

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE
BOBO-DIOULASSO

UNITE DE FORMATION ET DE
RECHERCHE EN SCIENCES ET
TECHNIQUES

FILIERE GENIE BIOLOGIQUE

CENTRE INTERNATIONAL DE
RECHERCHE-DEVELOPPEMENT SUR
L'ELEVAGE EN ZONE SUBHUMIDE

UNITE DE RECHERCHE SUR LES BASES
BIOLOGIQUES DE LA LUTTE INTEGREE



RAPPORT DE FIN DE CYCLE

Pour l'obtention de la

LICENCE PROFESSIONNELLE EN GENIE BIOLOGIQUE

Option : Analyses Biologiques

Thème :

**Diagnostic moléculaire de *Trypanosoma brucei*
*gambiense (T. b. gambiense)***

Présenté et soutenu publiquement le 23 Décembre 2016

Par

SORGHO Sountong-Noma Faïzatou

Maitre de stage

Dr Jacques KABORE

Directeur de rapport

Pr Aboubacar TOGUYENI

DEDICACE

Je dédie ce travail :

*A mon père **SORGHO ABOUBACAR**, mon premier encadreur, depuis ma naissance ;*

*A ma très chère mère **OUEDRAOGO LEONTINE**, qu'elle trouve ici l'hommage de ma gratitude qui, si grande qu'elle puisse être, ne sera à la hauteur de ses sacrifices et ses prières pour moi ;*

*A mon frère et ma sœur, **SORGHO SALIF FAHDE, SORGHO FATOUMATA-BINTOU** à qui je souhaite beaucoup de réussite et de bonheur ;*

A mes amies et amis qui me sont chers, à tous ceux que j'aime, qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments les plus dévoués et mes vœux les plus sincères ;

Que Dieu le tout puissant vous préserve tous et vous procure sagesse et bonheur.

REMERCIEMENTS

Ce rapport de stage de fin de cycle est le résultat de six mois d'études profondes réalisées au cours de notre stage au laboratoire de diagnostic moléculaire du Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES). L'objectif de ce stage était d'obtenir une certaine aptitude pour la réalisation des analyses de biologie clinique de qualité afin de répondre au mieux aux futures tâches auxquelles nous sommes appelés. Tous ces travaux menés n'ont été possibles que grâce à l'apport de plusieurs personnes à qui nous voudrions bien exprimer notre profonde gratitude.

Grand merci :

- **au Dr Valentine C. YAPI-GNAORE**, Directrice générale du Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES) pour nous avoir reçue au sein de son institution ;
- **au Pr Aboubacar TOGUYENI**, Enseignant-chercheur à l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso et Chercheur au CIRDES, Directeur de mémoire pour son encadrement, sa disponibilité et ses encouragements ;
- **au Dr Jacques KABORE**, Enseignant-chercheur à Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso et Chercheur au CIRDES, Maître de stage pour l'honneur qu'il nous a faite en acceptant suivre ce travail. Qu'il trouve dans l'aboutissement de ce travail, le couronnement de ses efforts ;
- **au Dr Zakaria BENGALY**, Directeur scientifique du CIRDES pour sa disponibilité ;
- **au Dr Charles DAYO**, Chef de l'Unité de Recherche sur les Bases Biologiques de la lutte Intégrée (URBIO) du CIRDES, pour nous avoir reçus dans les locaux de son service ;
- **au Dr Hamidou ILBOUDO**, pour sa constante disponibilité, son sens de l'écoute et ses précieux conseils ;
- **au Dr Vincent JAMMONEAU**, Chercheur à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) pour son appui technique ;
- **au Dr Mathurin KOFFI**, Enseignant-chercheur à l'Université d'Abobo-Adjamé pour la bonne collaboration qui a permis l'aboutissement de ce travail ;
- **au Dr Emilie DAMA**, pour son soutien, sa sympathie et sa courtoisie ;
- **aux Drs Ernest SALOU, Bienvenu M. SOMDA** pour les conseils prodigués ;

- aux Techniciens **Hassane SAKANDE, Adrien ZOUNGRANA, Souleymane SYLLA, Léopold MILLOGO, Maurice KONKOBO, Victor BAZEMO, Oumar COULIBALY, Meme YOUL**, pour leurs soutiens multiformes ;
- à l'ensemble des étudiants stagiaires du CIRDES (**Justin KABORE, Mohamed BAMBA, Dieudonné OUATTARA**), mes camarades de la 1^{ère} Promotion de Génie-Biologique option : Analyses Biologiques et amis (**Saïdatou DAO, Anaïs DAMIBA, Abdourahmane OUANGRE, Arnaud ZOUGMORE**), retrouvez ici ma profonde amitié ;
- à l'endroit des **Chercheurs** et du **personnel du CIRDES** pour leur accueil et leur courtoisie.

Nous tenons à remercier particulièrement :

- **le Pr Georges Anicet OUEDRAOGO**, Président de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso pour nous avoir permis d'intégrer l'université ;
- **le Pr Sado TRAORE**, Directeur de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Techniques (UFR/ST) pour avoir autorisé la réalisation de ce stage ;
- **le Dr Lassina OUATTARA**, Directeur adjoint de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Techniques (UFR/ST) pour ses conseils et encouragements prodigués tout au long de notre formation ;
- **le Dr Roland MEDA**, Coordonnateur de la filière Génie-Biologique pour sa disponibilité et ses encouragements;
- **les enseignants-chercheurs et l'administration de l'UFR/ST** pour leurs aides multiformes et les enseignements reçus lors de notre formation.

Nous devons beaucoup à toutes personnes qui de près ou de loin nous ont toujours témoigné de leur soutien par des prières, des encouragements, des conseils, des services, des gestes d'amitié et de fraternité. La liste étant très longue, nous leur demandons de bien vouloir trouver à travers ces lignes, l'expression de notre reconnaissance pour tous ces sacrifices consentis.

TABLES DES MATIERES

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
SIGLES ET ABREVIATIONS	vi
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ANNEXES	viii
RESUME	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	2
I- La Trypanosomose Humaine Africaine (THA)	3
I-1 Définition et répartition géographique	3
I-2 Evolution de la THA au cours du 20 ^{ème} siècle et situation actuelle.....	4
I-3 Conséquences socio-économiques de la THA	5
II-Agent pathogène de la THA : le Trypanosome	7
II-1 Définition et taxonomie	7
II-2 Morphologie et cycle biologique	10
II-3 Variation antigénique	12
II-4 Génome des trypanosomes	14
III-3 Diagnostic et traitement de la THA	14
III-3-1 Méthodes de diagnostic indirect.....	14
III-3-2 Méthodes de diagnostic direct.....	15
III-3-3 Méthodes de Diagnostic moléculaire	16
III-3-4 Diagnostic de phase et traitement.....	17
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	18
CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES	19
I-Matériels	19
I-1 Equipements.....	19
I-2 Réactifs et consommables.....	20
I-3 Matériel biologique	20
II-Méthodes	22
II-1 Extraction d'ADN.....	22
II-2 Contrôle de pureté et quantification des ADN.....	22

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Répartition géographique et classification des pays en fonction du niveau d'endémicité (Simarro <i>et al.</i>, 2011)	4
Figure 3: Morphologie de <i>T. brucei</i> (Laveissière <i>et al.</i>, 2000).....	10
Figure 4: Cycle de développement du trypanosome (CDC, 2015).....	12
Figure 5: Evolution de la parasitémie dans le sang de l'hôte en fonction du temps, illustration du phénomène de la variation antigénique	13
Figure 6: Spectre d'Absorption de l'ADN pur dans l'UV.....	23
Figure 7: Spectre d'Absorption typique d'ADN pur obtenue sur un NanoDrop.....	23
Figure 8: Exemple de révélation d'une PCR TBR1/2 sur gel d'agarose	29
Figure 9: Exemple de révélation d'une PCR TgsGP sur gel d'agarose.....	30
Figure 10 : révélation d'une PCR AnTat A/B sur gel d'agarose.....	31
Figure 11: Exemple de révélation d'une Nested PCR (Génotypage par des microsatellites) sur gel d'agarose aux UV.....	32

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Caractéristiques des échantillons utilisés	21
Tableau II: Valeurs de références du rapport $R = A_{260nm}/A_{280nm}$ pour le contrôle de pureté.....	22
Tableau III: Composition du mix pour la PCR TBR1/2	25
Tableau IV: Composition du mix pour la PCR TgsGP	25
Tableau V: Composition du mix pour la PCR AnTatA/B.....	26
Tableau VI: Composition du mix pour la Nested PCR	27

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Protocole d'extraction d'ADN Génomique au DNeasy à partir de sang total	xii
Annexe 2: Résultats du dosage et contrôle de pureté des échantillons d'ADN testés	xiii
Annexe 3: Résultats des différentes PCR.....	xiv
Annexe 4: Séquences des amorces TBR1/2, TgsGP et AnTatA/B	xvi
Annexe 5: Liste des marqueurs microsatellites	xvii
Annexe 6: Equipements	xviii

SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN	: Acide Désoxyribonucleique
BC	: Buffy –Coat
CATT	: Card Agglutination Test for Trypanosomiasis
CIRDES	: Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide
DFMO	: Difluoro-méthyl-ornithine
dNTP	: Désoxynucléotide triphosphate
ELISA	: Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay
LCR	: Liquide Céphalo-Rachidien
mAECT	: miniature Anion Exchange Centrifugation Technique
NECT	: Nifurtimox-Eflornithine Combinaison Therapy
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PCR	: Polymerase Chain Reaction
QBC	: Quantitative Buffy-Coat
SNC	: Système Nerveux Central
<i>T. b. g</i>	: <i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
TBE	: Tris Borate EDTA
THA	: Trypanosomiase Humaine Africaine
UI	: Unité Internationale
VAT	: Variant Antigen type
VSG	: Variable surface Glycoprotein

II-3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR=Polymerase Chain Reaction)	24
II-3-1 Principe de la PCR.....	24
II-3-2 Amplification de l'ADN	24
II-4 PCR TBR 1/2.....	24
II-5 PCR TgsGP.....	25
II-6 PCR AnTat A/B.....	26
II-7 Génotypage Microsatellites	26
II-8 Révélation par électrophorèse sur gel d'agarose	27
II-9 Exploitation des données	28
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION.....	29
I-Résultats	29
I-1. Dosage des ADN.....	29
I-2. PCR TBR1/2	29
I-3. PCR TgsGP.....	30
I-4. PCR AnTat A/B	31
I-5. Génotypage Microsatellites	32
II-Discussion	33
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	35
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	36
ANNEXES.....	xi

RESUME

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil est une affection parasitaire à transmission vectorielle due à un euglénozoaire kinéoplastidé de l'espèce *Trypanosoma brucei*. La complexité de la maladie est fréquemment évoquée, allant des formes asymptomatiques à des formes aiguës d'où la nécessité de poser un diagnostic fiable. La présente étude est focalisée sur l'identification du point de vue moléculaire de *Trypanosoma brucei gambiense*. L'identification de *T. b. gambiense* est un acte diagnostique essentiel pour la mise en place d'un traitement. A cet effet, nous avons utilisé des techniques de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) de génotypage par les microsatellites. En appliquant ces techniques à 25 échantillons, nous avons obtenu les résultats suivants : PCR TBR1/2 = 25 positifs, PCR TgsGP = 9 positifs, PCR AnTatA/B = 21 positifs, Génotypage M6C8 = 15 positifs, Génotypage Micbg6 = 13 positifs, Génotypage Misatg4 et Misatg9 = 14 positifs. Il ressort ainsi de cette étude que les échecs d'amplification par PCR rencontrés seraient dus notamment, à la faible quantité d'ADN de trypanosomes dans nos échantillons mais aussi, au manque de spécificité et/ou de sensibilité des marqueurs utilisés pour identifier spécifiquement *T. b. gambiense*. Néanmoins, en tenant compte des souches de références disponibles, nous avons pu détecter la présence d'ADN de trypanosomes dans nos échantillons.

Mots-clés : Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ; *Trypanosoma brucei gambiense* ; PCR ; génotypage ; microsatellites.

