

**BURKINA FASO**

*Unité-Progrès-Justice*

**MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE ET SUPERIEUR**

.....  
**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO DIOULASSO**  
.....

**INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL**



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

**En vue de l'obtention du Master II en Production et Industrie Animale (MaPIA)**

**Thème :**

**Etude expérimentale de la pathogénicité et de la virulence des souches de *Trypanosoma brucei gambiense***



**Présenté par: SANOU Djénéba**

**Directeur de mémoire : Pr Adrien Marie Gaston BELEM**

**Maître de stage : Dr Jacques KABORE**

**Mai 2014**

**N°:.....2014/MaPIA**

# Table des matières

Dédicaces.....	iii
Remerciements .....	iv
Sigles et abréviations.....	vi
Liste des figures.....	vii
Tableau .....	viii
Liste des photos .....	ix
Liste des annexes.....	x
Résumé .....	xi
Abstract .....	xii
Introduction .....	1
Première Partie : Revue Bibliographique.....	3
Chapitre I : Le trypanosome .....	4
1.1. Taxonomie et reproduction.....	4
1.2. Morphologie .....	5
1.3. Cycle de développement.....	5
1.4. Variation antigénique.....	6
1.5. Génome des trypanosomes .....	8
1.6. Vecteurs et réservoirs .....	8
Chapitre II : La Trypanosomose Humaine Africaine.....	9
2.1. Définition et répartition géographique.....	9
2.2. Conséquences socio-économiques de la THA.....	10
2.3. Diagnostic de la THA .....	11
2.3.1. Diagnostic indirect ou sérologique .....	11
2.3.2. Diagnostic direct ou parasitologique.....	13
2.3.3. Diagnostic de phase .....	14
2.4. Traitement.....	15
Chapitre III : La diversité clinique .....	16
3.1 Diversité clinique de la THA .....	16
3.2. Infections expérimentales sur les animaux de laboratoire et éthique de la recherche	18
3.2.1. Infections expérimentales sur les animaux de laboratoire .....	18
3.2.2. Ethique de la recherche sur les animaux.....	18
3.3. Pathogénicité et virulence des trypanosomes .....	19

Deuxième Partie : Etude Expérimentale .....	22
Chapitre I : Matériel et méthodes .....	23
1.1 Matériel.....	23
1.1.1 Cadre de l'étude .....	23
1.1.2 Matériel de laboratoire .....	23
1.1.2.1. Matériel biologique .....	24
1.1.2.1.1 Trypanosomes.....	24
1.1.2.1.2 Souris .....	25
1.2. Méthodes.....	26
1.2.1. Amplification des souches de trypanosomes .....	26
1.2.2. Préparation de l'inoculum.....	27
1.2.3. Infections expérimentales .....	27
1.2.4. Expérimentation sur lot témoin .....	28
1.2.5. Analyse des données.....	29
Chapitre II : Résultats et Discussion .....	30
2.1. Résultats.....	30
2.1.1. Virulence des souches .....	30
2.1.2. Pathogénicité des souches .....	32
2.1.2.1. Mortalité .....	32
2.1.2.2. Evolution de l'hématocrite .....	33
2.1.2.3. Evolution du Poids .....	34
2.2. Discussion.....	35
2.2.1. Virulence.....	35
2.2.2. Pathogénicité.....	36
Conclusion et perspective.....	37
Références bibliographiques .....	38
□ Articles scientifiques consultés.....	38
□ Documents consultés .....	45
□ Sites internet consultés .....	46
Annexes.....	54

## Dédicaces

- A mon papa SANOU Dokiè Dramane, arraché à notre affection le 19 Avril 2014. Que la terre vous soit légère et que votre âme repose en paix ;
  
- A mon fils SIDIBE Hama Arthur Dasiel, pour tous les moments que nous avons partagés et pour le courage que tu m'as toujours inspiré. Tu pourras toujours compter sur moi ;
  
- A ma maman, DIABATE Maimouna pour tous vos sacrifices et toute l'attention que vous avez portée sur mon enfant ;
  
- A tous mes frères et sœurs pour leurs encouragements et soutiens. Puisse l'amour fraternel nous unir pour toujours.

## Remerciements

Ce présent mémoire est le fruit des efforts conjugués et constants de plusieurs personnes, à qui nous voudrions témoigner notre reconnaissance et gratitude. Nous remercions :

- ❶ **le Docteur Valentine C. YAPI-GNAORE**, Directrice Générale du Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES) qui a bien voulu nous accepter comme stagiaire au sein de son institution ;
- ❷ **le Professeur Adrien Marie Gaston BELEM**, Enseignant-chercheur à l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso (UPB) et responsable de l'école doctorale de la même Université, notre directeur de mémoire. Merci pour vos encouragements, votre soutien et la confiance placée en nous;
- ❸ **le Docteur Jacques KABORE**, Enseignant-chercheur à l'UPB et chercheur au CIRDES, notre maître de stage, qui en dépit de son calendrier chargé, a toujours été présent à nos côtés. Nous vous remercions, pour la qualité de l'encadrement reçu et votre soutien sans faille ;
- ❹ **le Docteur Vincent JAMONNEAU**, Chercheur à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), basé au CIRDES, pour sa constante disponibilité, son sens de l'écoute et ses précieux conseils ;
- ❺ **les Professeurs Hassan B. NACRO et Hamidou BOLY**, qui malgré leur absence du pays, font du mieux qu'ils peuvent pour accompagner les étudiants. Merci pour la confiance placée en nous;
- ❻ **toute l'équipe de l'IRD/CIRDES** pour avoir porté leur choix sur nous, pour effectuer ce stage;
- ❼ **le Professeur Aboubacar TOGUYENI**, Enseignant-chercheur à l'UPB, chercheur au CIRDES et Vice-président chargé de la Recherche, de la Prospective et de la Coopération Internationale de la même Université pour ses conseils ;
- ❽ **tous les chercheurs et tout le personnel du CIRDES**, pour leur disponibilité et leurs conseils ;
- ❾ **Monsieur Hassane SAKANDE**, Technicien de laboratoire au CIRDES, pour nous avoir initiés aux techniques de diagnostic sérologiques et parasitologiques. Nous n'oublions pas

ses collègues, **Messieurs Leopold MILLOGO, Mêmê YOUL, Souleymane SYLLA, Adrien ZOUNGRANA et Maurice KONKOBO**, pour leur disponibilité, leurs précieux conseils et le climat de convivialité qui régnait au laboratoire. A l'animalerie, nous remercions **Monsieur Victor BAZEMO** pour sa disponibilité constante ;

❶ **Les Docteurs Hamidou ILBOUDO et Bienvenu M. SOMDA**, respectivement chercheurs au CIRDES et enseignants-chercheur à l'UPB, pour nous avoir initiés à la biologie moléculaire, au logiciel JMP et aux biostatistiques. Nous remercions aussi les **Docteurs Ernest SALOU et Emilie T. DAMA** ; les **Doctorants Aristide SEMPORE, Akoudjin MASSOUROUDINI, OUEDRAOGO Inoussa, Diane KIENDREBEOGO, Oumou CAMARA, Modou SERE et Monsieur Der DABIRE**, du bureau « Guantanamo » pour avoir corrigé notre document et notre présentation et pour leurs conseils et les bons moments passés ensemble ;

❷ **la Doctorante Ida O. BENAGABOU** qui nous a envoyé le fichier de l'appel d'offre et qui nous a encouragé à déposer notre dossier. Merci aussi pour tes conseils et soutiens. Nos remerciements vont aussi à l'endroit du **Doctorant Soumaila PAGABELEGUEM** au PATTEC, pour sa disponibilité, ses précieux conseils et encouragements et du **Doctorant Abel S. BIGUEZOTON**, délégué des stagiaires pour son accueil ;

❸ **tous les camarades stagiaires du CIRDES** pour les bons moments passés ensemble. Nous pensons notamment à **ZONGO André, YEO Issa, KARAMBIRI Medina, KANDE Souleymane, KONFE Harouna, KANAO Fatimata, TINGUERI Béatrice, TRAORE Ibrahim, BADOLO Honorine, BARRO Awa, ATTIOU Clément, ZOMA Bienvenu, TRAORE Lassina et KABORE Justin** ;

❹ **la 37<sup>e</sup> promotion de l'IDR**, pour les bons moments passés en classe.

Toutes les personnes physiques ou morales qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

**MERCI A TOUS !**

## **Sigles et abréviations**

**ADN:** Acide Désoxyribonucléique

**ARN:** Acide Ribonucléique

**CATT:** Card Agglutination Test for Trypanosomiasis

**CIRDES :** Centre Internationale de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide

**CTC :** Centrifugation en Tubes capillaires

**DFMO :** Difluoro-méthyl-ornithine

**DMSO:** Diméthylsulfoxyde

**ELISA:** Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay

**IFN- $\gamma$  :** Interféron-gamma

**IL :** Interleukine

**IRD:** Institut de Recherche et de Développement

**LCR :** Liquide Céphalo Rachidien

**mAECT :** miniature Anion Echange Centrifugation Technique

**NECT :** Nifurtimox-Eflornithine Combinaison Therapy

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé

**ONG :** Organisation Non Gouvernementale

**PCR :** Polymerase Chain Reaction

**PSG:** Phosphate Salin Glucosé

**QBC :** Quantitative Buffy Coat

**SNC :** Système Nerveux Centrale

**THA :** Trypanosomose Humaine Africaine

**TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor-alpha

**UI :** Unité Internationale

**VAT:** Variant Antigen Type

**VSG:** Variable Surface Glycoprotein

## Liste des figures

Figure 1: Morphologie de <i>T. brucei</i> (Laveissière <i>et al.</i> , 2000) .....	5
Figure 2: Cycle de développement du trypanosome ( <a href="http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAfrican.htm">http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAfrican.htm</a> ).....	6
Figure 3: Vagues parasitémiques de <i>T. brucei</i> .....	7
Figure 4: Répartition géographique et classification de la THA en fonction des niveaux d'endémicité (Simarro <i>et al.</i> , 2011). .....	10
Figure 5 : Niveaux de parasitémie des souris infectées par les différentes souches au cours des 5 premiers jours.....	30
Figure 6: Evolution de la parasitémie moyenne journalière des souris par souche .....	31
Figure 8 : Comparaison des taux de mortalité des souris infectées par souche .....	32
Figure 9: Evolution de l'hématocrite moyen journalier des souris en fonction des souches...	33
Figure 10: Evolution du poids moyen journalier des souris en fonction des souches .....	34



# Tableau

Tableau 1: Description des souches de trypanosomes utilisées pour les infections  
expérimentales ..... 25

## Liste des photos

Photo 1: CATT/sg effectué sur des échantillons prélevés chez dix sujets (IRD/CIRDES).....	12
Photo 2: CATT/pl de deux suspects (IRD/CIRDES).....	13
Photo 3: mAECT sur des échantillons de sujets positifs au CATT/pl.....	14
Photo 4: Souris Balb/c.....	26

## Liste des annexes

Annexe 1 : Tableau d'estimation de la parasitémie (Herbert et Lumsden, 1976).....

Annexe 2 : Fiche de suivi.....

## Résumé

La Trypanosomose Humaine Africaine ou maladie du sommeil est une maladie parasitaire à transmission vectorielle. Elle sévit en Afrique subsaharienne et est causée par deux sous-espèces de *Trypanosoma (T.) brucei (b.)*. Sur le terrain, une importante diversité de réponses à l'infection a été observée chez les patients. Cette diversité est probablement due aux interactions complexes qui existent entre le parasite et son hôte. Dans la recherche de moyens de lutte plus adaptés, l'implication réelle du parasite en termes de pathogénicité et de virulence reste à élucider. La présente étude a été réalisée sur 14 souches de *T. b. gambiense*, isolées chez des patients au cours des surveillances médicales effectuées en Côte d'Ivoire et en Guinée. L'objectif était de caractériser ces souches en fonction de leur virulence et pathogénicité afin de déterminer celles qui présentent les phénotypes extrêmes. Chaque souche a été inoculée à 20 souris Balb/c immunodéprimées. Sur une période expérimentale d'un mois, la parasitémie, le poids, la mortalité et l'hématocrite de chaque souris ont été suivis. Les résultats ont montré que les souches présentent des degrés très variables de virulence et de pathogénicité et que la mortalité des souris survenait suite à un état d'anémie et de diminution de poids très avancés. Cette étude a permis de montrer que les souches de trypanosomes étudiées expriment différents phénotypes de virulence et de pathogénicité. Il conviendrait d'orienter les recherches sur la génétique de *T. b. gambiense*, notamment sur la détermination des gènes et des mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression de ces phénotypes.

---

**Mots clés :** Trypanosomose Humaine Africaine, *Trypanosoma brucei gambiense*, souris Balb/c, pathogénicité et virulence.

---

## Abstract

Human African Trypanosomiasis or sleeping sickness is a parasitic disease transmitted by a vector. It occurs in sub-Saharan Africa and is caused by two sub-species of *Trypanosoma (T.) brucei (b.)*. In the field, an important variety of responses to the infection was observed in patients. This diversity is probably due to complex interactions between the parasite and its host. In the search for more suitable means of control, the actual involvement of the parasite in terms of pathogenicity and virulence remains unclear. This study was performed on 14 strains of *Trypanosoma brucei gambiense (T. b. gambiense)* isolated from patients during medical survey conducted in Côte d'Ivoire and Guinea. The aim was to characterize these strains according to their virulence and pathogenicity in order to determine those with extreme phenotypes. Each strain was inoculated into 20 Balb/c mice immunosuppressed. The parasitemia, weight, survival and hematocrit of each mouse were monitored during one month of experimental period. The results showed that the strains have very variable degrees of virulence and pathogenicity and that the mortality of the mice was a consequence of very advanced anemia and weight loss. This study showed that the different strains of trypanosomes express variable phenotypes of virulence and pathogenicity. It would suit to guide the research on the genetics of *T. b. gambiense*, including identifying genes and molecular mechanisms involved in the expression of these phenotypes.

---

**Keywords:** Human African Trypanosomiasis, *Trypanosoma brucei gambiense*, Balb/c mice, pathogenicity and virulence.

---

## Introduction

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA), communément appelée maladie du sommeil, est une maladie parasitaire affectant le système lymphatico-sanguin (phase 1) et le système nerveux central (phase 2). Elle est causée par deux sous espèces de *Trypanosoma* (*T. brucei* (b.) à savoir : *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*. La transmission de l'agent pathogène est assurée par la mouche tsé-tsé ou glossine. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2013), la THA constitue une menace dans 36 pays d'Afrique subsaharienne. Vingt quatre (24) de ces 36 pays sont affectés par *T. b. gambiense*, agent étiologique en Afrique occidentale et centrale et responsable de plus de 98% des cas.

Les conséquences socio-économiques de la THA sont énormes et touchent plusieurs secteurs. En effet, l'impact de la THA sur la santé publique se traduit par sa capacité à provoquer des épidémies explosives causant des milliers de décès (Cattand *et al.*, 2001). Sur le secteur de l'économie, les patients en deuxième phase souffrent de graves crises neurologiques et moteurs avec pour conséquence, la réduction de la main d'œuvre agricole. En l'absence de traitement, la THA se positionne comme une maladie invalidante et mortelle, l'une des causes du sous-développement des zones rurales atteintes (Simarro *et al.*, 2011).

