



UNIVERSITE
JEAN LOROUGNON GUEDE
UFR NVIRONNEMENT

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

.....
Ministère de l'Enseignement Supérieur et
de la Recherche Scientifique

THESE

**Pour l'obtention du grade de Docteur de
l'Université Jean Lorougnon GUEDE**

Mention : Ecologie, Biodiversité et Evolution

Spécialité : Génétique et Parasitologie moléculaire

**Diversité génétique de *Trypanosoma brucei* sensu lato chez les
animaux domestiques et implication épidémiologique dans la
transmission de la Trypanosomose Humaine Africaine (THA)
dans les foyers du Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire**

ANNEE : 2018 - 2019

N° D'ORDRE : 016

CANDIDAT :

Nom : N'DJETCHI

Prénoms : Kassi Martial

Soutenue publiquement
le 13 Juin 2020

JURY

Président	M. KONE Issiaka	Professeur Titulaire	Université Jean Lorougnon GUEDE
Directeur	M. KOFFI N'Goran Mathurin	Maître de Conférences	Université Jean Lorougnon GUEDE
Rapporteur	Mme. YAO-ACAPOVI Geneviève	Maître de Conférences	Félix Houphouët BOIGNY
Examineur	M. SOKOURI Didier Paulin	Maître de Conférences	Félix Houphouët BOIGNY
Examineur	M. KONATE Ibrahim	Maître de Conférences	Université Jean Lorougnon GUEDE

DEDICACE

A la mémoire de ma génitrice feu TEHOUA AKOMAN. Saches que je réaliserai ton rêve et tu resteras toujours dans mon cœur.

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été réalisée dans le cadre des activités du projet «Trypa-NO » financé par la Fondation Bill et Melinda Gates.

Ces activités visent à déterminer les causes de la résurgence et/ou du maintien de la Trypanosomose Humaine Africaine (THA) au Centre-ouest de la Côte d'Ivoire. Nous avons bénéficié d'une bourse de thèse du programme ARTS (Allocation de Recherche pour une thèse au Sud) de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Ce qui nous a permis de travailler dans de meilleures conditions.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés d'une collaboration fructueuse entre plusieurs institutions et centres de recherche, tels que: l'Université Jean Lorougnon Guédé (UJLoG) à Daloa en Côte d'Ivoire; l'Institut Pierre Richet (IPR) à Bouaké en Côte d'Ivoire; l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) à Montpellier en France; le Programme de Recherche Clinique sur la THA (PRCT) à Daloa en Côte d'Ivoire; le Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES) à Bobo-Dioulasso au Burkina Faso.

REMERCIEMENTS

Cette thèse n'aurait pu aboutir sans le soutien et la participation de nombreuses personnes, à qui nous voudrions témoigner toute notre reconnaissance.

Nous exprimons notre très profonde gratitude :

A Madame TIDOU Abiba Sanogo épouse KONE, Professeur Titulaire, Présidente de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, Côte d'Ivoire pour son amour de la recherche et son dévouement au travail bien fait ;

A Monsieur le Directeur Général de l'IRD pour nous avoir attribué une allocation de recherche pour une durée de 30 mois qui nous a permis d'effectuer les travaux ;

A Monsieur AKAFFOU Doffou Sélastique, Maître de Conférences, Vice-président chargé de la planification, de la programmation et des relations extérieures de l'UJLoG pour sa grande implication dans la visibilité externe de l'UJLoG ;

A Monsieur KONE Tidiani, Professeur Titulaire, Vice-président chargé de la pédagogie, de la recherche, de la vie universitaire et de l'innovation technologique de l'UJLoG pour sa bienveillance sur la formation et la recherche à l'UJLoG ;

A Monsieur KOUASSI Lazare, Maître de Conférences, Directeur de l'UFR Environnement de l'UJLoG qui a bien voulu accepter notre inscription en thèse au sein de l'UFR qu'il dirige ;

A Monsieur KOFFI N'Goran Mathurin, Maître de Conférences, en charge de l'Unité de Recherche de Génétique et Epidémiologie Moléculaire (URGEM) de l'UJLoG, notre Directeur de Thèse. Nous sommes très reconnaissants pour le privilège que vous nous avez accordé en nous acceptant dans votre équipe de recherche. Nous avons bénéficié de votre soutien combien important à ce travail malgré vos multiples responsabilités ;

A Monsieur JAMONNEAU Vincent, Chercheur à l'IRD, correspondant scientifique de cette thèse. Merci pour votre disponibilité et vos précieux conseils qui nous ont guidé dans la compréhension de la thématique de ce travail. Vous avez mis à notre disposition les moyens nécessaires pour la réalisation de ces travaux de recherche ;

Nous tenons à exprimer notre gratitude, au Président du jury, Monsieur KONE Issiaka, Professeur Titulaire, Directeur de l'UFR des sciences sociales et humaines de l'UJLoG, aux membres du jury : Madame YAO-ACAPOVI Geneviève, Maître de Conférences à l'UFHB, Monsieur SOKOURI Didier Paulin, Maître de Conférences à l'UFHB et Monsieur KONATE Ibrahim, Maître de Conférences à l'UJLoG pour avoir accepté de juger ce travail ;

A Monsieur SOLANO Philippe, Directeur de Recherche à l'IRD, Directeur de l'UMR-INTERTRYP IRD-Cirad, et A Monsieur BERTHIER David, chercheur au CIRAD, Directeur adjoint de l'UMR-INTERTRYP. Nous avons été très honorés d'avoir eu le privilège de réaliser une partie des travaux au sein de votre Unité ;

A Madame RAVEL Sophie, Chercheur et SEGARD Adeline, Assistante ingénieure à l'IRD dans l'UMR-INTERTRYP IRD-Cirad. Nous sommes très marqués par l'accueil chaleureux et par l'honneur que vous nous avez fait en nous acceptant dans votre laboratoire ;

A Monsieur DE MEEÛS Thierry, Chercheur à l'IRD à l'UMR-INTERTRYP, IRD-Cirad. Votre grande qualité scientifique et votre maîtrise parfaite des outils d'analyses de génétiques des populations sont sources de motivation pour toute personne embrassant ce domaine ;

A Monsieur HOUGARD et son équipe de la représentation de l'IRD en Côte d'Ivoire pour leur aide et soutien qui nous ont permis de travailler dans des conditions idoines ;

A Madame BRULE Gaëlle, Chargée du suivi des Programmes ARTS et BEST de l'IRD. Merci Madame pour votre générosité et vos efforts qui nous ont permis de bénéficier de nos allocations.

Nous adressons nos sincères remerciements :

A Messieurs KOUAKOU Lingué, Directeur coordonnateur du PNETHA, KABA Dramane, Directeur de l'IPR de Bouaké, N'GOUAN Kouassi Emmanuel, Directeur du PRCT et ses collaborateurs et COURTIN Fabrice, Chercheur à l'IRD à l'IPR, Bouaké pour leur contribution et leur assistance qui nous ont permis de mener à bien les enquêtes sur le terrain ; A Monsieur GREBAUT Pascal et Madame BOSSARD Géraldine, de l'UMR-INTERTRYP, IRD-Cirad. Leur encadrement ont permis de réaliser la culture des trypanosomes procycliques et sanguicoles ;

A Messieurs SANGNE Charles, AYOLIE Constant KPANDJI Isidore, AHOUTY Ahouty Bernadin, ILBOUDO Hamidou, KABORE Jacques, SIMARO Siriki, BERTE Djakaridja, SERE Modou et Madame DAMA Emilie, Docteurs pour l'amitié et l'assistance apportées selon leurs disponibilités ;

A tous les membres de l'équipe de l'UMR-INTERTRYP (TRUC Philippe, GEIGER Anne, BUCHETON Bruno, HERDER Stéphane, LEJON Veerle, BART Jean-Mathieu, THEVENON Sophie, CHANTAL Isabelle, MINET Cécile, SEMPERE Guilhem, LEMEUR Fadhila, ESCOMS Florence, PEYLHARD Moana, BERT Alicia, TCHICAYA Bernadette) basée au Campus International de Baillarguet, Montpellier, merci pour votre esprit d'ouverture et de partage qui ont facilité notre intégration ;

Aux techniciens KONAN Thomas de l'UJLoG, SAKANDE Hassane du CIRDES, GABIN Anastase du PRCT, YAPO Diambra technicien vétérinaire, LANADA, KOUADIO Alain De Marie et N'DRI Louis de l'IPR pour la bonne collaboration.

Nos remerciements vont à l'endroit de Mesdames KEI Rosalie Adeline, KONE née Bah DOKOU, Fatoumata OUATTARA et Monsieur BOUTUE Hippolyte Robert pour tous les conseils et aides.

A tous les étudiants doctorants : KASSI Bohoussou Georges, ABE Allepo Innocent, ANOH Adou Jean, TRAORE Barkissa, SOKOURY ABLA Edwige, KONE Minayegnirin, YOBOUE Félix, MESSOU Gbangbo, YANKOU Dougba Franck, KPASSOU Didier, GBETIBOUO Abraham, KOUADIO Akesse Blaise, KONAN N'Zi Rodrigue, KELY Marley Roger, N'GUESSAN Affoué Sylvie Rachelle et YAO Blé Gbacla Fora Dominique.

A ma bien aimée ATTEBA Lohouri Gouliah Prisca Geneviève et à mon fils N'djetchi Kassi Samuel Uriel. Merci pour le soutien et la joie que vous m'apportez.

A mes frères KOUASSI Kablan Bruno, EBY Amoa Anicet et sœur KOUASSI Amani Rose pour le soutien et les encouragements.

A toutes les personnes dont les noms n'ont pu être mentionnés, qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude.

TABLE DES MATIERES

Page

DEDICACE.....	i
AVANT-PROPOS	ii
REMERCIEMENTS	iii
SIGLES ET ABREVIATIONS	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xv
LISTE DES ANNEXES.....	xvii
INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	5
1.1. Trypanosomes.....	5
1.1.1. Biologie des trypanosomes.....	5
1.1.2. Systématique des trypanosomes	5
1.1.3. Morphologie de <i>Trypanosoma brucei</i> s.l.....	8
1.1.4. Cycle évolutif de <i>Trypanosoma brucei</i> s.l.....	8
1.1.4.1. Chez l'hôte vecteur.....	9
1.1.4.2. Chez l'hôte mammifère	10
1.1.5. Particularité du trypanosome : la variation antigénique	12
1.1.6. Mode de reproduction de <i>Trypanosoma brucei</i> s.l.....	14
1.1.7. Génome des trypanosomes	15
1.1.7.1. ADN nucléaire.....	15

1.1.7.2. ADN kinétoplastique	16
1.2. Vecteurs de la THA	17
1.3. Trypanosomoses africaines.....	19
1.3.1. Trypanosomose Animale Africaine.....	19
1.3.2. Trypanosomose Humaine Africaine.....	19
1.3.2.1. Historique de la THA	20
1.3.2.2. Situation actuelle de la THA	20
1.3.2.3. Importance économique de la THA	23
1.4. Diagnostic des infections aux trypanosomes	24
1.4.1. Techniques parasitologiques	24
1.4.2. Techniques immunologiques.....	26
1.4.3. Diagnostic des trypanosomes par Réaction de Polymérisation en Chaîne.....	27
1.4.4. Xénodiagnostic par mouches tsé-tsé	28
1.5. Détermination des génotypes ou génotypage à l'aide des marqueurs microsatellites.....	28
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES	30
2.1. Zones d'étude.....	30
2.1.1. Zone de Sinfra	31
2.1.2. Zone de Bonon	33
2.1.3. Zone de Vavoua.....	35
2.2. Matériel biologique.....	37
2.3. Matériel technique	37

2.4. Approche méthodologique.....	38
2.4.1. Préparation des enquêtes du réservoir animal domestique.....	38
2.4.2. Calendrier des enquêtes.....	38
2.4.3. Question éthique de la recherche.....	39
2.4.4. Echantillonnage.....	39
2.4.5. Culture et isolement des souches de trypanosomes.....	41
2.4.5.1. Culture des souches de trypanosome.....	41
2.4.5.1.1. Culture <i>in vivo</i> des souches du terrain.....	41
2.4.5.1.2. Souches de référence.....	42
2.4.5.1.2.1. Culture <i>in vivo</i> des formes sanguicoles.....	42
2.4.5.1.2.2. Culture <i>in vitro</i> des formes procycliques.....	43
2.4.5.2. Isolement des souches de trypanosomes.....	43
2.4.5.2.1. Souches du terrain.....	43
2.4.5.2.2. Souches sanguicoles.....	44
2.4.5.2.3. Souches procycliques.....	46
2.4.6. Diagnostic des trypanosomes chez les animaux domestiques.....	47
2.4.6.1. Techniques parasitologiques ou méthodes directes.....	47
2.4.6.2. Test de la trypanolyse.....	49
2.4.6.3. Diagnostic des trypanosomes à l'aide d'outils de biologie moléculaire.....	49
2.4.6.3.1. Extraction de l'ADN génomique.....	49
2.4.6.3.2. Amplification de l'ADN extrait.....	50
2.4.6.3.2.1. Réalisation du milieu réactionnel pour la PCR.....	50

2.4.6.3.2.2. Programme thermique de l'amplification en PCR	51
2.4.6.3.3. Electrophorèse et révélation des produits d'amplification	53
2.4.7. Géotypage des souches de trypanosomes à l'aide de loci microsatellites	53
2.4.7.1. Marqueurs microsatellites utilisés	54
2.4.7.2. Amplification de l'ADN du complexe <i>Trypanosoma brucei</i> s.l.	58
2.4.7.3. Réarrangement des plaques	59
2.4.7.4. Lecture des profils géotypiques	60
2.4.8. Expérimentation animale : Xenodiagnostic.....	60
2.4.8.1. Infections expérimentales des glossines.....	60
2.4.8.2. Suivi des infections.....	61
2.4.9. Analyses statistiques des données	63
2.4.9.1. Prévalence de l'infection aux trypanosomes	63
2.4.9.2. Estimation des paramètres de la diversité génétique.....	63
2.4.9.3. Structuration génétique des souches de <i>Trypanosoma brucei</i> s.l.....	65
TROISIEME PARTIE : RESULTATS	67
3.1. Prévalence de l'infection aux trypanosomes	67
3.1.1. Enquête de 2013	67
3.1.1.1. Diagnostic parasitologique	67
3.1.1.2. Diagnostic moléculaire des trypanosomes	69
3.1.1.3. Trypanolyse	72
3.1.2. Enquête de 2015	75

3.1.2.1. Diagnostic parasitologique	75
3.1.2.2. Diagnostic moléculaire des trypanosomes	76
3.1.2.3. Trypanolyse	79
3.1.3. Comparaison des prévalences d'infection des enquêtes de 2013 et 2015	82
3.1.3.1. Parasitologie	82
3.1.3.2. Diagnostic moléculaire des trypanosomes	83
3.1.3.3. Trypanolyse	85
Conclusion partielle.....	87
3.1.4. Enquête de 2017	88
3.1.4.1. Diagnostic parasitologique	88
3.1.4.2. Diagnostic moléculaire des trypanosomes	88
3.1.4.3. Trypanolyse	89
3.1.5. Diagnostic moléculaire de <i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	91
Conclusion partielle.....	93
3.2. Diversité génétique des populations de l'espèce <i>Trypanosoma brucei</i> s.l.	94
3.2.1. Profils génotypiques obtenus.....	94
3.2.2. Nombre moyen d'allèles et taux de polymorphisme	96
3.2.3. Déséquilibres de liaison entre paire de loci au sein des populations.....	98
3.2.4. Déviation de la panmixie dans les foyers et les villages	101
3.2.5. Isolement par la distance et subdivision.....	105
3.2.6. Structuration génétique du complexe <i>Trypanosoma brucei</i> s.l.	106

Conclusion partielle.....	108
3.3. Expérimentation animale : xénodiagnostic par mouches tsé-tsé.....	109
3.3.1. Suivi parasitologique des porcs	109
3.3.2. Efficacité du diagnostic des trypanosomes chez la glossine	109
Conclusion partielle.....	113
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION.....	114
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	123
CONCLUSION GENERALE	124
PERSPECTIVES.....	126
RECOMMANDATIONS.....	127
REFERENCES.....	128
ANNEXES	149
ARTICLES.....	159

SIGLES ET ABBREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
BC	: Buffy-Coat
BCT	: Buffy-Coat Test
BET	: Bromure d’Ethidium
CATT	: Card Agglutination Test for Trypanosomiasis
CIRDES	: Centre International de Recherche-Développement sur l’Elevage en zone Subhumide
dNTP	: Désoxynucléotide-5’-triphosphate
EDTA	: Acide Ethylène Diamine Trétracétique
DEAE	: Diethylaminoethyl cellulose
G	: Gramme
IPR	: Institut Pierre Richet
IRD	: Institut de Recherche pour le Développement
LCR	: Liquide céphalo-rachidien
LiTat	: Lille Trypanozoon antigen type
Mm	: millimolaire
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
WHO	: World Health Organization
Pb	: Paire de bases
PCR	: Réaction de Polymérisation en Chaîne
PNLTHA	: Programme National de Lutte contre la THA
URGEM	: Unité de Recherche Génétique et Epidémiologie Moléculaire
PRCT	: Projet de Recherche Clinique sur les Trypanosomoses
Rpm	: nombre de tour par minutes
TAA	: Trypanosomose Animale Africaine
Taq pol	: Taq polymérase
TBE	: Tris Borate EDTA
QBC	: Quantitative Buffy-Coat

mAECT	: miniature Anion Exchange Centrifugation Technique (technique de filtration sur mini-colonne échangeuse d'anions)
SVF	: Sérum de Veau Fœtal
THA	: Trypanosomose Humaine Africaine
TL	: Trypanolyse
VAT	: Variant antigénique (Variant Antigen Type)
VSG	: Glycoprotéine variable de surface (Variable Surface Glycoprotein)
PBS	: Phosphate Base Saline
U/ μ l	: Unité par microlitre
HWE	: Hardy-Weinberg
IC	: Intervalle de Confiance
A_m	: nombre moyen d'allèles

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Effectif d'animaux par espèce en fonction des foyers et des périodes d'enquêtes	39
Tableau II : Caractéristiques des couples d'amorces utilisées pour la PCR	52
Tableau III : Caractéristiques des 18 marqueurs microsatellites utilisés pour le génotypage des échantillons positifs à la PCR TBR1/TBR2	55
Tableau IV : Composition du milieu réactionnel de la PCR.....	59
Tableau V : Prévalence parasitologique des trypanosomes détectés chez les espèces animales	68
Tableau VI : Prévalence parasitologique des trypanosomes détectés chez les espèces animales dans chaque foyer d'étude.....	68
Tableau VII : Prévalence des espèces de trypanosomes identifiées chez les animaux domestiques.....	70
Tableau VIII : Prévalence des espèces de trypanosomes identifiées chez les animaux domestiques dans chaque foyer d'étude.....	71
Tableau IX : Prévalence parasitologique des trypanosomes détectés chez les espèces animales	75
Tableau X : Prévalence parasitologique des trypanosomes détectés chez les espèces animales dans chaque foyer d'étude.....	76
Tableau XI : Prévalence des espèces de trypanosomes identifiées chez les animaux domestiques.....	77
Tableau XII : Prévalence des espèces de trypanosomes identifiées chez les animaux domestiques dans chaque foyer d'étude.....	78
Tableau XIII : Prévalence parasitologique des trypanosomes détectés chez les espèces animales testés pendant les enquêtes de 2013 et 2015	82
Tableau XIV : Prévalence des espèces de trypanosomes identifiées chez les animaux domestiques testés pendant les enquêtes de 2013 et 2015	84
Tableau XV : Prévalence d'animaux testés positifs aux variants antigéniques de la trypanolyse effectuée pendant les enquêtes de 2013 et 2015	86
Tableau XVI : Prévalence des trypanosomes révélés par les différents tests de diagnostics effectués sur les porcs	90

Tableau XVII : Résultat de la PCR spécifique à <i>T. b. gambiense</i>	92
Tableau XVIII : Taux d'amplification obtenu avec les marqueurs <i>T. gambiense</i> et <i>T. brucei</i>	95
Tableau XIX : Nombre et taille des allèles obtenus avec les 18 marqueurs utilisés dans la population d'étude (Sinfra, Bonon et Vavoua)	97
Tableau XX : Nombre moyen d'allèles et taux de polymorphisme des sous-populations	98
Tableau XXI : Test de déséquilibre de liaison par paires de loci.....	99
Tableau XXII : Résultats parasitologiques enregistrés pendant les différents suivis	110
Tableau XXIII : Infection expérimentale des glossines	111
Tableau XXIV : Détection des trypanosomes par examen microscopique du sang des porcs et des organes des glossines	112

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification des trypanosomes des mammifères	7
Figure 2 : Structure de <i>Trypanosoma brucei</i> s.l.	8
Figure 3 : Cycle de vie de <i>Trypanosoma brucei</i> s.l.	9
Figure 4 : Protéines majeures de surface au cours du cycle parasitaire de <i>Trypanosoma brucei</i>	10
Figure 5 : Adénopathie cervicale	11
Figure 6 : Représentation schématique illustrant le phénomène de la variation antigénique ..	13
Figure 7 : Mouche tsé-tsé ou glossine (<i>Glossina palpalis palpalis</i>)	18
Figure 8 : Nombre total de cas de THA à <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> en Afrique	22
Figure 9 : Evolution du nombre de cas de THA en Côte d'Ivoire de 2000 à 2018.....	23
Figure 10 : Situation géographique des sites d'étude.....	30
Figure 11 : Localisation des sites d'échantillonnage dans le département de Sinfra.....	32
Figure 12 : Localisation des sites d'échantillonnage dans	34
Figure 13 : Localisation des sites d'échantillonnage dans le département de Vavoua	36
Figure 14 : Prélèvement de sang chez un porc	41
Figure 15 : Inoculation de sang parasité à une souris NMRI	42
Figure 16 : Récolte et purification de souche de référence sanguicole	45
Figure 17 : Observation microscopique d'une culture procyclique	46
Figure 18 : Illustration de méthodes directes dans la détection des trypanosomes.....	48
Figure 19 : Cage déposée sur un porc pour le repas de sang des glossines	60
Figure 20: Dissection et observation microscopique	62
Figure 21 : Proportion d'animaux testés positifs aux trois variants antigéniques de la trypanolyse	73
Figure 22 : Proportion d'animaux testés positifs aux variants LiTat1.3 (a), LiTat1.5 (b) et LiTat1.6 (c) par foyer	74

Figure 23 : Proportion d’animaux testés positifs aux trois variants antigéniques de la trypanolyse	80
Figure 24 : Proportion d’animaux testés positifs aux variants LiTat1.3 (a), LiTat1.5 (b) et LiTat1.6 (c) par foyer	81
Figure 25 : Gel d’électrophorèse montrant les produits d’amplification	91
Figure 26 : Profil mono-allélique représentant un homozygote (a) et profil bi-allélique représentant un hétérozygote (b).	95
Figure 27 : Valeurs de F_{IS} par locus et sur l’ensemble des loci, intervalles de confiance (95 %) de jackknife sur les foyers (pour les loci) ou de bootstrap sur les loci (pour la moyenne globale).....	102
Figure 28 : Valeurs de F_{IS} par locus et sur l’ensemble des loci, intervalles de confiance (95 %) de jackknife sur les villages (pour les loci) ou de bootstrap sur les loci (pour la moyenne globale).....	103
Figure 29 : Variation du F_{IS} d'un sous-échantillon à l'autre selon les combinaisons cohorte/village.....	104
Figure 30 : Représentation de l’isolement par la distance entre les sous-échantillons Contemporains	105
Figure 31 : Dendrogramme obtenu selon la méthode du NJTree sur la matrice de distance de Cavalli-Sforza et Edwards.....	107

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Questionnaires épidémiologiques et cliniques	149
Annexe II : Caractéristiques des souches de référence utilisées pour le génotypage	151
Annexe III : Quantité des produits chimiques pour la composition du milieu Cunningham .	153
Annexe IV : Protocole du Kit d'extraction QIAGEN	154
Annexe V : REA 1 de la plaque ADN n° A	156
Annexe VI: Conditions d'amplification PCR de l'ADN	157
Annexe VII : Panel de trois et de quatre marqueurs microsatellites	158

INTRODUCTION

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil est une affection parasitaire endémique touchant de nombreux pays de l'Afrique Subsaharienne (Simarro *et al.*, 2012). Cette parasitose est causée par deux sous-espèces de trypanosomes appartenant à l'espèce *Trypanosoma brucei* (*T. b*) sensu lato (s.l.) (Büscher *et al.*, 2017). Chaque sous-espèce provoque une forme de pathologie. La sous-espèce *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*), observée en Afrique de l'Ouest et Centrale est responsable de l'infection chronique de la THA et représente plus de 98 % de cas rapportés actuellement (Franco *et al.*, 2018), tandis que la sous-espèce *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*), présente en Afrique de l'Est et du Sud est responsable de la forme aiguë de la maladie et de plus de 2 % de cas notifiés. Une troisième sous-espèce, *T. b. brucei*, non pathogène pour l'homme, est l'un des trypanosomes responsables de la Trypanosomose Animale Africaine (TAA) chez les animaux sauvages et domestiques dans toutes les régions africaines colonisées par les glossines, vecteurs biologiques de ces parasites (Hoare, 1972).