ABSTRACT

Human African Trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is a parasitic disease caused by kinetoplastid euglenozoa, *Trypanosoma brucei*. The complexity of the clinical evolution of the disease is frequently mentioned ranging from asymptomatic to acute forms, it is important to lay reliable diagnosis. In fact, our study is carried out on the molecular identification of *Trypanosoma brucei gambiense*. Identification of *T. b. gambiense* is essential for putting an adapted treatment. In this context, we used PCR and Microsatellite Genotyping techniques. The application of these techniques showed different results: PCR TBR1/2 = 25 positive, PCR TgsGP = 9 positive, PCR AnTatA/B = 21 positive, Genotyping M6C8 = 15 positive, Genotyping Micbg6 = 13 positive, Genotyping Misatg4 and Misatg9 = 14 positive. The results of this study show that the PCR amplification failures encountered would be due notably to the small amount of trypanosome DNA in our samples but also to the lack of specificity and / or sensitivity of the markers used to specifically identify *T. b. gambiense*. Nevertheless, taking into account the available reference strains, we were able to detect that trypanosome DNA was present in our samples.

Key-Words: Human African Trypanosomiasis (HAT)-*Trypanosoma brucei gambiense*-PCR-Microsatellite- genotyping.

INTRODUCTION

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil est une affection parasitaire due à un protozoaire de l'espèce *Trypanosoma (T.) brucei (b.)*. La transmission du parasite à l'homme est assurée par un insecte vecteur hématophage du genre *Glossina* ou glossine, communément appelé mouche tsé-tsé, présente exclusivement en Afrique subsaharienne. *T. b. gambiense* est responsable de plus de 98 % des cas de la maladie du sommeil en Afrique de l'Ouest et Centrale (Franco *et al.*, 2014). Classiquement, la maladie est caractérisée par une première phase lymphatico-sanguine suivie de la deuxième phase méningo-encéphalique conduisant à la mort si elle n'est pas traitée.

Le diagnostic de la THA est basé généralement sur les méthodes de diagnostic indirect (tests sérologiques) et sur les méthodes de diagnostic direct (tests parasitologiques). Ces tests manquent souvent de sensibilité et/ou de spécificité. Afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic, des techniques basées sur la détection de l'ADN des trypanosomes ont été récemment développées et évaluées (Jamonneau *et al.*, 2004). Cependant, ces techniques moléculaires rencontrent aussi des difficultés quant à l'identification moléculaire de la sous-espèce *T. b. gambiense*.

Pour pallier à ces difficultés, des études antérieures effectuées sur la diversité génétique des trypanosomes ont permis de mettre au point des marqueurs microsatellites très prometteurs pour étudier la variabilité génétique au sein de l'espèce *Trypanosoma brucei*. Notre étude a pour objectif l'utilisation des techniques moléculaires pour l'identification de *T. b. gambiense*. L'objectif principal de notre travail est d'identifier spécifiquement *T. b. gambiense*.

Le présent rapport comprend deux parties :

- ❖ la première partie, la synthèse bibliographique qui fait un état de l'art des connaissances sur la THA ;
- ❖ la deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale avec la partie matériel & méthodes suivie de la partie résultats & discussion.

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I- La Trypanosomose Humaine Africaine (THA)

I-1 Définition et répartition géographique

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) communément appelée maladie du sommeil est une maladie parasitaire endémique, à transmission vectorielle. Deux sous espèces de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) sont responsables de la THA. Il s'agit de *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*) responsable de la forme aiguë de la maladie rencontrée en Afrique de l'Est et de *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*), responsable de la forme chronique de la maladie rencontrée en Afrique Centrale et de l'Ouest (Simarro *et al.*, 2008). La transmission s'effectue par la mouche tsé-tsé (Ravel *et al.*, 2006) chez qui a lieu une partie du cycle de développement des trypanosomes à l'issue duquel ils se fixent au niveau des glandes salivaires (Van Den Abbeele *et al.*, 1999).

La THA causée par *T. b. gambiense* ou *T. b. rhodesiense* est transmise par les glossines ou mouches tsé-tsé. Les glossines du groupe *palpalis* sont en effet spécifiques à l'Afrique de l'Ouest. Elles constituent les principaux vecteurs de la forme gambiense et sont rencontrées dans les abords des lacs et des rivières des zones boisées ou anciennement boisées et dans les zones à forte activité agricoles (Bouteille & Buguet, 2012). Les glossines du groupe *morsitans* sont quant à elles, spécifiques à l'Afrique de l'Est. Les glossines constituent les vecteurs biologiques des trypanosomes en ce sens qu'elles abritent une partie du cycle évolutif des trypanosomes. Une glossine infectée 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; Kennedy, 2004).

La THA constitue une menace dans 36 pays d'Afrique subsaharienne (**Figure 1**). 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 (Solano *et al.*, 2010). De ce fait, la THA n'est pas rencontrée sur toute la zone de répartition de la glossine (Malvy & Chappuis, 2011; Solano *et al.*, 2010).

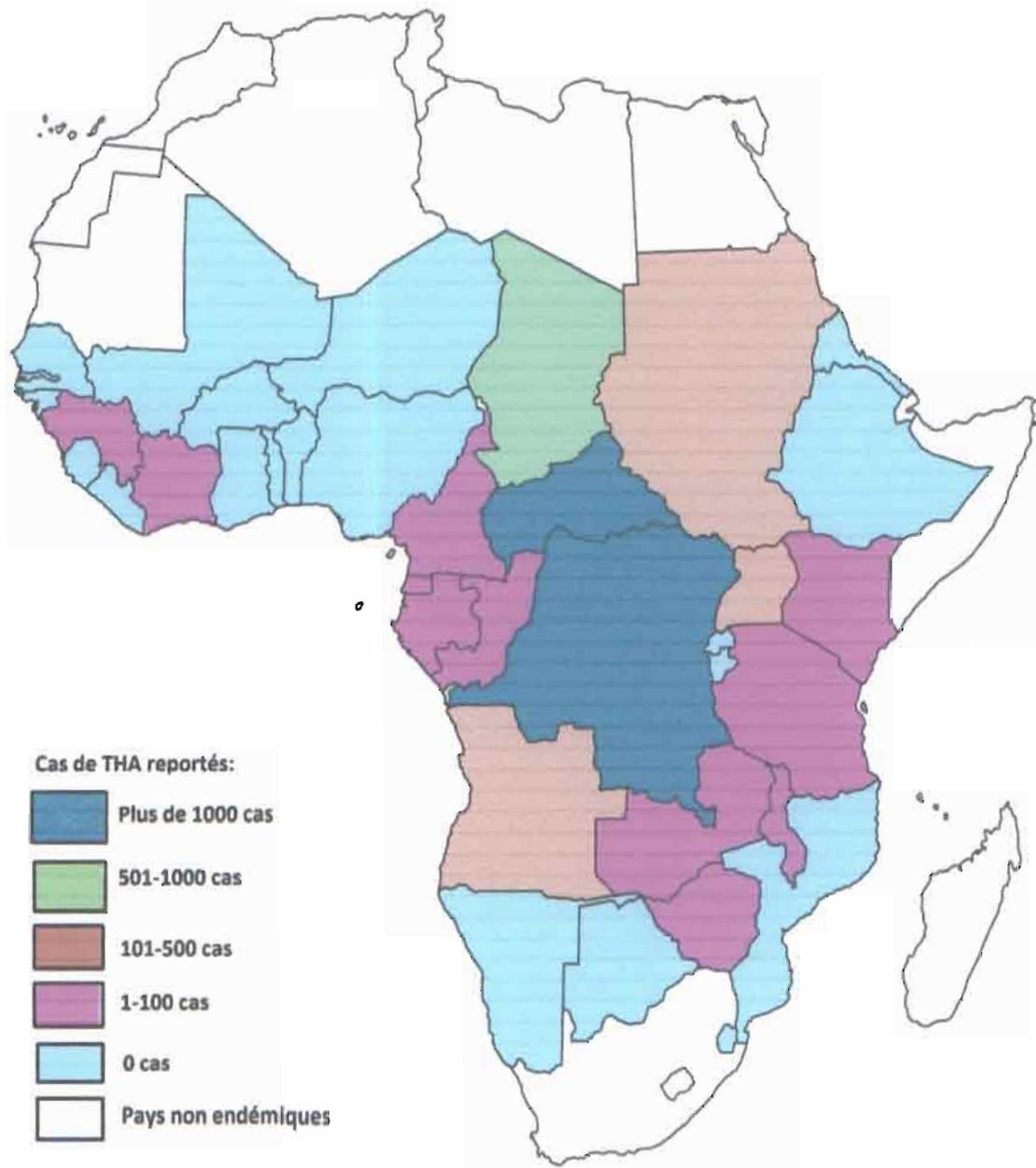


Figure 1: Répartition géographique et classification des pays en fonction du niveau d'endémicité (Simarro *et al.*, 2011)

I-2 Evolution de la THA au cours du 20^{ème} siècle et situation actuelle

L'Afrique a connu au siècle dernier trois grandes épidémies de THA ; La première a eu lieu entre 1896 et 1906, la deuxième en 1920 et la plus récente a eu lieu en 1970. Ces épidémies ont été combattues par des équipes mobiles qui ont organisé le dépistage chez des millions de personnes à risque. Vers le milieu des années 1960, la maladie avait presque entièrement disparu. Cependant, elle a commencé à réapparaître dans la plupart des foyers historiques à partir des années 1970 pour atteindre à nouveau dans les années 1990, des niveaux comparables

à ceux observés lors de l'épidémie précédente (WHO, 1998). Si la baisse des moyens financiers consacrés à la surveillance par les pays des foyers connus et l'instabilité politique et sociale, sont des facteurs qui ont certainement joué un rôle déterminant dans cette réémergence; D'autres facteurs, d'ordre biologique et épidémiologique, ont également contribué de manière significative. Au début des années 2000, le nombre de personnes infectées dans le monde était estimé entre 300 000 et 500 000 par l'OMS. En 2004, après un effort considérable de lutte en Afrique Centrale notamment, environ 25 000 cas ont été rapportés et l'OMS en 2005, annonçait le retour à une situation où l'élimination de la maladie du sommeil comme problème de santé publique était envisageable. En 2009, le nombre de cas notifiés par l'OMS est passé en dessous de 10 000 (9 689) pour la première fois en 50 ans. En 2008 et 2009, seules la République Démocratique du Congo et la République Centrafricaine déclaraient plus de 1 000 cas par an. L'Angola, le Tchad, le Soudan et l'Ouganda ont déclaré entre 100 et 1000 nouveaux cas par an. Des pays tels que le Cameroun, le Congo, la Côte d'Ivoire, le Gabon, la Guinée, la Guinée équatoriale, le Kenya, le Malawi, la Tanzanie, la Zambie et le Zimbabwe font désormais état de moins de 100 nouveaux cas par an. Le Benin, le Botswana, le Burkina Faso, le Burundi, l'Éthiopie, la Gambie, le Ghana, la Guinée-Bissau, le Libéria, le Mali, le Mozambique, la Namibie, le Niger, le Rwanda, le Sénégal, la Sierra Leone, le Swaziland et le Togo n'ont notifié aucun nouveau cas depuis plus de 10 ans. Notons cependant que des cas rares venant de la Côte d'Ivoire ont été dépistés au Burkina-Faso ces dernières années. Si cette situation de rareté des cas semble de plus en plus encourageante, ces chiffres ne reflètent que partiellement la réalité du fait de l'existence de nombreuses zones à risque qui demeurent sans surveillance à cause de l'instabilité sociale et/ou des difficultés d'accès qui font obstacle aux activités de surveillance et de diagnostic. Actuellement, on estime que 60 millions de personnes sont exposées au risque de contracter la THA en Afrique subsaharienne, avec moins de 10 000 nouveaux cas rapportés annuellement et le nombre de cas effectifs compris entre 50 000 et 70 000 (Simarro *et al.*, 2011). En 2010 le nombre de nouveaux cas était de 6978, en 2011 de 6637 et en 2012 de 7106 (WHO., 2013).

I-3 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); par conséquent, elle entrave le bien-être des populations dans les zones infectées. 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). En effet, suite aux trois grandes épidémies qu'a connues l'Afrique, Winston Churchill, homme politique britannique, estimait en 1906 que la population de l'Ouganda était passée de 6,5 à 2,5 millions d'habitants. La THA était alors classée parmi les deux premières causes de mortalité importante. Pendant la même période, la prévalence atteignait 50% dans plusieurs villages de la République Démocratique du Congo, de l'Angola et du Sud Soudan. Or, la plupart des malades en phase méningo-encéphalique 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. La THA se positionne alors comme une maladie invalidante et mortelle qui est à la base 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 effet, 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) et celle du groupe *palpalis* s'adapte bien aux fortes densités humaines, aux zones urbaines et périurbaines des régions infectées, notamment en Afrique de l'Ouest. 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; Courtin *et al.*, 2009; Tongue *et al.*, 2012). Ainsi, Bamako fut le premier foyer urbain de la THA et ce, seulement au lendemain des (Challier, 1962; Ricossé *et al.*, 1973). Depuis, d'autres cas ont été signalés, le plus récent étant celui de Bonon en Côte d'Ivoire en 2005 (Courtin *et al.*, 2005).