Face à ce fléau, l'OMS et ses partenaires ont initié plusieurs stratégies de lutte à savoir: la lutte médicale et la lutte anti vectorielle. Après plusieurs années de lutte acharnée, une baisse progressive du nombre de nouveaux cas de malades a été observée entre 1998 et 2011 avec 37 385 en 1998, 9 685 en 2009 ; 6 637 en 2011. En 2012, on note une légère hausse avec 7 106 nouveaux cas signalés (WHO, 2013).

Cette diminution du nombre global de nouveaux cas ne doit cependant pas occulter un phénomène de plus en plus observé : la persistance et la ré-émergence de la THA dans certains foyers historiques notamment ceux de la Côte d'Ivoire et de la Guinée, les deux pays les plus touchés en Afrique de l'Ouest. Cette situation pourrait s'expliquer par le maintien de la chaîne de transmission c'est-à-dire le contact homme/vecteur associé à l'existence de réservoir de parasites notamment le réservoir animal et/ou humain. L'existence de réservoir animal domestique et sauvage de *T. b. gambiense* avait déjà été évoquée dans de nombreuses études antérieures ; cependant, son rôle épidémiologique dans la transmission de THA reste toujours à prouver (Noireau *et al.*, 1986; Guedegbe *et al.*, 1992; Cordon-Obras *et al.*, 2009, 2010; Njiokou *et al.*, 2010). Chez l'homme, une diversité de réponse à l'infection a été observée sur le terrain chez certains sujets, se traduisant notamment par des sujets

asymptomatiques, positifs aux tests sérologiques, mais négatifs aux tests parasitologiques et qui ne sont pas traités (Ilboudo *et al.*, 2011). Cette diversité de réponses à l'infection pourrait être due à la variabilité parasitaire (souches plus ou moins virulentes/pathogènes) ou à la susceptibilité individuelle (sujets trypanosensibles/trypanotolérants). Notre étude s'est intéressée à la première hypothèse à savoir l'implication de la variabilité parasitaire dans la diversité de réponses à l'infection. Des études antérieures sur la diversité génétique des trypanosomes n'ont pas pu établir de façon formelle son implication dans la diversité clinique observée sur le terrain (Kaboré *et al.*, 2011). Les infections expérimentales de souris consanguines permettront de voir si des souches différentes de *T. b. gambiense*, expriment des phénotypes différents de virulence et de pathogénicité. L'objectif principal de cette étude était de caractériser les souches de *T. b. gambiense* en fonction de leur virulence et de leur pathogénicité afin de déterminer celles qui présentent les phénotypes extrêmes. Spécifiquement, il s'agissait d'évaluer l'effet des parasites sur l'évolution du poids, de l'hématocrite, de la parasitémie et de la mortalité des souris infectées.

Le présent mémoire comprend deux parties :

- la première partie fait un état de l'art des connaissances sur les trypanosomes, la THA et la diversité clinique;
- la seconde partie est consacrée à l'étude expérimentale avec les parties matériel/méthodes, résultats/discussion, la conclusion et la bibliographie.

## **Première Partie : Revue Bibliographique**



# Chapitre I : Le trypanosome

Le trypanosome est un hématozoaire flagellé, fusiforme et extracellulaire. Il est responsable de diverses maladies animales et humaines en l'occurrence les Trypanosomoses Animales Africaines (TAA) et la THA. Le trypanosome appartient au genre *Trypanosoma* qui comporte plusieurs espèces dont *T. brucei*.

## 1.1. Taxonomie et reproduction

*T. brucei* appartient au domaine des *Eukaryota*, au règne des *Excavata*, au super-embranchement des *Discicristata*, à l'embranchement (phylum) des *Euglenozoa*, à la classe des *Kinetoplastea*, à l'ordre des *Trypanosomatida*, à la famille des *Trypanosomatidae* et au genre *Trypanosoma* (Cavalier-Smith, 2004, 2010; Keeling *et al.*, 2009). Le genre *Trypanosoma* regroupe huit sous genres, répartis en deux sections : les sections *Stercoraria* et *Salivaria*. La section *Stercoraria* regroupe les trypanosomes qui se développent dans le tractus digestif du vecteur et achèvent leur cycle dans l'intestin postérieur. Les formes infectantes sont rejetées avec les fèces du vecteur et pénètrent dans l'organisme de l'hôte à travers la peau; on parle de transmission postérograde. Les trypanosomes de la section *Salivaria* se développent par contre dans l'intestin de la glossine et achèvent leur cycle dans ses glandes salivaires ; la transmission aux mammifères s'effectue par la piqûre de la glossine infectée; c'est la transmission antérograde. Les trypanosomes de la section *Salivaria* ont deux caractéristiques principales : leur transmission est exclusivement assurée par les glossines et ils induisent la variation antigénique qui leur permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Gibson, 2001) ; *T. b. gambiense* appartient à cette section.

La reproduction chez *T. brucei* s'effectue essentiellement de manière asexuée notamment par scissiparité. Cependant, des études expérimentales effectuées sur des glossines infectées avec différentes souches de trypanosomes ont montré des possibilités d'échanges génétiques entre les trypanosomes (Jenni *et al.*, 1986). Les sites d'échanges font l'objet de controverse entre les chercheurs ; les uns ciblant les glandes salivaires (Gibson et Whittington, 1993; Bingle *et al.*, 2001) et les autres, l'intestin postérieur (Schweizer *et al.*, 1994) ou l'intestin antérieur et les trompes (Van Den Abbeele, *et al.*, 1999).

## 1.2. Morphologie

*T. b. gambiense* est un organisme unicellulaire de forme allongée mesurant entre 20 à 30 micromètre ( $\mu\text{m}$ ) de long et trois ( $3$ )  $\mu\text{m}$  de diamètre. A l'une de ses extrémités, apparaît un petit point appelé kinétoplaste d'où part le flagelle libre, fixé sur la membrane ondulante. Outre le kinétoplaste, le trypanosome contient les organites suivants : le noyau, les granules cytoplasmiques, l'appareil de golgi, le réticulum endothélial, les ribosomes et les mitochondrions (Figure 1). Dans l'organisme, le *T. brucei* vivant se reconnaît par les mouvements ondulatoires de son flagelle.

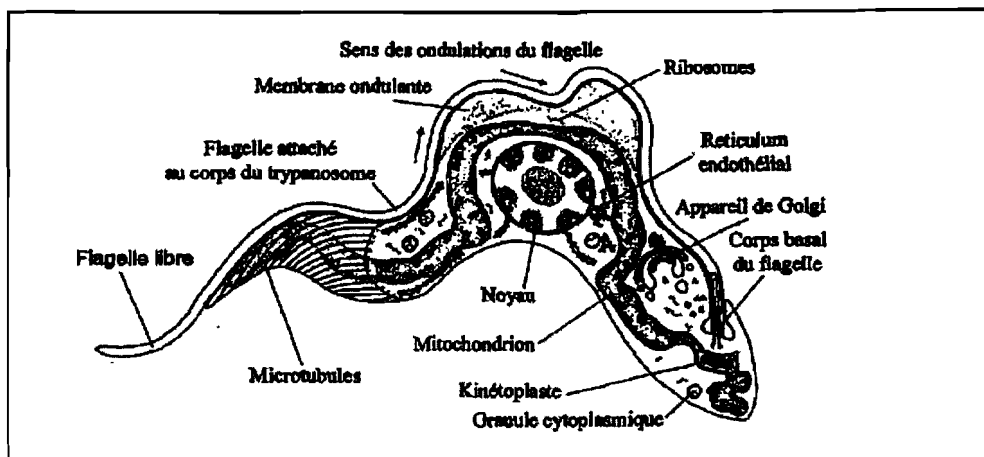


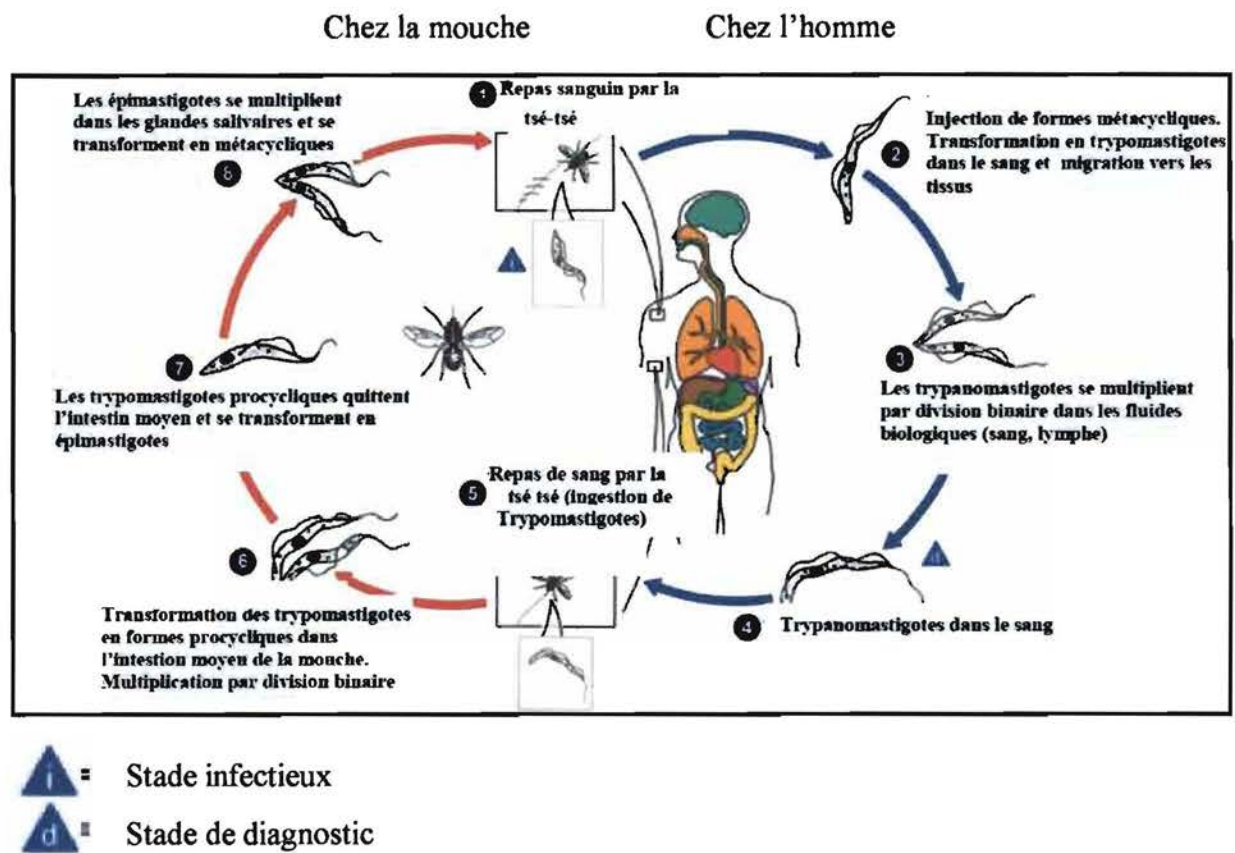
Figure 1: Morphologie de *T. brucei* (Laveissière *et al.*, 2000)

Chez le mammifère, plusieurs formes de trypanosomes coexistent (Vickerman, 1985). Ce sont : les formes longues prolifératives (slender), présentes pendant la phase ascendante de la parasitémie et les formes trapues non prolifératives (stumpy) observées au pic de la parasitémie (Matthews *et al.*, 2004). Il existe une forme intermédiaire entre les formes longue et courte.

## 1.3. Cycle de développement

Le cycle de développement des trypanosomes s'effectue à la fois chez la glossine et chez l'hôte mammifère. En effet, la glossine ingurgite les trypanosomes (la forme courte) lors de la prise du repas sanguin sur un hôte infecté. Dans son tractus digestif, notamment dans l'intestin moyen, les trypanosomes subissent des modifications biochimiques et morphologiques aboutissant à la transformation des formes courtes en formes longues appelées formes procycliques. Ces procycliques migrent dans la glande salivaire où elles sont

transformées en formes épimastigotes qui deviendront des formes métacycliques infectieuses. Lorsque cette glossine infectée pique un mammifère, elle lui injecte les formes métacycliques infectantes. Ces dernières entament une multiplication au point de piqûre et envahissent par la suite le sang, les nœuds lymphatiques, les autres tissus et organes en particulier, le système nerveux central (Kennedy, 2004). La durée du cycle dépend de l'espèce de trypanosome et de la température; elle est estimée à 30 jours chez *T. brucei*. Le cycle des trypanosomes est résumé par la figure ci-dessous (Figure 2).



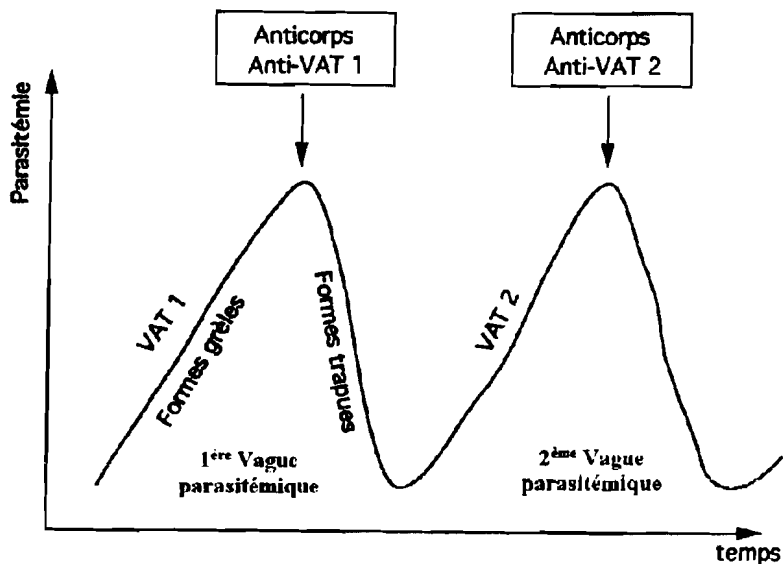
**Figure 2:** Cycle de développement du trypanosome (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAfrican.htm>)

## 1.4. Variation antigénique

La membrane cellulaire des trypanosomes est recouverte d'un manteau formé par deux types d'antigènes : les antigènes invariants dits « communs » et les antigènes variables appelés Glycoprotéines Variables de Surfaces (GVS).

Les antigènes invariants sont moins nombreux et sont surtout retrouvés à l'intérieur du manteau. Ils sont impliqués dans le recyclage de la membrane plasmique et jouent un rôle important dans le diagnostic de la trypanosomose du fait qu'ils peuvent être mis en évidence par des tests de fixation du complément, d'agglutination direct, et d'immunofluorescence indirect. Les antigènes variables de surface sont les plus nombreux et constituent la structure externe du manteau. Ils sont présents chez les formes courtes et métacycliques des trypanosomes chez qui ils forment une structure très dense servant de barrière physique entre la membrane plasmique du trypanosome et l'organisme de l'hôte. Leur rôle principal est de masquer les antigènes membranaires invariants du parasite. De plus, ils induisent la variation antigénique qui permet aux trypanosomes d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

La variation antigénique est le phénomène par lequel au cours d'une infection, il se produit une succession de populations de parasites, toutes différentes les unes des autres sur le plan antigénique (Doyle, 1977). En effet, les GVS sont recouvertes de Variant Antigen Type (VAT) formés généralement de types antigéniques dominants appelés variants « majeurs » et des variants tardifs appelés variants « mineurs » qui apparaissent respectivement en début et en fin d'infection. Suite à la réaction immunitaire de l'hôte pour contrer la prolifération des trypanosomes, les GVS expriment un nouveau type antigénique méconnu jusqu'alors du système immunitaire de l'hôte. La succession entre la prolifération des trypanosomes et la réaction immunitaire de l'hôte aboutit à un phénomène appelé vague parasitémique (Figure 3). Chaque pic de la parasitémie correspond à un pic de fièvre chez l'hôte.