L'histoire du continent africain a été profondément marquée par les flambées épidémiques de la THA, à la fin du XIX^{ème} siècle, qui décimèrent des villages entiers (Martin *et al.*, 1909). Dans les années 1960, une lutte acharnée, conduite par un médecin colonial, Eugène Jamot et divers services de lutte contre la THA, a permis de faire baisser le nombre de cas et de déclarer la maladie sous contrôle dans les années 70 dans toute l'Afrique sub-saharienne (Frézil, 1990). Cette situation favorable a conduit à une diminution de la surveillance après les indépendances, engendrant la résurgence de la maladie. A la fin du XX^{ème} siècle, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé que plus de 60 millions d'africains sont exposés au risque de contracter la maladie (WHO, 1998). Depuis lors, une alliance mondiale dirigée par l'OMS a fait sienne l'épidémie de la THA comme problème de santé publique (WHO, 2012). Cet engagement renouvelé des institutions nationales et internationales, y compris le secteur privé, a réussi à réduire le nombre de cas. Ainsi, les données récentes n'ont notifié que 977 nouveaux cas en 2018, contre 1442 en 2017 et 2164 en 2016 en Afrique subsaharienne (Franco *et al.*, 2018 ; WHO, 2019). De plus, de nombreux pays considérés comme endémiques n'ont signalé aucun cas ces dernières années. Dans ce contexte, l'élimination durable de la THA en tant que problème de santé publique (WHO, 2012), avec l'interruption totale de la transmission en Afrique envisagée pour 2030 par l'OMS (Holmes, 2014 ; Franco *et al.*, 2018) semble être réaliste.

La THA est une sorte de vestige de la grande époque coloniale, une espèce de maladie honteuse d'une période de l'histoire du continent que d'aucuns voudraient oublier à défaut de pouvoir l'effacer (Louis, 2002). Cependant, l'histoire récente suggère que la réémergence observée à la fin du XX^{ème} siècle serait due en partie à un relâchement des efforts de lutte et à une baisse du financement de la recherche opérationnelle. Prendre les dispositions nécessaires pour ne pas retomber dans une flambée épidémique représente donc un objectif capital (WHO, 1998).

En Afrique de l'Ouest, la Côte d'Ivoire reste le deuxième pays le plus touché par la maladie du sommeil après la Guinée (Simarro *et al.*, 2012 ; WHO, 2014). En Côte d'Ivoire, la stratégie de conquête de la forêt ivoirienne pour le développement des plantations de café et de cacao a suivi une logique de fronts pionniers partis du Sud-Est, en direction du Centre-Ouest, de l'Ouest puis du Sud-Ouest, appelé communément « boucle du cacao ». Cet itinéraire géographique, suivi par les fronts pionniers du binôme café-cacao, a également été emprunté par les foyers de THA qui se sont ouverts dans certaines aires forestières bien délimitées géographiquement (Hervouët *et al.*, 2000). La THA touche particulièrement les populations travaillant dans les plantations de culture de rente (café, cacao). Cette maladie peut donc avoir un impact sur la main d'œuvre agricole et particulièrement celle relative au café et cacao. En effet, la Côte d'Ivoire est le premier exportateur mondial de fèves de cacao et classée parmi les dix premiers producteurs de café au monde. Ces deux produits représentent 40 % des recettes d'exportation nationales et environ 20 % du produit intérieur brut (Aka *et al.*, 2017). Dans les zones de production de ces matières premières, des efforts de lutte ont été réalisés dans le sens du contrôle de la THA entre 2000 et 2011, avec 643 cas notifiés (Franco *et al.*, 2018). Ces efforts sont principalement le fait des campagnes de dépistage actif exhaustif (prospections médicales) menées depuis la fin des années 1990 par le programme National d'élimination de la THA en Côte d'Ivoire (Courtin *et al.*, 2010 ; Kambiré *et al.*, 2012 ; Simarro *et al.*, 2013), en collaboration avec les équipes techniques de recherche de l'UJLoG, de l'IPR et de l'IRD. Ces campagnes de dépistage ont permis de réduire considérablement la prévalence de la maladie (Koffi *et al.*, 2016). Depuis 2009, moins de 11 cas ont été notifiés annuellement en Côte d'Ivoire (Koffi *et al.*, 2016 ; Franco *et al.*, 2018). Malgré ces importants efforts de lutte qui ont permis ces dernières années de faire baisser significativement les prévalences de la maladie, la THA continue d'exister de façon

hypo-endémique dans le Centre-Ouest, notamment dans les foyers de Bonon et Sinfra. Ce maintien de la maladie à l'état hypo-endémique, dans ces zones pourrait être dû à l'existence et au maintien d'un réservoir du parasite qui continue d'entretenir le cycle de transmission. Deux cas de figures sont possibles, à savoir le réservoir humain et le réservoir animal (Buscher *et al.*, 2018).

Concernant le réservoir humain, des études ont montré qu'il existe dans les foyers de THA, des individus positifs aux tests sérologiques mais négatifs en parasitologie. Ces individus chez lesquels le parasite reste indétectable sont appelés séropositifs (Garcia *et al.*, 2000). Une partie de ces individus séropositifs sont des porteurs asymptomatiques de parasites (Bucheton *et al.*, 2011 ; Ilboudo *et al.*, 2011 ; Kabore *et al.*, 2011 ; Ahouty *et al.*, 2017) indétectables par les tests parasitologiques classiques utilisés en routine (Garcia *et al.*, 2006). En outre, le suivi des séropositifs en Côte d'Ivoire a montré que certains de ces individus maintiennent dans le temps des réponses sérologiques élevées sans développer la maladie (Garcia *et al.*, 2000).

Si ces personnes séropositives ne sont pas traitées, elles pourraient constituer un réservoir humain de trypanosomes et favoriser le maintien de la maladie à l'état hypo-endémique de par leur présence dans les zones de transmission.

Outre ces sujets séropositifs, les animaux domestiques ont été indexés sans que leur rôle épidémiologique réel soit prouvé (Büscher *et al.*, 2018). Des études menées dans un foyer actif de la maladie du sommeil en Côte d'Ivoire ont permis d'isoler des stocks de trypanosomes chez des humains et des porcs. Les résultats de ces études ont révélé que certains stocks humains appartenant à *T. b. gambiense* étaient génétiquement proches des stocks isolés chez les porcs (Jamonneau *et al.*, 2003). Ces résultats montrent que le rôle du réservoir animal dans l'épidémiologie de la THA mérite d'être élucidé, notamment dans un contexte d'élimination de la maladie par l'OMS.

C'est dans ce contexte que s'inscrit les travaux de recherches présentés dans cette thèse dont l'objectif général est de déterminer le rôle des animaux domestiques dans le maintien et / ou la réémergence de la THA dans les foyers du Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire.

Pour atteindre cet objectif général, les différents objectifs spécifiques qui ont été assignés à cette thèse sont de :

- 1- identifier les animaux domestiques présentant des infections à *T. brucei* s.l. et de rechercher la sous espèce pathogène pour l'Homme ;
- 2- évaluer la diversité génétique des populations de l'espèce *T. brucei* s.l. chez les animaux domestiques en utilisant des marqueurs microsatellites ;
- 3- estimer en expérimentation animale (xéno-diagnostic) l'implication des faibles charges parasitaires dans le maintien de la THA à l'état hypo-endémique.

Le présent mémoire de thèse est subdivisé en quatre parties. La première partie aborde les généralités sur les trypanosomes et l'épidémiologie de la THA. La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisés pour la détection et l'identification des trypanosomes ainsi que la détermination des génotypes au sein du complexe *T. brucei* s.l. à l'aide des marqueurs microsatellites. La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus qui seront discutés dans la quatrième partie. Enfin, ce document s'achève par une conclusion et des perspectives de recherches suscitées par les résultats obtenus.

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

1.1. Trypanosomes

Les trypanosomes sont des organismes unicellulaires, microscopiques, de forme allongée, dont la locomotion est assurée par un seul flagelle dirigé vers l'avant. Ce sont des protozoaires du genre *Trypanosoma*, ayant un hôte vertébré, chez lequel ils se multiplient dans les liquides biologiques et un hôte invertébré, généralement un insecte piqueur chez lequel ils vivent dans le tractus gastro-intestinal. Les trypanosomes sont responsables de diverses maladies animales et humaines en l'occurrence la Trypanosomose Animale Africaine (TAA) et la Trypanosomose Humaine Africaine (THA). Ils s'observent au microscope avec ou sans coloration. Il existe de nombreuses espèces de trypanosomes africains. Parmi celles-ci, seuls ceux qui appartiennent au groupe *T. brucei* s.l. sont infectieux pour l'être humain (WHO, 2013).

1.1.1. Biologie des trypanosomes

Les trypanosomes sont des protozoaires parasites obligatoires vivant dans les liquides biologiques (sang, lymphe et LCR). Cependant, des études récentes ont mentionné la présence de trypanosomes sous la peau de leurs hôtes (Caljon *et al.*, 2016 ; Capewell *et al.*, 2016) et dans les tissus adipeux (Trindade *et al.*, 2016). Les trypanosomes sont des êtres vivants constitués d'une seule cellule munie d'un flagelle qui assure leur locomotion. En Afrique subsaharienne, une seule espèce, *T. brucei* s.l., pathogène pour l'homme est strictement localisée dans les régions où vivent les glossines.

1.1.2. Systématique des trypanosomes

Les trypanosomes africains appartiennent à la classe des zoomastigophorea, à l'ordre Kinetoplastida, au sous-ordre Trypanosomatina, à la famille Trypanosomatidae et au genre *Trypanosoma* (WHO, 2013) (Figure 1). Le genre *Trypanosoma* comporte huit sous-genres subdivisés en deux sections selon les modalités de développement du trypanosome chez l'insecte. On distingue la section des *Stercoraria* et celle des *Salivaria*.

La section des *Salivaria* se caractérise par un cycle de développement qui a lieu dans l'intestin ou dans la région buccale du vecteur et qui s'achève dans les pièces buccales ou les glandes salivaires. Cette section a un mode de transmission antérograde. La transmission chez l'hôte

vertébré se fait par inoculation des formes infectantes lors de la piqûre de l'insecte. *Salivaria* contient quatre sous-genres (Hoare, 1972) : *Duttonella* (*T. vivax*, *T. uniforme*), *Trypanozoon* (*T. brucei* s.l., *T. evansi*, *T. equiperdum*), *Pycnomonas* (*T. suis*) et *Nannomonas* (*T. congolense*, *T. simiae*, *T. godfreyi*).

L'espèce *T. brucei* s.l. comprend trois sous-espèces génétiquement différentes (Gibson, 2007 ; Balmer *et al.*, 2011) : *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*. Cette dernière est subdivisée en deux sous-groupes génétiquement différents : le groupe 1, très homogène (*T. b. gambiense* groupe 1), responsable de la maladie du sommeil dans 98 % des cas répertoriés actuellement (Franco *et al.*, 2018) et le groupe 2, hétérogène (*T. b. gambiense* groupe 2) dont l'existence est discutée (Koffi *et al.*, 2009 ; Jamonneau *et al.*, 2019).

La section des *Stercoraria* se caractérise par un cycle de développement du parasite qui se déroule dans le tractus digestif de l'insecte vecteur et s'achevant dans l'intestin postérieur. Les formes infectantes sont transmises par les fécès du vecteur et pénètrent de façon active à travers la peau de l'hôte. On parle de cycle de développement à transmission postérograde. Cette section comprend trois sous-genres (Hoare, 1972) : *Megatrypanum* (*T. theileri*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*) et *Schizotrypanum* (*T. cruzi*, *T. rangeli*).

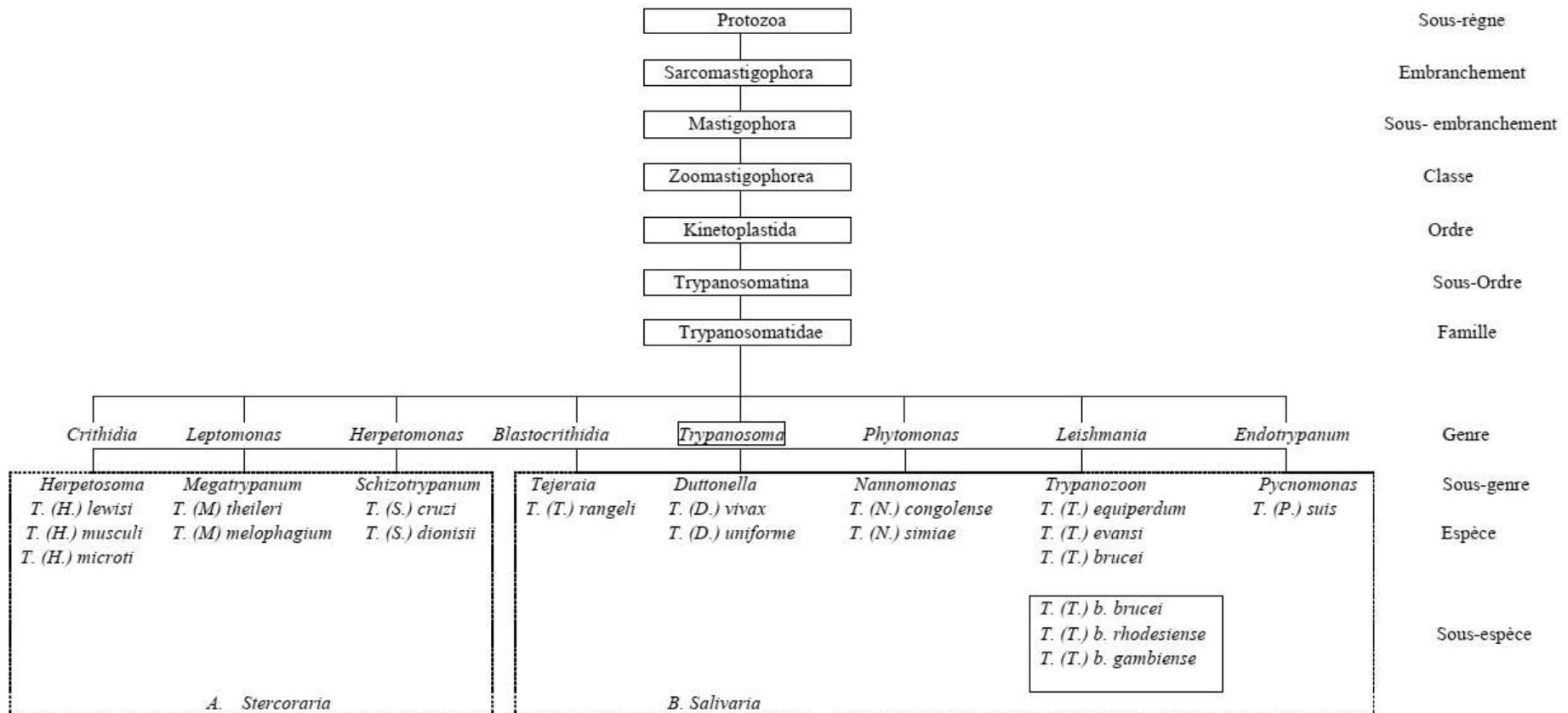


Figure 1 : Classification des trypanosomes des mammifères

Source : WHO. (2013).

1.1.3. Morphologie de *Trypanosoma brucei* s.l.

Les trypanosomes du complexe *T. brucei* s.l. mesurent 10 à 40 μm de long sur 2 à 3 μm de large. Comme tous les kinétoplastidés, les trypanosomes possèdent, outre les constituants cellulaires classiques (noyau, cytoplasme), un organite spécifique, le kinétoplaste, qui est une masse colorée en rouge par le Giemsa et situé à l'extrémité postérieure du trypanosome et d'où part le flagelle (Figure 2). Le kinétoplaste joue un rôle dans la production d'énergie du trypanosome. L'existence d'un flagelle plus ou moins développé délimite avec le périplasme une membrane ondulante, qui permet de distinguer plusieurs stades de différenciation du parasite, tant chez l'insecte vecteur que chez l'hôte mammifère. Ces stades permettent de distinguer des phases successives dans le cycle évolutif (Fenn *et al.*, 2007) (Figure 3).

1.1.4. Cycle évolutif de *Trypanosoma brucei* s.l.

Les trypanosomes du groupe *T. brucei* s.l. ont un cycle de vie complexe avec divers stades qui présentent une morphologie et une physiologie distinctes chez l'hôte vertébré (homme ou animal) et chez l'insecte vecteur (WHO, 2013).

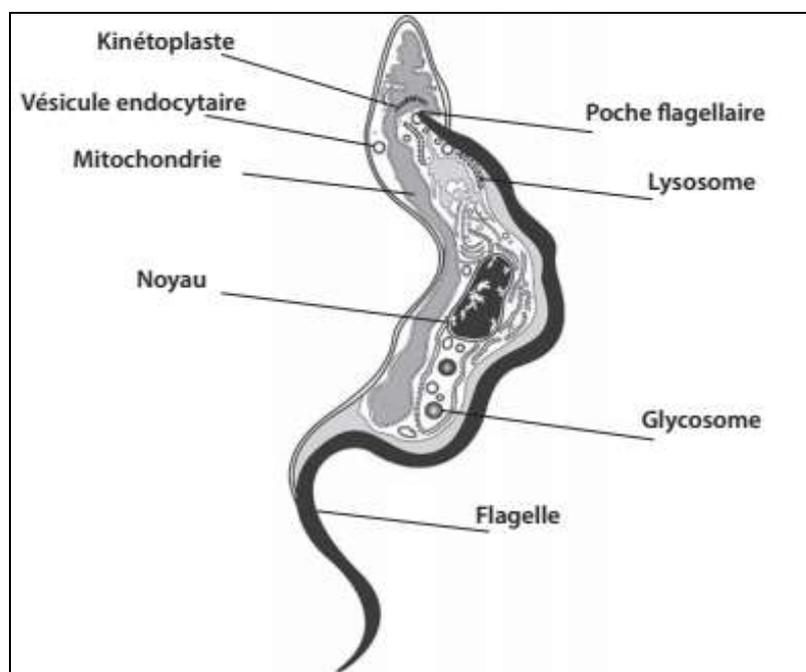


Figure 2 : Structure de *Trypanosoma brucei* s.l.

Source : WHO. (2013).

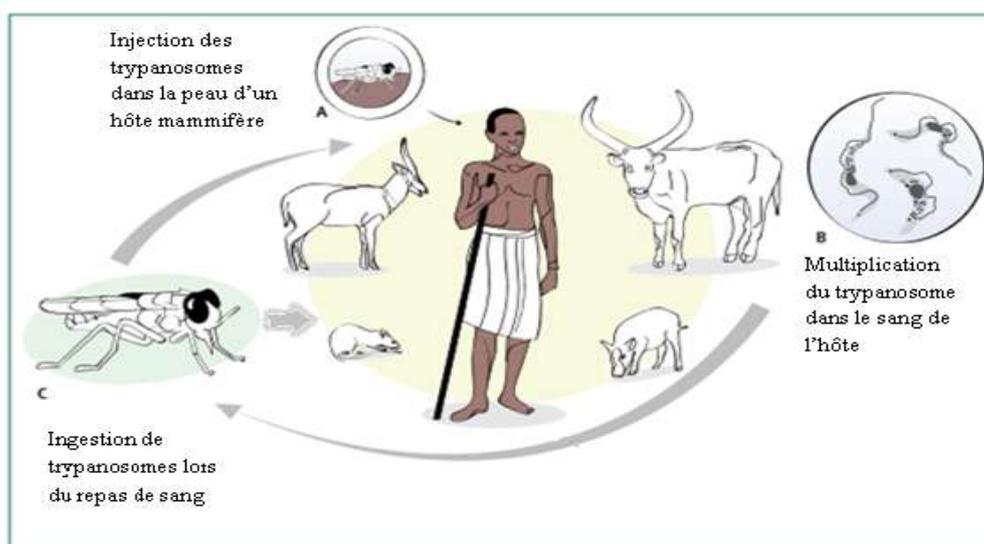


Figure 3 : Cycle de vie de *Trypanosoma brucei* s.l.