Des cas de THA due à *T. b. rhodesiense* sont fréquemment rencontrés chez les voyageurs, infectés pour la plupart dans les parcs de jeu en Tanzanie, au Kenya ou en Malawi (Jelinek *et al.*, 2002; Migchelsen *et al.*, 2011). Ainsi donc, la THA ne demeure pas un problème africain ; elle tend plutôt à devenir une maladie cosmopolite avec certainement de graves conséquences socio-économiques que cela pourrait engendrer notamment sur le secteur du tourisme.

Pour contrer ce fléau, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et ses partenaires ont initié plusieurs stratégies de lutte, pouvant être regroupées en deux volets : d'une part, le

dépistage des populations à risque et le traitement des malades; et de l'autre, 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.

II-Agent pathogène de la THA : le Trypanosome

II-1 Définition et taxonomie

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés sanguicoles exoérythrocytaires ; ce sont des êtres vivants constitués d'une seule cellule munie d'un flagelle. Ils se trouvent dans le sang où ils se déplacent entre les différentes cellules du sang comme les globules rouges et les globules blancs et dans d'autres liquides biologiques.

La taxonomie subspécifique du complexe *Trypanosoma brucei ssp* a toujours été très discutée. Ces dernières années, des travaux basés sur des analyses phylogénétiques des séquences clonées d'ADNr, après amplification par PCR ont donné la classification suivante (Cavalier-Smith, 2004) de l'espèce *Trypanosoma brucei*. *Trypanosoma brucei* appartient au domaine des *Eukaryota*, au sous-domaine des *Bikonta* (avec les plantes et les algues brunes), au règne des *Excavata* ou *Excavabionta* (avec les *Metamonadina* dont *Giardia sp*), au super-embranchement des *Discicristata* (avec les *Percolozoa* dont *Naegleria sp*), à l'embranchement (phylum) des *Euglenozoa* (avec les euglènes) puis à la classe *Kinetoplastea*, à l'ordre *Trypanosomatida*, à la famille *Trypanosomatidae* et au genre *Trypanosoma* (Keeling. *et al.*, 2009) (**Figure 2**). Le genre *Trypanosoma* comporte huit sous-genres regroupés en deux sections: Stercoraria et Salivaria.

- La section Stercoraria se caractérise par un mode de transmission "postérograde". Les formes métacycliques infectantes se trouvent dans la partie postérieure du tube digestif. La transmission chez l'hôte vertébré se fait après dépôt de fèces, par pénétration des trypanosomes dans la peau. Cette section comprend trois sous-genres : Megatrypanum (*Trypanosoma theileri*), Herpetosoma (*Trypanosoma lewisi*) et Schizotrypanum (*Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas).
- La section Salivaria se caractérise par un mode de transmission "antérograde". Les parasites infectants sont dans la partie antérieure du tube digestif. La transmission chez l'hôte vertébré se fait par inoculation, lorsque le vecteur (insecte) injecte sa salive au moment de la piqûre qui précède immédiatement la prise d'un repas sanguin. Les

Diagnostic moléculaire de *Trypanosoma brucei gambiense*

trypanosomes pathogènes existant sur le continent africain appartiennent tous à la section des Salivaria. Elle se compose de cinq sous-genres : Duttonella (*T. vivax*, *T. uniforme*), Nannomonas (*T. congolense*, *T. simiae*, *T. godfreyi*), Tejeraia, Pycnomonas (*T. suis*) et Trypanozoon (*T. brucei*, *T. evansi* et *T. equiperdum*).

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

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

- *Trypanosoma brucei gambiense*, est l'agent de la maladie du sommeil chez l'homme en Afrique Centrale et Occidentale. Ce parasite est transmis par les glossines du groupe *Glossina palpalis* (*G. palpalis*, *G. fuscipes* et *G. tachinoïdes*) au niveau des forêts galeries qui bordent les bords des eaux. Il provoque classiquement une maladie de type chronique.
- *Trypanosoma brucei rhodesiense*, est responsable de la forme aiguë de la maladie du sommeil chez l'homme en Afrique de l'Est. Ce parasite est transmis par les glossines du groupe *Glossina morsitans* (*G. morsitans*, *G. pallidipes* et *G. swynnertoni*). Il provoque typiquement une forme aiguë de la maladie.
- *Trypanosoma brucei brucei*, non pathogène pour l'homme, est responsable du nagana des mammifères domestiques et sauvages. Le nagana sévit sur toute l'aire de répartition du parasite.

Figure 2: Arbre phylogénétique des Eucaryotes (Keeling, *et al.*, 2009)



II-2 Morphologie et cycle biologique

Les trypanosomes sont des cellules fusiformes et aplaties, avec une membrane ondulante plus ou moins enroulée autour du corps et prolongée vers l'avant par un flagelle libre (**Figure 3**). Cependant, leur taille varie selon l'espèce *T. brucei ssp*, mesure de 12 à 42 μm de long sur 2 à 3 μm de large. Ils se multiplient essentiellement par division binaire longitudinale. En microscopie optique, outre les constituants fondamentaux de la cellule (noyau, cytoplasme et membrane), les trypanosomes se caractérisent par la présence d'un kinétoplaste (organite cytoplasmique) et d'un flagelle rattaché à la paroi du corps par une membrane ondulante. Le kinétoplaste est situé dans la partie postérieure de la cellule, près du corps basal du flagelle, à l'intérieur de la grande mitochondrie qui s'étend sur toute la longueur du corps cellulaire, il contient de l'ADN extra nucléaire. Le flagelle, dirigé vers l'avant, naît d'un corps basal situé à l'intérieur de la poche flagellaire et assure la mobilité du trypanosome.

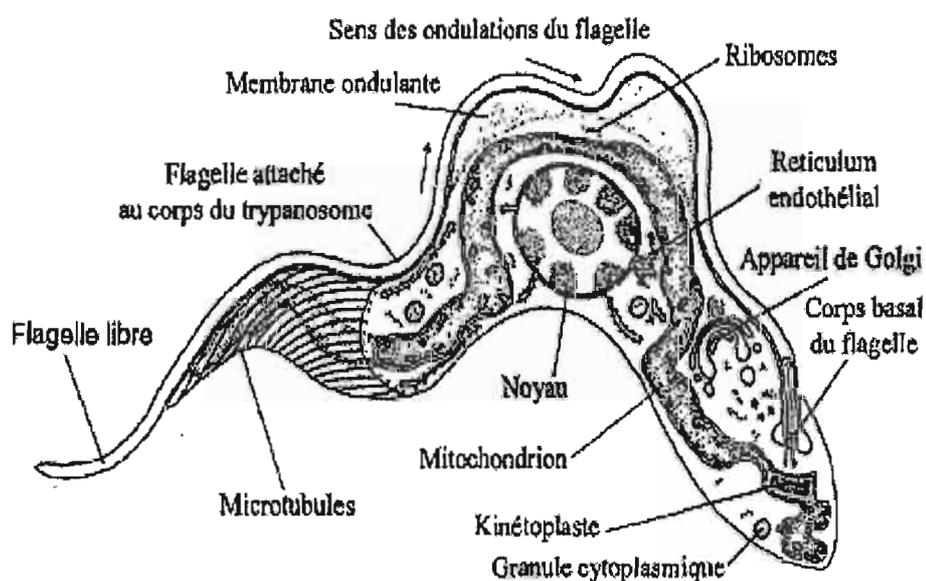


Figure 3: Morphologie de *T. brucei* (Laveissière *et al.*, 2000)

Diagnostic moléculaire de *Trypanosoma brucei gambiense*

Le cycle des trypanosomes s'effectue à la fois chez la glossine et chez l'hôte mammifère. En effet, la glossine ingurgite les trypanosomes (les formes courtes) 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 non infectieuses ou « slenders ». Les « slenders » migrent dans la glande salivaire où elles sont transformées en formes épimastigotes qui deviendront des formes courtes appelées « stumpy » ou formes métacycliques infectieuses. La durée du cycle dépend de l'espèce de trypanosome ; elle est estimée en moyenne à 30 jours pour *T. brucei*. Lorsque cette glossine infectée pique un mammifère, elle lui injecte les formes métacycliques infectantes. Ces dernières entament une multiplication au point de piqûre entraînant une réaction inflammatoire qui donne dans le cas de l'infection due à *T. b. rhodesiense* une sorte de furoncle appelé chancre ou trypanome ; c'est le premier signe clinique et apparaît environ cinq (5) à quinze (15) jours après la piqûre infectante. Or dans le cas de l'infection due à *T. b. gambiense*, les premiers symptômes apparaissent en moyenne trois (3) ans après. Le chancre est rare dans l'infection à *T. b. gambiense*. Les trypanosomes envahissent ensuite le sang, les nœuds lymphatiques et les autres tissus et organes, en particulier le système nerveux central (Kennedy, 2004). Le cycle des trypanosomes est résumé dans la figure ci-dessous (**Figure 4**).

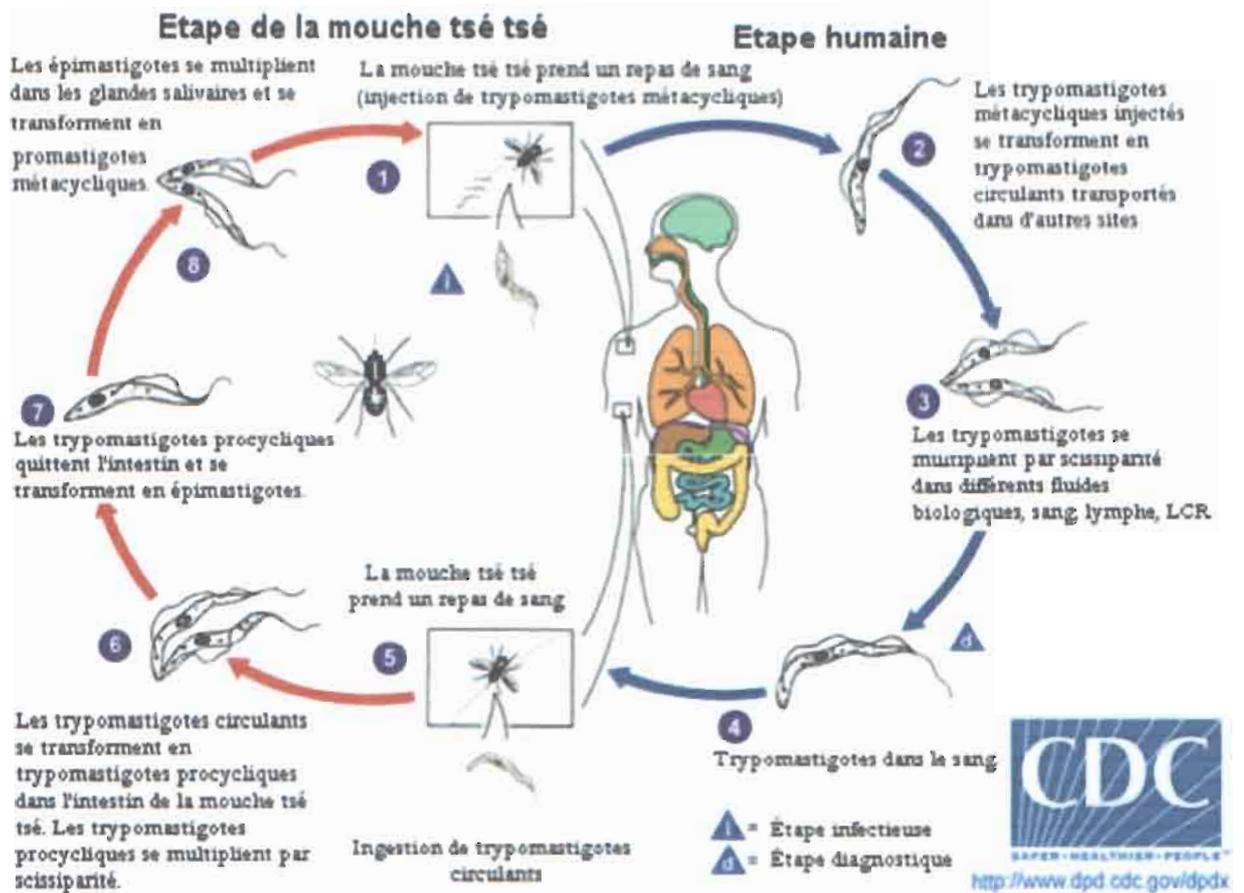


Figure 4: Cycle de développement du trypanosome (CDC, 2015)

II-3 Variation antigénique

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

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.