VAT1 : trypanosomes ayant la même couverture antigénique, de même que VAT2

Figure 3: Vagues parasitémiques de *T. brucei*

## 1.5. Génome des trypanosomes

Les trypanosomes possèdent deux types de matériel génétique : le génome nucléaire et le génome cytoplasmique.

Le génome nucléaire est très polymorphe et possède environ 120 chromosomes (Ersfeld *et al.*, 1999). On distingue : 11 paires de grands ou méga chromosomes; les chromosomes intermédiaires et les mini chromosomes. Les chromosomes intermédiaires sont essentiellement formés de gènes codant pour les GVS et les petits ou mini chromosomes ont pour rôle de stocker les gènes inexprimés pour la variation antigénique (Ogbadoyi *et al.*, 2000; Wickstead *et al.*, 2004).

Le génome cytoplasmique, appelé génome mitochondrial ou kinetoplastique (ADNk) représente environ 10 à 15% de l'ADN total de la cellule. Il est composé de minicercles et maxicercles. Les minicercles sont majoritaires et très variables en fonction de la souche de trypanosome. Leur rôle est la transcription des ARN. Les maxicercles, environ une douzaine, sont invariables. Ils codent pour l'ARN ribosomal (ARNr) et quelques protéines mitochondriales.

## 1.6. Vecteurs et réservoirs

Les vecteurs des trypanosomes varient en fonction de l'espèce de trypanosome considérée (Authié *et al.*, 1999). Ainsi, *T. b. gambiense* est transmis de manière cyclique par les glossines du groupe *palpalis*, notamment *Glossina fuscipes* et *Glossina palpalis*. Les glossines constituent les vecteurs biologiques des trypanosomes en ce sens qu'elles abritent une partie du cycle évolutif des trypanosomes. Une glossine infestée reste infectante toute sa vie et l'efficacité de la transmission dépend du taux d'infection des tsé-tsé et des interactions hôte-vecteur (Authié *et al.*, 1999).

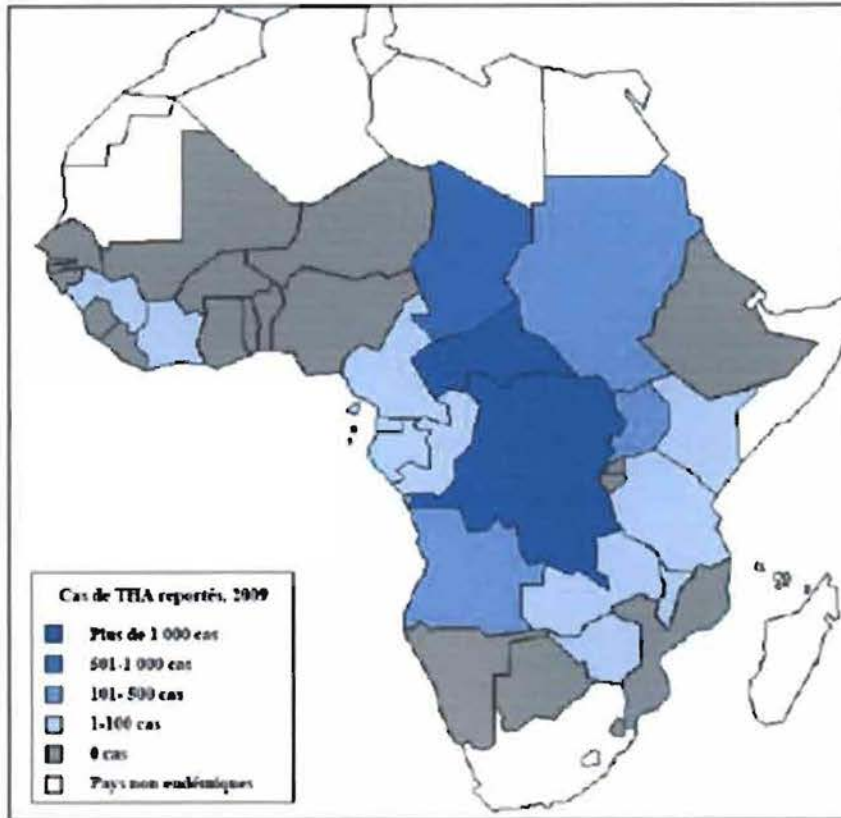
Le réservoir de *T. b. gambiense* est essentiellement constitué de malades, de séropositifs (individus à sérologie positive sans confirmation parasitologique) et des animaux sauvages et domestiques (Guedegbe *et al.*, 1992; Cordon-Obras *et al.*, 2009).

## Chapitre II : La Trypanosomose Humaine Africaine

### 2.1. Définition et répartition géographique

La THA, est une maladie parasitaire endémique à transmission vectorielle. Elle est causée par *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*, responsables respectivement des formes aiguë et chronique de la maladie. La forme aiguë est rencontrée en Afrique de l'Est et la forme chronique en Afrique centrale et occidentale (Checchi *et al.*, 2008; Simarro *et al.*, 2008). La transmission s'effectue par les glossines chez qui, a lieu une partie du cycle de développement des trypanosomes à l'issue duquel ces derniers se fixent au niveau des glandes salivaires (Van Den Abbeele *et al.*, 1999).

La répartition géographique de la maladie du sommeil est liée à celle du vecteur, la glossine (Laveissière *et al.*, 2000). La THA constitue une menace dans 36 pays d'Afrique subsaharienne (Figure 4), elle évolue en foyer. L'apparition de la maladie n'est pas seulement corrélée à la présence des glossines, mais à l'existence des conditions épidémiologiques telles que le climat, la végétation et la présence d'hôtes potentiels. De ce fait, la THA n'est pas rencontrée sur toute la zone de répartition de la glossine (Solano *et al.*, 2010; Malvy et Chappuis, 2011).



**Figure 4:** Répartition géographique et classification de la THA en fonction des niveaux d'endémicité (Simarro *et al.*, 2011).

## 2.2. Conséquences socio-économiques de la THA

La THA constitue un problème de santé publique et un obstacle majeur au développement des secteurs agricole et économique (Simarro *et al.*, 2008). Son impact sur la santé publique se traduit par sa capacité à provoquer des épidémies explosives causant des milliers de décès (Cattand *et al.*, 2001). La plupart des patients en deuxième phase souffrent de graves troubles neurologiques et moteurs. La conséquence directe du nombre élevé de malades non traités est la réduction de la main d'œuvre agricole. Aussi, les périodes d'épidémies ont connu des déplacements massifs de populations, abandonnant champs et animaux d'élevage d'où le ralentissement des activités agricoles et économiques. En absence de traitement, la THA se positionne comme une maladie invalidante et mortelle ; une cause importante du sous-développement des zones rurales infectées (Simarro *et al.*, 2011).

Les conséquences de la croissance démographique associée aux changements climatiques, à la pression anthropique et à l'exode rural ne laissent pas la THA et leurs vecteurs en reste. En Afrique de l'Ouest, un déplacement des mouches tsé-tsé du Nord vers le

Sud a été observé (Courtin *et al.*, 2009). De plus, la population de glossine du groupe *morsitans* est en baisse (Courtin *et al.*, 2009; Rayaissé *et al.*, 2009) et celle du groupe *palpalis* s'adapte bien aux fortes densités humaines, aux zones urbaines et périurbaines des régions infectées. Le mouvement et l'adaptation des glossines, couplés à l'immigration massive des populations rurales (réservoir potentiel de trypanosomes) vers les villes ont pour conséquence, le développement des foyers urbains et périurbains de la THA (Courtin *et al.*, 2005, 2009; Tongue *et al.*, 2012). Ainsi, Bamako fut le premier foyer urbain de la THA et ce, seulement au lendemain des indépendances (Challier, 1962; Ricossé *et al.*, 1973). Depuis, d'autres cas ont été signalés, le plus récent étant celui de Bonon en Côte d'Ivoire (Kambiré *et al.*, 2012).

Pour contrer ce fléau, l'OMS et ses partenaires ont initié plusieurs stratégies de lutte, pouvant être regroupées en deux volets : d'une part, la lutte médicale par le dépistage et le traitement des malades; et d'autre part, la lutte anti-vectorielle. La réalisation de ces opérations demande certes, d'énormes moyens matériels, financiers et humains mais, elle est d'une importance cruciale. En effet, on constate une baisse progressive du nombre de nouveaux cas de malades, allant de 37 385 en 1998 à 9 685 en 2009, une première depuis 50 ans de lutte. Cette tendance s'est maintenue avec seulement 6 637 en 2011. Cependant en 2012, on remarque une légère hausse avec 7 106 nouveaux cas. Pour atteindre l'objectif de l'OMS, à savoir, l'élimination de la THA comme un problème de santé public à l'horizon 2020, les politiques, les bailleurs de fonds, les firmes pharmaceutiques, les chercheurs, les populations vivant dans les régions endémiques, les agents de santé et les équipes de terrain doivent redoubler d'effort.

## **2.3. Diagnostic de la THA**

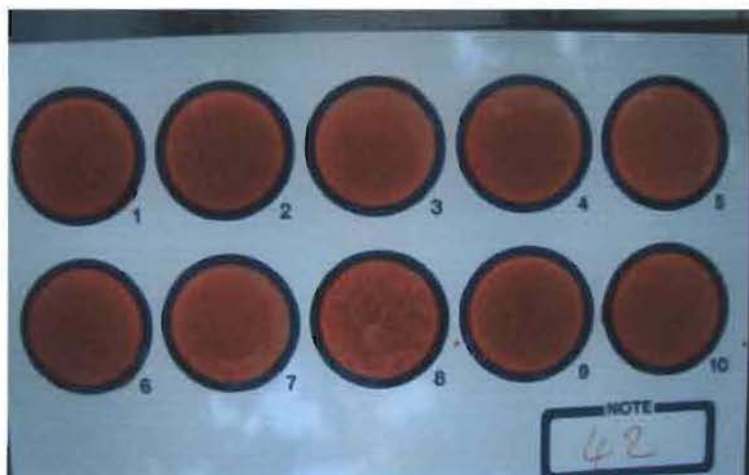
Le diagnostic de la THA repose sur deux stratégies : le diagnostic indirect et le diagnostic direct.

### **2.3.1. Diagnostic indirect ou sérologique**

Le diagnostic sérologique a pour objectif de rechercher des traces de passage ou de présence du parasite par la mise en évidence d'anticorps ou d'antigènes spécifiques dans le sang ou le plasma. Il peut être effectué au laboratoire ou sur le terrain avec des méthodes adaptées pour chaque cas.

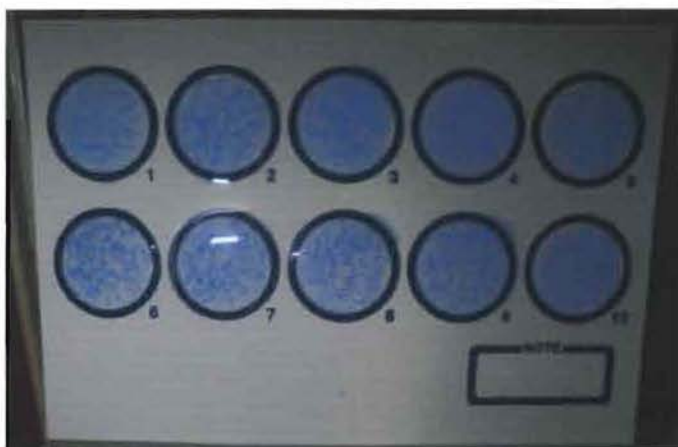


La méthode de diagnostic sérologique la plus utilisée pour le dépistage de masse de la THA est le Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT) (Magnus *et al.*, 1978). Elle est utilisée en première ligne par les Programmes Nationaux de Lutte contre la THA (PNLTHA) pour le dépistage actif des populations à risque dans les pays endémiques. C'est un excellent outil de suivi épidémiologique des trypanosomoses car il permet de sélectionner les sujets, sur lesquels seront effectués les examens parasitologiques. Le procédé consiste à mélanger une goutte de sang hépariné avec le réactif du CATT sur une carte adaptée à cet effet. En présence d'anticorps spécifiques, il se forme des agglutinats macroscopiques colorés qui sont visibles à l'œil nu (Photo 1). Le CATT effectué avec le sang est appelé CATT sur sang total (CATT/sg). Afin d'améliorer la spécificité du CATT/sg, le CATT sur dilution successive de plasma (CATT/pl) (Photo 2) est effectué sur tous les individus positifs au CATT/sg. Cependant, des problèmes de sensibilité et de spécificité existent. En plus du CATT, d'autres méthodes de diagnostic sérologique existent. Ce sont les Tests de Diagnostic Rapide (TDR), le test d'immunofluorescence indirecte, le dosage immuno-enzymatique, appelé Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) et la trypanolyse. Les TDR sont des tests individuels qui conviennent le mieux pour le dépistage passif ; ils sont en cours d'évaluation. En raison de leur grande sensibilité et spécificité, le test d'immunofluorescence indirecte, le test ELISA et la trypanolyse peuvent constituer des outils de surveillance et d'enquête (WHO, 2013).



**Photo 1:** CATT/sg effectué sur des échantillons prélevés chez dix sujets (IRD/CIRDES)

Une agglutination est observée dans le cercle huit (8) ; on conclut alors que le sujet huit (8) est positif au CATT/sg.



**Photo 2:** CATT/pl de deux suspects (IRD/CIRDES)

La photo 2 montre le CATT/pl effectué sur des échantillons de deux sujets : A (cercles 1 à 5) et B (cercles 6 à 10). Les résultats montrent que tous les deux sujets sont positifs au 1/32. Dans ce cas, la dilution se poursuit jusqu'à l'obtention du dernier cercle dans lequel l'observateur ne verra aucune agglutination.

### **2.3.2. Diagnostic direct ou parasitologique**

Le diagnostic direct est encore appelé diagnostic parasitologique ou diagnostic de certitude. Il a pour but de mettre en évidence le parasite dans les liquides physiologiques (le sang, la lymphe et le LCR) du patient. La recherche du parasite dans le sang peut s'effectuer par une observation de frottis, de la goutte épaisse ou de sang frais au microscope. La recherche du parasite dans la lymphe est par contre conditionnée par la présence d'adénopathies cervicales. Le suc ganglionnaire est alors ponctionné, déposé entre lame et lamelle et observé au microscope optique.

La parasitémie est souvent très faible dans le cas de l'infection due à *T. b. gambiense* (Truc *et al.*, 1994). Pour optimiser les résultats des observations microscopiques, les techniques de concentration telles que la Centrifugation en Tubes capillaires (CTC) (Woo, 1970), la filtration sur mini-colonne échangeuse d'ions (miniature Anion Exchange Centrifugation Technique, mAECT) (Lumsden, *et al.*, 1977) (Photo 3) et le Quantitative Buffy Coat (QBC) (Bailey et Smith, 1992) sont utilisées. Parmi les techniques ci-dessus citées, la mAECT effectuée sur Buffy Coat est la méthode parasitologique la plus sensible avec un seuil de détection de 10 parasites/ml (Camara *et al.*, 2010). Elle peut être utilisée au

laboratoire et sur le terrain. Les techniques de concentration sont sensibles mais coûteuses, car elles dépendent de l'électricité et des équipements spécialisés (Lejon *et al.*, 2013).