Source : Büscher *et al.* (2017).

1.1.4.1. Chez l'hôte vecteur

Lorsque la mouche tsé-tsé prend son repas de sang chez un hôte infecté, elle absorbe des formes trypomastigotes courtes ou trapues (formes sanguicoles) qui se transforment en formes dites trypomastigotes procycliques ou allongées dépourvues de leur revêtement antigénique. Dans l'intestin moyen de la glossine, ces formes procycliques se multiplient activement et migrent vers les glandes salivaires où elles se différencient en épimastigotes qui se transforment à leur tour en formes trypomastigotes métacycliques infectieuses. Les trypanosomes métacycliques et sanguicoles sont caractérisés par l'acquisition à leur surface d'un revêtement protecteur formé de Glycoprotéine Variable de Surface (GVS) ou Variant Surface Glycoprotein (VSG) en anglais. La GVS va permettre à ces trypanosomes de survivre chez l'hôte mammifère. Elle est remplacée par la procycline chez les trypanosomes procycliques (Figure 4) (Pays, 1990). Ces formes métacycliques infectantes se détachent des cellules épithéliales salivaires et restent dans la salive par laquelle elles sont transmises à l'hôte mammifère lors du prochain repas de sang. La durée du cycle dépend de l'espèce de trypanosome et de la température; elle est estimée à 30 jours chez *T. brucei* (Kennedy, 2004).

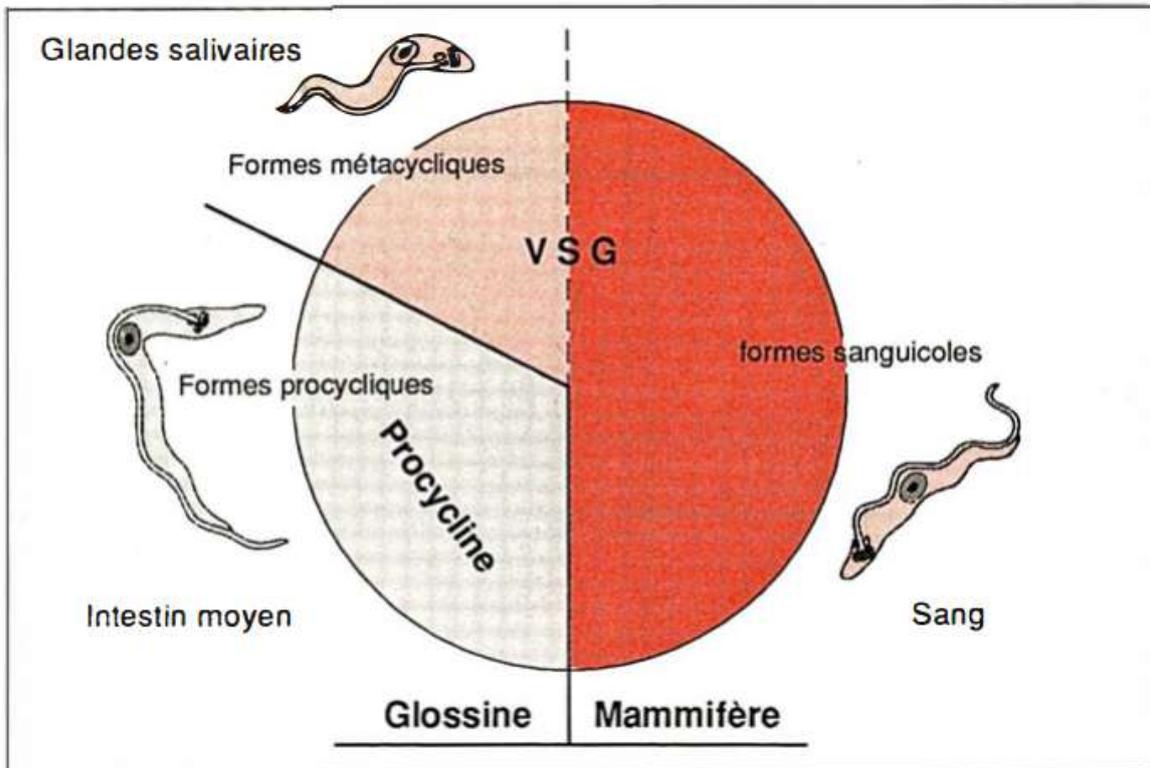


Figure 4 : Protéines majeures de surface au cours du cycle parasitaire de *Trypanosoma brucei*

Source : Pays. (1990).

1.1.4.2. Chez l'hôte mammifère

Lors du repas de sang, la glossine injecte par voie hypodermique des formes métacycliques infectieuses présentes dans ses glandes salivaires. Les trypanosomes métacycliques se localisent dès les premiers instants au niveau du point de piqûre où ils se différencient en formes sanguicoles longues et grêles qui sont entraînées vers le courant sanguin où elles se multiplient activement. C'est la première phase de la maladie ou phase lymphatico-sanguine. Cette première phase peut durer de plusieurs mois à plusieurs années. Ensuite, les trypanosomes envahissent le liquide céphalo-rachidien et d'autres organes, tout

particulièrement le cerveau et le système nerveux central (Kennedy, 2004), conduisant à la deuxième phase de la maladie ou phase neurologique. Les formes grêles se différencient également pour donner naissance à des formes trapues qui ne se reproduisent pas et sont déjà adaptées à l'environnement que va leur offrir la mouche tsé-tsé une fois que celle-ci les aura captées à la faveur d'un nouveau repas de sang. Ces formes trapues sont les seules à être infectieuses pour l'insecte (Fenn & Matthews, 2007).

Les symptômes les plus fréquents lors de la phase lymphatico-sanguine sont la fièvre, les céphalées, les adénopathies cervicales (Figure 5), signes de Winterbottom, l'asthénie et des douleurs musculaires et articulaires.

Le deuxième stade de la maladie se caractérise par de nombreux troubles sensitifs, moteurs, psychiatriques, des troubles de la vigilance, des troubles neuro-endocriniens (stérilité et perte de libido, trouble de la soif) et du sommeil.

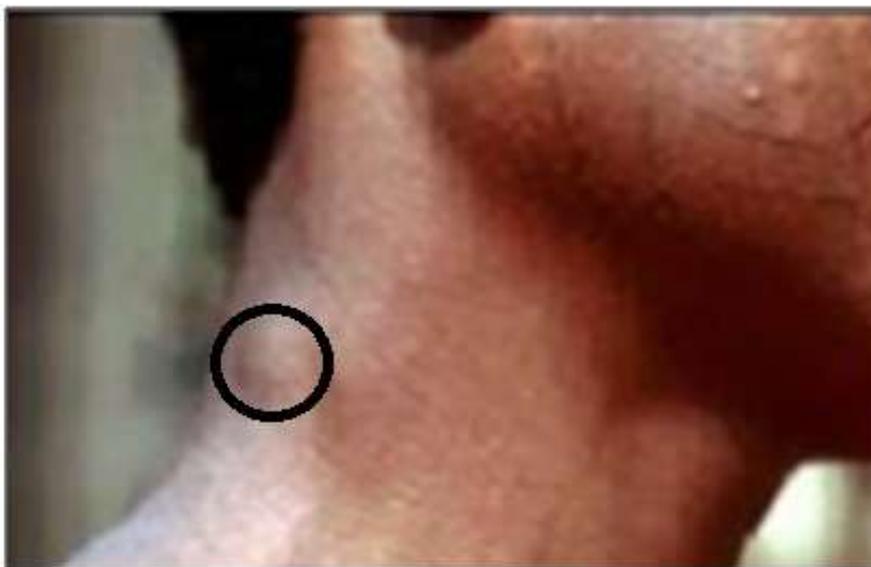


Figure 5 : Adénopathie cervicale

Source : Anofel. (2014).

1.1.5. Particularité du trypanosome : la variation antigénique

La variation des antigènes de surface au cours de l'infection chez l'hôte mammifère est un phénomène bien connu dans les trypanosomoses africaines. Elle protège les parasites contre la réponse immunitaire de l'hôte et permet ainsi la persistance de l'infection. En effet, le revêtement antigénique du trypanosome se compose d'un antigène majeur de surface (Glycoprotéine Variable de Surface: GVS) et d'antigènes mineurs (Pays & Berberof, 1995; Pays & Vanhollebeke, 2009). Cette couverture apparaît dès le stade métacyclique infectant chez l'insecte vecteur, elle recouvre les formes sanguicoles chez l'hôte vertébré et disparaît chez les formes procycliques dans l'intestin de la glossine, où la GVS est remplacée par la procycline (Rudenko *et al.*, 1994). Le trypanosome a la faculté de modifier la glycoprotéine de surface exprimée, ce qui lui permet d'échapper au système immunitaire de son hôte (Cross, 1975). Différents variants antigéniques (VAT) se multiplient lors de chaque vague de parasitémie. Un variant distinct, revêtant une GVS donnée, prolifère chez l'hôte, déclenchant alors une réponse immunitaire spécifique (type IgM); la majorité des trypanosomes est alors détruite mais une petite population, exprimant un nouvel antigène, survit. Cette dernière se multiplie activement jusqu'à ce que les nouveaux anticorps soient produits et le cycle recommence (Figure 6). Le trypanosome a la possibilité d'exprimer plus d'un millier de GVS différents (Pays *et al.*, 2006; Vanhollebeke & Pays, 2010). Cette propriété empêche l'hôte d'acquérir une immunité protectrice et constitue aussi un frein à l'élaboration d'un vaccin efficace (Dumas & Bouteille, 1996).

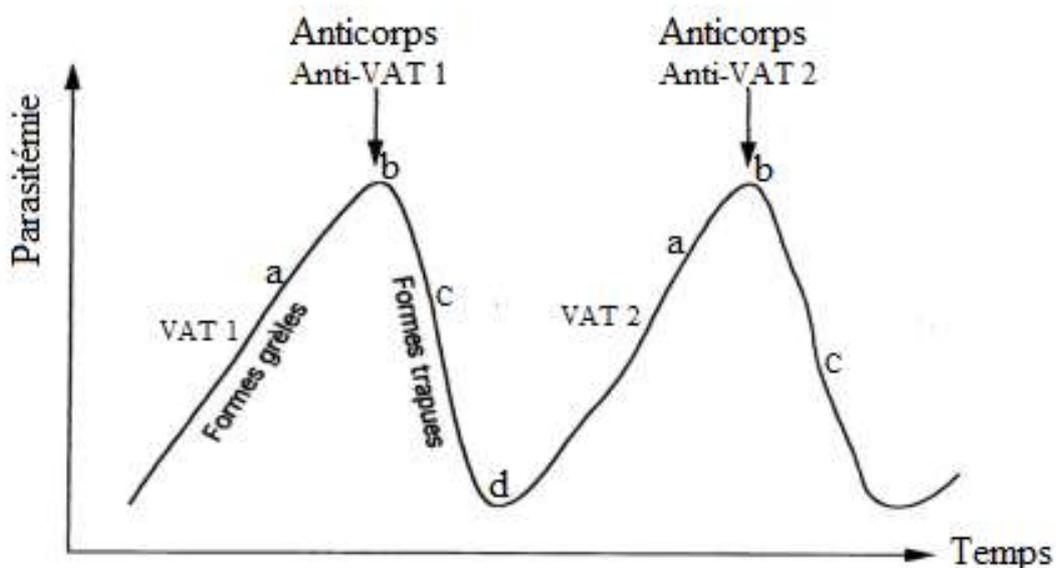


Figure 6 : Représentation schématique illustrant le phénomène de la variation antigénique

Source : Thèse de Koffi Mathurin, 2006.

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 (a). Une réaction immunitaire à médiation humorale (fabrication d'anticorps anti-VAT 1) combat rapidement cette première invasion (b) et la plupart des trypanosomes sont détruits (c). Les survivants évoluent en forme trapue, sous laquelle ils peuvent changer leur couverture antigénique pour former une nouvelle population VAT 2 (d). 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).

1.1.6. Mode de reproduction de *Trypanosoma brucei* s.l.

La question de savoir si les micro-organismes pathogènes ont un mode de reproduction clonal ou sexuel se pose depuis longtemps. Des débats à ce sujet ont été évoqués dans de nombreuses études sur des bactéries et des protozoaires parasites (Tibayrenc, 1999). Dans ce contexte, la clonalité a une signification purement génétique. En effet, le terme clonal fait référence à tout organisme dont la progéniture est génétiquement identique à celle du parent. L'analyse de la structure génétique des populations de *T. brucei* s.l. utilisant une variété de différents marqueurs, a généré des résultats et des interprétations contradictoires concernant son mode de reproduction. Dans le cadre du débat clonalité versus sexualité, pour certains auteurs, les parasites du genre *Trypanosoma* sont essentiellement clonaux (Tibayrenc *et al.*, 1990 ; Tibayrenc & Ayala, 1991). La proposition selon laquelle *T. brucei* s.l. est essentiellement clonal a été contestée, principalement sur la stabilité à long terme des clones naturels de ce parasite (Cibulskis, 1992; Maynard-Smith *et al.*, 1993). A cet égard, Tait (2007) en se basant sur des interprétations des modèles électrophorétiques enzymatiques, a fourni des preuves d'une certaine forme d'échange génétique dans une population en équilibre de Hardy-Weinberg. Récemment, il a été démontré que la sous-espèce *T. b. gambiense* groupe 1 de *T. brucei* s.l. est strictement clonale (Koffi *et al.*, 2009 ; Séré *et al.*, 2014), au moins aux échelles du court et moyen terme. La théorie de la reproduction sexuelle a été démontré expérimentalement par certains travaux (MacLeod *et al.*, 2005a ; Tait *et al.*, 2007 ; Peacock *et al.*, 2011 ; Tait *et al.*, 2011; Peacock *et al.*, 2014). En effet, pour ces auteurs, la recombinaison sexuée est possible entre différentes souches de laboratoire de *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* groupe 2 et *T. b. rhodesiense* (mais jamais *T. b. gambiense* groupe 1) dans les glandes salivaires de la mouche tsé-tsé.

Des échanges génétiques ont été fréquemment observés chez *T. b. rhodesiense*, avec une extension clonale sporadique de certains génotypes au cours des épidémies. La structure de la population de *T. b. gambiense* se révèle relativement stable, ce qui indique que les échanges génétiques y sont moins fréquents (Koffi *et al.*, 2007).

La reproduction sexuée n'est pas obligatoire chez le trypanosome (Kaboré *et al.*, 2011). Les études de Koffi *et al.* (2009) ont révélé de fréquents profils homozygotes comparativement à celles précédemment menées sur les mêmes sites, mais sur les échantillons isolés. Ces

résultats suggéraient l'existence d'événements sexuels rares chez les organismes étudiés ou plus probablement de problèmes techniques d'amplifications (Kaboré *et al.*, 2011 ; Kaboré *et al.*, 2013). Cette fréquence anormale d'homozygote a été supposée être due à des allèles nuls et / ou à des allèles nuls connus sous le vocable de dropouts alléliques (Kaboré *et al.*, 2011). Les allèles nuls produiraient une sous-estimation de l'hétérozygotie, ainsi qu'une augmentation de la variance des loci, qui pourrait être interprétée comme résultant de recombinaisons sexuelles rares (Balloux *et al.*, 2003 ; De Meeûs *et al.*, 2006).

1.1.7. Génome des trypanosomes

Les trypanosomes sont des organismes diploïdes qui subissent une mitose au cours de laquelle l'enveloppe nucléaire ne se décompose pas. Le génome des trypanosomes africains est relativement plastique. En effet, le nombre de copies géniques peut s'accroître ou se réduire à une fréquence relativement élevée (WHO, 2013). Chez les espèces procycliques et sanguines de *T. brucei* s.l., le nucléole reste toujours intégral tout au long de la division (Daniels *et al.*, 2010). Le génome de *T. brucei* s.l. est englobé par 11 paires de chromosomes de la taille d'une megabase (Daniels *et al.*, 2010). Les trypanosomes possèdent un génome nucléaire (ADN nucléaire) et un génome mitochondrial (ou kinétoplastique, ADNk).

1.1.7.1. ADN nucléaire

L'organisation du génome des trypanosomes n'a pas pu être étudiée par des méthodes cytologiques du fait de l'absence de condensation des chromosomes au cours du cycle cellulaire (Vickerman & Preston, 1970). Cependant, cette difficulté a été surmontée par l'analyse électrophorétique en champs pulsé (*Pulse Field Gel Electrophoresis [PFGE]*) du matériel génomique (Wells *et al.*, 1987). L'utilisation de cette PFGE a révélé que le génome nucléaire de ces organismes majoritairement diploïdes, est constitué de mini-chromosomes, de chromosomes intermédiaires et de méga-chromosomes (Wickstead *et al.*, 2004).

❖ Les mini-chromosomes sont au nombre d'une centaine dont la taille varie entre 50 et 250 kilobases (Kb) (Garside *et al.*, 1994). Selon Wickstead *et al.* (2004), les mini-chromosomes sont linéaires et très nombreux; de taille comprise entre 30 et 150 Kb.

❖ Les chromosomes intermédiaires sont en plus faible nombre, de 20 à 50 et de taille comprise entre 200 et 700 Kb (Wickstead *et al.*, 2004).

❖ Les méga chromosomes, au nombre d'une vingtaine, forment 11 paires homologues dont les tailles varient considérablement entre homologues et entre souches (Melville *et al.* 1999). La taille des méga chromosomes est comprise entre 900 et 6000 Kb (Wickstead *et al.*, 2004).

Le nombre de chaque catégorie de chromosomes n'est pas fixé de façon rigide. En effet, il peut varier notablement d'une souche de parasites à une autre au sein d'une même espèce (Gibson & Borst, 1986).

Les expériences de cinétique de renaturation de l'ADN des trypanosomes ont montré que la taille du génome d'une cellule haploïde est de $3,7 \times 10^7$ pb. Près de 12 % des ADN sont formés de séquences hautement répétées, 20 %, de séquences moyennement répétées, et enfin 68 %, de séquences non répétées (Michels *et al.*, 1991).

La moitié de l'ADN des trypanosomes comporte des séquences codantes, dont la majorité concerne l'expression des glycoprotéines variables de surface GVS nécessaire à la variation antigénique (Dero *et al.*, 1987; Wickstead *et al.*, 2004).

1.1.7.2. ADN kinétoplastique

L'ADNk est formé de deux types de molécules : les minicercles, en très grand nombre (5000 à 20000) et les maxicercles, en plus faible nombre (10 à 100).

❖ Les minicercles non-transcrits dont la taille varie entre 20 et 23 Kb, sont formés d'une région conservée de 100 à 150 Pb et d'une région variable de 850 à 900 Pb (Chen & Donelson, 1980).

Une séquence de 12 nucléotides présente sur la région conservée est hautement préservée d'une espèce à l'autre, voire d'un genre de *Kinetoplastidae* à l'autre (Sugisaki et Ray, 1987). N'tambi et Englund (1985) ont montré que cette séquence correspond à l'origine de la réplication des minicercles, et l'ont appelée : la "séquence universelle des minicercles".

L'existence d'une ou de plusieurs séquences transcrites sur les minicercles a été longtemps controversée (Simpson, 1987). Cependant, les travaux Pollard et Hajduk (1991) ont démontré

clairement le rôle joué par les minicercles, après transcription en ARN, dans le phénomène d'édition des ARN des trypanosomes.

❖ Les maxicercles transcrits sont formés chacun d'une région conservée et d'une région variable (Borst *et al.*, 1981). Ces ADN sont présents chez tous les trypanosomes de la section *Salivaria* sauf *T. evansi* (Simpson, 1987). Plusieurs maxicercles identiques codent des ARN ribosomiques et des ARN messagers pour 18 protéines mitochondriales (McDermott *et al.*, 2016). Leur taille est en moyenne 20 fois supérieure à celle des minicercles. L'analyse du maxicercle par le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) a été proposée comme outil taxonomique (Gibson *et al.*, 1985; Truc, 1991).

1.2. Vecteurs de la THA

La glossine ou mouche tsé-tsé est le principal vecteur des trypanosomoses aussi bien humaines qu'animales. La glossine du genre *Glossina* (Figure 7) est un insecte hématophage vecteur de la maladie du sommeil (Büscher *et al.*, 2017). Elle présente une série de caractéristiques biologiques et démographiques qui lui confèrent une place unique parmi les vecteurs importants sur le plan médical. Son cycle évolutif est particulièrement insolite, car elle ne pond pas d'œufs mais produit une seule larve par cycle. Cette larve tire sa nourriture des glandes utérines de la mère « viviparité adénotrophique » et une fois parvenue à maturité (troisième stade larvaire), elle est déposée dans le sol humide. Elle s'enfouit alors rapidement dans le sol et se transforme en puppe; l'insecte adulte émerge 20 à 80 jours plus tard, en fonction de la température et de l'humidité.

Les glossines ont une répartition strictement africaine. Leur distribution est liée à l'habitat qu'elles occupent. La présence des glossines dépend essentiellement des facteurs tels que la chaleur (température entre 25 et 30 °C), l'humidité, l'ombrage et la présence de nourriture. Selon la classification usuelle des glossines, il existe une trentaine d'espèces et de sous-espèces réparties en trois sous-genres en fonction des caractères de morphologie externes et de la répartition, ainsi que de certains facteurs écologiques (Itard *et al.*, 2003) :

✓ Le sous-genre *Nemorrhina* ou groupe *palpalis* avec pour principaux habitats, les galeries forestières et forêts d'Afrique Occidentale et Centrale et les mangroves. Ces espèces du

groupe *palpalis* sont les principaux vecteurs de la THA. *Glossina palpalis* transmet *T. b. gambiense* en Afrique Occidentale et Centrale, *Glossina fuscipes*, une espèce riveraine transmet *T. b. gambiense* en Afrique Centrale et *T. b. rhodesiense* en Afrique Orientale.

- ✓ Le sous-genre *Glossina sensu stricto* (ou groupe *Morsitans*) comprend les sous-espèces de savanes boisées ou de forêts claires. Ces espèces ont tendance à régresser en cas de trop forte anthropisation du milieu. Elles représentent les vecteurs majeurs des trypanosomoses du bétail et transmettent la maladie du sommeil à *T. b. rhodesiense* en Afrique Orientale.
- ✓ Le sous-genre *Austenina* ou groupe *fusca* rassemble les sous-espèces vivant presque toutes dans les forêts ombrophiles ou dans les galeries forestières larges et denses d'Afrique Equatoriale. Ces espèces pourraient assurer la transmission de trypanosomes chez la faune sauvage et entretiendraient ainsi un réservoir.