Dans la circulation sanguine, les trypanosomes ont la propriété de changer continuellement de spécificité antigénique (Bengaly, 2003) ; la conséquence de ce phénomène est la variation antigénique. En effet, les VSG sont recouverts 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 VSG 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. Chaque pic de la parasitémie correspond à un pic de fièvre chez l'hôte.

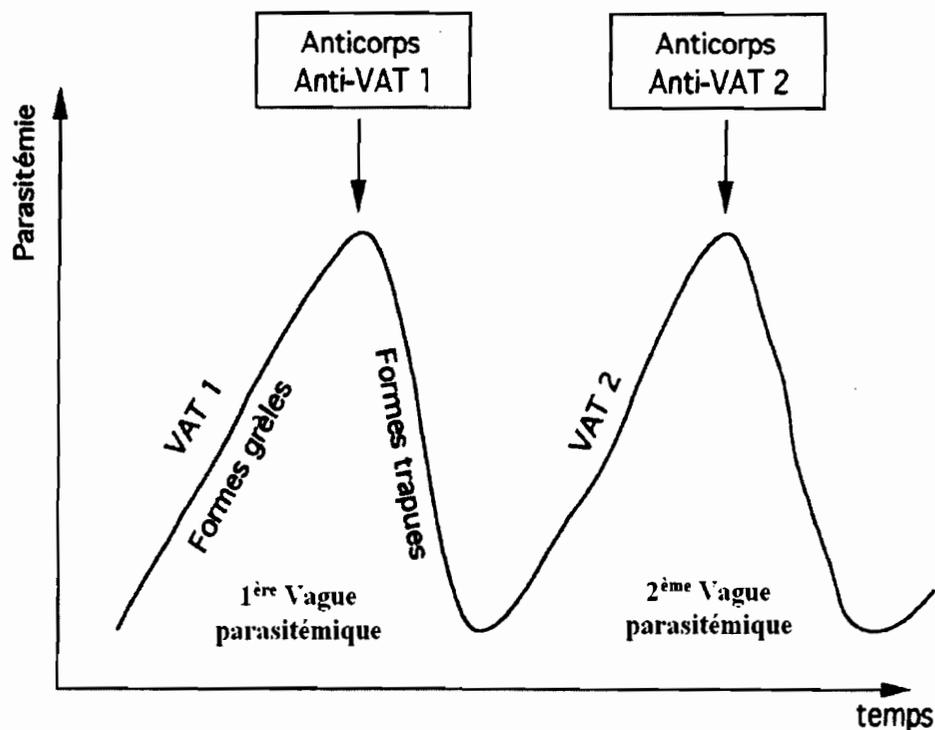


Figure 5: Evolution de la parasitémie dans le sang de l'hôte en fonction du temps, illustration du phénomène de la variation antigénique

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

antigénique pour former une nouvelle population VAT 2. Les trypanosomes reprennent leur forme grêle de division et sont à l'origine d'une deuxième vague parasitémique responsable d'une nouvelle réaction immunitaire (fabrication d'anticorps anti-VAT 2).

II-4 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 mini chromosomes. Les chromosomes intermédiaires sont essentiellement formés de gènes codant pour les VSG et les petits ou mini chromosomes ont pour rôle de stocker les gènes inexprimés pour la variation antigénique (Ogbadoyi *et al.*, 2000).

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 de 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.

III-3 Diagnostic et traitement de la THA

Le diagnostic de la THA causée par *T. b. gambiense* est une opération cruciale du fait, d'une part, de l'absence de symptômes spécifiques pendant la première phase et de l'autre, de l'utilisation de médicaments toxiques pour le traitement de la deuxième phase.

III-3-1 Méthodes de diagnostic indirect

Le diagnostic sérologique permet de mettre en évidence les signes indirects d'infection par la recherche d'antigènes et anticorps spécifiques dans le sang, le plasma ou le sérum. C'est un excellent outil épidémiologique des trypanosomoses, car il permet de sélectionner les malades, sur lesquels seront effectués les examens parasitologiques. Le diagnostic indirect peut s'effectuer aussi bien au laboratoire que sur le terrain avec des méthodes adaptées pour chaque cas.

La méthode de diagnostic sérologique de terrain la plus utilisée pour la détection des anticorps est le CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis). Le réactif du CATT est

une suspension lyophilisée de trypanosomes sanguicoles fixés, stabilisés et colorés au bleu de Coomassie. 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. 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) est effectué sur tous les individus positifs au CATT/sg. Cependant, des problèmes de sensibilité et de spécificité existent. Le LATEX / *T. b. gambiense* (Buscher *et al.*, 1999) a pour se faire été développé, mais les problèmes de sensibilité et de spécificité demeurent.

Le dosage immuno-enzymatique appelé Enzyme Linked Immunosorbant Assay, (ELISA) (Luckins, 1977) est le test immunologique couramment utilisée au laboratoire. Elle permet de détecter les anticorps produits contre les antigènes des trypanosomes. Comme les techniques précédentes, elle est peu spécifique du fait notamment qu'elle ne permet pas de déterminer si l'infection est passive ou active (les anticorps ont la capacité de persister plusieurs mois après la guérison).

Face à la difficulté d'établir un diagnostic sérologique fiable et à la toxicité avérée des produits utilisés pour le traitement des patients, il sera toujours impératif de confirmer le diagnostic avec des méthodes parasitologiques avant de débiter le traitement.

III-3-2 Méthodes de diagnostic direct

Il 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 Liquide Céphalo Rachidien) du patient. La recherche du parasite dans le sang s'effectue par une observation de frottis, de la goutte épaisse ou de sang frais au microscope. La parasitémie est souvent très faible (Truc *et al.*, 1994) dans le cas de l'infection due à *T. b. gambiense*. 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) et le Quantitative Buffy Coat (QBC) sont utilisés. Parmi les techniques ci-dessus citées, la mAECT pourrait être la méthode parasitologique la plus sensible avec un seuil de détection de 10 parasites/ml en utilisant le Buffy Coat en amont. Elle peut être utilisée au laboratoire et sur le terrain. Les techniques parasitologiques sont cependant peu sensibles (Koffi *et al.*, 2006).

Diagnostic moléculaire de *Trypanosoma brucei gambiense*

Face au manque de sensibilité et de spécificité des techniques parasitologiques et sérologiques ci-dessus citées, la biologie moléculaire serait une alternative d'avenir. En effet, l'amplification des séquences spécifiques d'ADN parasite appelée Polymerase Chain Reaction (PCR) est plus sensible que les techniques classiques du fait qu'elle peut détecter les infections précoces (Bengaly *et al.*, 2001).

III-3-3 Méthodes de Diagnostic moléculaire

Les premières études moléculaires se sont basées sur le développement de sondes ADN spécifiques d'espèces de trypanosomes. Puis, à partir de ces sondes, avec l'avènement de la PCR, des amorces ont été synthétisées, spécifiques de telle ou telle espèce ou sous-espèce de trypanosome. Parmi ces méthodes, certaines ont déjà été utilisées notamment sur des échantillonnages de terrain ; et certaines d'entre eux ont été utilisées dans le cadre de notre étude :

- ✓ les amorces TBR 1/2 amplifient une séquence d'ADN satellite de 177 paires de bases (pb) qui est répétée plusieurs centaines de fois dans le génome nucléaire sur les mini-chromosomes. Cette PCR très sensible est spécifique de tout le sous-genre *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi*, *T. equiperdum*) ;
- ✓ les amorces TgsGP amplifient la séquence spécifique de la glycoprotéine de surface de *T. b. gambiense* (TgsGP) (Radwanska *et al.*, 2002). Comparé à d'autres gènes homologues de *T. b. brucei* et *T. b. rhodesiense*, ce gène TgsGP est bien conservé et utilisable pour le diagnostic spécifique de l'espèce *T. b. gambiense*. Par contre, la PCR-TgsGP amplifie une séquence unique du génome limitant ainsi sa sensibilité notamment dans le cas de faibles parasitémies souvent observées dans la THA à *T. b. gambiense* (Radwanska *et al.*, 2002) ;
- ✓ les amorces AnTat A/B amplifient également une séquence spécifique de la glycoprotéine de surface de *T. b. gambiense* (Paindavoine *et al.*, 1986). Ce gène AnTat est utilisable pour le diagnostic spécifique de *T. b. gambiense* I et II. En outre la PCR-AnTat permet d'amplifier une séquence d'ADN de 650 pb répétée plusieurs fois dans le génome du parasite augmentant ainsi la sensibilité et la spécificité de cette PCR à l'espèce *T. b. gambiense* ;
- ✓ le génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites est une méthode largement utilisée pour inférer la structure génétique de la population de plusieurs organismes.

III-3-4 Diagnostic de phase et traitement

Le diagnostic de phase intervient suite à la mise en évidence du parasite par les méthodes parasitologiques. Il est basé sur l'examen du LCR qui permet de déterminer s'il y a atteinte du système nerveux central et donc de déterminer le stade de la maladie, qui conditionnera la nature du traitement à administrer selon l'espèce de *T. brucei* considérée. La détermination de la phase de la maladie peut se faire de façon directe par simple ou double centrifugation du LCR ou de façon indirecte par comptage des leucocytes (cytorachie). L'OMS préconise, pour un diagnostic de deuxième phase, une cytorachie supérieure à 5 cellules/ μ l avec ou sans mise en évidence des trypanosomes dans le LCR (WHO, 1998).

De manière générale, un trypanosomé de cytorachie ≤ 5 cellules/ μ l avec absence de trypanosome dans le LCR sera considéré comme étant en première phase lymphatico-sanguine (stade 1), et en seconde phase neurologique (stade 2) lorsque sa cytorachie > 5 cellules/ μ l avec ou sans trypanosomes dans le LCR quelle que soit la forme de THA. Le traitement de la première phase est simple et n'entraîne pas de graves effets secondaires (Bouteille & Buguet, 2012). Ainsi, le traitement de la première phase des infections dues à *T. b. gambiense* est effectué avec la pentamidine (Sanderson *et al.*, 2009). Le traitement de la deuxième phase s'effectue par le mélarsoprol, le difluoro-méthyl-ornithine (DFMO) ou la combinaison thérapeutique du Nifurtimox et de l'Eflornithine (Nifurtimox-Eflornithine Combinaison Therapy, NECT).

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

L'étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de diagnostic moléculaire du Centre International de Recherche-Développement sur l'élevage en zone Subhumide (CIRDES) sis à Bobo-Dioulasso.

I-Matériels

I-1 Equipements

Pour atteindre les objectifs de cette étude, plusieurs équipements de laboratoire ont été nécessaires :

- ❖ Hotte à flux laminaire, sous laquelle les différents mix pour les PCR ont été préparés ;
- ❖ Centrifugeuses à tubes, pour la centrifugation des échantillons ;
- ❖ Cuve à électrophorèse horizontale plus générateur de courant, pour la migration des produits d'amplification des PCR sur le gel d'agarose ;
- ❖ Réfrigérateur, pour la conservation des réactifs et des produits PCR ;
- ❖ Congélateur (-20°C, -80°C), pour la conservation des ADN et d'autres réactifs ;
- ❖ Four micro-onde, chauffage de l'agarose ;
- ❖ Erlenmeyer,
- ❖ Agitateur (vortex), pour l'homogénéisation des échantillons ;
- ❖ Pipettes P10, P20, P200, P1000, pour le prélèvement de différents volumes d'ADN et des réactifs ;
- ❖ Plaque UV muni d'un appareil photo avec moniteur, pour la révélation sur le gel d'agarose et la photographie ;
- ❖ Thermocycleur applied Biosystem (Thermal cycler 2720), pour l'amplification des ADN ;
- ❖ Thermo Scientific NanoDrop 2000 Spectrophotometer, pour le dosage des ADN ;
- ❖ Bain marie, pour la digestion des protéines par la protéinase K à une température de 56°C.

I-2 Réactifs et consommables

Les réactifs ayant servi à la réalisation des travaux sont :

- Agarose ;
- Eau distillée;
- TBE 1X ;
- Gel RED ;
- Bleu de charge ;
- Marqueur de taille ;
- Kit d'extraction Qiagen.