En général, les tests parasitologiques comportent quelques limites. En effet, sur le terrain, certains sujets donnent des résultats positifs aux tests sérologiques mais restent négatifs aux tests parasitologiques. Face à cette situation, de nouveaux outils ont été développés afin de pouvoir élucider le statut de ces sujets. Ainsi, la biologie moléculaire pourrait être une alternative d'avenir. L'amplification des séquences spécifiques d'ADN parasite appelée Polymerase Chain Reaction (PCR) est plus sensible que les techniques classiques (Truc *et al.*, 1999) ; sa limite de détection varie entre 1 à 40 trypanosomes/ml (Jamonneau *et al.*, 2004). Cependant, son utilisation est restreinte au domaine de la recherche du fait de son coût d'acquisition élevé et de ses exigences techniques. De plus, une PCR positive ne signifie pas forcément que l'individu est malade. Il se pourrait qu'il soit guéri et que l'ADN du parasite persiste toujours dans son organisme. La PCR est plutôt utile pour la recherche.



**Photo 3:** mAECT sur des échantillons de sujets positifs au CATT/pl

### 2.3 3. Diagnostic de phase

Le diagnostic de phase permet de situer la phase de la maladie ; donc d'orienter le traitement. Deux types de diagnostic de phase existent : le diagnostic direct qui s'effectue par simple ou double centrifugation du LCR. Le test est confirmé si l'observateur voit un seul trypanosome. Le diagnostic indirect se fait par le comptage des cellules (cytorachie). La présence des cellules de Mott caractérise l'inflammation du Système Nerveux Central (SNC).

Selon l'OMS (2013), une cytorachie comprise entre 0-5 éléments/ $\mu$ l sans trypanosomes dans le LCR est un signe de la première phase. A partir de six (6) éléments/ $\mu$ l

avec présence ou non de trypanosomes dans le LCR, le patient est déclaré en deuxième phase. Le seuil de cytorachie proposé par l'OMS (5 éléments/ $\mu$ l) est sujet de controverse et certains auteurs proposent un seuil de 20 éléments/ $\mu$ l (Bisser *et al.*, 1997; Chappuis *et al.*, 2005).

## 2.4. Traitement

Le traitement contre la THA est fonction de la phase et de l'agent pathogène en cause. De nos jours, le traitement de la phase 1 des infections dues à *T. b. gambiense* s'effectue avec la pentamidine (Sanderson *et al.*, 2009) ; des doses de 4 mg/kg/jour sont administrées pendant sept (7) jours. Le traitement de la première phase est simple et n'entraîne pas de graves effets secondaires (Bouteille et Buguet, 2012). Quand à la phase 2, le traitement est effectué par le Nifurtimox-Eflornithine Combinaison Therapy (NECT). Des doses de 3×5 mg/kg/jour de nifurtimox sont administrées par voie orale durant 10 jours, associées à 2×200 mg/kg/jour de l'éflornithine, administré par perfusion lente pendant sept (7). Le NECT est moins toxique pour le patient (Burri, 2010).

## Chapitre III : La diversité clinique

### 3.1 Diversité clinique de la THA

La THA est sujette à une importante diversité de réponses à l'infection (diversité de tableaux cliniques et d'évolutions de la maladie dans le temps) (Sternberg, 2004). En effet, la THA causée par *T. b. rhodesiense* présente des profils infectieux différents allant de la forme aiguë avec une atteinte précoce du système nerveux, à la forme chronique comme dans le cas de l'infection à *T. b. gambiense* (MacLean *et al.*, 2007) ; pourtant *T. b. rhodesiense* est connu pour induire des infections aiguës.

La THA causée par *T. b. gambiense* est classiquement décrite comme une maladie chronique évoluant en deux phases. La première phase encore appelée phase lymphatico-sanguine est caractérisée par la présence de symptômes légers et non spécifiques (Jannin *et al.*, 1993) qui sont entre autres, la fièvre, les céphalées, les prurits, les lésions de grattages. La seconde phase (phase encéphalique) se caractérise par l'invasion du système nerveux central par les trypanosomes entraînant des dysfonctionnements neurologiques et la mort de l'hôte s'il n'est pas traité. Cependant, le tableau clinique ainsi décrit n'est pas toujours observé chez tous les patients. En effet, des formes aiguës de la THA due *T. b. gambiense* ont été observées (Truc *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 2000;). Outre, la forme chronique classiquement décrite, deux voies naturelles alternatives d'évolution existent ; il s'agit d'une part de l'évolution vers une apparence aparasitémiq ue et asymptomatique associée à de fortes réactions sérologiques de longue durée et de l'autre, de l'évolution vers une guérison spontanée avec une baisse de la production d'anticorps comme chez les malades traités. L'existence de la trypanotolérance chez les humains (Bucheton *et al.*, 2011; Ilboudo *et al.*, 2011; Jamonneau *et al.*, 2012) comme préalablement décrite chez les bovins (Naessens, 2006) est plus que jamais évoquée. La plupart des individus à sérologie positive sans confirmation parasitologique (séropositifs) ont une parasitémie très faible qui est inférieure à la limite de détection des tests parasitologiques utilisés sur le terrain (Garcia *et al.*, 2006) ; par conséquent ils ne sont pas traités. Or, les techniques de diagnostic les plus poussées telles que la PCR (Kabiri *et al.*, 1999; Koffi *et al.*, 2006) et la trypanolyse (Jamonneau *et al.*, 2010) ont montré des signes de passage du parasite. D'ailleurs, les trypanosomes en cause seraient du même groupe génétique que ceux des malades c'est-à-dire les trypanosomes du groupe 1 (Kaboré *et al.*, 2011), connus pour induire des infections chroniques chez l'hôte. Wombou *et al.* (2011) ont en effet démontré par le xénodiagnostic (technique consistant à détecter le parasite par la

dissection du vecteur arthropode après l'avoir nourri sur un patient) que les glossines étaient capables de s'infecter sur des animaux à parasitémie faible, non détectable par les tests parasitologiques ; le rôle des séropositifs dans le maintien et la résurgence de la THA dans les foyers historiques pourraient ainsi être justifiés.

La THA due à *T. b. gambiense* semble complexe, régie par plusieurs facteurs en interaction dont l'environnement, le parasite et l'hôte, avec pour conséquence, une grande diversité clinique (Garcia *et al.*, 2006). Ainsi, les variations génétiques dans certains éléments clefs de la réponse immunitaire pourraient contribuer à la diversité clinique observée en réponse à l'infection par *T. b. gambiense* (Ilboudo *et al.*, 2011), en occurrence la variation du niveau des cytokines. En effet, il a été démontré que les niveaux des cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  étaient significativement plus élevés chez les patients que chez les séropositifs et les témoins (Courtin *et al.*, 2006). Or, IFN- $\gamma$  jouerait un rôle dans le développement de la maladie notamment dans le passage de la barrière hémato-encéphalique (MacLean *et al.*, 2007). De plus, la diversité de la réponse à l'infection pourrait être due à la variabilité parasitaire (Kaboré *et al.*, 2011) et/ou à l'expression de facteurs parasitaires (Holzmuller *et al.*, 2008).

A ce jour, les causes de la diversité clinique restent encore peu connues notamment l'implication réelle du parasite. Au cours des campagnes de dépistage des populations vivant dans les zones à risque et des surveillances médicales effectuées dans les foyers, les sujets confirmés malades sont soumis à des traitements. Dans ces conditions, le rôle de la variabilité parasitaire dans la diversité de réponses ne peut pas être étudié. De plus, ce type d'étude est censuré par l'éthique de la recherche médicale. Les infections expérimentales des animaux de laboratoire constituent alors la seule alternative pour la poursuite des recherches. Elles ont d'ailleurs permis de mieux comprendre la biologie des trypanosomes, les interactions entre le système immunitaire de l'hôte et les trypanosomes et les facteurs de l'hôte impliqués dans l'infection par les trypanosomes (Sternberg, 2004; Holzumuller *et al.*, 2008).

## **3.2. Infections expérimentales sur les animaux de laboratoire et éthique de la recherche**

### **3.2.1. Infections expérimentales sur les animaux de laboratoire**

Les infections expérimentales sur les animaux de laboratoire sont utilisées depuis plusieurs années pour étudier les phénomènes impliqués dans la diversité clinique et pour tester les médicaments. Elles sont effectuées en milieu contrôlé avec des types d'hôtes et de parasites bien déterminés et les paramètres étudiés sont régulièrement suivis, ce qui n'est pas le cas chez l'homme (Tabel *et al.*, 2000). Plusieurs animaux de laboratoire existent, les plus utilisés étant les rats, les souris, les singes (Kennedy, 2007) et les petits ruminants notamment les moutons (Ndo *et al.*, 1991). Les animaux de laboratoire ont l'avantage d'être de petite taille, disponibles, faciles à entretenir et à manipuler.

### **3.2.2. Ethique de la recherche sur les animaux**

Les études sur les animaux sont actuellement indispensables en recherche biologique et médicale. Cependant, cette nécessité doit prendre en compte l'éthique en expérimentation animale. La Directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques stipule que « l'utilisation des animaux vivants demeure nécessaire pour protéger la santé humaine et animale ainsi que l'environnement. Cependant, cette nécessité doit prendre en compte le bien-être des animaux ». C'est dans cette optique que les projets de recherche en expérimentation animale doivent être soumis à l'examen d'un comité d'éthique dont l'objectif est, la protection des animaux. L'évaluation éthique a pour but de s'assurer qu'à chaque étape de la réalisation d'une étude ou d'un projet, l'animal est pris en compte en tant qu'être vivant sensible. De plus, elle examine l'intérêt et la qualité scientifique des projets d'études parce les projets doivent avoir une finalité d'enseignement ou de recherche fondamentale, thérapeutique ou environnementales. A l'issue de cet examen, un avis éthique sur le projet de recherche est émis. L'évaluation d'un projet de recherche se base sur le principe des 3R défini par Russell et Burch en 1909:

- « Reduce » c'est-à-dire Réduire le nombre d'animaux en expérimentation en ne réalisant que les expériences indispensables. De plus, la rédaction en amont d'un protocole expérimentale pourrait constituer la preuve que l'étude a bien été préparée ; par conséquent, les résultats qui en découleront seront plus concluants. Il sera donc inutile de vérifier les résultats par d'autres essais portant sur de nouvelles séries d'animaux.
- « Refine » c'est-à-dire Raffiner, qui fait allusion à la méthodologie appliquée aux animaux dans le but de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subis par les animaux, et d'obtenir plus d'informations pertinentes à moindre coût en terme de souffrance causée aux animaux. Le raffinage s'effectue, avant, pendant et après l'expérimentation. Avant l'expérimentation, les types d'animaux doivent être judicieusement choisis en tenant compte des objectifs de l'étude. De plus, une attention particulière doit être portée sur le bien être des animaux notamment sur leurs conditions de transport, d'élevage et d'hébergement. Pendant l'expérimentation, le raffinage fait allusion aux méthodes choisies et aux modes opératoires utilisées en préférant entre autres, des procédures non invasives, en évitant des tests douloureux à chaque fois que des méthodes alternatives existent et en réduisant au mieux la durée de certaines études surtout en toxicologie. Aussi, il faudra amener les animaux à coopérer de manière à ne pas les stresser et éviter le recours à l'anesthésie pour des actes non invasifs et non douloureux. Le raffinage après l'expérimentation revient à exploiter au mieux les résultats obtenus lors de l'expérimentation par l'utilisation des méthodes statistiques fiables et adaptées.
- « Replace » c'est-à-dire remplacer si possible, le modèle *in vivo* par des modèles *in vitro* ou "*in silico*" (bio-informatique).

### 3.3. Pathogénicité et virulence des trypanosomes

La diversité clinique des infections dues aux trypanosomes a été beaucoup étudiée notamment à travers la pathogénicité et la virulence. Ainsi, la pathogénicité d'un trypanosome se définit par son aptitude à provoquer des troubles physiologiques ou des lésions avec pour conséquences, l'apparition de la maladie et la mort éventuelle de l'hôte (Stephen, 1986). Selon Morrison (2011), la virulence d'une souche de trypanosome se rapporte aux différents phénotypes induits par ce trypanosome suite à une infection. Elle peut être décrite par les quatre paramètres que sont : le niveau de parasitémie et la période pré-patente (période qui



s'écoule entre l'infection et la première apparition des trypanosomes dans le sang); l'efficacité de la transmission du trypanosome par le vecteur et les effets du trypanosome sur l'organisme notamment sur les tissus et les fluides biologiques. Cependant, il n'est pas établi que l'expression d'un phénotype ou d'un autre soit tributaire de tous ces paramètres ci-dessus cités.

Selon Andrade *et al.*, (1985), la pathogénicité est une caractéristique intrinsèque du parasite qui est liée à sa capacité à entraîner des lésions tissulaires et la mortalité. La virulence a, quant à elle, été définie par la capacité de multiplication du parasite chez l'hôte (Devera *et al.*, 2003 cités par Holzmuller *et al.*, 2008).

Morrison *et al.*, (2009 et 2010) estimaient que la pathogénicité et la virulence étaient dues à la diversité génétique des souches. En effet, les infections expérimentales sur des souris avec des souches différentes de trypanosomes ont révélé des profils infectieux différents. De plus, des études génétiques effectuées sur les mêmes souches de trypanosomes ont permis d'identifier les loci *TBOg1* et *TBOg2* respectivement situés sur les chromosomes 3 et 2 et qui seraient impliqués dans les diversités ci-dessus observées. La comparaison des séquences de GVS d'une même souche avant l'infection et durant la phase de la chute de la parasitémie a montré des différences (Giroud *et al.*, 2009), d'où l'implication probable des GVS dans la diversité de réponse à l'infection. De plus, *T. b. gambiense* a une structure hétérogène. En effet, la caractérisation génétique des souches de *T. b. gambiense* d'Afrique centrale et occidentale a permis de distinguer deux groupes : l'un, génétiquement homogène et qui représenterait 80% de la population, appelé, *T. b. gambiense* « groupe 1 » (Gibson et Borst, 1986), connu pour induire des infections plus chroniques. Au sein de cette population, existe une importante clonalité (Koffi *et al.*, 2009) qui pourrait être l'une des causes de la diversité de la réponse à l'infection dans certains foyers historiques. Le « groupe 2 » de *T. b. gambiense* correspondrait à 20% de la population et est génétiquement hétérogène (Godfrey *et al.*, 1990).

La diversité de la réponse à l'infection n'est pas seulement corrélée à la diversité génétique des souches de parasites. Les infections expérimentales de souris Balb/c avec des souches de trypanosomes génétiquement homogènes ont montré des profils infectieux différents (Holzmuller *et al.*, 2008; Giroud *et al.*, 2009). De plus, les souris immuno-déficientes infectées avec de faibles doses de parasites ont développé une infection caractérisée par une faible parasitémie qui a duré 50 à 60 jours suivie par une rechute, une parasitémie élevée et la mort des souris (Giroud *et al.*, 2009). La rechute de la parasitémie pourrait être due à

l'expression de la réponse immunitaire de l'hôte. Courtin *et al.* (2006), ont montré que la THA entraîne une forte sécrétion des cytokines. De plus, des souches de trypanosomes génétiquement identiques ont exprimé (en culture *in vivo*) chacune, différentes proportions des secrétomes spécifiques. Or les secrétomes induisent l'expression des macrophages qui influent sur la susceptibilité/résistance aux trypanosomes. La même expérience a d'ailleurs montré que la souche qui avait le niveau le plus élevé de l'expression des secrétomes spécifiques est la plus virulente. Cela montre donc le lien étroit qui existe entre l'expression de ce facteur et la susceptibilité/résistance de l'hôte à l'infection.

