nf	-
Kank/2/1/13	S+	16	Abs	-	nf	nf	nf	-
Kank/2/1/21	S+	16	Abs	-	nf	nf	nf	-
Taba/14/1/14	S+	8	Abs	-	nf	nf	nf	+
Khol/25/2/13	S+	8	-	-	nf	nf	nf	+
Bokh/19/1/1	S+	8	Abs	-	nf	nf	nf	+
Dp48	S+	8	Abs	-	nf	nf	nf	+
Kope/2/1/4	S+	8	Abs	-	nf	nf	nf	+
Kank/2/1/13	S+	8	Abs	-	nf	nf	nf	+
Yati/3/1/1	S+	8	Abs	-	nf	nf	nf	-
Sira/5/1/2	S+	8	Abs	-	nf	nf	nf	-
Doti/14/1/1	S+	8	Abs	-	nf	nf	nf	-
Doti/19/2/4	S+	8	Abs	-	nf	nf	nf	-
Doti/13/1/2	S+	8	Abs	-	nf	nf	nf	-
Toug/6/1/13	S+	8	Abs	-	nf	nf	nf	-
Dp14	S+	8	Abs	-	nf	nf	nf	-
Kako/6/1/2	S+	8	Abs	-	nf	nf	nf	-
yegu/4/2/2	S+	4	Abs	-	nf	nf	nf	+
Tegn/34/1/4	S+	4	Abs	-	nf	nf	nf	+
Bokh/18/1/3	S+	4	Abs	-	nf	nf	nf	+
khon/28/1/5	S+	4	Abs	-	nf	nf	nf	+
Kank/8/1/5	S+	4	Abs	-	nf	nf	nf	+
Sira/7/1/11	S+	4	Abs	-	nf	nf	nf	-
yati/6/1/11	S+	4	Abs	-	nf	nf	nf	-
yati/7/1/6	S+	4	Abs	-	nf	nf	nf	-
Kope/15/1/9	S+	4	Abs	-	nf	nf	nf	-
kank/18/1/8	S+	4	Abs	-	nf	nf	nf	-
Bala/1/1/7	S+	4	Abs	-	nf	nf	nf	-

PG = Ponction ganglionnaire et examen microscopique du suc ganglionnaire, Abs = absence de ganglion, SC LCR = simple centrifugation du LCR (recherche de parasite dans le LCR), Cytorachie = nombre de cellules blanches / μ l de LCR