Les réactions PCR ont nécessité les réactifs suivants: les amorces, les dNTPs (desoxynucléotide triphosphates) qui sont des bases composant l'ADN (dATP, dTTP, dGTP et dCTP) et sont nécessaires à la formation du brin complémentaire, la Taq polymérase qui synthétise le brin complémentaire de l'ADN matrice à partir de l'extrémité 3'OH de l'amorce, de l'eau ultra pure et du tampon 10X contenant du Mg^{2+} nécessaire à la réaction.

Et comme consommables nous avons du papier aluminium, du papier photo, le parafilm, les gants, les marqueurs pour écrire, les tubes Eppendorf AG (1,5 ml, 0,5ml, 0,2 ml), du savon, de l'eau de javel.

I-3 Matériel biologique

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé comme matériel biologique 25 échantillons de sang qui se composent comme suit :

- 7 échantillons de sang provenant du réservoir animal prélevés lors des prospections médicales dans les foyers de Sinfra et de Bonon en Côte d'Ivoire ;
- 4 échantillons de sang et de 2 LCR prélevés chez un patient suspecté de THA dans le village de Gouéra dans la zone de Banfora au Burkina-Faso ;
- un échantillon de glandes salivaires de glossine provenant du village de Gouéra dans la zone de Banfora au Burkina-Faso ;
- 11 extraits d'ADN de souches de référence provenant des stabilats de la banque du CIRDES (**Tableau I**).

Tableau I: Caractéristiques des échantillons utilisés

N°	Echantillons	Nature	Pays d'origine	Hôte	Espèces
1	40/1	ADN	Côte d'ivoire	Homme	<i>T. b. gambiense</i>
2	ABBA	ADN	Côte d'Ivoire	Homme	<i>T. b. brucei</i>
3	B4/I315	ADN	Côte d'Ivoire	Homme	<i>T. b. gambiense</i>
4	B4C191	ADN	Côte d'Ivoire	Homme	<i>T. b. gambiense</i>
5	B4F303	ADN	Côte d'ivoire	Homme	<i>T. b. gambiense</i>
6	BE3M3P2	Sang	Côte d'ivoire	Mouton	à identifier
7	BE7M10P3	Sang	Côte d'ivoire	Mouton	à identifier
8	BE7P1P1	Sang	Côte d'ivoire	Porc	à identifier
9	D12K	ADN	Congo	Homme	<i>T. b. gambiense</i>
10	Feor	ADN	Togo	Homme	<i>T. b. gambiense</i>
11	GO/SA/B1	Sang	Burkina Faso	Homme	à identifier
12	GO/SA/B2	Sang	Burkina Faso	Homme	à identifier
13	GO/SA/L1	LCR	Burkina Faso	Homme	à identifier
14	GO/SA/L2	LCR	Burkina Faso	Homme	à identifier
15	GO/SA/S1	Sang	Burkina Faso	Homme	à identifier
16	GO/SA/S2	Sang	Burkina Faso	Homme	à identifier
17	GO25/14	Organe	Burkina Faso	Glossine	à identifier
18	LVH 143	ADN	Kenya	Homme	<i>T. b. rhodesiense</i>
19	OKITMAP	ADN	Côte d'Ivoire	Homme	<i>T. b. gambiense</i>
20	S14/5/1	ADN	Côte d'Ivoire	Homme	<i>T. b. gambiense</i>
21	S7/2/2	ADN	Côte d'Ivoire	Homme	<i>T. b. gambiense</i>
22	SE10M10P4	Sang	Côte d'ivoire	Mouton	à identifier
23	SE11M3P1	Sang	Côte d'ivoire	Mouton	à identifier
24	SE2P5P11	Sang	Côte d'ivoire	Porc	à identifier
25	SE4C9P12	Sang	Côte d'ivoire	Chèvre	à identifier

II-Méthodes

II-1 Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. Il existe aujourd'hui un ensemble de réactifs prêts à l'emploi (kits) permettant de réaliser rapidement ces extractions. Pour l'extraction de nos ADNs, nous avons utilisé deux kits à savoir : QIAamp DNA Blood Mini Kits (**Annexe 1**) et QIAamp DNA Blood Midi Kits. Il n'y a pas de différence entre les deux kits, ce sont les mêmes tampons, la différence se trouve au niveau de la colonne d'élution. Le midi permet d'éluer une grande quantité par rapport au mini. Ces kits sont faciles à utiliser et avec une très bonne reproductibilité.

Après extraction nos échantillons ont été conservés au réfrigérateur à -20°C.

II-2 Contrôle de pureté et quantification des ADNs

Après extraction de l'ADN, nous avons procédé au contrôle de la pureté et à la quantification de nos ADN. Nous avons utilisé le Nano Drop 2000.

La pureté des ADNs est estimée comme suit :

- le maximum d'absorption des acides nucléiques se situe à 260 nm.
- les protéines, absorbent à 280 nm.
- le rapport $R = A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ constitue alors un bon moyen pour apprécier une éventuelle présence d'impuretés (protéines ou ARN) dans la préparation d'ADN.

Une présence des ARN se traduit par une augmentation du rapport R.

Tableau II: Valeurs de références du rapport $R = A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ pour le contrôle de pureté

$R = A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	
ADN pur:	$1,8 \leq R < 2$
ADN impur (présence des protéines) :	$R < 1,7$
ADN impur (présence d'ARN):	$R \geq 2$

Le spectre d'absorption U.V. permet également d'estimer les contaminations (**Figure 6**). L'apparition d'épaulements donne une idée de différentes impuretés :

- Un épaulement à 280 nm indique une présence protéique.

- Un épaulement à 270 nm indique la présence de phénol.
- Un épaulement à 230 nm indique la présence des glucides.
- En absence d'impuretés l'absorbance de la solution d'ADN à 320 nm doit être autour de zéro.

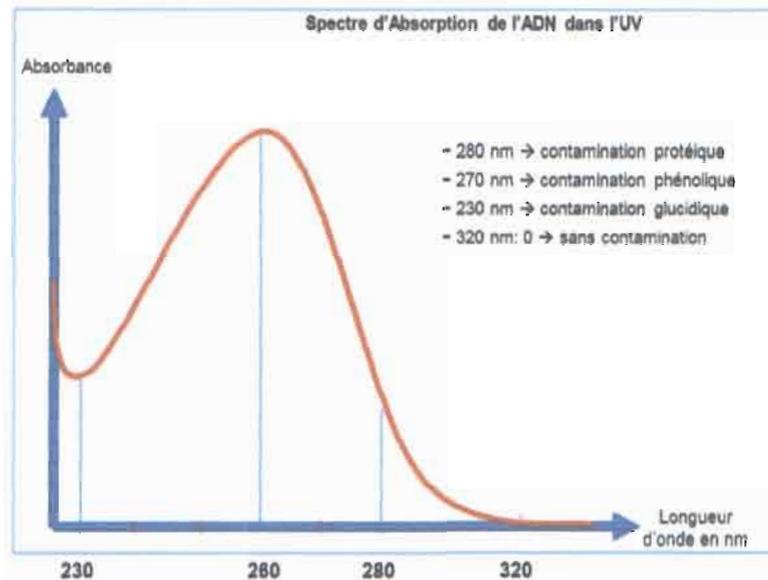


Figure 6: Spectre d'Absorption de l'ADN pur dans l'UV

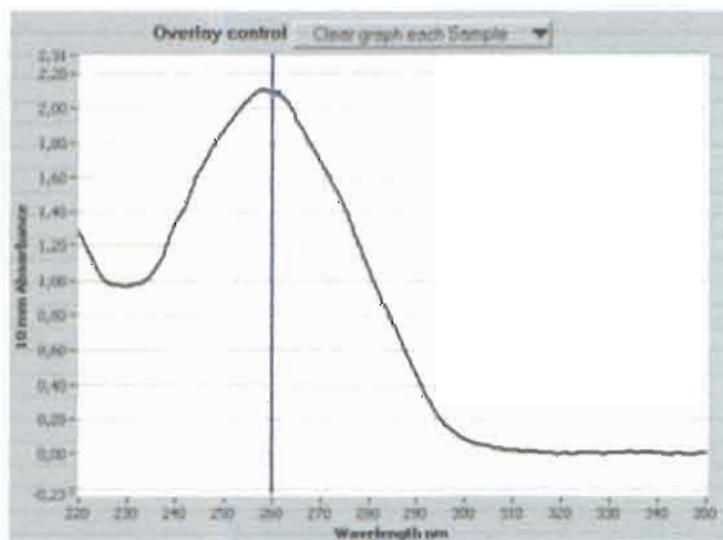


Figure 7: Spectre d'Absorption typique d'ADN pur obtenue sur un NanoDrop

II-3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR=Polymerase Chain Reaction)

II-3-1 Principe de la PCR

Après l'extraction, la quantification et le contrôle de puretés de nos échantillons, on a ensuite procédé à leur amplification par PCR. En effet, la PCR a pour principe d'amplifier sélectivement et à l'aide d'un couple d'amorces, une séquence particulière d'ADN par action répétée d'une ADN polymérase (Taq polymérase). Le fragment d'ADN à amplifier est compris entre deux séquences qui doivent être connues pour définir les amorces. Elles vont se fixer à l'ADN sur les séquences qui leur sont complémentaires et permettre le début de la polymérisation. Trois étapes thermiques, caractérisées par trois températures sont nécessaires à l'amplification et est fonction de chaque PCR : une étape de dénaturation, une étape d'hybridation dont la température dépend du couple d'amorce utilisé et une étape d'extension. Il existe cependant, plusieurs variantes de la PCR dont la PCR nichée (Nested PCR). Elle est une PCR en deux étapes successives, avec deux couples d'amorces différents. Des amorces externes dont la spécificité peut permettre d'amplifier à la fois un petit nombre de séquences homologues et des amorces internes permettant d'amplifier spécifiquement une des séquences révélées par le couple d'amorces externes. Les amorces utilisées dans le cadre de notre étude sont présentées en annexe (voir Annexe 4 et 5).

II-3-2 Amplification de l'ADN

Les amplifications des ADNs ont été réalisées dans différentes conditions mais chacune comportant une étape de dénaturation, d'hybridation et d'élongation. Les amplifications ont été effectuées au moyen d'un thermocycleur Applied biosystem (Thermal cycler 2720).

II-4 PCR TBR 1/2

Cette PCR TBR1/TBR2 a été effectuée sur tous les échantillons d'ADN. Les amorces TBR1/2 ne sont pas spécifiques de *T. b. gambiense* mais du sous-genre *Trypanozoon*. La PCR TBR1/2 a été réalisée dans un volume réactionnel de 50ul soient 40ul de mix et 10ul d'ADN

Diagnostic moléculaire de *Trypanosoma brucei gambiense*

dans les conditions suivantes : une première étape de 95°C pendant 5min permet une dénaturation totale de l'ADN et l'activation de la Taq polymérase, suivie de 40 cycles avec une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 sec et une étape d'extension à 72°C pendant 1min. L'amplification se termine par une extension finale à 72°C pendant 5 min.

Tableau III: Composition du mix pour la PCR TBR1/2

Eléments	Concentration	V/éch (ul)	V pour x éch
Eau ultra pure	---	31,9	31,9x
Tampon 10X	---	5	5x
Dntp	10mM	1	1x
Amorce 1	20uM	1	1x
Amorce 2	20Um	1	1x
Taq polymérase	5U/ul	0,1	0,1x
Volume final	---	40	40x

V : volume ; x : variable numérique ; éch : échantillon ; Volume d'ADN = 10 µl

II-5 PCR TgsGP

Sur tous nos échantillons positifs a la PCR TBR1/2 nous avons alors réalisé la PCR TgsGP (Radwanska *et al.*, 2002) . La PCR TgsGP a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl soient 22,5 µl de Mix et 2,5 µl d'ADN dans les conditions suivantes : une première étape à 95°C pendant 15 min permet une dénaturation totale de l'ADN et l'activation de la Taq polymérase, suivie de 45 cycles avec une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une étape d'hybridation à 63°C pendant 30 sec et une étape d'extension à 72°C pendant 30 sec. L'amplification se termine par une extension finale à 72°C pendant 5 min.