## **Deuxième Partie : Etude Expérimentale**

# Chapitre I : Matériel et méthodes

## 1.1 Matériel

### 1.1.1 Cadre de l'étude

Nos travaux ont été réalisés dans les locaux du Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES) sis à Bobo-Dioulasso. Le CIRDES, dispose en effet de plusieurs laboratoires dont l'animalerie et le laboratoire de sérologie où ont été réalisées nos activités, et d'une cryobanque où des souches de trypanosomes sont conservées dans de l'azote liquide. Le protocole de cette étude avait reçu l'approbation du comité d'éthique de l'Institut de Recherche et de Développement (IRD).

### 1.1.2 Matériel de laboratoire

L'étude expérimentale de la pathogénicité et de la virulence des souches de *T. b. gambiense* chez les souris a nécessité l'utilisation des matériels de laboratoire suivants :

- une balance électrique de portée 320g et de précision 0,001g;
- des lames porte-objet, des lamelles, une paire de ciseaux et un microscope optique, pour le suivi de la parasitémie ;
- des tubes capillaires (microtubes), des portoirs de tubes contenant de la plasticine, une micro centrifugeuse et un lecteur à hématocrite, pour la centrifugation et la lecture de l'hématocrite ;
- des plaques de dilution, un agitateur électrique, des cellules de comptage d'Uriglass, un microscope optique, du Phosphate-Salin-Glucose (PSG) communément appelé tampon phosphate glucosé, pour la préparation de l'inoculum,
- des cryotubes de 1,5 ml, une pince, une paire de ciseaux, de l'héparine (500 UI), de la kétamine (50 mg/ml), du glycérol, du Diméthylsulfoxyde (DMSO/PSG 20%), des pipettes, des embouts, des seringues, un agitateur, un congélateur (-80°C), des boîtes à polystyrène et de l'azote liquide (-196°C) pour la préparation et la cryoconservation des stabilats.

Pour la réalisation des activités, les bonnes pratiques de laboratoire étaient respectées notamment, le port des gants, de la blouse et des chaussures fermées. De plus, l'eau de javel était utilisée pour la désinfection des différents matériels avant et après leur utilisation.

### **1.1.2.1. Matériel biologique**

#### **1.1.2.1.1 Trypanosomes**

Les souches de trypanosomes utilisées pour les infections expérimentales appartiennent toutes à la sous-espèce *T. b. gambiense*. Des échantillons de liquides biologiques (suc ganglionnaire, sang) avaient été prélevés chez des patients au cours des prospections médicales effectuées dans les foyers de la Côte d'Ivoire et de la Guinée. A partir de ces liquides biologiques, des trypanosomes étaient isolés sur les rongeurs de laboratoire au CIRDES. Les souches ainsi isolées avaient été stabilisées et conservées dans une bonbonne à azote liquide.

La description des souches utilisées dans le cadre de la présente étude est consignée dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 1:** Description des souches de trypanosomes utilisées pour les infections expérimentales

Codes	Pays d'origine	Dates d'isolement
B4/C191	Côte d'Ivoire	2004
B4/F303	Côte d'Ivoire	2004
B4/I315	Côte d'Ivoire	2004
CB5/1	Côte d'Ivoire	2002
S7/2/2	Côte d'Ivoire	2002
S12/9/5	Côte d'Ivoire	2002
S14/5/1	Côte d'Ivoire	2002
TT22/1	Côte d'Ivoire	2002
T33/1/7	Côte d'Ivoire	2000
KO117/2	Guinée	2008
MBONR1	Guinée	2008
17/3 sang	Guinée	2008
17/3 suc	Guinée	2008
68/6	Guinée	2008

(Thèse de Mathurin KOFFI, 2006 ; données de la thèse Jacques KABORE, 2011)

#### 1.1.2.1.2 Souris

L'objectif de cette étude étant de caractériser les souches de *T. b. gambiense* en fonction de leur virulence et pathogénicité, le choix de l'hôte s'avère important. Pour ce faire, l'étude a été effectuée avec des souris consanguines notamment les Balb/c mâles et femelles de six (6) à huit (8) semaines d'âge et ayant un poids compris entre 19 et 22 grammes (g). Les animaux issus de la même lignée consanguine sont considérés comme ayant le même potentiel génétique. Par conséquent, dans la présente étude, la diversité de réponses à l'infection sera seulement due à la variabilité parasitaire. De plus, les variations de poids entre le mâle et la femelle sont moins importantes. Les souris Balb/c sont aussi caractérisées par un pelage blanc et des yeux rouges (Photo 4). Elles se reproduisent facilement et sont faciles à manipuler. Les reproducteurs du CIRDES avaient été importés des laboratoires de Charles River (France) et depuis, ils sont nourris, soignés, hébergés et soumis à la reproduction dans l'animalerie. Les souris Balb/c ont servi à l'amplification des souches, aux infections expérimentales et à l'expérimentation sur le lot témoin.



**Photo 4:** Souris Balb/c

## 1.2. Méthodes

### 1.2.1. Amplification des souches de trypanosomes

L'amplification a consisté à produire des parasites par réinfection des souris Balb/c avec les souches de trypanosomes qui étaient préalablement conservées dans l'azote liquide. L'objectif de cette activité était d'obtenir un grand nombre de trypanosomes à partir des souches afin de pouvoir harmoniser la quantité de trypanosomes à inoculer aux souris. Le protocole suivant était adopté. Le jour de l'opération, les stabilats des souches de trypanosomes qui avaient été préalablement choisis à partir de la banque de données étaient retirés de la bonbonne et soumis à la décongélation rapide à l'air ambiant. Après cette décongélation, une petite quantité du stabilat était déposée entre lame et lamelle et observée au microscope pour vérifier la viabilité des trypanosomes. La viabilité est dite positive quand des trypanosomes en mouvement sont identifiés au cours de l'observation microscopique. Les stabilats ayant des trypanosomes viables étaient alors inoculés par injection intra-péritonéale à trois (3) souris Balb/c immunodéprimées. L'état d'immunodépression était obtenu par injection intradermique de 0,2ml de cyclophosphamide communément appelé endoxan® à chaque souris. Tous les cinq jours, une nouvelle injection de cyclophosphamide était effectuée.

Après l'infection, un suivi quotidien de la parasitémie de chaque souris était effectué par observation microscopique au grossissement 400 d'une goutte de sang frais obtenu après saignement de la queue de la souris. La charge parasitaire ou parasitémie était évaluée en fonction du nombre de trypanosomes par champ microscopique (Paris *et al.*, 1982) grâce à la méthode rapide d'estimation de la parasitémie d'Herbert et Lumsden (1976) (Annexe 1). Lorsque la parasitémie atteignait 7.8 ou 8.1 soit  $64 \times 10^6$  parasites/ml ou  $125 \times 10^6$  parasites/ml,

les souris étaient anesthésiées par injection de 0,2 ml de kétamine. Le sang hépariné obtenu par ponction cardiaque était utilisé pour réinfecter de nouvelles souris et le reste était mélangé avec des cryoconservateurs (le glycérol ou le Diméthylsulfoxyde (DMSO/PSG 20%)), selon les proportions suivantes : 1/3 de la quantité de sang du DMSO/PSG 20% ou 111 µl de glycérol pour 1 ml de sang. Le mélange ainsi constitué (stabilat) était reparti dans des tubes (à raison de 0,6 ml/tube) qui étaient à leur tour disposés dans des boîtes en polystyrène contenant de l'isopropanol et gardées dans le congélateur à -80°C pendant 24 à 48h. L'isopropanol assure une congélation progressive du stabilat. Les stabilats étaient enfin récupérés et stockés dans de l'azote liquide pour une conservation de longue durée.

### **1.2.2. Préparation de l'inoculum**

L'inoculum devait contenir en moyenne 10 trypanosomes/µl. L'infection des hôtes avec la même quantité de parasites permet d'éviter les variations de la réponse à l'infection dues à la quantité de trypanosomes inoculées. A cet effet, des dilutions successives au PSG étaient effectuées sur le sang obtenu par ponction cardiaque de souris infectées. A chaque étape de la dilution, était effectué un comptage des trypanosomes à l'aide d'une lame d'Uriglass observée au microscope optique. Le nombre de trypanosomes contenus sur la lame correspondait au nombre de trypanosomes par microlitre.

### **1.2.3. Infections expérimentales**

Pour chaque souche, les expérimentations se sont effectuées sur 20 souris numérotées à la queue, immunodéprimées et gardées dans des cages étiquetées. Elles étaient nourries avec un aliment composé complet destiné aux animaux utilisé à des fins scientifiques. L'eau leur était fourni par des biberons placés au dessus des cages et la salle d'expérimentation était climatisée (24°C). L'inoculum était alors injecté par voie intra-péritonéale aux souris à raison de 0,5 ml/souris soit  $5 \times 10^6$  trypanosomes. Après l'infection et un mois durant, les opérations suivantes étaient effectuées sur chaque souris :

- un suivi quotidien de la parasitémie et de la mortalité de toutes les souris. La parasitémie était obtenue par étalement de sang frais entre lame et lamelle et observé au microscope. L'impression visuel était alors comparé avec les dessins contenu dans le tableau



d'estimation de la parasitémie d'Herbert et Lumsden (1976) pour en déduire la parasitémie;

- tous les deux jours, le suivi de l'évolution du poids et de l'hématocrite étaient effectués. La souris vivante était déposée dans un bocal en verre et pesée à l'aide d'une balance électrique. L'hématocrite encore appelé Packed Cell Volume (PCV) correspond à la proportion de globules rouges contenue dans le sang par rapport au volume total du sang. Elle est exprimée en pourcentage et permet de déterminer de façon indirecte, le degré d'anémie. Pour le mesurer, le sang des souris infectées était recueilli dans des tubes capillaires héparinés; une des extrémités était bouchée avec de la plasticine et les tubes étaient soumis à une centrifugation à 12 500 tours/mn pendant 5 mn. Après centrifugation, trois parties se reconnaissent dans le tube à savoir : le plasma (liquide jaunâtre en haut), les leucocytes et les trypanosomes (liquide blanchâtre au milieu) et les globules rouges au fond du tube. La lecture de l'hématocrite était effectuée en mettant la limite de la plasticine sur le niveau zéro de l'abaque de lecture tout en s'assurant que le contenu du tube est confiné dans les deux extrémités de la carte;
- tous les cinq jours, 0,2 ml de cyclophosphamide était injecté aux souris. Les souris Balb/c ne sont pas des hôtes naturels de *T. b. gambiense* ; elles sont d'ailleurs résistantes à *T. b. gambiense*. Le cyclophosphamide, affaiblit leur système immunitaire et donc facilite la multiplication des trypanosomes.

Du fait de la variation des paramètres biologiques au cours de la journée, les différentes opérations étaient réalisées le matin.

Au total, 14 souches de *T. b. gambiense* ont été utilisées pour les infections expérimentales. Les paramètres ci-dessus observés sont caractéristiques de la virulence et de la pathogénicité. Ainsi, les paramètres caractéristiques de la pathogénicité des souches sont l'hématocrite, le poids et la mortalité des souris infectées. La virulence quant à elle, se rapporte à la parasitémie.

#### **I.2.4. Expérimentation sur lot témoin**

L'expérimentation sur le lot témoin a consisté à injecter du PSG à 20 souris Balb/c à raison de 0,5 ml/souris. Cette activité avait pour but d'évaluer l'effet des parasites sur les paramètres étudiés. Un mois durant, le suivi du poids, de l'hématocrite et de la survie de chacune de ces souris a été effectué.

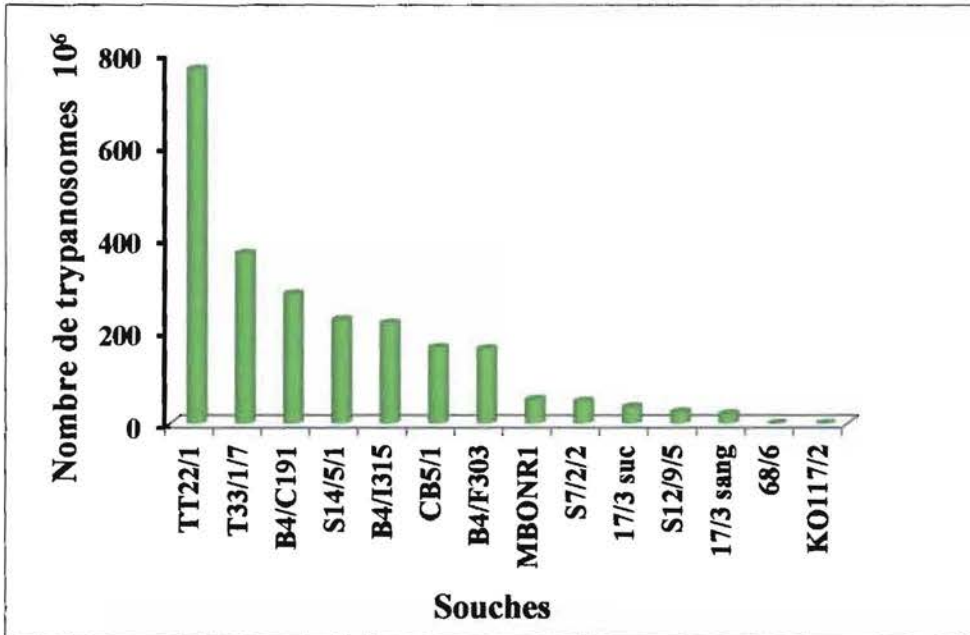
### **I.2.5. Analyse des données**

Les données récoltées ont été saisies dans des feuilles de Microsoft Office Excel 2007. Microsoft Office Excel a aussi servi à effectuer les calculs suivants : la parasitémie moyenne journalière des souris par souche, la somme de la parasitémie des souris par souche au cours des cinq premiers jours après l'infection, l'hématocrite moyen journalier des souris par souche et le poids moyen journalier des souris par souche. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel JMP version 7.0.1. Le seuil de signification de 5% a été retenu pour les comparaisons des résultats. Le choix du type de test a été effectué grâce au test de Shapiro-Wilk partant de l'hypothèse nulle selon laquelle les données suivent une loi normale. Dans ce cas, la *P*-value serait supérieure au seuil de 5%. Cependant, lorsque la *P*-value serait inférieure au seuil, nous concluons que les données ne suivent pas une loi normale ; par conséquent, les analyses ne peuvent être effectuées qu'avec des tests non paramétriques. Le test de Wilcoxon/ Kruskal Wallis a alors été utilisé pour vérifier s'il existait une différence significative entre les lots de données indépendants.