Figure 7 : Mouche tsé-tsé ou glossine (*Glossina palpalis palpalis*)

Source : Fauret *et al.* (2018).

1.3. Trypanosomoses africaines

1.3.1. Trypanosomose Animale Africaine

La Trypanosomose Animale Africaine (TAA) est une affection parasitaire à transmission vectorielle provoquée par la présence dans le sang et la lymphe de *T. congolense*, *T. vivax*, et *T. brucei* s.l. Ces parasites se multiplient dans les liquides biologiques et divers tissus de nombreuses espèces animales et semblent n'être pathogènes que chez les mammifères (bœufs, moutons, chèvres, porcs etc.).

La transmission de ces trypanosomes d'un hôte à un autre est assurée de manière cyclique par les glossines ou mouches tsé-tsé (Larivière, 1978), mais aussi de façon mécanique par les tabanidés ou taons et les stomoxes (Foil, 1989).

La vaste répartition des TAA et leur impact sur la production animale et les systèmes agricoles, font de ces maladies un des obstacles majeurs au développement économique du secteur agricole. Le contrôle des trypanosomoses animales en Afrique permettrait de bénéficier d'environ sept millions de km² de terre pour l'élevage et l'agriculture (Negash *et al.*, 2007) et d'économiser 2 025 milliards de francs CFA (Mattioli *et al.*, 2004).

1.3.2. Trypanosomose Humaine Africaine

Le tableau clinique de la trypanosomose humaine africaine (THA) dépend de la sous-espèce du parasite et de la phase de la maladie. Il existe classiquement deux formes de THA, une forme chronique (forme gambienne) qui sévit en Afrique de l'Ouest et Centrale, et dont l'agent pathogène est *T. b. gambiense*, et une forme aiguë (forme rhodésienne) qui sévit en Afrique de l'Est et est causée par *T. b. rhodesiense*. Dans le cas de la forme gambienne, le cycle de transmission homme-mouche-homme semble prédominer et concerne principalement des glossines du groupe *Glossina palpalis*. Depuis longtemps, *T. b. gambiense* a été considéré comme un parasite spécifiquement humain. Des récentes études ont rapporté la présence de *T. b. gambiense* chez les animaux domestiques et sauvages, mais le rôle de ces animaux dans l'épidémiologie de la THA est toujours discuté (Büscher *et al.*, 2018). La THA à *T. b. rhodesiense* est une zoonose dans laquelle les animaux domestiques et sauvages jouent un rôle important dans le cycle de transmission (Fevre *et al.*, 2008). Sa transmission à l'homme,

souvent hôte accidentel se fait suivant le cycle animal-mouche-homme. Les parasites sont transmis principalement par les glossines du groupe *morsitans* et les glossines de l'espèce *Glossina fuscipes*.

1.3.2.1. Historique de la THA

Le premier cas de trypanosomose humaine africaine (THA) fut décrit par le philosophe Ibn Khaldoun, qui raconte la mort du sultan Maariy Djazaa vers 1374 aux environs du fleuve Niger. La maladie du sommeil a été signalée pour la première fois en 1734 par John Atkins, chirurgien de la marine anglaise dans son ouvrage *The Navy Surgeon* où il rapporte un trouble profond du sommeil. Ainsi, il appelle cette affection « sleeping distemper ou "perturbation du sommeil ». Les marchands d'esclaves comprennent déjà les conséquences de cette maladie : tous les esclaves présentant de gros ganglions à la base du cou sont écartés (Louis *et al.*, 2002). En 1901, Forde voit des vermicules mobiles dans le sang d'un capitaine de bateau faisant le trafic fluvial en Gambie. Dutton, en 1902, examine le sang du patient et identifie un trypanosome qu'il décrit sous le nom de *Trypanosoma gambiense*.

Le continent africain a connu ses premières épidémies dès 1885. La maladie sévit au confluent du fleuve Congo et de l'Oubangui et s'est étendue jusqu'au lac Albert et vers la République Centrafricaine pour éclater également en Ouganda en 1889 avec près de 800 000 morts. L'épidémie prit des proportions telles que des villages entiers furent décimés par la maladie (Martin *et al.*, 1909).

1.3.2.2. Situation actuelle de la THA

La THA est l'une des maladies tropicales les plus négligées au monde (Brun *et al.*, 2010), bien qu'en Afrique, elle soit en termes de mortalité, la neuvième sur 25 maladies parasitaires et infectieuses pour l'homme (Welburn *et al.*, 2006). Une grande partie des personnes touchées par la maladie vit principalement dans des régions reculées, pauvres, avec un accès limité aux services de santé appropriés (Odiit *et al.*, 2004), ce qui fait obstacle à la surveillance et par conséquent au diagnostic et au traitement des cas.

En Afrique, après une situation épidémique dramatique dans les années 1900 à 1940, la THA a été déclarée sous contrôle dans les années 1960 avec moins de 5000 cas notifiés sur

l'ensemble du continent (Franco *et al.*, 2014). Cela grâce aux nombreux efforts de lutte qui ont été mis en place par les pays colonisateurs de l'Afrique. Cependant, l'instabilité politique des pays africains qui a affecté les systèmes de santé publique et le relâchement dans les programmes de contrôle ont conduit vers les années 1970, à une recrudescence progressive du nombre de cas de THA et la maladie a retrouvé, à la fin des années 1990, une situation semblable à celle du début du siècle. Face à cette situation, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a adopté une stratégie de contrôle à trois volets avec une surveillance médicale active des populations à risque, une surveillance médicale passive dans les centres de santé et le contrôle des vecteurs. La stratégie la plus efficace serait sans aucun doute une combinaison mesurée des trois actions. En 2009, grâce aux nouveaux efforts de lutte et au dépistage à grande échelle des populations à risque, l'épidémie a été maîtrisée et le nombre de nouveaux cas notifiés est tombé en dessous de 10 000 (9 878). Cette baisse s'est poursuivie et seulement 977 cas ont été enregistrés en 2018 (WHO, 2019), soit le nombre le plus faible jamais enregistré depuis que la collecte systématique des données a été mise en place en 1975 (Figure 8). Ces tendances montrent que les objectifs de l'OMS d'éliminer la THA en tant que problème de santé publique d'ici 2020 (WHO, 2012) et d'interrompre la transmission à l'homme d'ici 2030 (Holmes *et al.*, 2014) sont sur la bonne voie.

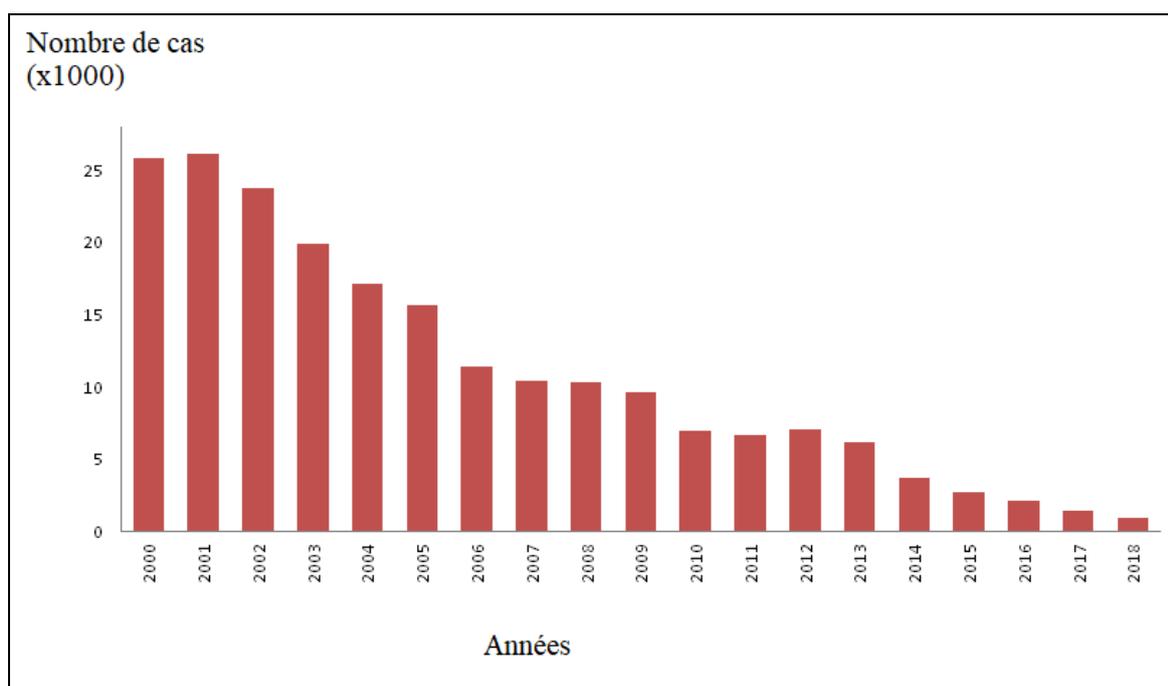


Figure 8 : Nombre total de cas de THA à *Trypanosoma brucei gambiense* en Afrique Subsaharienne de 2000 à 2018

Source : Franco *et al.* (2018) ; WHO. (2019).

La Côte d'Ivoire est le deuxième pays le plus touché par la THA en Afrique de l'Ouest (WHO, 2013) après la Guinée. C'est dans le Centre-Ouest du pays (foyers de Daloa, Vavoua, Sinfra, Bonon, Oumé, Bouaflé) que le plus grand nombre de cas a été dépisté (Djé *et al.*, 2002). Dans les années 1930, en Côte d'Ivoire, des épidémies ont été décrites dans l'Ouest, le Sud-Est et le Centre-Ouest (Jamot, 1933 ; Domergue-Cloarec, 1986) notamment à Bonon et Sinfra, zones de grandes production de café-cacao. Les campagnes de lutte médicale active menées, parfois soutenue par des actions de lutte antivectorielle (Laveissière *et al.*, 2003), ont permis de contenir les phénomènes épidémiques. Ces dernières années, seuls quelques dizaines de cas de THA ont été dépistés activement ou passivement dans ces foyers tous devenus hypo-endémiques (Djé *et al.*, 2002 ; Kaba *et al.*, 2006). En outre, le dépistage actif qui a été réalisé entre 2000 et 2018 (Figure 9) par le programme National d'élimination de la THA en Côte d'Ivoire, en collaboration avec les équipes techniques de recherche de l'UJLoG, de l'IPR et de l'IRD ont permis considérablement de réduire significativement la prévalence

de la maladie (Kambire *et al.*, 2012 ; Koffi *et al.*, 2016 ; Franco *et al.*, 2018). En dépit de ces importants efforts de lutte, la THA continue de se maintenir à l'état hypo-endémique dans les foyers du Centre-Ouest, notamment les foyers de Bonon et Sinfra.

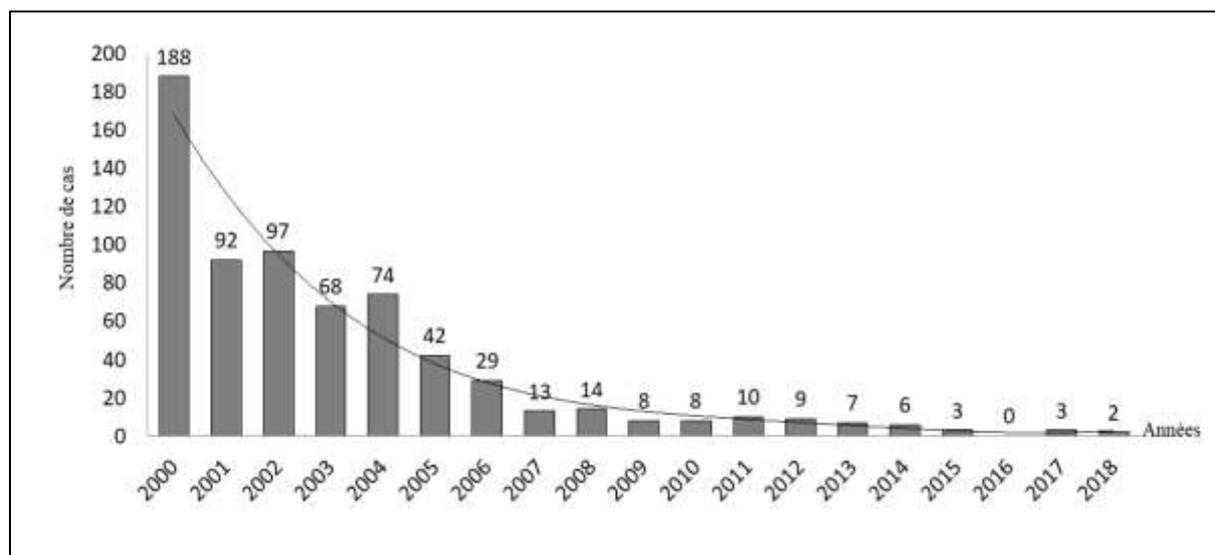


Figure 9 : Evolution du nombre de cas de THA en Côte d'Ivoire de 2000 à 2018

Source : Franco *et al.* (2018).

1.3.2.3. Importance économique 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 morts (Cattand *et al.*, 2001). Cette parasitose menace des millions de personnes dans 36 pays d'Afrique subsaharienne (OMS, 2013). Au plan économique, la maladie du sommeil est responsable des perturbations majeures du développement social et agricole en Afrique (Simarro *et al.*, 2011). Les populations rurales vivant dans les régions où a lieu la transmission et qui dépendent de l'agriculture, de la pêche, de l'élevage ou de la chasse sont

les plus exposées à la mouche tsé-tsé et par conséquent à la maladie. On peut donc imaginer aisément l'impact que cette maladie peut avoir sur la main d'œuvre agricole dans ces régions et donc sur l'économie d'un pays. La THA représente une grave menace pour le développement économique car elle affecte principalement le groupe d'âge le plus productif (15-45 ans) et prolonge le cycle maladie-pauvreté-maladie. Une proportion importante d'enfants est touchée par la THA et bon nombre d'entre eux souffriront d'un retard mental considérable, même après un traitement efficace, ce qui aura par la suite un impact négatif sur leurs éventuelles réalisations tout au long de leur vie. En l'absence de traitement, la THA se positionne comme une maladie invalidante et mortelle.

1.4. Diagnostic des infections aux trypanosomes

La mise en évidence de la présence de parasites chez l'hôte vertébré et chez le vecteur fournit une preuve directe d'une infection trypanosomienne et constitue donc le diagnostic irréfutable d'une parasitose (WHO, 2013). Ces dernières années, de nombreuses techniques de détection des trypanosomes ont vu le jour. Parmi ces techniques, certaines apportent un diagnostic de certitude, par une observation microscopique du parasite, et d'autres apportent un diagnostic de présomption, par la mise en évidence de "traces", témoignant de la présence ou du simple passage des parasites chez l'hôte (tests d'immuno-trypanolyse et diagnostic moléculaire par PCR) (Desquesnes *et al.*, 2003).

1.4.1. Techniques parasitologiques

La technique parasitologique ou diagnostic direct la plus classique consiste à l'observation microscopique des trypanosomes dans une goutte de sang déposée à l'état frais entre lame et lamelle. Cette méthode est trop peu sensible pour les faibles parasitémies souvent présentes dans le sang. Cependant, diverses techniques telles que la centrifugation et l'observation de la couche leucocytaire ou Buffy-Coat (BC) (Murray *et al.*, 1977) et la technique de centrifugation sur minicolonne échangeuse d'anions (mAECT) (Lanham & Godfrey 1970; Lumsden *et al.*, 1977) ont été élaborées. Ces techniques ont permis de concentrer les parasites du sang avant l'observation microscopique afin d'améliorer la sensibilité du diagnostic parasitologique (Chappuis *et al.*, 2005).

La technique parasitologique par la méthode du BCT (BCT: "Buffy Coat Technique") consiste à concentrer au préalable les parasites par centrifugation différentielle en microtube capillaire. Après la centrifugation, les trypanosomes se localisent dans l'interface hématies-plasma ou "Buffy-Coat ou couche leucocytaire". La strate parasitaire est examinée soit directement au travers des parois du tube (Woo, 1970), soit à l'état frais entre lame et lamelle après cassure du microtube et étalement sur lame de la couche leucocytaire ou buffy-coat (Murray *et al.*, 1977).

Paris *et al.* (1982) ont comparé les efficacités de certaines des méthodes microscopiques et ont trouvé que le BCT était la méthode la plus sensible. Cependant, ces auteurs ont montré que la sensibilité du BCT dépend de l'espèce de trypanosome; les plus petites quantités détectables de trypanosomes par millilitre sont 5.10^3 , $2,5.10^2$, 5.10^2 pour *T. brucei* s.l., *T. congolense* et *T. vivax* respectivement. L'identification de l'espèce de trypanosome semble reposer sur des critères morphologiques tels que la position du kinétoplaste, la mobilité et la taille du parasite.

La technique parasitologique par la méthode de la mAECT s'est avérée être la plus sensible (Büscher *et al.*, 2009). Cette méthode consiste à séparer les trypanosomes dans un volume de 350 μ L de sang par chromatographie échangeuse d'anions sur diéthylaminoethyl cellulose (DEAE). Les trypanosomes élués sont ensuite concentrés par centrifugation, suivi d'un examen direct au microscope du culot dans le tube collecteur transparent. Les éléments figurés du sang sont chargés plus négativement que les trypanosomes et sont donc absorbés sur la colonne d'échange d'ion, tandis que les trypanosomes sont élués en conservant toute leur viabilité. L'éluât est centrifugé à 3000 rpm/mn pendant 10 minutes et est examiné au microscope optique.

Concernant la forme gambienne, la mAECT offre les meilleurs résultats (Buscher *et al.*, 2009) au laboratoire comme sur le terrain parmi les méthodes parasitologiques classiques.

Les techniques du BCT et de la mAECT sont pratiquées sur le terrain au cours des enquêtes médicales et vétérinaires en Côte d'Ivoire.

1.4.2. Techniques immunologiques

Parmi les méthodes sérologiques pour le dépistage de masse de la THA, le Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT *T. b. gambiense*) (Magnus *et al.*, 1978), est le plus utilisé actuellement. Ce test est très simple d'emploi sur le terrain. Le réactif du test CATT est une suspension lyophilisée de trypanosomes sanguicoles fixés, stabilisés et colorés au bleu de Coomassie. Ces parasites appartiennent à un sérotype bien défini et sélectionné: le LiTat 1.3, qui permet d'obtenir une réactivité optimale dans les différents foyers de THA.

Le test CATT ne nécessite qu'une goutte de sang, et en présence d'anticorps spécifiques, les parasites forment des agglutinats macroscopiques colorés et visibles à l'œil nu. Afin d'augmenter la spécificité du test, un CATT sur dilutions successives de plasma (CATT/pl) est effectué sur tous les individus positifs au CATT/sang. Le seuil de dilution retenue pour dire qu'un CATT/pl est positif est de 1/4 en Côte d'Ivoire. Il détermine les individus pour lesquels les examens parasitologiques doivent être effectués.

Le test d'immuno-trypanolyse consiste à la détection d'anticorps dirigés contre des antigènes variables spécifiques de *T. b. gambiense* (Van Meirvenne *et al.*, 1995 ; Jamonneau *et al.*, 2010). Ces antigènes sont des clones de trypanosomes exprimant spécifiquement les antigènes LiTat 1.3 et LiTat 1.5 (spécifiques de *T. b. gambiense*) et LiTat 1.6 (exprimé chez *T. brucei* s.l.). Son utilisation se limite aux laboratoires qui disposent des moyens nécessaires (azote liquide et animaux de laboratoire) pour entretenir des populations de trypanosomes clonés. L'immuno-trypanolyse est une réaction très spécifique et ce test peut donc être utilisé pour déterminer s'il y a eu un contact avec *T. b. gambiense* (Van Meirvenne *et al.*, 1995 ; Jamonneau *et al.*, 2010) même en l'absence de détection par les observations microscopiques (Bucheton *et al.*, 2011 ; Ilboudo *et al.*, 2011). Le test repose sur la reconnaissance des épitopes des GVS présentes à la surface des trypanosomes vivants par les anticorps correspondants présents dans l'échantillon, ce qui conduit à une lyse par le complément à médiation anticorpale. Le test de la trypanolyse n'engendre pas de faux positifs, il peut donc servir de référence pour l'ensemble des autres tests sérologiques (Büscher & Lejon, 2003). Actuellement, ce test est pratiqué sur le plasma ou le sérum, mais il existe aussi un protocole pour son utilisation avec du sang total sur papier absorbant (Jamonneau *et al.*, 2010).

1.4.3. Diagnostic des trypanosomes par Réaction de Polymérisation en Chaîne

La Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerase Chain Reaction : PCR) (Singh, 1997) est une technique d'amplification génique *in vitro*, qui permet de copier avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir de quelques picogrammes d'acide nucléique.

L'intérêt majeur de cette technique de biologie moléculaire (PCR) est de pouvoir déterminer spécifiquement les trypanosomes mis en cause dans une infection et de révéler la présence simultanée de plusieurs espèces. La PCR permet d'amplifier sélectivement une séquence particulière d'ADN présente même en faible quantité, par action répétée de l'ADN polymérase. Dès les années 1996, l'application de la PCR à la maladie du sommeil, en utilisant l'amorce TBR1/TBR2 à partir de séquences d'ADN satellites (Moser *et al.*, 1989), a permis de détecter l'ADN des trypanosomes en Côte d'Ivoire (Kanmogne *et al.*, 1996), au Cameroun (Truc *et al.*, 1999) et en Ouganda (Enyaru *et al.*, 1998 ; Kyambadde *et al.*, 2000).

La limite de détection de la PCR est de 25 parasites par mL (Kanmogne *et al.*, 1996). Dans la plupart des cas, les diagnostics par PCR visent à identifier le parasite de façon plus ou moins spécifique. Des couples d'amorces ont été développés pour le diagnostic des différentes espèces de trypanosomes :

- Les amorces TBR1/TBR2 qui amplifient une séquence d'ADN satellite de 177 paires de bases qui est répétée de nombreuses fois dans le génome nucléaire sur les minichromosomes des trypanosomes du sous genre *Trypanozoon* dont fait partie l'espèce *T. brucei* s.l. (Moser *et al.*, 1989).
- Les amorces TCF1/TCF2, sont spécifiques à *T. congolense* type forêt, amplifient une séquence d'ADN satellite de 350 Pb (Masiga *et al.*, 1992).
- Les amorces TCS1/TCS2, spécifiques à *T. congolense* type savane, amplifient une séquence d'ADN satellite de 321 Pb (Masiga *et al.*, 1992).
- Les amorces TVW1/TVW2 amplifient une séquence d'ADN satellite de 150 Pb (Masiga *et al.*, 1992), et sont spécifiques à *T. vivax*.
- Les amorces TgsGP amplifient une séquence d'ADN codant pour une glycoprotéine variable de surface spécifique de *T. b. gambiense* (Radwanska *et al.*, 2002).