Tableau IV: Composition du mix pour la PCR TgsGP

Eléments	Concentration	V/éch (ul)	V pour x éch
Eau ultra pure	---	8	8x
Amorce 1	20uM	1	1x
Amorce 2	20uM	1	1x
HotstarTaq Master mix	---	12,5	12,5x
Volume final	---	22,5	22,5x

V : volume ; x : variable numérique ; éch : échantillon ; Volume d'ADN = 2,5µl

II-6 PCR AnTat A/B

La PCR AnTat A/B a été également utilisée sur tous les ADN positifs à la PCR TBR1/2. La PCR AnTatA/B a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl soit 22,5 µl de Mix et 2,5 µl d'ADN dans les conditions suivantes : une première étape à 95°C pendant 15 min permet une dénaturation totale de l'ADN et l'activation de la Taq polymérase, suivie de 45 cycles avec une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une étape d'hybridation à 58°C pendant 30 sec et une étape d'extension à 72°C pendant 30 sec. L'amplification se termine par une extension finale à 72°C pendant 5 min.

Tableau V: Composition du mix pour la PCR AnTatA/B

Eléments	Concentration	V/éch (ul)	V pour x éch
Eau ultra pure	---	8	8x
Amorce 1	20uM	1	1x
Amorce 2	20uM	1	1x
HotstarTaq Master mix	---	12,5	12,5x
Volume final	---	22,5	22,5x

V : volume ; x : variable numérique ; éch : échantillon ; Volume d'ADN = 2,5µl

II-7 Génotypage Microsatellites

Les microsatellites correspondent à de courtes séquences (de 1 à 4 nucléotides, le plus souvent) d'ADN répétées en tandem (toujours dans le même sens) un certain nombre de fois. En effet, le principe du génotypage par les microsatellites est d'amplifier, par la technique de PCR, spécifiquement un fragment d'ADN comportant le marqueur microsatellite encadré par deux séquences connues utilisées comme amorces, puis de séparer les différentes tailles des amplifiats, correspondant aux divers profils alléliques de ce marqueur, par électrophorèse.

Pour nos échantillons, les loci microsatellites ont été amplifiés en utilisant quatre paires d'amorces : M8C8-CA, Micbg6, Misatg4 et Misatg9. Un ul d'ADN a été utilisé pour la PCR dans un volume de 10µl. L'amplification par Nested-PCR a été réalisée dans les conditions suivantes : pour les deux « rounds » 28 cycles de 50 sec à 90°C, 50 sec à 55°C et 1min à 65°C. Ces conditions ont été les mêmes pour tous les marqueurs microsatellites. A chaque fois, 1 µl de la dilution 1/280 du premier produit PCR du premier round a été utilisé comme produit à amplifier dans le deuxième round de la Nested-PCR. Une amorce de chaque paire de microsatellites du second round de Nested-PCR était marquée par un fluorochrome 5'-FAM, ce qui permet une séparation des produits sur un séquenceur.

Tableau VI: Composition du mix pour la Nested PCR

Eléments	Concentration	V/éch (ul)	V pour x éch
H2O	---	5,7	5,7x
Primer C	20uM	1	1x
Primer D	20uM	1	1x
Tampon 10X	---	1	1x
Dntp	10mM	0,2	0,2x
Taq	5U/ul	0,1	0,1x
Volume final	---	9	9x

V : volume ; x : variable numérique ; éch : échantillon ; Volume d'ADN = 1µl

II-8 Révélation par électrophorèse sur gel d'agarose

Après l'amplification de nos échantillons d'ADN par PCR, nous avons ensuite procédé à leur révélation par électrophorèse. L'électrophorèse est une technique de biologie moléculaire qui permet une séparation des molécules en utilisant une de leur propriété chimique : leur charge électrique. Le principe consiste à déposer les molécules à séparer sur un gel d'agarose placé dans un champ électrique créé par une tension continue. Le gel baigne dans un tampon qui permet le passage du courant, entraînant ainsi les molécules d'ADN (de charge négative) vers le pôle de signe opposé à leur charge (borne positive du générateur), avec une vitesse proportionnelle à leur taille et à la taille des pores du gel. On ajoute à l'échantillon pendant le dépôt, un colorant (tampon de charge) bien visible sur le gel qui entraîne l'ADN au fond du puits. Ce colorant permet aussi de suivre le front de migration. Dans le cadre de notre étude, pour séparer et identifier les fragments d'ADN amplifiés, une électrophorèse sur gel d'agarose 2 % a été réalisée. Pour chaque gel, nous avons pesé 3g d'agarose à l'aide d'une balance puis additionnée à 150 ml de TBE 1X (Tris Borate EDTA). Après homogénéisation, le mélange est porté à ébullition grâce à un four micro-onde pendant 3 min. Ensuite on laisse refroidir, puis on ajoute 7,5 µl de Gel Red (agent intercalant de l'ADN). Après homogénéisation, on coule le gel dans la cuve de préparation de gel et on laisse le gel polymérisé. Après polymérisation, le gel est retiré et placé dans la cuve de migration contenant du tampon de TBE 1X qui va permettre au courant de passer et donc à l'ADN de migrer. Un marqueur moléculaire de taille est déposé dans le puit 1 du gel. 5 µl de chaque échantillon d'ADN est mélangé avec du bleu de charge puis déposé dans les autres puits. La migration a été effectuée à 100 volts pendant 60 min. A la fin de la migration, la révélation est faite sous lumière UV avec un système de capture de gel

Diagnostic moléculaire de *Trypanosoma brucei gambiense*

relié à un écran permettant d'enregistrer et/ou de prendre des photos du gel. En cas de présence d'une bande à la taille attendue pour chaque amorce la PCR est considérée positive.

II-9 Exploitation des données

Les données ont été saisies à l'aide du tableur Excel 2013. Les pourcentages ont été calculés à l'aide du logiciel Excel 2013.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

I-Résultats

I-1. Dosage des ADN

Au total, nous avons dosé 24 échantillons d'ADN parmi les 25 échantillons de départ car l'échantillon Go25/14 étant un échantillon de glande salivaire de glossine a été extrait au chelex par conséquent, il n'est pas pur. Il n'est pas nécessaire de le quantifier avec le Nanodrop. Parmi les 24, 12 sont purs (50%) ; 3 sont contaminés par des protéines (12,5%) et 9 ont été contaminés par de l'ARN (37,5%). La quantité de nos ADN variait de 0 à 122,7 ng/ μ l (**Annexe 2**).

I-2. PCR TBR1/2

La PCR TBR1/2 effectuée sur nos échantillons d'ADN a donné 100% de positifs ce qui démontre la présence de parasites appartenant au sous-genre *Trypanozoon*. Tous les extraits d'ADN positifs ont ensuite été utilisés pour la suite de l'étude.

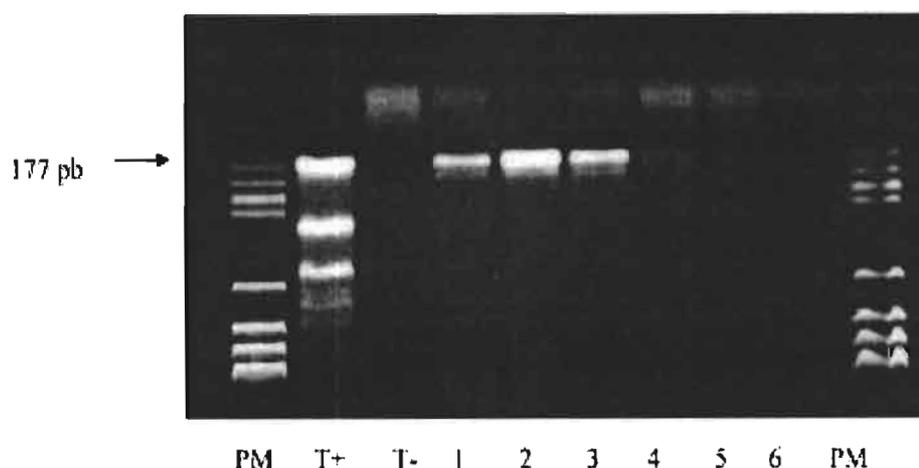


Figure 8: Exemple de révélation d'une PCR TBR1/2 sur gel d'agarose

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

I-3. PCR TgsGP

Les résultats de la PCR TgsGP réalisée sur les échantillons d'ADN positifs à la PCR *T. brucei sl* (n=25) étaient positifs pour 9 d'entre elles (36%). Cette PCR est spécifique de *T. b. gambiense*.

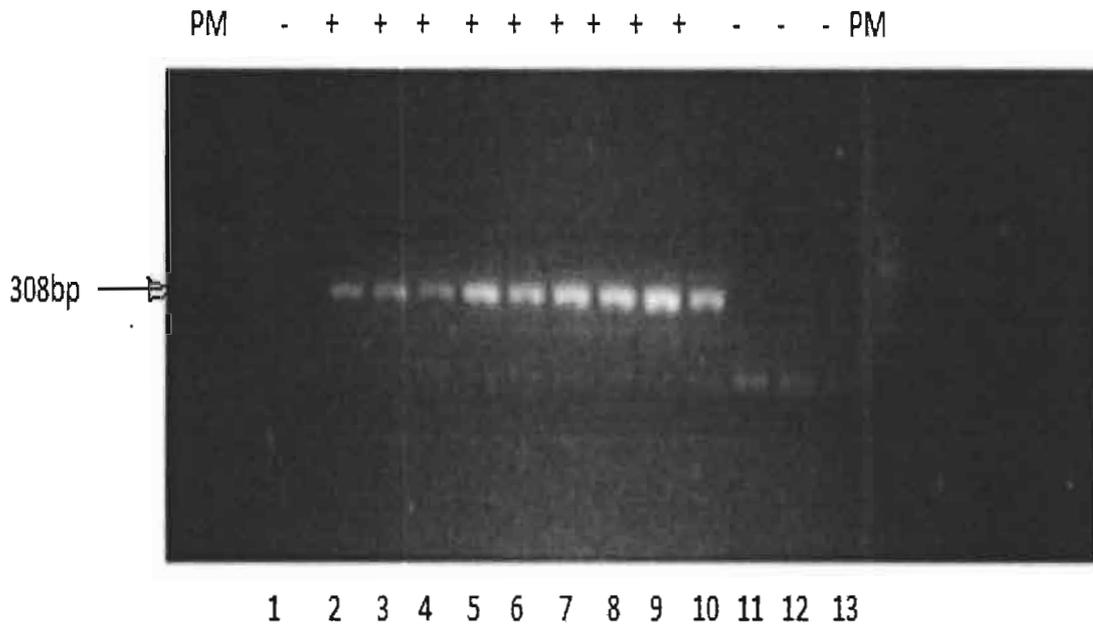


Figure 9: Exemple de révélation d'une PCR TgsGP sur gel d'agarose

PM = Poids Moléculaire, les échantillons 2 à 12 correspondent à des sujets positifs en PCR (Présence de la bande à 308 paires de bases), les échantillons 1 et 11 sont négatifs en PCR (absence de la bande à 308 pb) ,13 = T- = Témoin négatif attestant qu'il n'y a pas eu contamination de la PCR, 12 = T- ext = Témoin d'extraction attestant qu'il n'y a pas eu de contamination lors de l'extraction.

I-4. PCR AnTat A/B

Les résultats de la PCR AnTat A/B effectuée sur nos échantillons d'ADN positifs à la PCR TBR1/2 ont donné 21 échantillons positifs (84%).