## Chapitre II : Résultats et Discussion

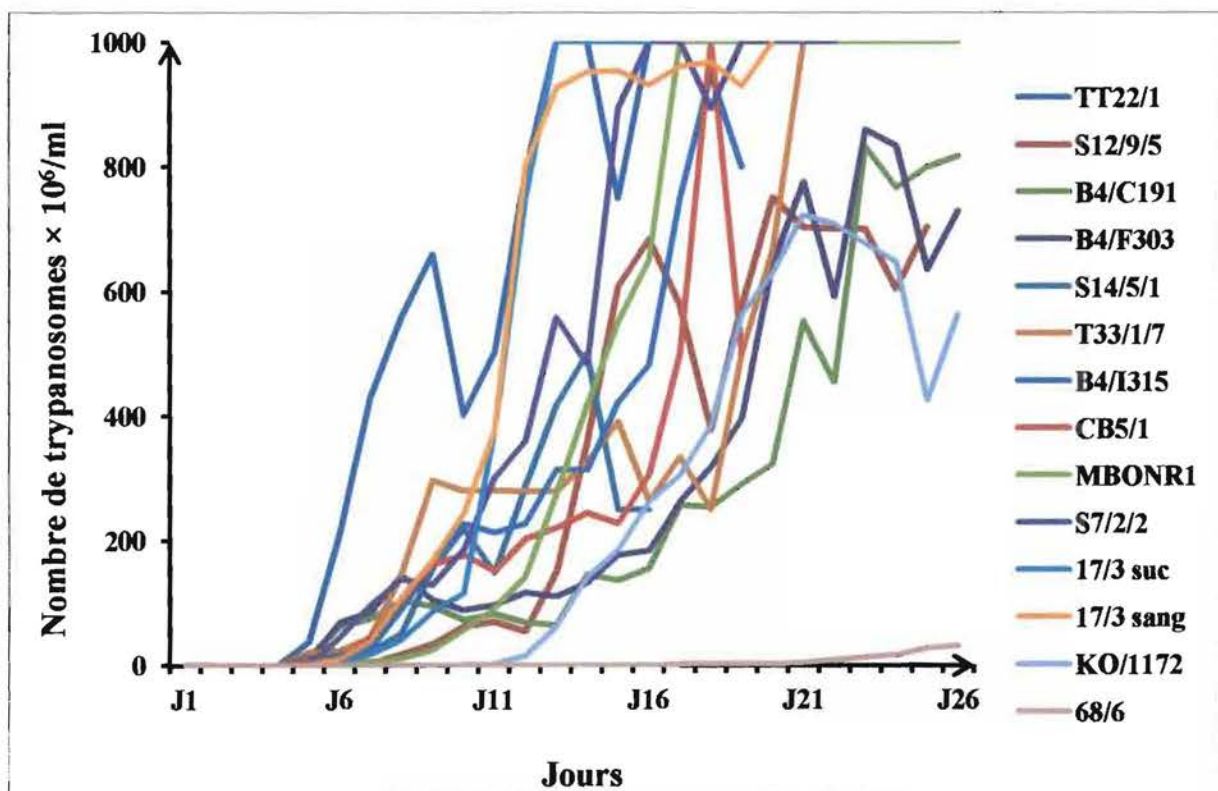
### 2.1. Résultats

#### 2.1.1. Virulence des souches



**Figure 5 :** Niveaux de parasitémie des souris infectées par les différentes souches au cours des 5 premiers jours

La figure 5 montre les niveaux de parasitémie des souris infectées par les différentes souches au cours des cinq (5) premiers jours après l'infection. On constate qu'excepté les souches 68/6 et Ko117/2, toutes les autres souches ont pu se multiplier chez les souris. De plus, la souche TT22/1 semble être celle qui a le niveau de parasitémie le plus élevé. Les analyses effectuées n'ont pas montré de différence significative entre les souches.



**Figure 6:** Evolution de la parasitémie moyenne journalière des souris par souche

Au cours de notre étude, nous avons remarqué que l'apparition de la première parasitémie chez les souris infectées par les souches TT22/1, S12/9/5, B4/C191, B4/F303, B4/I315, S14/5/1, T33/1/7, CB5/1, MBONR1, S7/2/2, 17/3 suc et 17/3 sang s'effectuait entre le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jours après l'infection; et entre le 8<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jour respectivement pour les souches Ko117/2 et 68/6

La figure 6 montre une augmentation de la parasitémie chez toutes les souris infectées par les différentes souches. Cette augmentation est cependant variable entre les souches et à l'intérieur des souches. La variation est cependant moins importante chez les souris infectées par les souches TT22/1, 17/3 sang; 17/3 suc, MBONR1. Ces quatre souches font parties des huit souches qui ont pu atteindre une moyenne journalière de la parasitémie de  $1000 \times 10^6$ /ml. Les souris infectées par les souches Ko117/2 et 68/6 ont une parasitémie qui apparait tardivement et qui évolue lentement. A J27, les souris infectées par la souche 68/6 ont une moyenne journalière de la parasitémie d'environ  $32 \times 10^6$ /ml contre  $1000 \times 10^6$ /ml pour les souris infectées par la souche TT22/1. Les analyses ont montré une différence significative entre les moyennes journalières de la parasitémie des souris infectées par les différentes souches ( $P$ -value < 0,0001).

## 2.1.2. Pathogénicité des souches

### 2.1.2.1. Mortalité

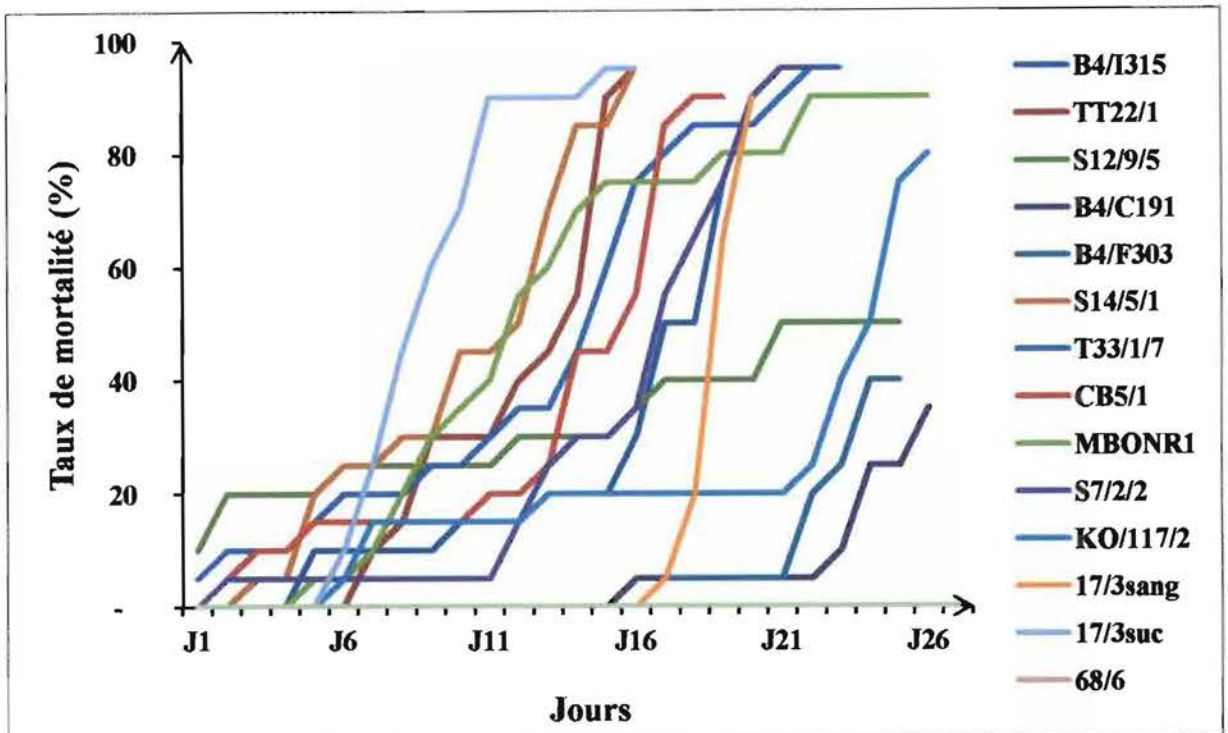
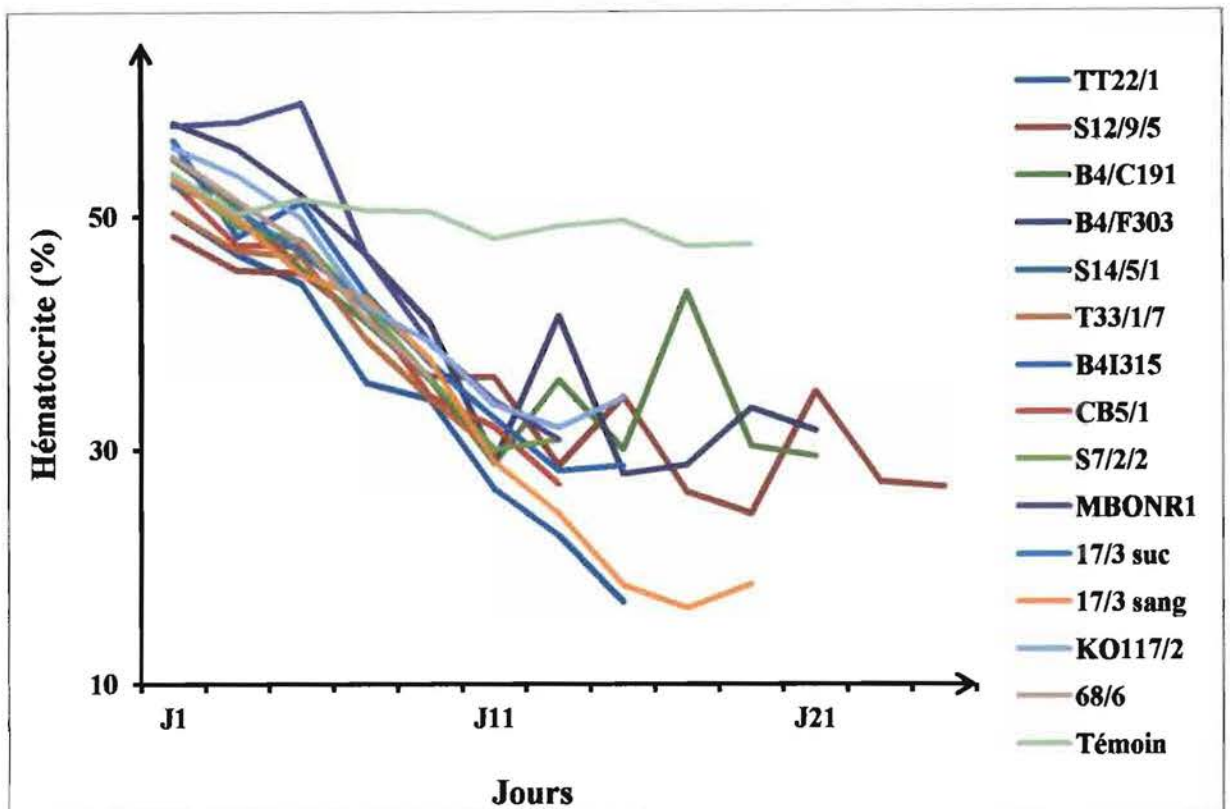


Figure 7 : Comparaison des taux de mortalité des souris infectées par souche

Au cours des expériences, nous n'avons enregistré aucune mortalité avec le lot témoin de même qu'avec la souche 68/6 comme en témoigne la figure 8. A J1 déjà, respectivement 5% à 10% de mortalité ont été enregistrés chez les souris infectées par les souches T33/1/7 et S12/9/5; ces mortalités interviennent avant même l'apparition de la première parasitémie qui a lieu respectivement à J2 et J4. A J5, sept (7) (S7/2/2, MBONR1, B4/I315, T33/1/7, CB5/1, S12/9/5 et S14/9/5) des 14 souches avaient engendré des mortalités allant de 5% à 20%, mais cette mortalité a évolué lentement. Les premières mortalités de souris infectées par les souches S14/5/1, 17/3 suc et TT22/1, sont apparues respectivement aux J3, J6 et J7. Ces mortalités ont évolué plus rapidement chez la souche 17/3 suc, suivie par TT22/1 et S14/5/1 ; en 16 jours de suivi, 95% des souris étaient déjà mortes. Pour les souris infectées par les souches B4/C191 et B4/F303, les premières mortalités ont été enregistrées entre J16 et J17. A partir de J17, les taux de souris mortes par les deux souches sont identiques jusqu'à J21 où ils augmentent respectivement jusqu'à 35% et 40%. Les analyses ont montré une différence significative entre les moyennes journalières des souris mortes par souche ( $P$ -value = 0,0030).

La souche 17/3 suc engendre une mortalité précoce à évolution rapide pendant que la souche 17/3 sang entraîne une mortalité tardive (début entre J16-J17) mais qui évolue plus rapidement pour atteindre 90% à J20. Les analyses montrent une différence significative entre les souris mortes infectées par les souches 17/3 suc et 17/3 sang ( $P$ -value = 0,0031).

### 2.1.2.2. Evolution de l'hématocrite



**Figure 8:** Evolution de l'hématocrite moyen journalier des souris en fonction des souches

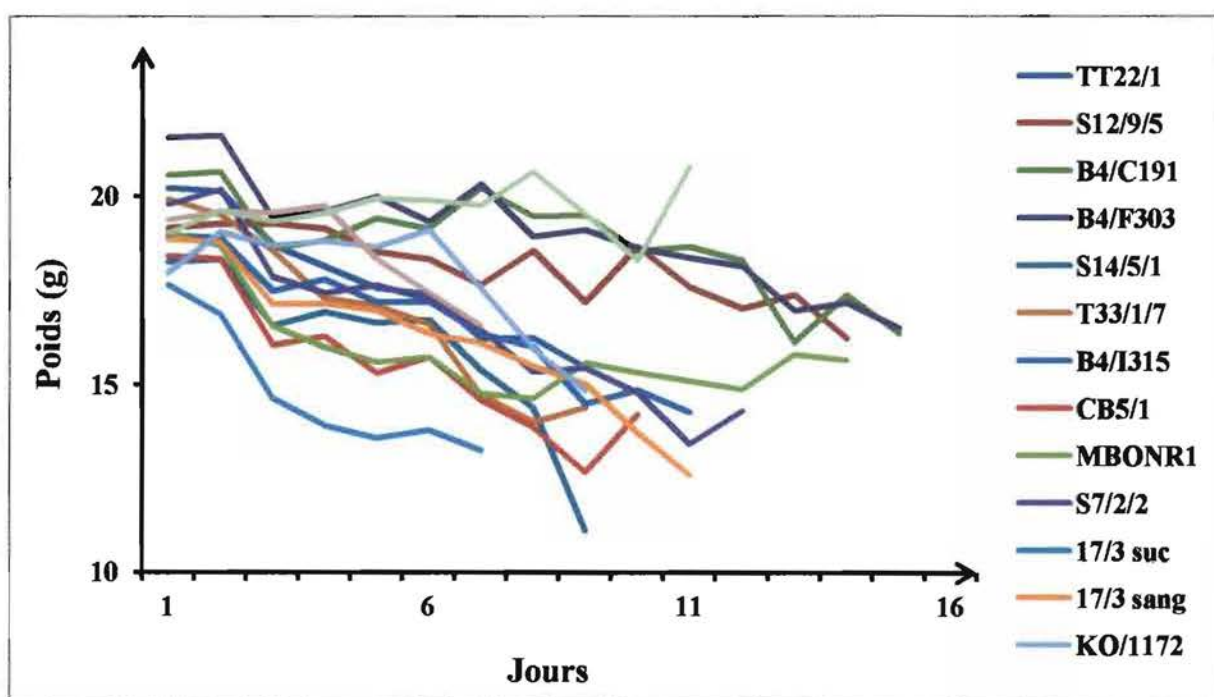
La variation de l'hématocrite moyen s'effectue en trois phases (Figure 9): la première phase se situe entre J1 et le J3 ; elle est caractérisée par une chute brutale de l'hématocrite moyen chez toutes les souris, même chez le témoin. Chez les souris infectées par la souche MBONR1 l'hématocrite moyen a légèrement augmenté (58,05% à 59,68%). Cette première phase correspond à l'apparition de la parasitémie chez la plupart des souris. La seconde phase se caractérise par une accentuation de la baisse de l'hématocrite. C'est au cours de cette phase que près de 79% des souris infectées par les 14 souches, meurt. La diminution est plus prononcée chez les souris infectées par la souche TT22/1 allant de 50,3% en début d'infection

à 17% en fin d'infection. Chez les souris infectées par la souche 68/6, la diminution de l'hématocrite est moins sévère ; elle va de 55,15% en début d'infection à 36,3% en fin d'infection. La troisième phase se caractérise par des pics sporadiques au J13 pour les souches B4/F303, J15 et J21 pour la souche S12/9/5, J13 et J17 pour B4/C191.