L'identification de *T. b. gambiense* repose essentiellement sur la détection du gène TgsGP qui est à copie unique (Berberof *et al.*, 2001), ce qui limite ainsi sa sensibilité notamment dans les cas de faibles parasitémies (Radwanska *et al.*, 2002; Deborggraeve & Büscher, 2010).

1.4.4. Xénodiagnostic par mouches tsé-tsé

Le xénodiagnostic est une technique qui consiste à nourrir des glossines ténérales (exemptes de trypanosomes) sur des mammifères infectés ou suspects et détecter les parasites chez les mouches tsé-tsé qui se sont infectées au cours de ce repas par dissection et examen microscopique des organes susceptibles d'héberger des parasites (intestin moyen, proboscis et glande salivaire). Cette technique fut initialement appliquée pour le diagnostic de la maladie de Chagas (Brumpt, 1914), et adaptée pour le diagnostic de la maladie du sommeil à *T. b. gambiense* (Frézil, 1971 ; Maillot, 1973). Le xénodiagnostic a été efficace pour révéler la présence de *T. b. gambiense* difficile à mettre en évidence par les techniques parasitologiques classiques. Bien que très sensible, cette technique est très peu utilisée du fait de la difficulté à élever des glossines (Frézil, 1971).

1.5. Détermination des génotypes ou génotypage à l'aide des marqueurs microsatellites

Les marqueurs microsatellites sont des séquences d'ADN répétées en tandem dont l'unité de répétition est de 1 à 6 nucléotides. Ils peuvent être de différents types : mono, di, tri, tétranucléotides pour les plus utilisés mais aussi penta, hexa et octonucléotides et peuvent être purs, composés ou interrompus. La longueur de ces séquences (c'est-à-dire le nombre de répétitions) est variable d'un individu à l'autre et d'un allèle à l'autre chez un même individu. Ils constituent des outils utiles pour la cartographie génétique et les études de la diversité et la structure génétique des populations des organismes vivants et en particulier des espèces parasitaires telles que *Plasmodium falciparum* (Razandrainibe *et al.*, 2005) ; *Theileria parva* (Odongo *et al.*, 2006) ; *Leishmania tropica* (SchwenKenbecher *et al.*, 2006) ; *Leishmania donovani* (Jamjoom *et al.*, 2002) ; *Leishmania infantum* (Bulle *et al.*, 2002) ; *Toxoplasma gondii* (Ajzenberg *et al.*, 2002). Les marqueurs microsatellites ont été largement utilisés pour la caractérisation moléculaire des trypanosomes (Biteau *et al.*, 2000 ; Koffi *et al.*, 2007 ; Morrison *et al.*, 2008 ; Koffi *et al.*, 2009 ; Simo *et al.*, 2010 ; Kaboré *et al.*, 2011 ; Simo *et al.*, 2011) et pour l'évaluation de la structure de la population et du mode de reproduction

(Macleod *et al.*, 2000 ; Macleod *et al.*, 2005a ; Simo *et al.*, 2014 ; Echodu *et al.*, 2015 ; Gibson *et al.*, 2015 ; Pyana *et al.*, 2015 ; Kato *et al.*, 2016 ; Séré *et al.*, 2017). Ils ont été également utilisés pour la construction de la carte génétique des trypanosomes (MacLeod *et al.*, 2005b ; Cooper *et al.*, 2008). La sensibilité et la spécificité élevées de ces marqueurs ont permis de caractériser génétiquement *T. brucei* s.l. directement à partir d'échantillons biologiques (Koffi *et al.*, 2007 ; Kaboré *et al.*, 2011 ; Simo *et al.*, 2011 ; Simo *et al.*, 2012 ; Truc *et al.*, 2012). À l'aide de ces fluides biologiques, ces marqueurs ont fourni des données qui ont permis de mieux comprendre certains aspects biologiques, génétiques et épidémiologiques de la THA (Koffi *et al.*, 2007 ; Kaboré *et al.*, 2011 ; Simo *et al.*, 2014). C'est donc cet outil qui sera utilisé pour évaluer la diversité génétique des trypanosomes du complexe *T. brucei* s.l. rencontré chez les animaux domestiques des foyers du Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire.

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

2.1. Zones d'étude

Sur la base des données du Programme National d'Élimination de la THA (PNETHA) et du Projet de Recherches Cliniques sur la THA (PRCT), les zones du Centre-Ouest, notamment Sinfra, Bonon et Vavoua. Sinfra et Bonon sont les deux zones de THA actuellement actives en Côte d'Ivoire. Vavoua est un foyer à l'état hypo-endémique. Au cours de la dernière décennie, des cas ont été dépistés passivement dans ces zones. Ainsi, dans le contexte actuel d'élimination de la THA, les sites d'étude ciblés de cette thèse sont les foyers endémiques de Sinfra et Bonon et le foyer hypo-endémique de Vavoua (Figure 10).

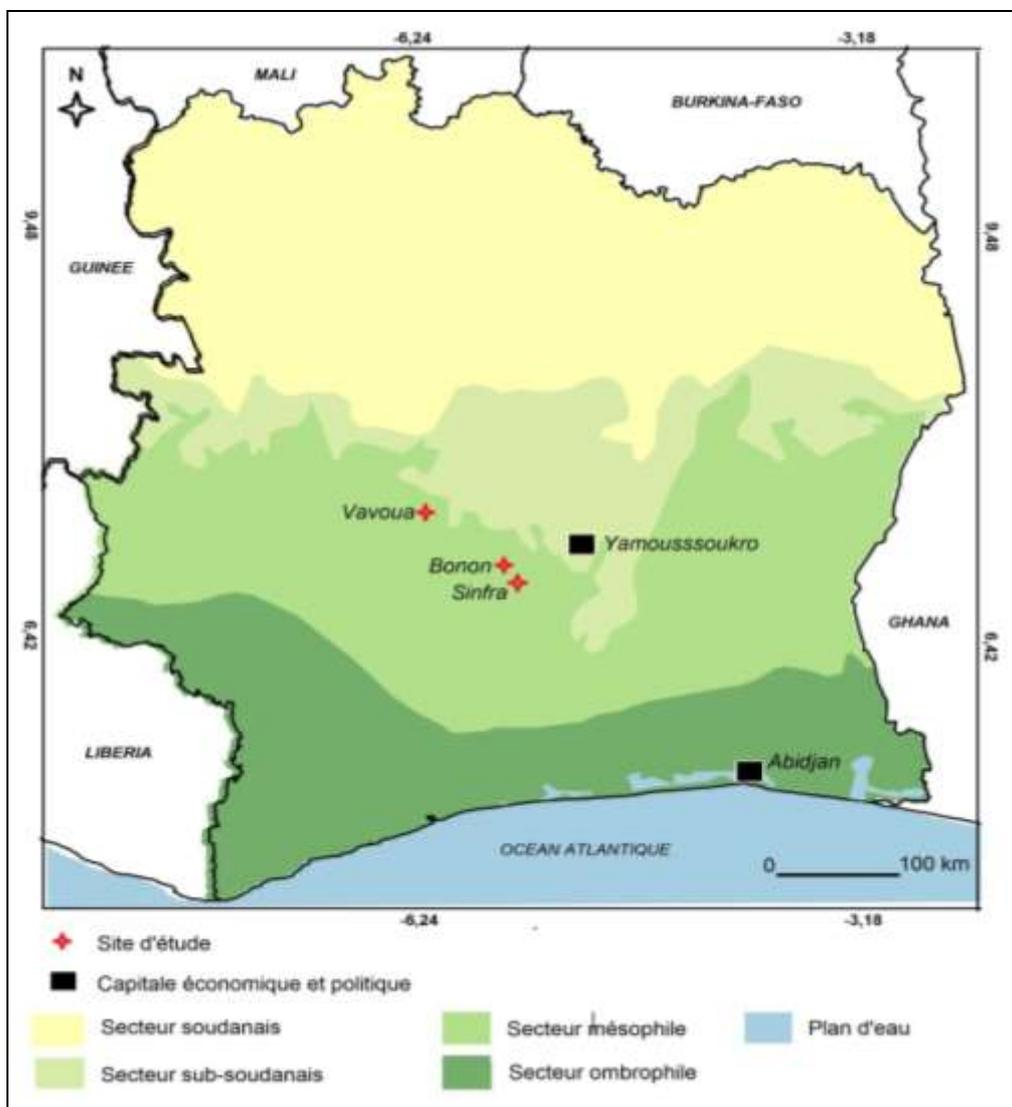


Figure 10 : Situation géographique des sites d'étude

Source : IPR, 2015.

2.1.1. Zone de Sinfra

Le département de Sinfra est situé à 6°37 de latitude Nord et 5°54 de longitude Ouest. Sinfra se trouve dans le Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire, précisément dans la région de la Marahoué, elle couvre une superficie de 1618 km² avec un nombre d'habitants estimé à 98 623 (RGPH, 2014). Distante de 80 km de Yamoussoukro, la capitale politique et de 320 km d'Abidjan, la capitale économique du pays, la ville de Sinfra est sous l'influence d'un climat de type équatorial à deux saisons de pluies (de mai à mi-juillet et d'août à octobre).

La forêt mésophile dans cette zone a été progressivement dégradée par une très forte déforestation due à la mise en valeur des cultures de rente (café, cacao) créant un environnement favorable pour *Glossina palpalis palpalis*, principal vecteur de la Trypanosomose Humaine Africaine (Kiendrébéogo *et al.*, 2012). Sinfra est un foyer actif de la THA actuellement en Côte d'Ivoire selon les données du PNETHA et du PRCT. Deux malades ont été dépistés de 2015 à 2018 c'est à dire une incidence de 0,02 %.

Les populations majoritairement rurales pratiquent essentiellement l'agriculture et l'élevage de porcs, caprins, ovins, bovins (Courtin *et al.*, 2005). A Sinfra, l'échantillonnage a été effectué dans les élevages situés à Binoufla (6°67 de latitude Nord et 5°88 de longitude Ouest), Proziblanfla (6°68 de latitude Nord et 5°87 de longitude Ouest), Tracata-Barata (6°66 de latitude Nord et 5°89 de longitude Ouest), Manoufla (6°61 de latitude Nord et 5°90 de longitude Ouest), Blontifla (6°62 de latitude Nord et 5°91 de longitude Ouest), Douafla (6°61 de latitude Nord et 5°92 de longitude Ouest), Djamadji (6°62 de latitude Nord et 5°91 de longitude Ouest), quartier Résidentiel (6°61 de latitude Nord et 5°90 de longitude Ouest), Nagadoua (6°59 de latitude Nord et 5°87 de longitude Ouest), N'drikro (6°57 de latitude Nord et 5°84 de longitude Ouest), Bentifla (6°57 de latitude Nord et 5°82 de longitude Ouest), Benefla (6°56 de latitude Nord et 5°79 de longitude Ouest) et Huafla (6°56 de latitude Nord et 5°80 de longitude Ouest). Au total, 124 élevages ont été visités dans la zone de Sinfra. La figure 11 présente la répartition géographique des sites d'échantillonnage dans le département de Sinfra.

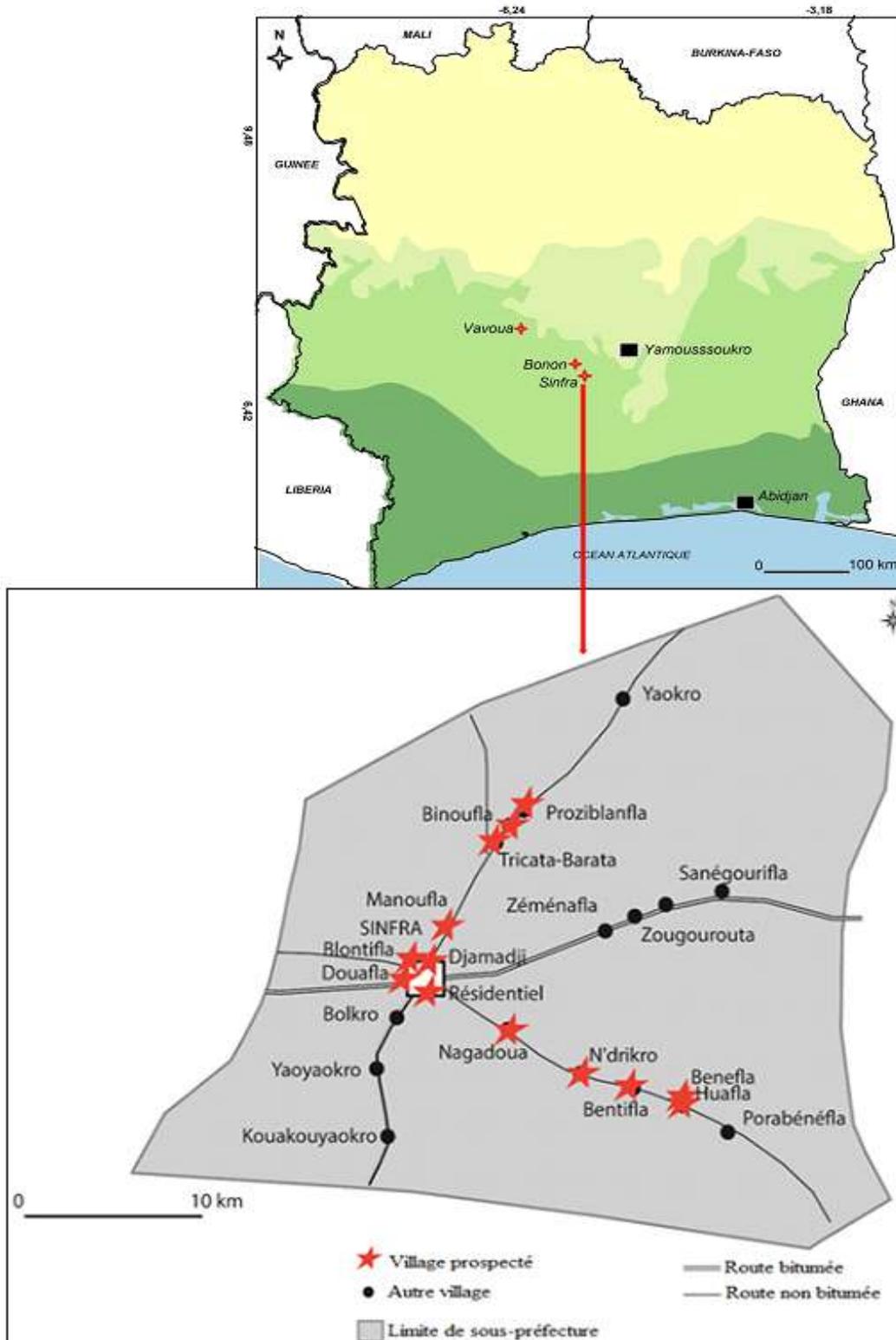


Figure 11 : Localisation des sites d'échantillonnage dans le département de Sinfra

Source : IPR, 2015.

2.1.2. Zone de Bonon

Le département de Bonon est situé à 6°55 de latitude Nord et -6°02 de longitude Ouest, se trouve dans le Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire, dans la région de la Marahoué. Bonon couvre une superficie de 520 km² et compte environ 92 523 habitants (RGPH, 2014) et est située à 60 km à l'Ouest de Yamoussoukro et à 350 km au Nord-Ouest d'Abidjan. Situé en zone de forêt mésophile, le département de Bonon a un climat équatorial avec des saisons des pluies qui s'étendent de Mai à mi-Juillet, et d'Août à Octobre. Le paysage est dominé par une succession de bas-fonds et de versants courts et étroits résultant de l'activité de nombreux cours d'eau temporaires qui se raccordent aux affluents de la Marahoué. Les cultures de rente développées massivement dans cette zone ont permis à *Glossina palpalis palpalis* de bénéficier d'un habitat idéal (Kiendrébéogo *et al.*, 2012). Les récentes données du PNETHA et du PRCT montrent que Bonon est le foyer le plus actif de la THA en Côte d'Ivoire. De 2015 à 2018, six malades (0,21 %) ont dépistés.

De multiples élevages de porcs, caprins, ovins et bovins existent dans le département de Bonon (Courtin *et al.*, 2005). Les villages prospectés sont : Jacquerville (6°91 de latitude Nord et 6°04 de longitude Ouest), Dabouzra (6°93 de latitude Nord et 5°98 de longitude Ouest), Bognonzra (6°94 de latitude Nord et 5°96 de longitude Ouest), Blablata (6°93 de latitude Nord et 6°01 de longitude Ouest), Iriéfla (6°91 de latitude Nord et 6°04 de longitude Ouest), Biégon (6°79 de latitude Nord et 6°03 de longitude Ouest), Kangréta (6°79 de latitude Nord et 6°04 de longitude Ouest), Blanoufla (6°79 de latitude Nord et 6°02 de longitude Ouest), Dianoufla (6°79 de latitude Nord et 6°01 de longitude Ouest) et Zanoufla (6°79 de latitude Nord et 6°01 de longitude Ouest). Sur l'ensemble des villages retenus, 107 élevages ont été visités. La figure 12 présente la répartition géographique des sites d'échantillonnage dans le département de Bonon.

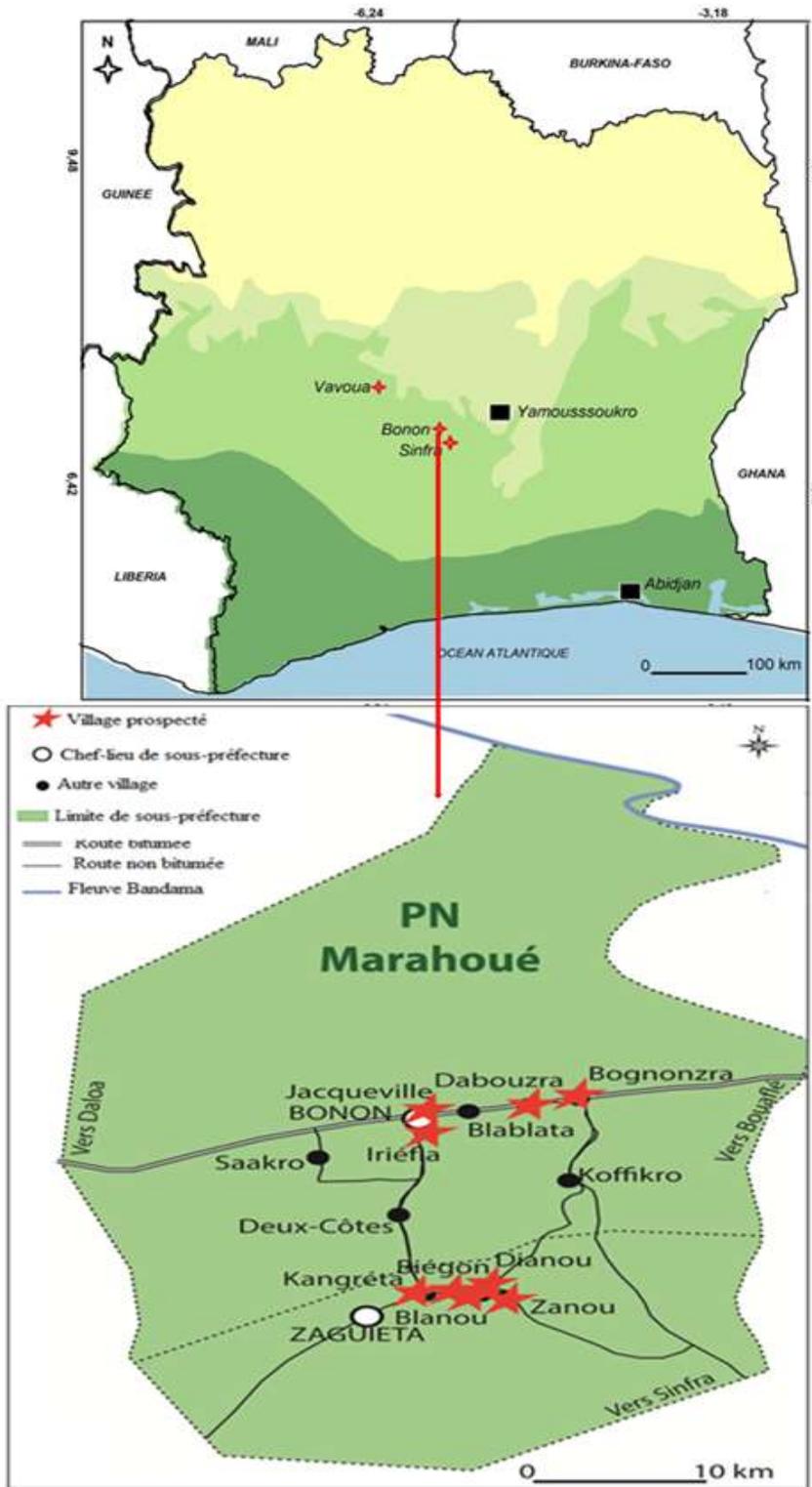


Figure 12 : Localisation des sites d'échantillonnage dans le département de Bonon

Source : IPR, 2015.

2.1.3. Zone de Vavoua

Le département de Vavoua (7°25 Nord et 6°45 Ouest) est une localité de la région du haut Sassandra au Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire. Sa superficie est de 6233 km² et compte une population de 286182 habitants (RGPH, 2014). Le climat de Vavoua se situe entre un climat équatorial chaud et humide et un climat subtropical. Cette région se trouve dans une zone de transition entre deux forêts denses humides de type semi-décidue. Vavoua est une route de transhumance pour le bétail des pays du nord de la Côte d'Ivoire vers le sud. Selon les données du PNETHA et du PRCT, le dernier cas dépisté dans cette zone date de 2011.