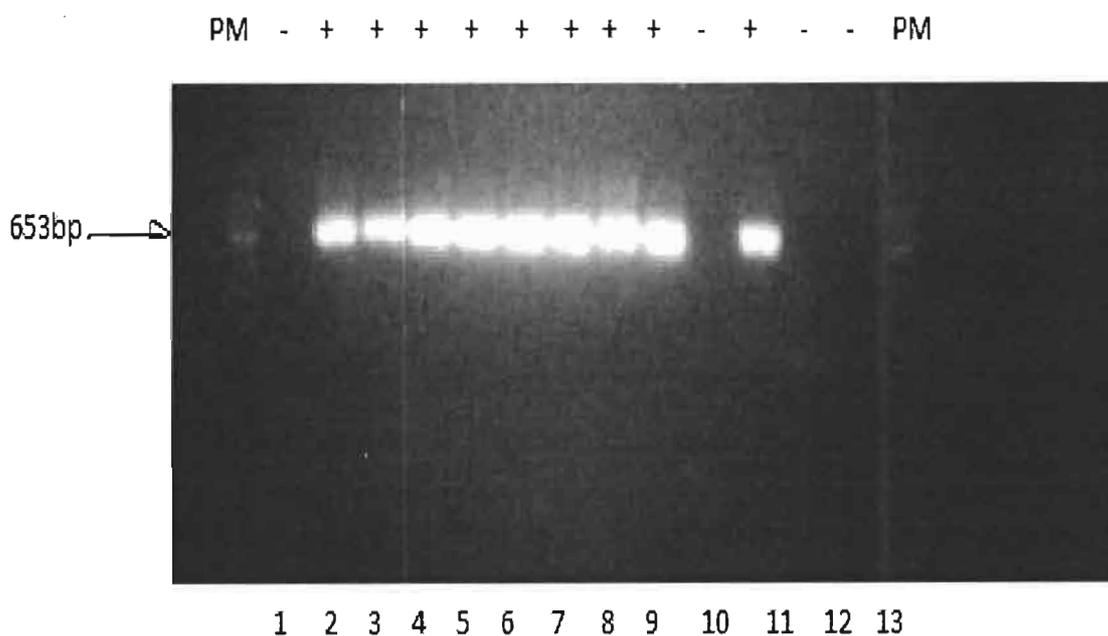


Figure 10 : révélation d'une PCR AnTat A/B sur gel d'agarose

PM = Poids Moléculaire, les échantillons 2 à 9 et 11 correspondent à des sujets positifs en PCR (Présence de la bande à 653 paires de bases), les échantillons 1 et 10 sont négatifs en PCR (absence de la bande à 653pb) ,13 = T- = Témoin négatif attestant qu'il n'y a pas eu de contamination de la PCR, 12 = T- ext = Témoin d'extraction attestant qu'il n'y a pas eu de contamination lors de l'extraction.

I-5. Génotypage Microsatellites

Les résultats du génotypage donnent des produits d'amplification pour 15 échantillons testés avec M6C8 (60%), 13 pour Micbg6 (52%), 14 pour Misatg4 (56%) et 14 pour Misatg9 (56%).

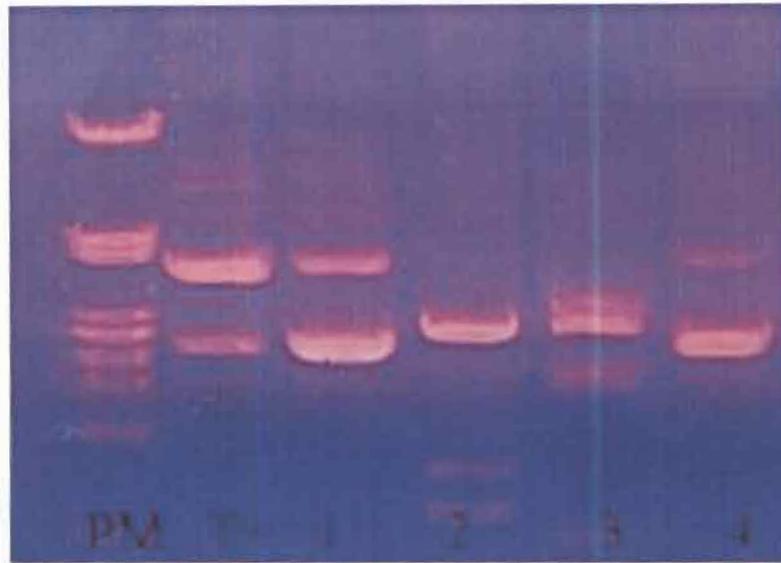


Figure 11: Exemple de révélation d'une Nested PCR (Génotypage par des microsatellites) sur gel d'agarose aux UV.

PM = poids moléculaire, T+ = témoin positif de manipulation, les échantillons 1, 2,3 et 4 correspondent à des sujets positifs a la Nested PCR (présence de plusieurs bandes a différentes paires de bases)

II-Discussion

Le contrôle de pureté et la quantification de l'ADN nous a permis d'avoir une idée sur l'état de nos ADN. Les impuretés rencontrées dans les échantillons, pourraient être dues à une mauvaise manipulation (erreur de pipetage, insuffisance de la protéinase K, élution de l'ADN). Cependant, les échantillons impurs, pourraient avoir un impact négatif sur nos PCR.

La PCR TBR1/2 a une meilleure sensibilité du fait de la présence de séquences satellites répétées des milliers de fois. Il est spécifique du groupe *Trypanozoon* et cela suggère que nos échantillons contiennent de l'ADN de *T. brucei sl.* Cette PCR s'est avérée positive pour tous nos échantillons. La PCR TgsGP quant à elle, qui est une PCR spécifique de *T. b. gambiense* a été négative sur certains échantillons d'ADN positifs à la PCR TBR. Ce résultat pourrait s'expliquer par la présence d'ADN de *T. b. gambiense* dans les échantillons testés. En effet, les amorces TgsGP sont très spécifiques de *T. b. gambiense* mais peu sensibles car elles n'amplifient qu'une séquence unique, non répétée dans le génome. La PCR AnTat A/B qui est également une PCR spécifique de *T. b. gambiense* a été positive sur certains échantillons d'ADN positifs à la PCR TBR. Cette PCR vient confirmer la présence de *T. b. gambiense* dans nos échantillons. L'hétérogénéité des résultats PCR TgsGP et AnTat pourrait s'expliquer par une faible quantité d'ADN de *T. b. gambiense* dans nos échantillons, mais également par les contraintes techniques rencontrées au cours de notre étude. En outre notons que, les amorces AnTat A/B sont spécifiques de *T. b. gambiense* (Teresa *et al.*, 1993) et très sensibles du fait des séquences satellites répétées. Afin de déterminer le génotype des parasites, quatre marqueurs microsatellites ont été amplifiés à partir des échantillons d'ADN mais, on notait cependant, certains problèmes d'échecs d'amplification comme déjà observés (Koffi *et al.*, 2007), et également en Côte d'Ivoire chez des sujets SERO (des sujets positifs en sérologie sans confirmation parasitologique) et en Guinée chez des sujets trypanosomés (Kaboré *et al.*, 2011). Ceux-ci ont soulevé la question de la sensibilité des marqueurs microsatellites lorsqu'ils sont appliqués sur l'ADN extrait directement à partir des échantillons de sang. Un tel problème est devenu un inconvénient important de la méthode, car la parasitémie est souvent faible dans le sang dans les cas d'infections à *T. b. gambiense*. Cela est particulièrement vrai en Guinée où les parasitémies de *T. b. gambiense* dans le sang des patients sont connues pour être très faibles (Camara *et al.*, 2010; Camara *et al.*, 2005). Cependant, nous avons obtenu des amplifications avec les 4 marqueurs microsatellites. La détermination exacte de la taille des bandes (amplifiats) sur le gel s'est avérée difficile et elle n'a pas permis de déterminer sur le plan génétique la nature des ADN de trypanosomes contenus dans nos échantillons. Cela pourrait être résolu par

Diagnostic moléculaire de *Trypanosoma brucei gambiense*

l'utilisation d'un séquenceur à capillaire que le CIRDES vient d'acquérir. La caractérisation génétique de *Trypanosoma brucei ssp* a permis de mieux comprendre l'évolution des endémies et des épidémies de THA en Afrique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de notre étude, après avoir vu quelques-unes des applications principales de la PCR dans le diagnostic de la THA causée par *Trypanosoma brucei gambiense*, nous pouvons retenir que l'outil moléculaire a apporté des progrès importants dans l'identification des trypanosomes pathogènes pour l'homme grâce à la disponibilité des amorces spécifiques d'ADN de trypanosomes. A cet effet, dans le cadre de notre travail, deux(2) amorces spécifiques de *Trypanosoma brucei gambiense* à savoir TgsGP et AnTat nous ont permis d'effectuer des PCR simples et quatre (4) marqueurs microsatellites M6C8, Micbg6, Misatg4 et Misatg9 ont été utilisés pour la nested PCR et se sont révélés peu efficaces pour poser le diagnostic.

Il est donc important de poursuivre cette étude avec la mise en place d'un protocole spécifique avec le séquenceur à capillaire qui permettra de déterminer la taille exact des bandes d'ADN et ainsi une meilleure identification de *Trypanosoma brucei gambiense*.

Concomitamment, la diminution du temps nécessaire à l'application de la technique associée à la capacité de traiter plus d'échantillons à la fois, et l'existence d'amorces très spécifique et sensible, sont autant d'étapes indispensables à l'utilisation de la PCR dans des conditions de terrain ou de laboratoire, pour le diagnostic de la THA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AUTHIÉ, E., BRINGAUD, F., BAKALARA, N., TETAUD, E. and BALTZ, T. (1999). Trypanosomoses Humaines et Animales: maladie du sommeil et nagana. *Annales de l'Institut Pasteur*, 27-50.
- BENGALY, Z. (2003). Pathogénicité comparée de 3 types phylogénétiques distincts de l'espèce *Trypanosoma Congolense*. In *UFR/SVT* pp. 116. Université de Ouagadougou.
- BENGALY, Z., KASBARI, M., DESQUESNES, M. and SIDIBÉ, I. (2001). Validation of a Polymerase Chain Reaction Assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. *Veterinary Parasitology*, 101-113.
- BOUTEILLE, B. and BUGUET, A. (2012). The detection and treatment of Human African Trypanosomiasis. 35-45.
- BUSCHER, P., LEJON, V., MAGNUS, E. and VAN MEIRVENNE, N. (1999). Improved latex agglutination test for detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense* infected patients. *Acta Tropica*, 11-20.
- CAMARA, M., ILBOUDO, H., SAKANDE, H., KABORE, J., N'DRI, L., JAMONNEAU, V. and BUCHETON, B. (2010). Sleeping sickness diagnosis: use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test. *Trop Med Int Health* 15,, 796-799.
- CAMARA, M., KABA, D., KAGBADOUNO, M., SANON, J. R., OUENDENO, F. F. and SOLANO, P. (2005). Human African trypanosomiasis in the mangrove forest in Guinea: epidemiological and clinical features in two adjacent outbreak areas. *Med Trop (Mars)* 65, 155-161.
- CATTAND, P., JANNIN, J. and LUCAS, P. (2001). Sleeping sickness surveillance: an essential step towards elimination. *Tropical Medicine & International Health*, 348-361.
- CAVALIER-SMITH, T. (2004). Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society of London-B*, 1251-1262.
- CDC (2015). Parasites-African Trypanosomiasis (also known as Sleeping Sickness), <http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>.
- CHALLIER, A. (1962). Campagne de lutte contre *Glossina palpalis gambiense* dans le foyer de Bamako (République du Mali). 9ème Réunion du Comité Scientifique International de Recherches Sur Les Trypanosomiasés (CSIRT), Conakry.
- COURTIN, F., DUPONT, S., ZEZE, D. G., JAMONNEAU, V., SANÉ, B., COULIBALY, B., CUNY, G. and SOLANO, P. (2005). Trypanosomose Humaine Africaine: transmission urbaine dans le foyer de Bonon (Côte d'Ivoire). *Tropical Medicine & International Health*, 340-346.
- COURTIN, F., SIDIBÉ, I., ROUAMBA, J., JAMONNEAU, V., GOURO, A. and SOLANO, P. (2009). Impacts des évolutions démographiques et climatiques sur la répartition spatiale des hommes, des Tsé-tsé et des Trypanosomoses en Afrique de l'Ouest. *Parasite*, 3-10.
- ERSFELD, K., MELVILLE, S. E. and DULL, K. (1999). Nuclear and genome organization of *Trypanosoma brucei*. . *Parasitology Today*, 58-63.
- FRANCO, J. R., P. P. SIMARRO, A. DIARRA, RUIZ-POSTIGO, J. A. and J. G. JANNIN (2014). The journey towards elimination of gambiense human African trypanosomiasis: not far, nor easy. . *Parasitology*, 748-760.
- HOARE, C. B. (1972). The trypanosomes of mammals.A zoological monograph. *Blackwell, Oxford*, 749.