Chez le témoin, on distingue deux phases : une baisse entre J1 et J3. A partir du J3, la courbe reste relativement constante jusqu'à la fin de l'infection.

Les analyses ne montrent aucune différence significative entre les hématokrites moyens journaliers des souris par souches ( $P$ -value = 0,3260).

### 2.1.2.3. Evolution du Poids



**Figure 9:** Evolution du poids moyen journalier des souris en fonction des souches

Le poids moyen des souris en début d'infection variait entre 17,63 à 21,55g. Cette valeur est restée constante entre le J1 et J2 pour toutes les autres souches excepté les souches 17/3 suc et Ko117/2 qui ont entraîné respectivement une légère baisse (17,63g à 16,86g) et une augmentation (17,97g à 19,04g). S'en suit une courte phase caractérisée par une chute généralisée du poids moyen des souris entre le J2 et J3. Les poids moyens des souris infectées par les souches 68/6 et Ko117/2 sont restés constants entre J2 et J5 et entre J2 et J6 respectivement. La souche S14/5/1 a engendré une baisse allant de 18,40g à 11,1g. Quant au

lot témoin, le poids moyen est resté relativement constant variant de 19,61g à 20,77g. Les analyses ont montré qu'il existe une différence hautement significative entre les moyennes de poids des différentes souches ( $P$ -value < 0,0001).

## 2.2. Discussion

### 2.2.1. Virulence

Les résultats ont montré que toutes les souches se sont multipliées chez les souris ; avec cependant des degrés différents. De plus, en dehors des souches 68/6 et Ko117/2, toutes les autres souches ont une parasitémie précoce ; la souche TT22/1 se distinguant des autres par l'évolution rapide de la parasitémie. La souche 68/6 se caractérise quant à elle par une parasitémie tardive à évolution lente.

Cette diversité de réponses à l'infection des souches de *T. b. gambiense* n'est pas un phénomène nouveau car elle est observée depuis un certain nombre d'années déjà sur le terrain chez les patients de la Côte d'Ivoire (Jamonneau *et al.*, 2004; Koffi *et al.*, 2006), de la Guinée (Ilboudo *et al.*, 2011; Kaboré *et al.*, 2011b) et en infection expérimentale sur les souris (Holzmuller *et al.*, 2008; Giroud *et al.*, 2009). Cette diversité pourrait s'expliquer par les variabilités génétiques, *T. b. gambiense* groupe 1 et groupe 2 (Gibson et Borst, 1986; Godfrey *et al.*, 1990; Gibson *et al.*, 1999) et/ou par la clonalité importante au sein du *T. b. gambiense* groupe 1 (Koffi *et al.*, 2009). De plus, la diversité de réponses à l'infection pourrait être due à la sécrétion d'un facteur parasitaire appelé secrétomes connu pour induire l'expression des macrophages qui influent sur la sensibilité/résistance aux trypanosomes (Holzmuller *et al.*, 2008).

Les souches 17/3 sang, 17/3 suc, Ko117/2, MBONR1 et 68/6 proviennent toutes de la Guinée notamment du foyer de Forécariah, un des trois foyers actifs que compte le pays. Pourtant, elles ont des niveaux de parasitémie différents. Cette même observation a été effectuée avec les neuf (9) autres souches, toutes récoltées chez les patients de Bonon (Côte d'Ivoire). Ces résultats corroborent avec ceux de Holzmuller *et al.*, (2008) qui avaient obtenu des réponses différentes avec deux souches de *T. b. gambiense* pourtant prélevées chez des patients du même foyer de Bonon (Côte d'Ivoire). La variabilité parasitaire ne semble pas être influencée par un effet foyer.



## 2.2.2. Pathogénicité

Les données sur la mortalité des souris enregistrées au cours de l'expérimentation ont montré que les souches 17/3 suc, TT22/1 et S14/5/1 sont celles qui entraînent le plus de mortalité et ce, en seulement 16 jours de suivi et que la souche 68.6 n'a engendré aucune mortalité. Ces résultats semblent corrélés à la diminution du poids et de l'hématocrite. Ces résultats sont similaires à ceux de Bengaly (2003) et Ndo (2006) qui avaient pu établir une relation entre la pathogénicité des souches de *T. congolense* et l'évolution du poids et de l'hématocrite au cours de l'infection. La diminution de l'hématocrite serait due à la destruction des globules rouges qui entraînerait une anémie sévère et la mort des souris (Ndoutamia *et al.*, 2002; Noyes *et al.*, 2009). De plus, au cours de l'infection, pour assurer leur survie, les trypanosomes utiliseraient les protéines et le glucose de l'hôte pour leur métabolisme (Ndoutamia *et al.*, 2002). La combinaison de tous ces éléments entraînerait la perte de poids chez l'hôte.

Les souches 17/3 suc et 17/3 sang bien qu'ayant été isolées chez le même patient ont des profils différents. La souche 17/3 suc engendre une mortalité précoce à évolution rapide pendant que la souche 17/3 sang entraîne une mortalité tardive à évolution rapide. Le génotypage microsatellite effectué par Kaboré *et al.*, (2011a) sur ces souches n'avait pas montré de différence significative. Or selon Andrade (1985), la pathogénicité est une caractéristique intrinsèque de l'hôte. La variabilité pourrait être due aux facteurs parasitaires et/ou à des différences génétiques que les six (6) marqueurs utilisés par Kaboré *et al.*, n'ont pas pu montrer.

L'analyse globale a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre l'hématocrite des différentes souches. Cette situation pourrait s'expliquer par le fait que la régulation de l'anémie serait liée à la spécificité génétique de l'hôte notamment à la taille du tissu d'hématopoïèse comme précédemment démontré par Noyes *et al.*, (2009). Les souris Balb/c étant issues de reproduction consanguine, elles ont le même matériel génétique. Par conséquent, elles auraient un tissu d'hématopoïèse de la même taille, donc la même capacité à réagir face à l'infection. Dans les infections dues aux trypanosomes, l'anémie est considérée comme un élément très important en ce sens qu'elle permet de déterminer la sensibilité ou la résistance de l'hôte à l'infection.

## Conclusion et perspective

La diversité de réponses à l'infection constitue l'un des obstacles majeurs à l'élimination de la THA et l'implication réelle du parasite dans cette diversité est peu connue.

Aux termes de cette étude, il ressort que la diversité de réponses est en partie corrélée à la variabilité parasitaire qui elle, ne semble pas être affectée par un effet foyer. De plus, l'étude a permis de caractériser les souches en fonction de leur virulence et pathogénicité. Ainsi, la souche la plus virulente semble être la souche TT22/1 (Côte d'Ivoire), la souche la plus pathogène est 17/3 suc (Guinée) et la souche la moins pathogène et la moins virulente est la souche 68/6 (Guinée).

La variabilité parasitaire constitue l'un des éléments clés de la diversité de la réponse à l'infection. Il conviendrait alors d'orienter les recherches sur la génétique de *T. b. gambiense* notamment sur la détermination des gènes et des mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression de ces phénotypes. Pour ce faire, les souches 17/3 sang et 17/3 suc seront d'un grand intérêt.

## Références bibliographiques

### ➤ Articles scientifiques consultés

**Andrade S.G., Andrade V., Brodskyn C., Magalhaes J.B., Netto M.B., (1985).** Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 79:397-407.

**Authié E., Bringaud F., Bakalara N., Tetaud E., Baltz T., (1999).** Trypanosomoses humaines et animales: maladie du sommeil et nagana. *Annales de l'Institut Pasteur*, 10:27-50.

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

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

**Bisser S., Bouteille B., Sarda J., Stanghellini A., Ricard D., Jauberteau M.O., Marchan F., Dumas M., Breton J.C., (1997).** Apports des examens biochimiques dans le diagnostic de la phase nerveuse de la Trypanosomose Humaine Africaine. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 90 :321-326.

**Bouteille B., Buguet A., (2012).** The detection and treatment of Human African Trypanosomiasis. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 3:35-45.

**Bucheton B., MacLeod A., Jamonneau V., (2011).** Human host determinants influencing the outcome of *Trypanosoma brucei gambiense* infections: *Parasite Immunology*, 33:438-447.

**Burri C., (2010).** Chemotherapy against Human African Trypanosomiasis: is there a road to success? *Parasitology*, 137:1987-1994.

**Camara M., Camara O., Ilboudo H., Sakandé H., Kaboré J., N'Dri L., Jamonneau V., Bucheton B., (2010).** Sleeping sickness diagnosis: use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test. *Tropical Medicine & International Health*, 15:796-799.

**Cattand P., Jannin J., Lucas, P., (2001).** Sleeping sickness surveillance: an essential step towards elimination. *Tropical Medicine & International Health*, 6:348-361.

- Challier A., (1962).** Campagne de lutte contre *Glossina palpalis gambiensis* Vanderplank dans le foyer de Bamako (République du Mali). 9ème réunion du Comité Scientifique International de Recherches sur les Trypanosomiasés (CSIRT), Conakry.
- Chappuis F., Loutan L., Simarro P.P., Lejon V., Büscher P., (2005).** Options for field diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 18:133-146.
- Cecchi F., Filipe J.A.N., Barrett P.M., Chandramohan D., (2008).** The naturel progression of gambiense sleeping sickness: What is the evidence? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2.
- Cordon-Obras C., Berzosa P., Ndong-Mabale N., Bobuakasi L., Buatiche J.N., Ndongo-Asumu P., Benito A., Cano, J., (2009).** *Trypanosoma brucei gambiense* in domestic livestock of Kogo and Mbini foci (Equatorial Guinea). *Tropical Medicine & International Health*, 14:535-541.
- Cordon-Obras C., García-Estébanez C., Ndong-Mabale N., Abaga S., Ndongo-Asumu P., Benito, A., Cano J., (2010).** Screening of *Trypanosoma brucei gambiense* in domestic livestock and tsetse flies from an insular endemic focus (Luba, Equatorial Guinea). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4:e704.
- Courtin D., Jamonneau V., Mathieu J.-F., Koffi M., Milet J., Yeminanga C.S., Kumeso V.K.B., Cuny G., Bilengue C.M.M., Garcia A., (2006).** Comparison of cytokine plasma levels in Human African Trypanosomiasis. *Tropical Medicine & International Health*, 11:647-653.
- Courtin F., Dupont S., Zeze D.G., Jamonneau V., Sané B., Coulibaly B., Cuny G., Solano, P. (2005).** Trypanosomose Humaine Africaine: transmission urbaine dans le foyer de Bonon (Côte d'Ivoire). *Tropical Medicine & International Health*, 10:340-346.
- Courtin F., Sidibé I., Rouamba J., Jamonneau V., Gouro A., Solano P., (2009).** Impacts des évolutions démographiques et climatiques sur la répartition spatiale des hommes, des tsésé et des trypanosomoses en Afrique de l'Ouest. *Parasite*, 16:3-10.
- Doyle J.J., (1977).** Antigenic variation in the *Salivarian* Trypanosomes. In *Immunity to blood parasites of animals and man*. Springer, 31-63.
- Ersfeld K., Melville S.E., Gull K., (1999).** Nuclear and genome organization of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today*, 15:58-63.
- Garcia A., Courtin D., Solano P., Koffi M., Jamonneau V., (2006).** Human African

- Trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics. *Trends in Parasitology*, 22 :405-409.
- Garcia A., Jamonneau V., Magnus E., Laveisière C., Lejon V., N'Guessan P., N'Dri L., Van Meirvenne N., Buscher P., (2000).** Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitemic individuals in Cote d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population. *Annals of Tropical Medicine and International Health*, 75:786-793.
- Gibson W., (2001).** Sex and evolution in trypanosomes. *International Journal for Parasitology*, 31:643-647.
- Gibson W.C., Borst P., (1986).** Size-fractionation of the small chromosomes of *Trypanozoon* and *Nannomonas* trypanosomes by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 18:127-140.
- Giroud C., Ottones F., Coustou V., Dacheux D., Biteau N., Miezian B., Van Reet N., Carrington M., Doua F., Baltz T., (2009).** Murine models for *Trypanosoma brucei gambiense* disease progression-from silent to chronic infections and early brain tropism. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3:e509.
- Godfrey D.G., Baker R.D., Rickman L.R., Mehlitz D., (1990).** The distribution, relationships and identification of enzymic variants within the subgenus *Trypanozoon*. *Adv. Parasitol.* 29:1-74.
- Guedegbe B., Verhulst A., Van Meirvenne N., Pandey V.S., Doko A., (1992).** Indications sérologiques de l'existence d'un réservoir sauvage du *Trypanosoma brucei gambiense* dans la réserve de la biosphère de la Pendjari en République du Bénin. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 72 :113-120.
- Herbert, W.J., Lumsden W.H.R., (1976).** *Trypanosoma brucei*: a rapid 'matching' method for estimating the host's parasitemia. *Experimental Parasitology* , 40(3): 427-431. doi:10.1016/0014-4894(76)90110-7.
- Holzmuller P., Biron D.G., Courtois P., Koffi M., Bras-Gonçalves R., Daulouès S., Solano P., Cuny G., Vincendeau P., Jamonneau V., (2008).** Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei gambiense* field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics. *Microbes and Infection*, 10 :79-86.
- Ilboudo H., Jamonneau V., Camara M., Camara O., Dama E., Léo M., Ouendeno F.,**

- Courtin F., Sakandé, H., Sanon, R., et al., (2011).** Diversity of response to *Trypanosoma brucei gambiense* infections in the Forecariah mangrove focus (Guinea): perspectives for better control of sleeping sickness. *Microbes and Infection*, 13:943-952.
- Jamonneau V., Ravel S., Koffi M., Kaba D., Zeze D.G., N'Dri L., Sane B., Coulibaly B., Cuny G., Solano P., (2004).** Mixed infections of trypanosomes in tsetse and pigs and their epidemiological significance in a sleeping sickness focus of Cote d'Ivoire. *Parasitology*, 129:693-702.
- Jamonneau V., Ilboudo H., Kaboré J., Kaba D., Koffi M., Solano P., Garcia A., Courtin D., Laveissière C., Lingue K., (2012).** Untreated human infections by *Trypanosoma brucei gambiense* are not 100% fatal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6:e1691.
- Jannin J., Moulia-Pelat J.P., Chanfreau B., Penchenier L., Louis J.P., Nzaba P., De la Baume F.E., Eozenou P., Cattand P., (1993).** Trypanosomiase Humaine Africaine: étude d'un score de présomption de diagnostic au Congo. *Bulletin World Health Organisation*. 71:215-222
- Kabiri M., Franco J.B., Simarro P.P., Ruiz J.A., Sarsa M., Steverding D., (1999).** Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7. *Tropical Medicine & International Health*, 4:659-661.
- Kaboré J., MacLeod A., Jamonneau V., Ilboudo H., Duffy C., Camara M., Camara O., Belem A.M.G., Bucheton B., De Meeûs T., (2011a).** Population genetic structure of Guinea *Trypanosoma brucei gambiense* isolates according to host factors. *Infection, Genetics and Evolution*, 11:1129-1135.
- Kaboré J., Koffi M., Bucheton B., Macleod A., Duffy C., Ilboudo H., Camara M., De Meeus T., Belem A.M.G., Jamonneau V., (2011b).** First evidence that parasite infecting apparent aparasitemic serological suspects in Human African Trypanosomiasis are *trypanosoma brucei gambiense* and are similar to those found in patients. *Infection Genetics and Evolution*, 11:1250-1255.
- Kambiré R., Lingué K., Courtin F., Sidibé I., Kiendrébéogo D., N'Gouan K.E., Blé L., Kaba D., Koffi M., Solano P., Bucheton B., Jamonneau V., (2012).** La Trypanosomose Humaine Africaine dans l'espace ivoirio-burkinabé: optimisation des stratégies de surveillance épidémiologique. *Parasite*, 19:389-396.