Les activités économiques de la zone de Vavoua sont essentiellement l'agriculture et l'élevage de bovins, ovins, caprins, porcins et volailles. Les villages concernées par le dépistage des animaux sont: Trafla-Gotron (7°50 de latitude Nord et 6°37 de longitude Ouest), PK 14 (7°44 de latitude Nord et 6°40 de longitude Ouest), PK 11 (7°41 de latitude Nord et 6°40 de longitude Ouest), PK 5 (7°37 de latitude Nord et 6°43 de longitude Ouest), PK8 (7°39 de latitude Nord et 6°42 de longitude Ouest), Gozy (7°45 de latitude Nord et 6°34 de longitude Ouest), Gatifla (7°36 de latitude Nord et 6°47 de longitude Ouest), CIFCI (7°30 de latitude Nord et 6°47 de longitude Ouest) et Déma (7°31 de latitude Nord et 6°48 de longitude Ouest). Dans l'ensemble, 31 élevages ont été visités dans la zone de Vavoua. La figure 13 présente la répartition géographique des sites d'échantillonnage.

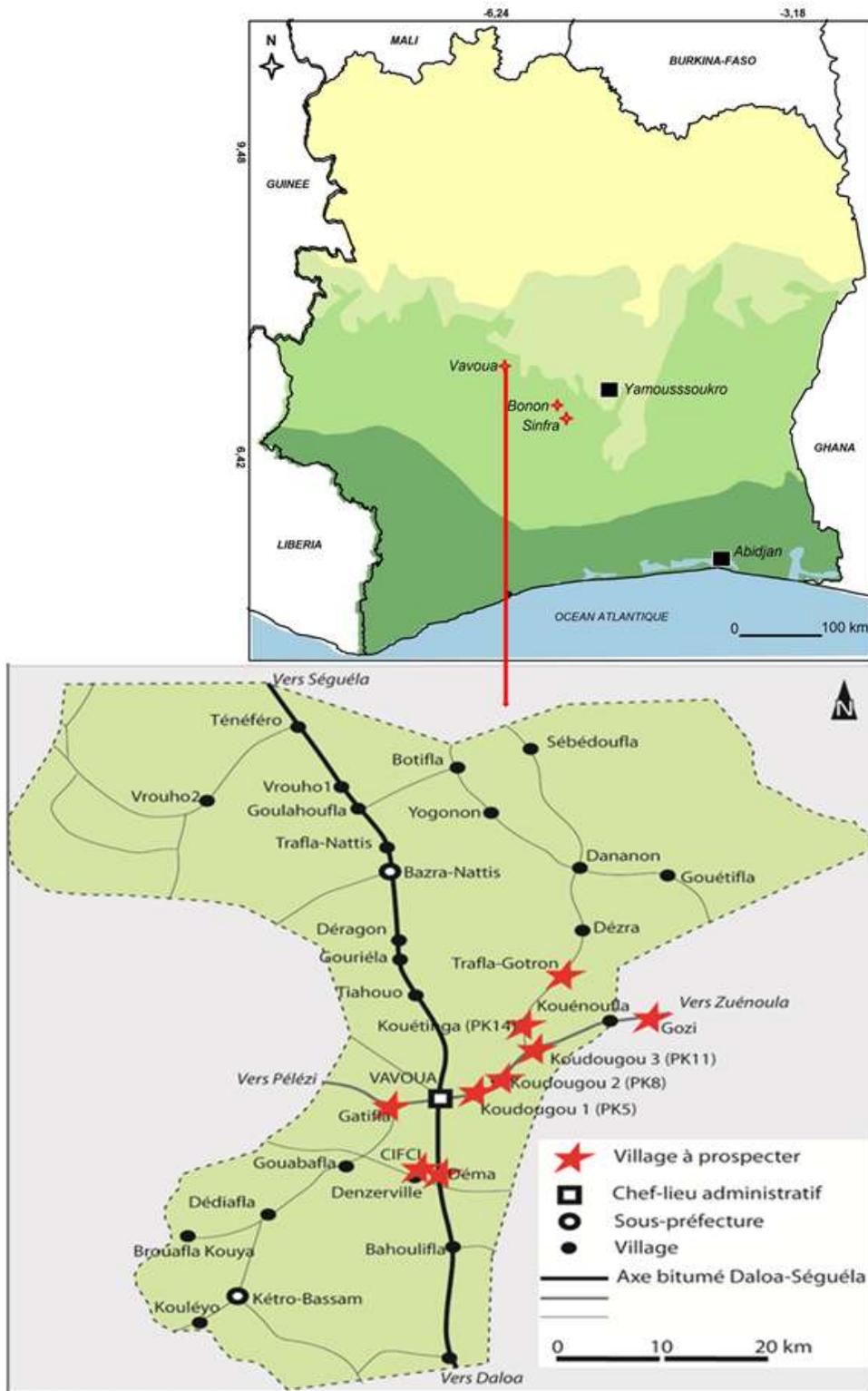


Figure 13 : Localisation des sites d'échantillonnage dans le département de Vavoua

Source : IPR, 2015.

2.2. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué de différents liquides biologiques (sang total, plasma et couche leucocytaire ou buffy-coat) collectés sur les animaux domestiques (bovins, ovins, caprins et porcs). Il comprend également des souches de trypanosomes, des glossines (*Glossina morsitans submorsitans*).

2.3. Matériel technique

L'étude du réservoir animal domestique a nécessité l'utilisation de matériels techniques suivants :

- ✓ des lames et lamelles, des seringues stériles, des tubes héparines, des tube eppendorf, des tubes capillaires, une centrifugeuse réfrigérée à tube Eppendorf, un microscopie optique, des pipettes P10, P20, P100, P200, P1000 et des cônes à filtres de 10, 20, 100, 200 et 1000 μ L ;
- ✓ une balance, une plaque chauffante, un thermocycleur (PTC-T100, Biorad, USA), un vortex (agitateur), une cuve électrophorèse avec générateur de courant et un transilluminateur muni d'un appareil photo ;
- ✓ une bonbonne d'azote liquide, un Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific), une hotte à flux laminaire et un séquenceur ABI 3500 XL ;
- ✓ un kit d'extraction Qiagen, de l'eau distillée, de l'agarose, du TBE 0,5X, du GelRed ;
- ✓ des amorces spécifiques, des marqueurs microsatellites, de tampon 10X, de dNTP à 10 mM, de Taq polymérase (5u/ μ L) et de Marqueur de poids moléculaire (100 pb) ;
- ✓ de solution stabilat, de cyclophosphamide 20 mg/mL, de papier aluminium et de parafilm.

2.4. Approche méthodologique

2.4.1. Préparation des enquêtes du réservoir animal domestique

Avant toute prospection du réservoir animal domestique, une équipe d'information et de sensibilisation est envoyée auprès des autorités administratives et villageoises pour les informer sur les activités de la mission. Par ailleurs, la même équipe de sensibilisation se rend dans les villages à visiter accompagnée d'un agent de santé communautaire (ASC) pour présenter les activités prévues pour la mission et donner le programme de passage de l'équipe, notamment aux éleveurs. Pour une meilleure sensibilisation, certaines autorités villageoises comme le chef du village, le président des jeunes, les responsables religieux sont aussi impliqués. Après le passage de l'équipe de sensibilisation, l'information est encore relayée par les infirmiers ainsi que les ASC présents dans la zone et influents au niveau des peuplements sélectionnés.

2.4.2. Calendrier des enquêtes

Les enquêtes ont été réalisées de 2013 à 2017 dans les trois foyers de la THA du Centre-Ouest. Dans le foyer de Sinfra, l'échantillonnage a été effectué sur trois années : 2013 (22 au 28 septembre), 2015 (17 au 23 décembre) et 2017 (14 au 24 janvier 2017). A Bonon, l'échantillonnage a été réalisé en 2013 (30 septembre au 06 octobre) et 2015 (09 au 16 décembre). A Vavoua, l'échantillonnage a été effectué seulement en 2017 du 25 février au 05 mars.

Des deux enquêtes effectuées en 2013 et 2015, les tendances générales ont montré que les porcs sont les animaux domestiques les plus infectés. De même les porcs provenant du foyer endémique de Sinfra ont été plus infectés par *T. brucei* que ceux de Bonon. A cet effet, l'enquête de 2017 s'est ainsi focalisée sur les porcs dans les foyers de Sinfra et Vavoua. L'enquête dans le foyer hypo-endémique de Vavoua a permis de comparer les prévalences d'infection aux trypanosomes entre un foyer endémique et un foyer hypo-endémique.

2.4.3. Question éthique de la recherche

Le prélèvement des échantillons de sang a été effectué par un agent vétérinaire dans le cadre des activités de surveillance épidémiologique supervisées par le Programme National d'Elimination de la THA. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une prophylaxie ou d'une campagne de diagnostic. Les propriétaires des animaux ont donné leur consentement pour le prélèvement après leur avoir expliqué les objectifs de l'étude en français ou en langue locale.

2.4.4. Echantillonnage

Le choix des sites d'échantillonnage a été fait en tenant compte des données d'archive du PNLTHA et du PRCT. A partir de ces données, une liste d'anciens cas de THA a été établie et la cartographie de leur provenance a été produite. Pour chaque village retenu, un échantillon de 25 à 30 animaux domestiques a été constitué par espèce animale. Le choix de chaque animal domestique a été fait de façon aléatoire au sein de l'élevage. Les effectifs d'animaux par espèce en fonction des foyers et des périodes d'enquêtes sont présentés par le tableau I.

Tableau I : Effectif d'animaux par espèce en fonction des foyers et des périodes d'enquêtes

Espèce Animale	Bonon			Sinfra				Vavoua	Total
	2013	2015	N	2013	2015	2017	N	2017	
Bovin	35	41	76	52	39	0	91	0	167
Ovin	92	100	192	100	50	0	150	0	342
Caprin	47	91	138	89	59	0	148	0	286
Porc	77	136	213	60	110	117	287	167	667
Total	251	368	619	301	258	117	676	167	1462

N : Effectif

Pour chaque animal retenu, 5 mL de sang ont été prélevés au niveau de la veine jugulaire à l'aide d'une aiguille stérile dans des tubes héparines (Figure 14). Les tubes ont ensuite été conservés sur la glace avant les examens parasitologiques (BCT et mAECT). Chaque animal prélevé a été identifié par une boucle auriculaire portant un code permettant de retrouver le site d'échantillonnage et le propriétaire.

Ce code comprend :

- la première lettre de la localité (exemple: B pour Bonon) ;
- le chiffre correspondant au rang du site d'échantillonnage (E1 pour le premier site) ;
- la première lettre de l'espèce animale (exemple: P pour Porc) et le numéro d'ordre de l'animal (1, 2 etc.) ;
- le chiffre correspondant au rang du propriétaire (P1 pour le premier propriétaire).

Par exemple, l'animal codifié BE2C3P1 signifie: B=Foyer de Bonon; E2= code du deuxième site visité (Séhizra); C3= Chèvre n°3; P1= Propriétaire 1.

Le code marqué sur la boucle est reporté sur les tubes contenant les différents échantillons sanguins. A la fin de chaque prélèvement, un questionnaire épidémiologique et clinique a été soumis aux éleveurs pour obtenir des informations sur leur situation socio-sanitaire en rapport avec la THA, leur pratique d'élevage, et l'état sanitaire de l'animal (Annexe I). Des aliquots de 1 mL de sang, 1 mL de plasma et 0,5 mL de buffy-coat ont été réalisés à partir du prélèvement et conservés immédiatement à -20 °C dans un congélateur puis transportés au laboratoire et conservés également à -20 °C. Ces aliquots ont servi pour réaliser le test immunologique de la trypanolyse et le diagnostic des trypanosomes par la technique PCR.



Figure 14 : Prélèvement de sang chez un porc

2.4.5. Culture et isolement des souches de trypanosomes

2.4.5.1. Culture des souches de trypanosomes

2.4.5.1.1. Culture *in vivo* des souches du terrain

La culture des trypanosomes sur le terrain a consisté à inoculer du sang infecté à des souris NMRI (Naval Medical Research Institute) saines. Pour ce faire, 0,5 mL de sang de chaque animal positif aux tests parasitologiques (BCT/ mAECT) a été injecté par voie intrapéritonéale à deux souris NMRI (Figure 15). Les souris ont été préalablement immunodéprimées par injection intradermique de 0,2 mL de cyclophosphamide (Endoxan®, 200mg/mL).



a) Souris NMRI saines

b) Infection d'une souris NMRI

Figure 15 : Inoculation de sang parasité à une souris NMRI

2.4.5.1.2. Souches de référence

Des trypanosomes de références de formes procycliques et sanguicoles (Annexe II) de la cryobanque de souches du laboratoire Intertryp IRD-Cirad de Montpellier, France, ont été utilisées dans cette étude.

2.4.5.1.2.1. Culture *in vivo* des formes sanguicoles

Cette étape a consisté à cultiver les souches de trypanosomes sanguicoles sur des souris NMRI préalablement immunodéprimées. A cet effet, les stabilats des souches de trypanosomes sanguicoles ont été choisis de la cryobanque. Ensuite, ils ont été retirés de leur bonbonne d'azote liquide et décongelés à la température ambiante. Les stabilats qui ont présenté des trypanosomes mobiles par observation microscopique ont été inoculés par injection intra-péritonéale à des souris NMRI (en raison de deux souris par stabilat) préalablement immunodéprimées par injection intradermique de 0,2 mL d'Endoxan® à 20 mg/mL.

2.4.5.1.2.2. Culture *in vitro* des formes procycliques

La culture des trypanosomes procycliques a été effectuée sur un milieu de Cunningham (1977) à 20% de sérum de veau fœtal (SVF). Le milieu de Cunningham a été préparé au laboratoire selon le protocole suivant : dans un premier temps, les produits chimiques (annexe III) servant à la préparation du milieu ont été dissous dans de l'eau distillée et ce mélange a été homogénéisé sur une plaque chauffante à une température de 50°C. Un volume de 1800 mL pour un pH 7,2 a été préparé (milieu de Cunningham).

Au milieu de Cunningham a été ajouté 200 mL de sérum de veau fœtal (milieu de Cunningham à 20% de SVF). Après la préparation du milieu de Cunningham à 20% de SFV, les stabilats de trypanosomes procycliques ont été retirés de l'azote liquide et décongelés. Une observation microscopique au grossissement 400 a été effectuée pour vérifier la qualité de chaque stabilat (présence de trypanosomes mobiles). Les stabilats présentant des trypanosomes mobiles ont été ajoutés au milieu de Cunningham à 20% de SVF pour la culture des trypanosomes procycliques.

2.4.5.2. Isolement des souches de trypanosomes

2.4.5.2.1. Souches du terrain

Deux jours après l'inoculation, un suivi quotidien de la charge parasitaire de chaque souris a été effectué par observation microscopique (au grossissement 400) d'une goutte de sang prélevée à la queue. La charge parasitaire a été 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). Lorsque la charge parasitaire atteint un antilog supérieur ou égal à 8.1, soit 125×10^6 parasites/mL de sang, la souris est anesthésiée par injection de 0,2 mL de kétamine et son sang est ponctionné avec une seringue stérile par voie intracardiaque.

Une partie du sang obtenu est mélangé avec un cryoconservateur (10 % de glycérol et du Phosphate Saline Glucose : PSG). Ce mélange appelé stabilat a été cryoconservé dans l'azote liquide (à -196° C) à l'Unité de Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire (URGEM) pour des études ultérieures.

Les trypanosomes du sang restant ont été recueillis par élution sur mAECT. Les éluats obtenus ont été alors congelés à -20°C pour en extraire l'ADN.

2.4.5.2.2. Souches sanguicoles

Deux jours après l'infection des souris, un suivi quotidien de la charge parasitaire a été effectué par observation microscopique (grossissement 400) d'une goutte de sang prélevée à la queue de chaque souris. Pour toute parasitémie présentant un antilog supérieur ou égal à 8.1 (125×10^6 parasites/mL de sang), la souris est anesthésiée à l'isoflurane et son sang est ponctionné avec une seringue stérile par voie intracardiaque. Une partie de ce sang a été mélangée avec du glycérol et du PSG.

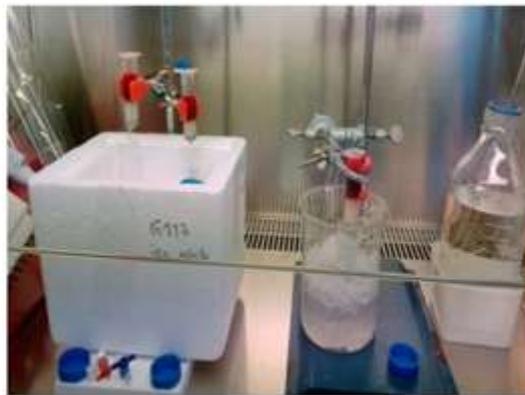
Ce mélange (stabilat) a été cryoconservé dans de l'azote liquide (à -196°C). Le reste du sang a été déposé sur une colonne Diethylaminoethyl (DEAE 52)-cellulose (Lanham & Godfrey, 1970) pour recueillir les trypanosomes qui sont ensuite congelés à -20°C pour extraire ultérieurement l'ADN. La figure 16 illustre la procédure de purification d'une souche de référence sanguicole.



a) Souris anesthésiée à l'isoflurane



b) Ponction cardiaque d'une souris



c) Purification des trypanosomes sanguicoles sur DEAE 52

Figure 16 : Récolte et purification de souche de référence sanguicole

2.4.5.2.3. Souches procycliques

Deux jours après la culture des souches, un suivi quotidien de la charge parasitaire de chaque culture procyclique a été effectué par observation au microscope (Figure 17). Lorsque la parasitémie atteint un antilog supérieur ou égal à 8.1, c'est-à-dire 125×10^6 parasites/mL, la culture est purifiée avec du tampon PSG 80 %. Une partie du culot de trypanosomes ainsi obtenu a été mélangée avec du glycérol. Le stabilat a été ainsi reconstitué et cryoconservé dans l'azote liquide (à -196°C).

Le reste du culot a été ensuite congelé à -20°C pour extraire ultérieurement l'ADN des trypanosomes.



Figure 17 : Observation microscopique d'une culture procyclique

2.4.6. Diagnostic des trypanosomes chez les animaux domestiques

Plusieurs techniques ont été utilisées pour la mise en évidence des trypanosomes circulant chez les animaux domestiques examinés. Parmi celles-ci, les tests parasitologiques par la technique du BCT et de la mAECT ont été utilisés sur le terrain et d'autres tels que le test immunologique (trypanolyse) et la technique moléculaire (PCR) ont été effectués au laboratoire.

2.4.6.1. Techniques parasitologiques ou méthodes directes

➤ Technique du Buffy-Coat (BCT)

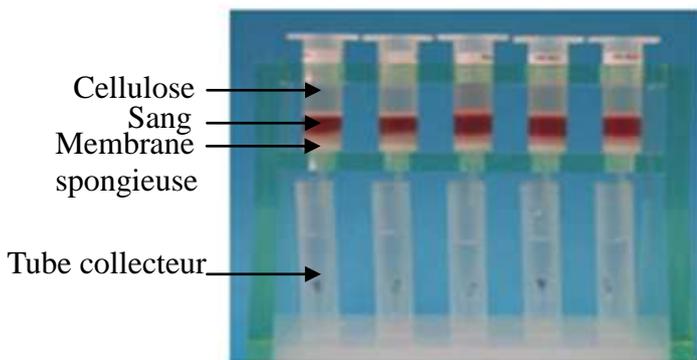
Le test parasitologique BCT (Buffy-Coat Technique) (Murray *et al.*, 1977) a été effectué sur tous les échantillons de sang prélevés chez les animaux domestiques lors des différentes enquêtes. Pour chaque animal, un tube capillaire a été rempli d'un volume de sang d'environ 70 μ L. Le tube capillaire a été ensuite bouché à l'une de ses extrémités avec de la pâte à modeler puis centrifugé pendant 5 minutes à 13000 rpm. Après la centrifugation, le tube présente trois couches : une couche de liquide clair en surface (le plasma), une couche de liquide rouge au fond du tube, contenant la plupart des globules rouges et la couche leucocytaire ou buffy-coat se trouvant entre le liquide clair et le liquide rouge. Le tube capillaire a été sectionné à l'aide d'une pointe diamant et la couche leucocytaire a été observée au microscope au grossissement 400 (Figure 18-a). Une infection a été déclarée active à la suite du test, lorsque des trypanosomes mobiles sont observés au microscope.

➤ Technique de la mini-colonne échangeuse d'ions (mAECT)

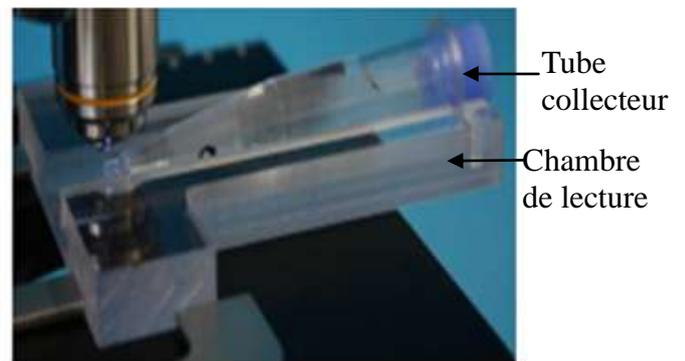
La mAECT (Lumsden *et al.*, 1977) est la technique parasitologique la plus sensible pour la détection des trypanosomes dans le sang. Sur une colonne échangeuse d'anions, les trypanosomes d'animaux ont été séparés à partir de 350 μ L de sang sur DEAE 52 cellulose (Figure 18-b) conformément aux recommandations de la notice d'instructions fournie avec le test. Les trypanosomes élués dans le tube collecteur transparent ont été ensuite concentrés par centrifugation du tube pendant 5 minutes à 2500 rpm. Après l'étape de centrifugation, le tube collecteur monté dans la chambre de lecture (Figure 18-c) a été observé microscopique afin de rechercher les trypanosomes mobiles.



a) Observation microscopique du buffy-coat



b) Portoir de mAECT avec des colonnes DEAE-cellulose montées et élution des trypanosomes dans les tubes collecteurs



c) Tube collecteur monté dans la chambre de lecture de la mAECT

Figure 18 : Illustration de méthodes directes dans la détection des trypanosomes

2.4.6.2. Test de la trypanolyse

Le test d'immuno-trypanolyse pour la recherche des anticorps utilise de trypanosomes sanguicoles vivants (antigènes variables de *Trypanosoma brucei gambiense* types LiTat 1.3, LiTat 1.5, et LiTat 1.6). Il a été réalisé au CIRDES de Bobo-Dioulasso au Burkina-Faso.