- JAMONNEAU, V., SOLANO, P., KOFFI, M., DENIZOT, M. and CUNY, G. (2004). Contributions and limits of the diagnosis of human African trypanosomiasis. *Med Sci (Paris)*, 871-875.
- JELINEK, T., BISOFFI, Z., BONAZZI, L., VAN THIEL, P., BRONNER, U., DE FREY, A., GUNDERSEN, S. G., MCWHINNEY, P. and RIPAMONTI, D. (2002). Cluster of African Trypanosomiasis in travelers to Tanzanian national parks. *Emerg Infect Dis*, 634-635.
- KABORÉ, J., KOFFI, M., BUCHETON, B., MACLEOD, A., DUFFY, C., ILBOUDO, H., CAMARA, M., DE MEEUS, T., BELEM, A. M. G. and JAMONNEAU, V. (2011). 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.
- KEELING., PATRICK., BRIAN S, L. and ALASTAIR, S. (2009). Eukaryotes. Eukaryota, Organisms with nucleated cells. *The Tree of Life Web Project*.
- KENNEDY, P. G. E. (2004). Human African Trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *Journal of Clinical Investigation*, 496-504.
- KOFFI, M., SOLANO, P., BARNABE, C., DE MEEUS, T., BUCHETON, B., CUNY, G. and JAMONNEAU, V. (2007). Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei s.l.* using microsatellite typing: new perspectives for the molecular epidemiology of human African trypanosomiasis. *Infect Genet Evol* 7., 675-684.
- KOFFI, M., SOLANO, P., DENIZOT, M., COURTIN, D., GARCIA, A., LEJON, V., BÜSCHER, P., CUNY, G. and JAMONNEAU, V. (2006). Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* Human African Trypanosomiasis: a potential human reservoir of parasites? *Acta Tropica*, 183-188.
- LAVEISSIÈRE, C., GRÉBAUT, P., HERDER, S. and PENCHENIER, L. (2000). Les Glossines Vectrices de la Trypanosomiase Humaine Africaine. *OCEAC-IRD, Yaoundé.*, 246p.
- LUCKINS, A. G. (1977). Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Tropical Animal Health and Production*, 53–62.
- LUMSDEN, W. H. R., C.D., K. and STRANGE, M. (1977). *Trypanosoma brucei*: detection of low parasitaemias in mice by a miniature anion-exchanger/centrifugation technique. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 421-424.
- MALVY, D. and CHAPPUIS, F. (2011). Sleeping sickness. *Clinical Microbiology and Infection*, 986-995.
- MIGCHELSEN, S. J., BUSCHER, P., HOEPELMAN, A. I., SCHALLIG, H. D. and ADAMS, E. R. (2011). Human African Trypanosomiasis: a review of non-endemic cases in the past 20 Years. *International Journal of Infectious Diseases*, 517-524.
- OGBADOYI, E., ERSFELD, K., ROBINSON, D., SHERWIN, T. and GULL, K. (2000). Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma*, 501-513.
- PAINDAVOINE, P., ZAMPETTI-BOSSELER, F., PAYS, E., SCHWEIZER, J., GUYAUX, M., JENNI, L. and STEINERT, M. (1986). Trypanosome hybrids generated in Tsetse flies by nuclear fusion. *The EMBO Journal*, 3631–3636.
- RADWANSKA, M., CLAES, F., MAGEZ, S., MAGNUS, E., PEREZ-MORGA, D., PAYS, E. and BUSCHER, P. (2002). Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. 289-295.
- RAVEL, S., PATREL, D., KOFFI, M., JAMONNEAU, V. and CUNY, G. (2006). Cyclical transmission of *Trypanosoma brucei gambiense* in *Glossina palpalis gambiensis* displays great differences among field isolates. *Acta Tropica*, 100, 151-155.

- RICOSSÉ, J. H., CHALLIER, A., LE MAO, G., ALBERT, J. P. and LEGAIT, J. P. (1973). L'épidémiologie actuelle de la Trypanosomiase Humaine Africaine et les problèmes qu'elle pose. 291-299.
- SANDERSON, L., DOGRUEL, M., RODGERS, J., DE KONING, H. P. and 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. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 967-977.
- SIMARRO, P. P., DIARRA, A., RUIZ-POSTIGO, J. A., FRANCO, J. R. and JANNIN, J. G. (2011). The Human African Trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009. *The way forward*, 1007.
- SIMARRO, P. P., JANNIN, J. and CATTAND, P. (2008). Eliminating Human African Trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? *PLoS Tropical Neglected Diseases*, 174-180.
- SOLANO, P., BOUYER, J., ITARD, J. and CUISANCE, D. (2010). The cyclical vectors of trypanosomosis. *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock*, 155-183.
- TERESA, B., WENDY, G., KEN, H. and PETER, D. (1993). Identification of *Trypanosoma brucei gambiense* by PCR amplification of variant surface glycoprotein genes. *Acta Tropica*, 107-119.
- TONGUE, L. K., MAVOUNGOU, J. F., KAMKUMO, R. G., KABA, D., FAKO HENDJI, G. C. and AL., E. (2012). Human African Trypanosomiasis in suburban and urban areas: A potential challenge in the fight against the disease. *Journal Clinic Experiment Pathology S3:002*. doi:10.4172/2161-0681.S3-002.
- TRUC, P., BAILEY, J. W., DOUA, F., LAVEISSIÈRE, C. and 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 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 419-421.
- VAN DEN ABEELE, J., CLAES, Y., VAN BOCKSTAELE, D., LE RAY, D. and COOSEMANS, M. (1999). *Trypanosoma brucei* Spp. Development in the Tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology*, 469-478.
- WHO (1998). Control and surveillance of African Trypanosomiasis. pp. 1-113. World Health Organization Technical Report Series, 881.
- WHO. (2013). Control and surveillance of human African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 984.
- WOO, P. T. K. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. *Acta Tropica*, 613-634.

ANNEXES

Annexe 1 : Protocole d'extraction d'ADN Génomique au DNeasy à partir de sang total

- 1- Ajouter 500ul d'eau ultra pure dans des tubes de 1,5ml
- 2- Ajouter 500ul de sang dans chaque tube
- 3- Vortexer 10 secondes toutes les deux minutes pendant 10 minutes
- 4- Centrifuger à 6000 rpm pendant 3minutes
- 5- Virer le surnageant
- 6- Resuspendre le culot (en grattant sur portoir et vortex)
- 7- Ajouter 20ul de protéinase K
- 8- Compléter à 200ul avec PBS (150ul)
- 9- Vortexer rapidement
- 10- Faire tomber le liquide (centri)
- 11- Ajouter 200ul de tampon AL
- 12- Vortexer vigoureusement (15s/tube) et incuber à 56°C pendant 20 minutes minimum
- 13- A partir de là on peut stoker les tubes quelques temps (12h max)
- 14- Faire tomber le liquide (centri)
- 15- Ajouter 200ul d'éthanol 100% et vortexer vigoureusement (10s)
- 16- Faire tomber le liquide (centri)
- 17- Numéroter les colonnes
- 18- Transférer la totalité dans les colonnes
- 19- Centrifuger la totalité à 13000 rpm, 1min
- 20- Jeter les collecteurs et récupérer les colonnes dans des nouveaux collecteurs
- 21- Ajouter 500ul de tampon AW1 et centrifuger à 13000 rpm, 1min
- 22- Récupérer à nouveau les colonnes sur des nouveaux collecteurs
- 23- Ajouter 500ul de tampon AW2 aux colonnes et centrifuger pendant 3 minutes à 14000 rpm
- 24- Vider les collecteurs, replacer les colonnes et centrifuger à 14000 rpm, 1min
- 25- Les colonnes sont maintenant posées sur les tubes dans lesquels sera élué l'ADN. On y ajoute 100ul de tampon AE. On laisse incuber pendant 5 minutes à température ambiante
- 26- Centrifuger à 14000 rpm pendant 1 minute
- 27- Remettre 100ul de tampon AE dans les colonnes, incuber 5 minutes à température ambiante et centrifuger à 14000 rpm pendant 1minute
- 28- Récolter en tout 200ul d'éluât.

Annexe 2: Résultats du dosage et contrôle de pureté des échantillons d'ADN testés

N°	Echantillons	Concentration en acides nucléiques (ng/μl)	Rapport 260/280
1	40/1	7.65	2.15
2	ABBA	68.1	1.93
3	B4/I315	4.1	2.43
4	B4C191	7.6	2.62
5	B4F303	1.6	0.49
6	BE3M3P2	50.8	1.83
7	BE7M10P3	9.8	1.97
8	BE7P1P1	17.8	1.86
9	D12K	4.7	2.71
10	Feor	14.6	2.26
11	GO/SA/B1	57.6	1.88
12	GO/SA/B2	4.2	3.06
13	GO/SA/L2	0	0.46
14	GO/SA/S1	29.5	1.89
15	GO/SA/S2	7.2	2.28
16	LVH 143	24.5	2
17	OKITMAP	33.8	2.17
18	S14/5/1	1	0
19	S7/2/2	39.6	1.99
20	SE10M10P4	102.2	1.84
21	SE11M3P1	26.9	1.87
22	SE2P5P11	23.2	1.86
23	SE4C9P12	122.7	1.85
24	GO/SA/L1	2.1	10.9

Annexe 3: Résultats des différentes PCR

Echantillons	PCR Simple			Nested PCR			
	TBR1/2	TgsGP	AnTat	M6C8	Micbg6	Misatg4	Misatg9
SE2P5P11	+	-	+	-	-	-	-
SE10M10P4	+	-	+	-	-	-	-
SE4C9P12	+	-	+	-	-	-	-
SE11M3P1	+	-	+	+	-	-	-
BE3M3P2	+	-	+	-	-	-	-
BE7M10P3	+	-	+	-	-	-	-
BE7P1P1	+	-	+	-	-	-	-
GO/SA/B1	+	-	+	+	+	+	+
GO/SA/B2	+	-	+	-	-	-	-
GO/SA/S1	+	-	+	+	+	+	+
GO/SA/S2	+	-	-	-	-	-	-
GO/SA/L1	+	-	+	-	-	+	+
GO/SA/L2	+	-	+	-	-	-	-
GO25/14	+	-	-	+	-	-	-
40/1	+	+	+	+	+	+	+
ABBA	+	-	+	+	+	+	+
B4/I315	+	+	+	+	+	+	+
B4C191	+	+	+	+	+	+	+
B4F303	+	+	+	+	+	+	+
D12K	+	+	+	+	+	+	+
Feor	+	+	+	+	+	+	+
LVH143	+	-	-	+	+	+	+
OKITMAP	+	+	+	+	+	+	+
S14/5/1	+	+	-	+	+	+	+
S7/2/2	+	+	+	+	+	+	+

+ : échantillon positif ; - : échantillon négatif.

Annexe 4: Séquences des amorces TBR1/2, TgsGP et AnTatA/B

Amorces	Séquences des Amorces (5'→ 3')	Taille amplifiée	Spécificité
TBR- 1	CGA-ATG-AAT-ATT-AAA-CAA-TGC-GCA-G	177pb	<i>T. brucei</i>
TBR- 2	AGA-ACC-ATT-TAT-TAG-CTT-TGT-TGC		
TgsGP -1	GCT-GCT-GTG-TTC-GGA-GAG-C	308pb	<i>T. b. g</i>
TgsGP- 2	GCC-ATC-GTG-CTT-GCC-GCT-C		
AnTat -A	CAC-AGA-CGA-CAG-AAG-CGA-TA	650pb	<i>T. b. g I et II</i>
AnTat -B	GAA-AGT-GGG-AGT-TGT-TGC-TC		

Annexe 5: Liste des marqueurs microsatellites

Outside (externe) Amorces	séquence (5' → 3')	Nested (niché) Amorces	séquence (5' → 3')	Spécificité
M6C8-C1	GCTGTTTGAATTTGCCTGTA	M6C8-A-FAM	CTTTCAACCGCCTTATCAGC	
M6C8-D1	CAACCACTCCTTGATATTCAC	M6C8-B	GGCTAGTTACACTGTAGTTCTC	<i>T. b. g</i>
Micbg6-C1	GGTAGTGGCGGTGGTATTC	Micbg6-A-FAM	CGGTGTAGTGGCATTCCGGT	
Micbg6-D1	GACCTGAAGAGGCCATGAT	Micbg6-B	GCTCGCCGCCTCATGAGGTG	<i>T. b. g</i>
Misatg4-C2	ATCGTACTGCTGGTTGTTC	Misatg4-A-FAM	GAAGTAACTCTATACGGGTGG	
Misatg4-D2	CAAGATACGTCGCCTCTG	Misatg4-B	GTTTTCCCCTTGTTGTAATC	<i>T. b. g</i>
Misatg9-C1	ATAATGATTCAATTATGCATGGTC	Misatg9-A-FAM	GAGCTCTTACTTATTGCCCGTCT	
Misatg9-D1	CGGTGGTTGAGAGAGTTGA	Misatg9-B	GTGGGGAAGAACAAGCAGA	<i>T. b. g</i>

Annexe 6: Equipements



Photo 1 : Cuve à électrophorèse



Photo 2 : Appareil photo avec moniteur



**Photo 3: Thermocycleur applied biosystem
(Thermal cycler 2720)**



Photo 4: Hotte à flux laminaire