- Keeling P., Leander B.S., Simpson A., (2009).** Eukaryotes. Eukaryota, organisms with nucleated cells. Version 28 October 2009.
- Kennedy P.G.E., (2004).** Human African Trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *Journal of Clinical Investigation*, 113 (4): 496-504. doi: 10.1172/JCI21052.
- Kennedy P.G.E., (2007).** Animal models of human African Trypanosomiasis-very useful or too far removed? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 101:1061-1062.
- 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 Tropica*, 98:183-188.
- Koffi M., De Meeûs T., Bucheton B., Solano P., Camara M., Kaba D., Cuny G., Ayala F.J., Jamonneau V., (2009).** Population genetics of *Trypanosoma brucei gambiense*, the agent of sleeping sickness in Western Africa. *PNAS*, 106 :209-214.
- Laveissière C., Grébaut P., Herder S., Penchenier L., (2000).** Les glossines vectrices de la Trypanosomiase Humaine Africaine (OCEAC).
- Lejon V., Jacobs J., Simarro P.P., (2013).** L'élimination de la maladie du sommeil se heurte à la difficulté du diagnostic. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*, 91:718.
- Lumsden W.H.R., Kimber C.D., Strange M., (1977).** *Trypanosoma brucei*: detection of low parasitemias in mice by a miniature anion-exchanger/centrifugation. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71:421-424.
- MacLean L., Odiit M., MacLeod A., Morrison L., Sweeney L., Cooper A., Kennedy P.G.E., Sternberg J.M., (2007).** Spatially and genetically distinct African Trypanosome virulence variants defined by host interferon- $\gamma$  response. *J. Infect. Dis.*, 196:1620-1628.
- Magnus E., Vervoort T., Van Meirvenne N., (1978).** A card-agglutination test with stained trypanosomes (CATT.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 58:169-176.
- Malvy D., Chappuis F., (2011).** Sleeping sickness. *Clinical Microbiology and Infection*, 17:986-995.
- Matthews K.R., Ellis J.R., Paterou A., (2004).** Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. *Trends in Parasitology*, 20:40-47.

**Morrison L.J., Tait A., McLellan S., Sweeney L., Turner C.M.R. MacLeod A., (2009).** A major genetic locus in *Trypanosoma brucei* is a determinant of host pathology. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3:e557.

**Morrison L.J., McLellan S., Sweeney L., Chan C.N., MacLeod A., Tait A., Turner C.M.R., (2010).** Role for parasite genetic diversity in differential host responses to *Trypanosoma brucei* infection. *Infection and Immunity*, 78:1096-1108.

**Morrison L.J., MacLeod A., (2011).** African Trypanosomiasis. *Parasite Immunology*, 33:421-422.

**Naessens J. (2006).** Bovine trypanotolerance: a natural ability to prevent severe anaemia and haemophagocytic syndrome? *Inter. J. Parasitol.*, 36:521-528.

**Ndo D., Nicolas A., Caix M., Bouteille B., Dumas M., Pestre-Alexandre M., (1991).** Techniques for collecting cerebrospinal fluid from sheep. *Progress in Veterinary Neurology*, 2.

**Ndoutamia G., Mbakasse R.N., Brahim A., Khadidja A., (2002).** Influence de la trypanosomose à *T. congolense* sur les paramètres hématologiques, minéraux et protéo-énergétiques chez les chèvres sahéliennes du Tchad. *Revue Méd. Vét.*, 153:395-400.

**Njiokou F., Nimpaye H., Simo G., Njitchouang G.R., Asonganyi T., Cuny G., Herder S., (2010).** Domestic animals as potential reservoir hosts of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness foci in Cameroon. *Parasite*, 17:61-66.

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

**Noyes H.A., Alimohammadian M.H., Agaba M., Brass A., Fuchs H., Gailus-Durner V., Hulme H., Iraqi F., Kemp S., Rathkolb B., (2009).** Mechanisms controlling anaemia in *Trypanosoma congolense* infected mice. *PLoS One*, 4(4):e5170. doi:10.1371/journal.pone.0005170.

**Ogbadoyi E., Ersfeld K., Robinson D., Sherwin T., Gull K., (2000).** Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma*, 108:501-513.

**Paris J., Murray M., McOdimba F., (1982).** A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African Trypanosomiasis in cattle. *Acta*



Tropica, 39:307-316.

**Pays, E., Vanhollenbeke, B., Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D.P., Perez-Morga, D., (2006).** The trypanolytic factor of human serum. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4:477-486.

**Rayaissé J.B., Courtin F., Akoundjin M., César J., Solano P., (2009).** Influence de l'anthropisation sur la végétation locale et l'abondance des tsé-tsé au sud du Burkina Faso. *Parasite*, 16 :21-28.

**Ricossé J.H., Challier A, Le Mao G., Albert J.P., Legait J.P., (1973).** L'épidémiologie actuelle de la Trypanosomiase Humaine Africaine et les problèmes qu'elle pose. *Médecine d'Afrique Noire* 20:291-300.

**Sanderson L., Dogruel M., Rodgers J., De Koning H.P., Thomas S.A., (2009).** Pentamidine movement across the murine blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers: effect of trypanosome infection, combination therapy, P-glycoprotein, and multidrug resistance associated protein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 329:967-977.

**Schweizer J., Pospichal H., Hide G., Buchanan N., Tait A., Jenni L., (1994).** Analysis of a new genetic cross between two East African *Trypanosoma brucei* clones. *Parasitology-Cambridge*, 109:83.

**Simarro P.P., Jannin J., Cattand P., (2008).** Eliminating Human African Trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? *PLoS Medicine*, 5(2): e55. doi:10.1371/journal.pmed.0050055.

**Simarro P.P., Diarra A., Postigo J.A.R., Franco J.R., Jannin, J.G., (2011).** The human African Trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000–2009: the way forward. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5:e1007.

**Solano P, Bouyer J, Itard J, Cuisance D., (2010).** The cyclical vectors of trypanosomosis. *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock* 13, 155–183.

**Stephen C.A., (1986).** Trypanosomiasis: A veterinary Perspective. Oxford: Pergamon Press.

**Sternberg J.M., (2004).** Human African Trypanosomiasis: clinical presentation and immune response. *Parasite Immunology*, 26:469-476.

**Tabel H., Kaushik R.S., Uzonna J.E., (2000).** Susceptibility and resistance to *Trypanosoma congolense* infections. *Microbes and Infection*, 2:1619-1629.

**Tongue L.K., Mavoungou J.F., Kamkumo R.G., Kaba D., Fako Hendji G.C., (2012).** Human African Trypanosomiasis in suburban and urban areas: A potential challenge in the

- fight against the disease. *J. Clin. Experiment. Pathol.*, S3: 2-3. doi: 10.4172/2161-0681.S300 2.
- Truc P., Bailey J.W., Doua F., Laveissière C., Godfrey D.G., (1994).** A comparison of parasitological methods for the diagnosis of gambian Trypanosomiasis in an area of low endemicity in Cote d'Ivoire. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88:419-421.
- Truc P., Formenty P., Diallo P.B., Komoin-Oka C., Lauginie F., (1997).** Confirmation of two distinct classes of zymodemes of *Trypanosoma brucei* infecting man and wild mammals in Cote d'Ivoire: suspected difference in pathogenicity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 91:951-956.
- Truc P., Jamonneau V., Cuny G., Frésil J.L., (1999).** Polymerase Chain Reaction in African Trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bulletin of the World Health Organization*, 77:745-749.
- Van Den Abbeele J., Claes Y., van Bockstaele D., Le Ray D., Coosemans M., (1999).** *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology*, 118:469-478.
- Vickerman K., (1985).** Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *British Medical Bulletin*, 41:105-114.
- Wickstead B., Ersfeld K., Gull K., (2004).** The small chromosomes of *Trypanosoma brucei* involved in antigenic variation are constructed around repetitive palindromes. *Genome Res.*, 14:1014-1024.
- Wombou T.C.M., Solano P., Bengaly Z., Jamonneau V., Bucheton B., (2011).** Experimental evaluation of xenodiagnosis to detect trypanosomes at low parasitaemia levels in infected hosts. *Parasite*, 18:295-302.
- Woo P.T.K., (1970).** The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. *Acta Tropica*, 27:613-634.

## ➤ Documents consultés

**Bengaly Z., (2003).** Pathogénicité comparée de 3 types phylogénétiques distincts de l'espèce *Trypanosoma congolense*. Thèse de doctorat es sciences, Université de Ouagadougou,

UFR/SVT. 116p + annexes.

**Directive 2010/63/UE du 22 septembre 2010** relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. 47p.

**Mathurin K., (2006).** Caractérisation génétique de *Trypanosoma brucei* s.l. : implications épidémiologiques et nouvelles perspectives. Thèse de doctorat en parasitologie ; Université de Montpellier II, 150p + annexes.

**N'DO S., (2006).** Etude comparée de la pathogénicité de quatre souches de *Trypanosoma congolense* chez les bovins. Mémoire d'ingénieur. 74p.

**World Health Organization (WHO, 2013).** Control and surveillance of human African Trypanosomiasis: report of a WHO expert committee. 250p.

## ➤ Sites internet consultés

**Cavalier-Smith T., (2004).** Only six kingdoms of life. Proceedings of the Royal Society of London-B 271, 1251-1262.  
<http://rspsb.royalsocietypublishing.org/content/271/1545/1251.short>. 14/11/2013 à 07:29:56.

**Cavalier-Smith T., (2010).** Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. Biology Letters, 6:342-345.  
<http://rsbl.royalsocietypublishing.org/content/6/3/342.short>. 14/11/2013 à 07:26:19.

**Devera R., Fernandes O., Coura J.R., 2003.** Should *Trypanosoma cruzi* be called 'cruzi' complex ? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762003000100001&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762003000100001&script=sci_arttext). 25/03.2014 à 07:06:24.

**Gibson W., Stevens J., Ruc P., (1999).** Identification of trypanosomes: from morphology to molecular biology. [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/pleins\\_textes\\_7/divers2/010018251.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_7/divers2/010018251.pdf). 30/10/2013 à 08:03:38.

**Johnson M., (2012).** Souris et Rats de Laboratoire. Materials and Methods fr2. <http://www.labome.fr/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>. 26/02/2014 à 08:12:45.

**OMS, 2013.** Trypanosomiase Humaine Africaine (maladie du sommeil). Aide-mémoire N°259. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/fr/>. 12/04/2014 à 10 :40.

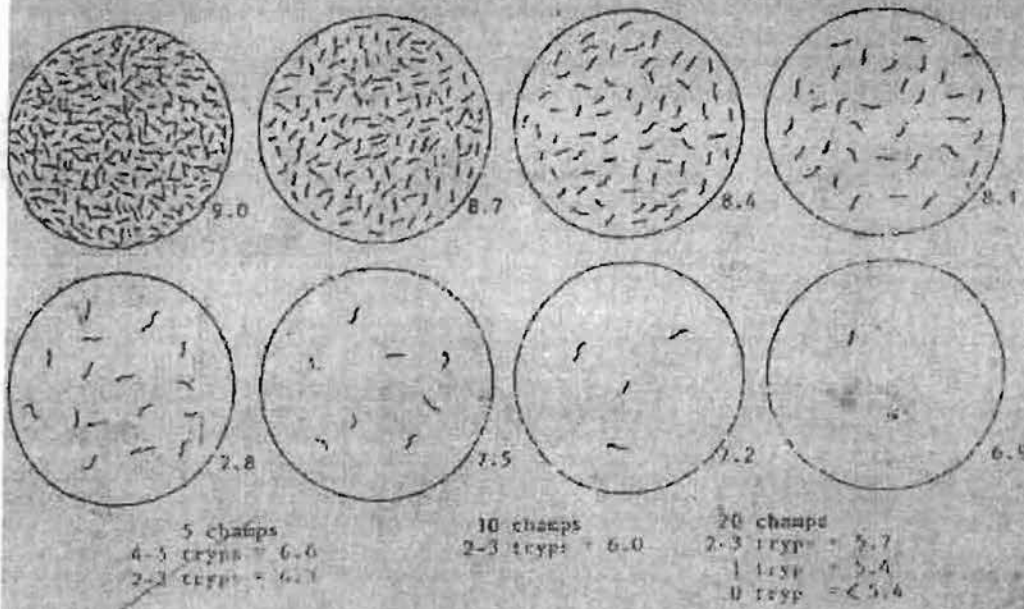
# **Annexes**

C - Techniques de dénombrement des trypanosomes

• Méthodes rapides d'estimation de la parasitémie

• méthode de Herbert et Lumsden (matching method) objectif No 1

Utilisable lors du diagnostic des trypanosomes sur état frais (pas de concentration).  
Examiner attentivement plusieurs champs de rétal frais et comparer l'impression visuelle  
avec les dessins ci-dessous. Trouver le dessin se rapprochant le plus de l'impression visuelle. Le  
chiffre indiqué l'antilog du nombre de trypanosomes par ml



antilog	5.4	5.7	6	6.3	6.6	6.9	7.2	7.5	7.8	8.1	8.4	8.7	9
nb de trypanos par ml ( $\times 10^6$ )	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	125	250	500	1000

Annexe 1 : Tableau d'estimation de la parasitémie (Herbert et Lumsden, 1976)

Souche :  
Date d'infection:

**Code de l'expérience :**  
Nature de l'animal de passage:

Parasitémie de passage  
Parasitémie d'inoculation

	Dates						
	Opérations						
	Souris						
Cage N°1							
Cage N°2							
Cage N°3							
Cage N°4							
Cage N°5							

**Annexe 2 : Fiche de suivi**