Dans une plaque de 96 puits, 25 µL de sérum contenant des anticorps anti-LiTat (témoin positif) et 25 µL de sérum de cobaye (témoin négatif) ont été distribués respectivement dans le premier et deuxième puits. Ensuite, 25 µL de plasma à tester sont distribués dans les autres puits. Puis, 25 µL de sérum de cobaye est ajouté dans tous les puits et le mélange a été incubé pendant 30 minutes à température ambiante. Le sang infecté par *T. b. gambiense* a été dilué dans du sérum de cobaye à une concentration finale de 10^7 trypanosomes/mL. Cinquante (50) µL de la suspension de trypanosomes vivants exprimant les variants antigéniques ont été ajoutés dans les puits contenant le plasma et le sérum de cobaye. La souche de sérum résistant de *Trypanosoma brucei rhodesiense* ETAT 1. a été utilisée comme témoin de l'absence d'activité trypanolytique non spécifique du plasma à tester. Après 90 minutes d'incubation à la température ambiante, la suspension a été examinée au microscope (x250). La trypanolyse a été considérée comme positive lorsque 50 à 100 % des trypanosomes sont lysés.

2.4.6.3. Diagnostic des trypanosomes à l'aide d'outils de biologie moléculaire

Trois étapes sont nécessaires pour obtenir les profils électrophorétiques qui seront analysés. Ces étapes sont l'extraction de l'ADN, l'amplification des extraits d'ADN obtenus, et l'électrophorèse des produits d'amplification.

2.4.6.3.1. Extraction de l'ADN génomique

Au laboratoire, l'ADN génomique a été extrait à partir des échantillons de sang collecté sur le terrain, des trypanosomes purifiés provenant des souches isolées et des souches de référence. L'extraction a été effectuée à l'aide du Kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valencia, CA, USA).

Dans un microtube de 1,5 µL, un mélange de 500 µL de sang total et 500 µL d'eau moléculaire a été effectué. Le mélange a été homogénéisé pendant 10 minutes, puis centrifugé à 6000 rpm pendant 3 minutes. Après la centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot

conservé pour la suite de l'extraction selon le protocole (annexe IV). L'ADN extrait a migré sur un gel d'agarose 1% pendant 20 minutes à 100 volts. Le gel a été visualisé grâce à un transilluminateur, puis photographié. Cette étape a permis de vérifier la qualité de l'ADN extrait. L'extraction de l'ADN des souches isolées et de référence a été réalisée selon le même protocole mais à la première étape, les parasites ont été resuspendus dans 200 µL de tampon PBS. La concentration des échantillons d'ADN des souches de référence a été mesurée au Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific). Ensuite, des aliquots à 10 ng/µL ont été réalisés pour la détermination des génotypes et le reste de l'ADN extrait a été conservé à -80 °C.

2.4.6.3.2. Amplification de l'ADN extrait

La PCR ou Réaction de Polymérisation en Chaîne a été la technique de la biologie moléculaire utilisée pour l'amplification spécifique de l'ADN des trypanosomes chez les animaux domestiques. Cette activité a été réalisée dans le laboratoire de l'URGEM à l'UJLoG, Côte d'Ivoire et dans le laboratoire de biologie moléculaire de l'UMR Intertryp IRD-Cirad, France. Elle a consisté à caractériser chaque espèce de trypanosomes (*T. congolense* types savane et forêt, *T. vivax* ou *T. brucei* s.l.) à partir des ADN extraits.

2.4.6.3.2.1. Réalisation du milieu réactionnel pour la PCR

Les réactions d'amplification de l'ADN des espèces *T. brucei* s.l., *T. vivax*, *T. congolense* type forêt, *T. congolense* type savane et *T. b. gambiense* ont été réalisées en utilisant respectivement les amorces (séquences encadrant la portion d'ADN ou d'ARN à amplifier) mono-spécifiques TBR1/TBR2, TVW1/TVW2, TCF1/TCF2, TCS1/TCS2 et Tg19F/Tg19R (Tableau II). Le gène TgsGP spécifique à *T. b. gambiense* n'a été recherché que dans les échantillons positifs à la PCR TBR1/TBR2 en utilisant les amorces Tg19F/Tg19R.

La PCR avec les amorces TBR1/TBR2, TVW1/TVW2, TCF1/TCF2 et TCS1/TCS2 a été effectuée dans un volume final de 50 µL comprenant 5 µL de tampon 10X, 1 µL de dNTP à 10 mM, 1 µL de chaque amorce (10 pmol), 0,1 µL de Taq polymérase (5U/µL), 36,9 µL d'eau et 5 µL d'ADN à 10 ng/µL.

La PCR avec les amorces Tg19F/Tg19R a été réalisée dans un volume final de 25 μL contenant 12,5 μL de Hotstar Taq Master mix (Qiagen), 1 μL de chaque amorce (20 pmol), 8 μL d'eau et 2,5 μL d'ADN à 10 ng/ μL .

L'ADN de référence a été ajouté dans le tube témoin positif et de l'eau stérile a été ajoutée dans le tube témoin négatif.

2.4.6.3.2.2. Programme thermique de l'amplification en PCR

Chaque espèce et sous-espèce de trypanosomes a été amplifiée dans un thermocycleur (PTC-T100, Biorad, USA) selon les étapes suivantes :

Pour les amorces TBR1/TBR2, TVW1/TVW2, TCF1/TCF2, TCS1/TCS2 :

- dénaturation initiale à 95° C pendant 3 min, suivie de 40 cycles dont dénaturation à 95° C de 30 sec ;
- hybridation à 55° C pendant 30 sec ;
- élongation à 72° C pendant 1 min puis élongation finale de 5 min à 72° C.

Concernant les amorces Tgs19F/Tgs19R :

- dénaturation initiale à 95° C pendant 3 min, suivie de 45 cycles dont dénaturation à 95° C de 30 sec ; - hybridation à 63° C pendant 30 sec ;
- et élongation à 72° C pendant 1 min. puis élongation finale de 5 min à 72° C.

Tableau II : Caractéristiques des couples d'amorces utilisées pour la PCR

Spécificité	Séquence des amorces (5'→3')	Tm	Taille	Références
<i>T. brucei s.l</i>	TBR1: CGA-ATG-AAT-ATT-AAA-CAA-TGC-GCA-G	55°C	177 pb	Moser <i>et al.</i> , 1989
	TBR2: AGA-ACC-ATT-TAT-TAG-CTT-TGT-TGC			
<i>Tcs</i>	TCS1: CGA-GCG-AGA-ACG-GGC-AC	55°C	321 pb	Masiga <i>et al.</i> , 1992
	TCS2: GGG-ACA-AAC-AAA-TCC-CGC			
<i>Tcf</i>	TCF1: GGA-CAC-GCC-AGA-AGG-TAC-TT	55°C	350 pb	Masiga <i>et al.</i> , 1992
	TCF2: GTT-CTC-GCA-CCA-AAT-CCA-AC			
<i>T. vivax</i>	TVW1: CTG-AGT-GCT-CCA-TGT-GCC-AC	55°C	150 pb	Masiga <i>et al.</i> , 1992
	TVW2 : CCA-CCA-GAA-CAC-CAA-CCT-GA			
<i>Tbg</i>	Tg19-F : GCTGCTGTGTTCCGGAGAGC	63°C	310 pb	Radwanska <i>et al.</i> , 2002
	Tg19-R : GCCATCGTGCTTGCCGCTC			

1 : sens, 2 : anti sens, bp : paires de bases, F : forward (sens), R : reverse (anti sens), Tm : melting Temperature (Température d'hybridation), Réf : références, Taille : Taille attendue, Tcs : *Trypanosoma congolense savane*, Tcf : *T. congolense forêt*, Tbg : *T. b. gambiense*.

2.4.6.3.3. Electrophorèse et révélation des produits d'amplification

Les fragments d'ADN amplifiés ou amplicons (produits de la PCR) ont été séparés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 2 %. Pour chaque gel, 2 g d'agarose ont été dissouts dans 100 mL de tampon TBE 0,5X (Tris Borate EDTA). Après homogénéisation, le mélange est porté à ébullition grâce à une plaque chauffante ou un four micro-onde. Ensuite, 3 µL de GelRed (agent intercalant entre les bases de l'ADN) ont été ajoutés lors de la préparation du gel. Le GelRed se fixe sur les fragments d'ADN et permet de les visualiser par fluorescence sous exposition aux ultraviolets d'un transilluminateur. Le mélange obtenu est coulé dans une cuve à électrophorèse contenant des peignes qui vont créer des puits dans le gel. Dans chaque puits du gel, sont déposés 8 µL de chaque amplicon mélangés avec 2 µL de solution tampon de charge (bleu de charge).

Le tampon de charge facilite le dépôt en augmentant la densité du mélange et indique le front de migration. Un marqueur de poids moléculaire à 100 pb est déposé dans le premier puits du gel. L'ensemble est soumis à un courant électrique continu de 100 Volts pendant 45 min. A la fin de la migration, le gel est sorti de son moule et visualisé dans un appareil (transilluminateur) sous lumière Ultraviolette puis photographié. Les poids moléculaires des fragments d'ADN amplifiés sont déterminés par rapport au marqueur de poids moléculaire. Les images des gels stockées dans le transilluminateur ont été exportées sur l'ordinateur du laboratoire pour la lecture.

2.4.7. Génotypage des souches de trypanosomes à l'aide de loci microsatellites

Le génotypage des échantillons d'ADN positifs à la PCR TBR1/TBR2 a été réalisée avec des marqueurs microsatellites choisis sur la base de leur polymorphisme. Au total, les extraits d'ADN de 88 animaux domestiques, de 50 souches isolées lors des enquêtes sur le réservoir animal domestique et de 32 souches de référence ont été testés au laboratoire de biologie moléculaire de l'UMR Intertryp IRD-Cirad de Montpellier en France.

2.4.7.1. Marqueurs microsatellites utilisés

Dix-huit (18) marqueurs microsatellites ont été utilisés pour déterminer les génotypes des souches de trypanosomes (Tableau III). Parmi ces marqueurs, quatre (Micbg5, Micbg6, Misatg4 et Misatg9) ont précédemment été mis au point au cours des travaux sur l'étude de la diversité génétique du complexe *T. brucei* s.l. (Koffi *et al.*, 2007). Ces marqueurs (marqueurs *brucei*) ont été conçus à partir d'une souche de référence de *T. brucei* s.l. Les quatorze autres marqueurs microsatellites ont été définis à partir d'une banque microsatellite réalisée à partir de l'ADN extrait de la souche de référence B4F303 de l'espèce *T. b. gambiense*. Ces nouveaux marqueurs (marqueurs *gambiense*) ont été sélectionnés de la manière suivante : (i) motif de répétition : dinucléotide, nombre de répétition supérieur à 8, taille de l'amplicon compris entre 150 et 300 bp, (ii) chaque couple d'amorce sélectionné a été évalué par PCR et les produits d'amplification ont été migrés sur un gel d'agarose 2 % dans du tampon TBE 0,5X en utilisant un marqueur de poids moléculaire (100 pb) afin de détecter la présence ou l'absence des amplicons. La révélation des bandes d'ADN est rendue possible par le Bromure d'Ethidium (BET: agent intercalant) (Higuchi *et al.*, 1992) se liant à l'ADN double brin (Poitras & Houde, 2002) ajouté au gel d'agarose et qui permet de visualiser l'ADN dans le gel sous forme de bande. Le résultat de cette étape a permis de sélectionner les paires d'amorces oligonucléotides les plus adaptées et qui ont présenté un polymorphisme élevé, (iii) les paires d'amorces choisis ont ensuite été testées sur séquenceur capillaire.

Tableau III : Caractéristiques des 18 marqueurs microsatellites utilisés pour le génotypage des échantillons positifs à la PCR TBR1/TBR2

Loci	Motif répété	Séquences (5'-3')	References
Micbg5	(AT) _n	F : TAACCCCAAATGCTCTCCCCC R : CACACCACAGCCAATTCCGCC	Koffi <i>et al.</i> (2007)
Micbg6	(AC) _n (AT) _n	F : CGGTGTAGTGGCATTCCGGT R : GCTCGCCGCCTCATGAGGTG	Koffi <i>et al.</i> (2007)
Misatg4	(AC) _n	F : GAAGTAACTCTATACGGGTGG R : GTTTTCCCCTTGTTGTAATC	Koffi <i>et al.</i> (2007)
Misatg9	(AC) _n	F : GAGCTCTTACTTATTGCCCGTCT R : GTGGGGAAGAACAAGCAGA	Koffi <i>et al.</i> (2007)
TBG01	(AT) _n	F : CCGAAGAAGAACGCAA R : ACGGTGAACGAGCTGAA	Nouveaux marqueurs
TBG02	(TC) _n	F : AACTGTGCCTTTCCGT R : GAAACCGGGTCGTGTAAG	

Loci	Motif répété	Séquences (5'-3')	References
TBG03	(TA) _n	F : CGCTTCCCTTAGCTTTGT R : TCAGGTAAACCCACCGA	Nouveaux marqueurs
TBG04	(AC) _n	F : AAGCGATGGTGAATGGA R : GCCAAGCAGCAAGAAAG	
TBG05	(GT) _n	F : TACAGCCTTGTTGGGGA R : ATGGAGTGAGGGAGATGTG	
TBG08	(AT) _n	F : ATTCGGCTTCGGATAGTT R : GCTCCGTTGTTCACTCC	
TBG14	(AT) _n	F : CACGGTGTTCGACTCTT R : TTCCACACAAACACGCA	
TBG15	(AT) _n	F : TGAAATAGGAAGAGCATACGA R : ACGTCAGATACACGCACAC	

Loci	Motif répété	Séquences (5'-3')	References
TBG17	(TA) _n	F : CTCCCCAAACAAGCAA R : TTGGCACAGGATGAAGAG	Nouveaux marqueurs
TBG18	(TA) _n	F : GCCGCACATCATAATCC R : ACGCGACACAAGGAGAG	
TBG21	(CA) _n	F : GGTGATACACGTCCTCCA R : GGTTGCCAAAATGGTGT	
TBG22	(AT) _n	F : GATGAAGGGCTAGGGTAATG R : GATGCGTCCTTCCTGTCT	
TBG30	(AT) _n	F : AAACAAAGGGGCGAAAC R : CACACACGCACACAAGG	
TBG34	(AT) _n	F : GAAGGTGACGAGCCCA R : AGATTGCCCCGTGTTTT	

F : sens ; R : anti-sens

2.4.7.2. Amplification de l'ADN du complexe *Trypanosoma brucei* s.l.

Après la PCR classique, tous les échantillons porteurs de l'ADN de *T. brucei* s.l. ont été amplifiés par PCR à l'aide de 18 loci microsatellites. Cette étape a permis de déterminer les profils génotypiques de chaque échantillon.

Pour chaque marqueur microsatellite, l'amorce « sens (ou forward) » a été prolongée à son extrémité 5' par une séquence universelle de 19 pb appelée queue M13 (5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3'). Lors de la réaction PCR, le M13-Dye ajouté va rentrer en compétition avec l'amorce M13 sens à partir du 3^{ème} cycle de la réaction et permettre ainsi le marquage des amplicons et leur détection lors de la migration sur capillaire. Quatre fluorochromes différents sont disponibles: FAM, VIC, PET et NED. Le fluorochrome FAM a été utilisé pour les PCR des loci TBG21, TBG18, TBG22 et TGB05; NED pour TBG01, TBG03, TBG30 et Misatg4; VIC pour TBG02, TBG08, TBG34, Misatg9 et Micbg5 et PET pour TBG15, TBG14, TBG17, TBG04 et Misatg6. Chaque fluorochrome permet de visualiser les produits de la PCR sur le séquenceur ABI 3500 XL (Applied Biosystems, USA). Le plan de plaque de la PCR est consigné en annexe V.

Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume final de 10 µL composé de 5 µL de chaque échantillon d'ADN précédemment utilisé et 5 µL du milieu réactionnel. La composition du milieu réactionnel pour un individu est présentée dans le tableau IV. Le M13-Dye est ajouté à la fin du mélange et à l'obscurité. Afin d'éviter toute contamination (amplification d'ADN étrangers), le milieu d'amplification est préparé sous une hotte protégée où aucun ADN n'est manipulé. Sur la paillasse, l'ADN est ajouté dans chaque puits et la plaque PCR est fermée avec une feuille thermos seal par la soudeuse (un appareil) et ensuite conservée dans du papier aluminium à + 4°C pour l'amplification des loci. Les températures d'hybridation ont été adaptées pour chaque marqueur microsatellite entre 53 et 55 °C. Les PCR sont réalisées en ajustant les températures d'hybridation afin de diminuer les amplifications non spécifiques (Annexe VI)

Tableau IV : Composition du milieu réactionnel de la PCR

Réactif	Composition pour un échantillon (μL)
Amorce M13F (10 pmol/microl)	0,16
Amorce R (10 pmol/microl)	0,2
M13-Dye (10 pmol/microl)	0,2
Tampon 10X	1
dNTP 10 Mm	0,2
Taq (5 u/microl)	0,1
H2O stérile	3,14

ADN : 5 μL

2.4.7.3. Réarrangement des plaques

Le réarrangement des plaques pour la PCR a consisté à associer dans une même plaque les produits des échantillons amplifiés avec quatre loci différents marqués par quatre fluorochromes différents. En effet, des loci marqués par des fluorochromes différents pourront être analysés de façon indépendante. Au final, deux panels de trois et trois panels de quatre marqueurs ont été obtenus (Annexe VII). A la plateforme de génotypage de Lavalette de Montpellier en France, 2 μL du produit de chaque réarrangement ont été distribués dans de nouvelles plaques. Puis, 10 μL d'un mélange formamide-GS600LIZ ont été ajoutés dans chaque puits de plaque. Le formamide a pour rôle de dénaturer les amplicons qui doivent être simple brin pour migrer dans les capillaires et le GS600LIZ est un marqueur de taille marqué avec un 5^{ème} fluorochrome qui permet de déterminer la taille exacte de chaque allèle obtenu à l'issue de la migration. Le génotypage a été réalisé à l'aide d'un séquenceur automatique couplé à un ordinateur.

2.4.7.4. Lecture des profils génotypiques

La lecture des profils génotypiques des échantillons a été réalisée à l'aide du logiciel GeneMapper® version 4.1 (Applied Biosystems 2007). Les données brutes issues du séquenceur capillaire ABI 3500XL (Applied Biosystems Inc, USA) ont été téléchargées sur le logiciel. A la fin, des fichiers de sortie donnant les tailles des allèles de chaque individu pour le marqueur étudié sont récupérés et ces fichiers sont exportés dans un tableur Excel puis sauvegardés pour les analyses.

2.4.8. Expérimentation animale : Xenodiagnostic

2.4.8.1. Infections expérimentales des glossines

Les glossines ténérales de l'espèce *Glossina morsitans* (individus naissants et à jeun) qui ont été utilisées proviennent de l'insectarium du CIRDES de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Ces glossines ont été réparties en lot de 30 par cage. A l'animalerie du laboratoire de l'URGEM de l'UJLoG, les cages ont été déposées sur l'abdomen de sept porcs pour le premier repas sanguin des glossines (Figure 19). Parmi ces porcs, deux ont été infectés naturellement par *T. brucei* s.l., quatre ont été infectés expérimentalement avec des souches de *T. brucei* s.l. et un porc non infecté a été pris comme témoin. Tous les repas de sang ont été effectués pendant 20 min.



Figure 19 : Cage déposée sur un porc pour le repas de sang des glossines

Source : URGEM, 2015

2.4.8.2. Suivi des infections

Pendant un an (12 mois), six suivis parasitologiques ont été effectués sur les porcs. Ces suivis ont été effectués chaque deux mois. En outre, le xénodiagnostic a été réalisé durant quatre suivis. Ces différents suivis ont permis d'évaluer la charge parasitaire des porcs et d'estimer le rôle de la glossine, dans sa capacité à acquérir et transmettre le parasite à partir des réservoirs d'hôtes mammifères.

Avant chaque repas des glossines, des examens parasitologiques (BCT et mAECT) ont été effectués à partir des prélèvements sanguins de chaque porc. Ces différentes analyses ont permis de suivre l'évolution de la charge parasitaire des animaux.

Les porcs ont été suivis dans une enceinte sous moustiquaire pour éviter tout contact avec d'autres glossines ou d'autres insectes hématophages.

Deux jours après le repas de sang (J2), les glossines ont été disséquées sous la loupe binoculaire (Figure 20) et d'autres au quinzième jour (J15) post-repas sur porc selon la méthode de Yoni *et al.* (2005). Leurs différents organes (intestin moyen, proboscis et glande salivaire) ont été isolés puis examinés au microscope en contraste de phase (grossissement x 400) afin de localiser et répertorier les infections aux trypanosomes.

Les glossines ont été entretenues tous les trois jours sur des lapins dont les qualités d'hôte nourricier au laboratoire sont bien connues (Moloo, 1981). La parasitémie des lapins est régulièrement contrôlée par examen de sang à l'état frais. Dès l'apparition des trypanosomes, les lapins sont soumis à un traitement au trypanocide, puis sont mis au repos et remplacés pendant cette période par d'autres qui sont sains.



Figure 20: Dissection et observation microscopique
des organes des glossines

Source : URGEM, 2016

2.4.9. Analyses statistiques des données

2.4.9.1. Prévalence de l'infection aux trypanosomes

La prévalence est la proportion (en %) d'individus positifs à une infection dans une population donnée. Dans cette étude, les infections aux trypanosomes ont été détectées à l'aide d'outils parasitologiques (BCT et/ou mAECT), moléculaires (PCR) et immunologiques (trypanolyse). Les prévalences de ces infections ont été comparées entre les espèces animales domestiques, les sites de l'étude et aussi les années d'échantillonnage. La prévalence est déterminée par la relation :

$$\text{Prévalence (\%)} = \frac{n}{N} \times 100$$

n : effectif d'individus positifs à l'infection aux trypanosomes

N: effectif total d'individus examinés de la population considérée.

2.4.9.2. Estimation des paramètres de la diversité génétique

Les diversités génétiques totales et des sous-populations ont été estimées sur l'ensemble des individus testés. Les paramètres mesurés sont :

➤ Taux de polymorphisme (P)

C'est la proportion des loci microsatellites polymorphes sur l'ensemble des microsatellites étudiés. Un marqueur est considéré comme polymorphe lorsqu'il a au moins deux allèles et la fréquence de l'allèle le plus fréquent est inférieure au seuil de 0,95.

$$P = \frac{n}{L} \times 100$$

n = nombre de locus polymorphes

L = nombre de loci étudiés.

➤ **Nombre moyen d'allèles par locus (A)**

Cet indice est déterminé par le nombre total d'allèles présent, dans la population divisée par le nombre de loci. Il est exprimé selon la formule suivante :

$$A = \sum n/L$$

n = nombre d'allèles à un locus

L = nombre de loci étudiés.

➤ **Indices de fixation (F_{IS} , F_{ST} , F_{IT}) de Wright (1965)**

Ces indices sont calculés pour chaque locus et la moyenne est prise sur l'ensemble des loci. Le logiciel Create a permis d'obtenir le format d'analyse pour les logiciels Fstat version 2.9.4 (Goudet, 2003), Genetix version 4.0.3 et Genepop version 4.7.0 (Rousset, 2008) qui ont été utilisés.

- Le F_{IS} (I pour individus et S pour sous-population) estime l'écart à la panmixie. Il exprime la variabilité génétique au sein des individus par rapport à la sous-population à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Il mesure ainsi l'excès ou le déficit d'hétérozygotie à l'intérieur de chaque sous-population, par locus et pour l'ensemble des loci. Le F_{IS} se calcule selon la formule :

$$F_{IS} = (H_e - H_o) / H_e = 1 - (H_o / H_e)$$

H_o : taux d'hétérozygotie observée

H_e : Taux d'hétérozygotie attendue

Lorsque :

$F_{IS} < 0$, alors il y a un excès d'individus hétérozygotes

$F_{IS} > 0$, alors il y a un déficit d'individus hétérozygotes

$F_{IS} = 0$, alors il y a équilibre de Hardy-Weinberg.

- Le F_{ST} (S pour sous-population et T pour population totale) représente la consanguinité des sous-populations par rapport à la population totale et mesure l'effet de la dérive génétique et de la migration des sous-populations. Il donne le déficit en hétérozygotes issu de la structuration en sous-populations. Sa valeur est toujours positive.

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

Où H_T est l'hétérozygotie attendue en supposant la population totale à l'équilibre Hardy-Weinberg et H_S , l'hétérozygotie attendue par individu pour chaque sous-population en la supposant à l'équilibre Hardy-Weinberg.

Si le F_{ST} est égal ou très proche de **0**, cela signifie qu'il y a de nombreux échanges génétiques entre les populations (peu de différenciation génétique, population panmictique). A l'inverse, si le F_{ST} est proche de **1**, cela se traduit par une forte différenciation génétique entre les populations, suggérant très peu, voire aucun flux de gènes entre les populations.

- Le paramètre F_{IT} est une mesure de la consanguinité des individus (I) par rapport à la consanguinité dans la population totale (T). Il correspond à la résultante des deux précédents. Le F_{IT} varie de:

- ✓ -1 (quand tous les individus de la population totale sont hétérozygotes pour les deux mêmes allèles);
- ✓ 1 (quand tous les individus sont homozygotes, avec au moins deux allèles, dans la population totale).

Les tests de chi-2 (X^2) d'homogénéité ou X^2 de Pearson et exact de Fisher ont été effectués pour comparer les distributions observées entre les animaux domestiques examinés. Les valeurs des probabilités (p) < 0,05 ont été considérées comme significatives. Le test a été réalisé à l'aide du logiciel R (R-Core-Team, 2018).

2.4.9.3. Structuration génétique des souches de *Trypanosoma brucei* s.l.

Les comparaisons du succès d'amplification entre les échantillons biologiques (échantillons de sang) et les souches isolées ou entre des marqueurs *brucei* et *gambiense* ont été effectuées avec un test exact de Fisher en utilisant le logiciel R (R-Core-Team, 2018).

La correspondance entre les marqueurs *T. brucei* et *T. gambiense* a été étudiée à l'aide du test de Mantel à partir des matrices de distance de Cavalli-Sforza et Edwards, (1967) obtenues avec chaque type de marqueur.

La structure génétique des populations a été évaluée au moyen des tests de déséquilibre de liaison (LD) corrigés selon la procédure de Benjamini & Yekutieli. (2001) et des indices de fixation de Wright. Ces tests ont été effectués avec Fstat 2.9.4 (Goudet, 2003).

Etant donné que la différenciation génique des populations devient significative entre les sous-échantillons d'un même site mais séparés par six mois (Kaboré *et al.*, 2011), l'échantillon a été divisé selon ce critère en trois cohortes (C) qui sont: C1 (septembre à octobre 2013), C5 (décembre 2015 à avril 2016) et C7 (octobre 2016 à mars 2017). Chaque cohorte ou chaque combinaison de cohorte/village et cohorte/foyer a été considérée comme une unité définissant des sous-échantillons pour l'analyse de la structure des sous-populations locales. Le village est le site où l'échantillon a été prélevé et le foyer est la zone de l'étude.

Le Test de l'isolement par la distance a été effectué avec l'approche de Rousset. (1997) pour évaluer la corrélation entre la distance génétique entre la distance géographique.

Les critères de De Meeûs & Balloux. (2005) ont été utilisés pour détecter les clones fortement subdivisés, où $F_{ST} \approx -F_{IS}/(1-F_{IS})$ et $F_{IT} \approx 0$. Pour ces analyses, seules les sous-populations avec suffisamment d'isolats génotypés de la même cohorte ont été utilisées. Ainsi, la Cohorte 7 a été conservée.

Lorsque les populations clonales sont fortement subdivisées en de nombreuses sous-populations et que le taux de mutation $u \ll m$ (taux de migration), le nombre de migrants peut être calculé comme suit $Nm = -(1+F_{IS})/(4F_{IS})$ (De Meeûs et Balloux, 2005).

La classification des trypanosomes des stocks d'animaux domestiques par rapport aux souches de référence a été réalisée en générant un dendrogramme selon la méthode du NJTree (Neighbor-Joining Tree) (Saitou & Nei, 1987) sur la base de la matrice de distance de Cavalli-Sforza et Edwards (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) comme recommandé (Takezaki & Nei, 1996). La matrice de distance de Cavalli-Sforza et Edwards a été obtenue à l'aide du logiciel FreeNA (Chapuis et Estoup, 2007). Le dendrogramme (NJTree) a été visualisé avec le logiciel MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

TROISIEME PARTIE : RESULTATS

3.1. Prévalence de l'infection aux trypanosomes

3.1.1. Enquête de 2013

3.1.1.1. Diagnostic parasitologique

Dans l'ensemble, 552 animaux domestiques comprenant 87 bovins (15,76 %), 192 ovins (34,78 %), 136 caprins (24,64 %) et 137 porcs (24,82 %) ont été testés durant l'enquête conduite en 2013.

Les résultats des analyses parasitologiques (BCT/mAECT) ont révélé une prévalence globale d'infection de 10,33 %. Les prévalences obtenues ont varié significativement ($p < 0,001$) entre les différentes espèces animales. Les porcs ont constitué l'espèce animale la plus infectée avec une prévalence de 29,93 %, suivis des bovins avec 5,75 %. Les ovins et les caprins ont été les moins infectés avec des prévalences respectives de 4,69 % et 1,47 % (Tableau V).

Les animaux domestiques examinés dans le foyer de Bonon ont été plus infectés avec une prévalence de 12,75 % contre 8,64 % obtenue chez ceux de Sinfra. Aucune différence significative d'infection n'a été observée entre les deux foyers ($p = 0,15$).

La répartition des prévalences d'infection par localité a montré que les bovins de Bonon ont été plus infectés que ceux de Sinfra. Cependant, aucune différence significative d'infection n'a été observée entre les bovins ($p = 0,388$) des deux localités. Les infections aux trypanosomes sont plus importantes chez les porcs et les ovins de Sinfra que chez ceux de Bonon. Aucune différence significative d'infection n'a été observée entre les porcs ($p = 0,821$), entre les ovins ($p = 1$) de Bonon et de Sinfra. En outre, aucune infection aux trypanosomes n'a été détectée chez les caprins provenant du foyer de Sinfra (Tableau VI).

Tableau V : Prévalence parasitologique des trypanosomes détectés chez les espèces animales

Espèce animale	N	Nbre d'animaux infectés (%)	X^2	P
Bovin	87	5 (5,75)		
Caprin	136	2 (1,47)		
Ovin	192	9 (4,69)	79,92	< 0,001
Porc	137	41 (29,93)		
Total	552	57 (10,33)		

N = effectif d'animaux testés ; Nbre = nombre ; X^2 : test chi-2 ; P = valeur de la probabilité.

Tableau VI : Prévalence parasitologique des trypanosomes détectés chez les espèces animales dans chaque foyer d'étude

Espèce animale	Foyer	N	Nbre d'animaux infectés (%)	P
Bovin	Sinfra	52	2 (3,85)	0,388
	Bonon	35	3 (8,57)	
Caprin	Sinfra	89	0 (0)	0,119
	Bonon	47	2 (4,35)	
Ovin	Sinfra	100	5 (5)	1
	Bonon	92	4 (4,35)	
Porc	Sinfra	60	19 (31,67)	0,821
	Bonon	77	23 (29,87)	
Total		552	57 (10,33)	

N = effectif d'animaux testés, Nbre = nombre, P = valeur de la probabilité.

3.1.1.2. Diagnostic moléculaire des trypanosomes

Les résultats de la PCR mono-spécifique ont montré que trois espèces de trypanosomes circulent chez animaux domestiques testés. Au total, 109 animaux ont été infectés sur les 552 examinés. La prévalence globale d'infection est 19,75 %. *T. brucei* s.l. a été l'espèce la plus infectante avec une prévalence de 13,77 %, suivies de *T. congolense* type forêt avec 8,51 % et *T. vivax* avec 2,36%. Les prévalences des infections dues à *T. brucei* s.l. ($p < 0,001$), *T. congolense* type forêt ($p < 0,001$) et *T. vivax* ($p = 0,02$) diffèrent significativement entre les espèces animales (Tableau VII).

Aucune infection à *T. congolense* type savane n'a été détectée. Concernant l'infection à *T. brucei* s.l., la prévalence de 36,50 % observée chez les porcs a été significativement plus élevée ($p < 0,001$) par rapport à celle de 17,24 % observée chez les bovins, 4,17 % chez les ovins et 2,21 % chez les caprins. Par ailleurs, aucun porc n'a été testé positif à la PCR avec les amorces spécifiques de *T. vivax* (Tableau VII).

La distribution des infections par localité a montré que dans les foyers de Bonon et de Sinfra, les infections à *T. brucei* s.l. sont plus importantes chez les bovins et les porcs que chez les caprins et les ovins. La prévalence de l'infection à *T. brucei* s.l. a révélé que les bovins de Bonon avec 37,14 % ont été significativement ($p < 0,001$) plus infectés que ceux de Sinfra avec 5,76 %. Par contre, les porcs de Sinfra avec une prévalence de 43,33 % ont été plus infectés par *T. brucei* s.l. que ceux de Bonon avec 31,17 %. Cependant, ces données n'ont révélé aucune différence significative à l'intérieur des groupes d'animaux que sont les porcs ($p = 0,142$), les caprins ($p = 1$) et les ovins ($p = 0,223$) de Bonon et de Sinfra.

Les infections à *T. congolense* type forêt ont été détectées chez toutes les espèces animales. Aucune infection à *T. vivax* n'a été observée chez les porcs des foyers de Bonon et Sinfra. De même, aucun caprin du foyer de Sinfra n'a été infecté par *T. vivax* (Tableau VIII).

Tableau VII : Prévalence des espèces de trypanosomes identifiées chez les animaux domestiques

Espèce animale	N	Nombre d'animaux infectés (%)			Total
		TBR	TCF	TVW	
Bovin	87	15 (17,24)	9 (10,34)	3 (3,45)	
Ovin	192	8 (4,17)	9 (4,69)	9 (4,69)	
Caprin	136	3 (2,21)	5 (3,68)	1 (0,73)	
Porc	137	50 (36,50)	24 (17,52)	0 (0)	
Total	552	76 (13,77)	47 (8,51)	13 (2,36)	109 (19,75)
X^2		90,72	22,33	9,85	
P		< 0,001	< 0,001	0,02	

N = effectif d'animaux testés, TBR: *Trypanosoma brucei.sl* ; TCF : *Trypanosoma congolense* type forêt; TVW : *Trypanosoma vivax*, X^2 : test chi-2, probabilités (P) significatives (< 0,05) sont indiquées en gras

Tableau VIII : Prévalence des espèces de trypanosomes identifiées chez les animaux domestiques dans chaque foyer d'étude

Espèce animale	Foyer	N	Nombre d'animaux infectés (%)			P		
			TBR	TCF	TVW	TBR	TCF	TW
Bovin	Sinfra	52	3 (5,76)	3 (5,77)	2 (3,85)	<0,001	0,087	0,804
	Bonon	35	12 (37,14)	6 (17,14)	1 (2,86)			
Caprin	Sinfra	89	2 (2,25)	3 (3,37)	0 (0)	1	1	/
	Bonon	47	1 (2,13)	2 (4,26)	1 (2,13)			
Ovin	Sinfra	100	2 (2)	5 (5)	6 (6)	0,223	1	0,369
	Bonon	92	6 (6,52)	4 (4,35)	3 (3,26)			
Porc	Sinfra	60	26 (43,33)	12 (20)	0 (0)	0,142	0,5	/
	Bonon	77	24 (31,17)	12 (15,58)	0 (0)			
Total		552	76 (13,77)	47 (8,51)	13 (2,36)			
X			90,72	22,33	9,85			
P			< 0,001	< 0,001	0,02			

N = effectif d'animaux testés, TBR : *Trypanosoma brucei.sl* ; TCF : *Trypanosoma congolense* type forêt; TVW : *Trypanosoma vivax*, probabilités (P) significatives (< 0,05) sont indiquées en gras

3.1.1.3. Trypanolyse

Les trois variants antigéniques de la trypanolyse ont été exprimés chez 93 animaux domestiques sur les 552 animaux testés, donnant une prévalence globale de 16,85 %. Chaque espèce animale a exprimée au moins l'un des trois variants antigéniques, à savoir LiTat 1.3, LiTat 1.5 et LiTat 1.6. Spécifique aux infections à *T. b. brucei*, le LiTat 1.6, a été le variant le plus exprimé chez toutes les espèces animales. Par contre, le LiTat 1.5 a été le variant, le moins exprimé.

Les porcs et les bovins ont été positifs aux trois variants antigéniques de la trypanolyse, avec plus de cas positifs observés chez les porcs. Aucun cas positif, ni au LiTat 1.3, ni au LiTat 1.5 (variants spécifiques de *T. b. gambiense*) n'a été observé chez les ovins et les caprins (Figure 21). Seuls quelques cas positifs au LiTat 1.3 et au LiTat 1.5 ont été enregistrés dans le foyer de Bonon chez les bovins (Figures 22-a et b). Bien que le LiTat 1.6 soit le variant antigénique le plus exprimé, aucun caprin provenant du foyer de Bonon n'a été positif à ce variant (Figure 22-c). Les prévalences de 27,27 % et de 15,58 % respectivement pour le LiTat 1.3 et LiTat 1.5, enregistrées chez les porcs du foyer de Bonon ne sont pas significativement différentes (LiTat 1.3 : $p = 0,937$ et LiTat 1.5 : $p = 0,669$) de celles de 26,67 % et 18,33 % obtenues dans le foyer de Sinfra. Cependant, avec le variant LiTat 1.6, la prévalence de 36,36 % obtenue chez les porcs de Bonon est significativement différente ($p = 0,047$) de celle de 53,33 % enregistrée à Sinfra. La prévalence chez les bovins testés positifs à la trypanolyse LiTat 1.6 est de 40 % pour le foyer de Bonon et de 5,77 % pour Sinfra. Ces prévalences varient significativement ($p = 0,0001$) entre ces deux foyers.

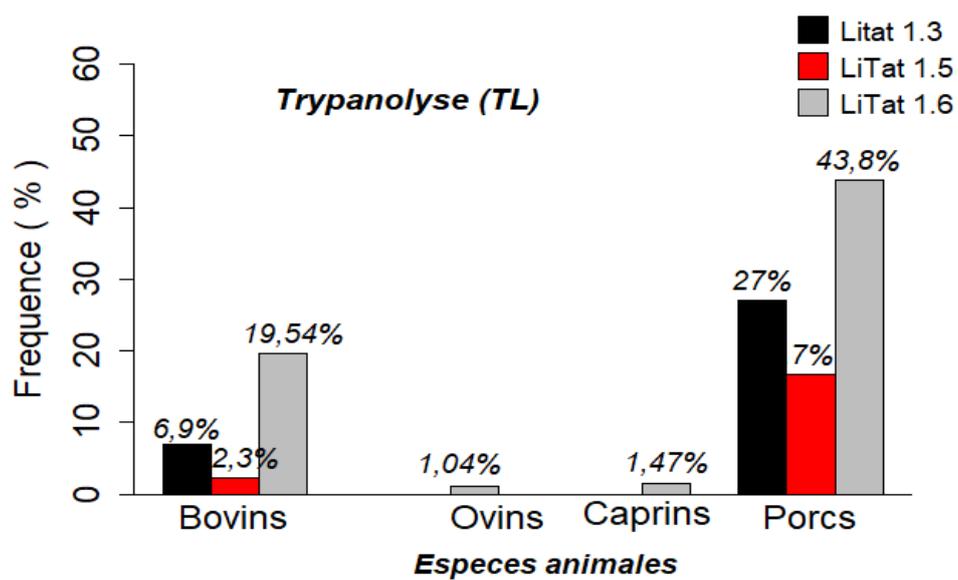


Figure 21 : Proportion d'animaux testés positifs aux trois variants antigéniques de la trypanolyse

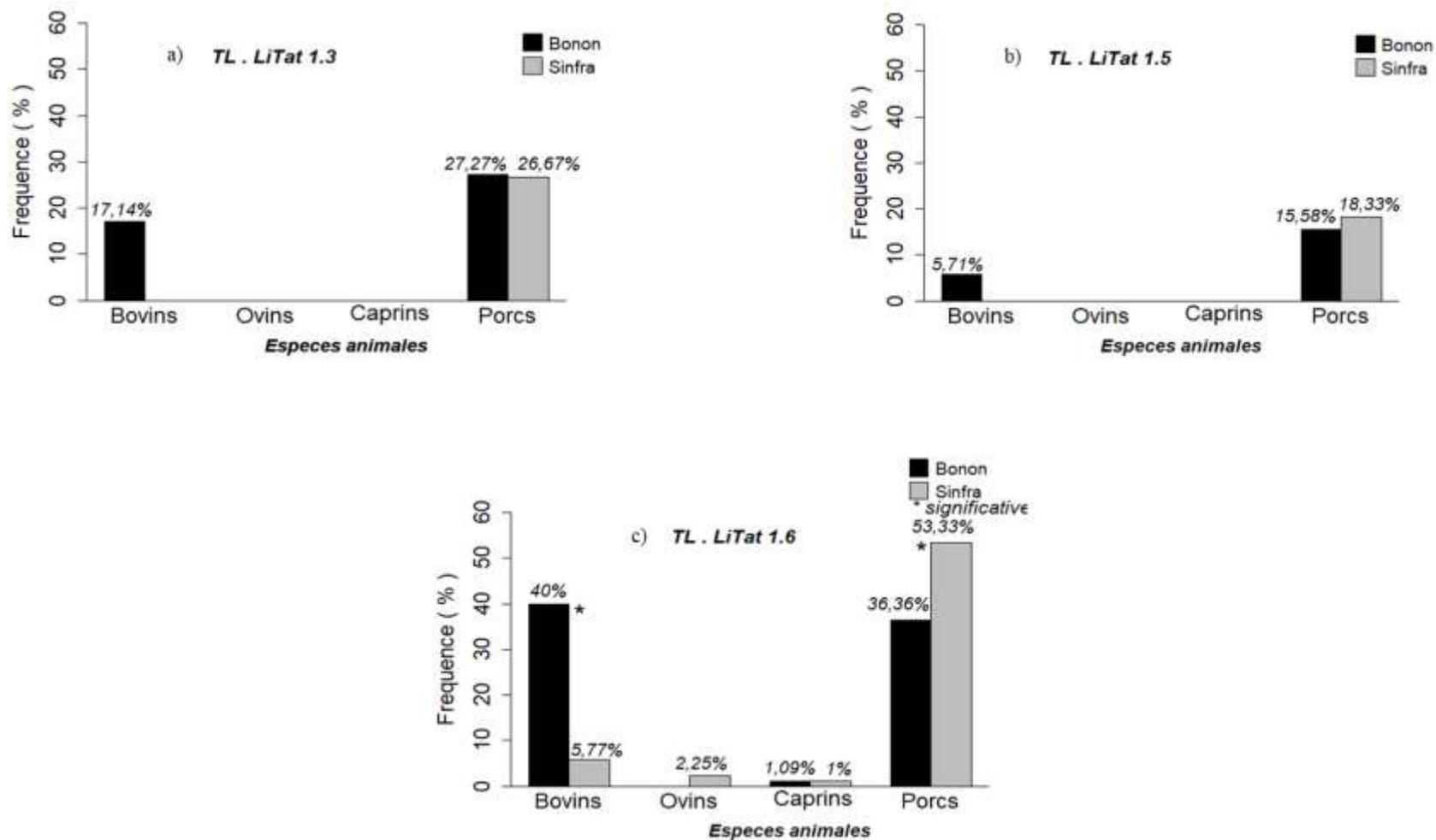


Figure 22 : Proportion d’animaux testés positifs aux variants LiTat1.3 (a), LiTat1.5 (b) et LiTat1.6 (c) par foyer

3.1.2. Enquête de 2015

3.1.2.1. Diagnostic parasitologique

Les données de l'observation microscopique des trypanosomes sont présentées par les tableaux IX et X. Les analyses ont révélé la présence de trypanosomes chez 49 animaux domestiques sur les 626 échantillonnés, donnant une prévalence parasitologique globale de 7,83 %. Toutes les espèces animales ont été infectées par les trypanosomes. Parmi celles-ci, les porcs ont été significativement les plus infectés ($p < 0,001$) avec une prévalence de 17,07 %, suivis des bovins chez lesquels la prévalence a été de 6,25 %. Les caprins et les ovins ont été les moins infectés avec des prévalences de 0,67% par espèce.

La distribution du nombre total d'animaux domestiques infectés par foyer a révélé une différence significative ($p = 0,03$) entre les foyers de Bonon et Sinfra. La prévalence de 9,78 % des animaux infectés dans le foyer de Bonon a été plus élevée que celle de 5,31 % enregistrée à Sinfra. La comparaison de la prévalence parasitologique entre les porcs des deux foyers a montré une différence significative ($p = 0,013$). Aucune différence significative ($p = 0,686$) n'a été observée entre les prévalences parasitologiques chez les bovins dans les deux foyers.

Tableau IX : Prévalence parasitologique des trypanosomes détectés chez les espèces animales

Espèce animale	N	Nbre d'animaux infectés (%)	X^2	P
Bovin	80	5 (6,25)		
Caprin	150	1 (0,67)	33,08	< 0,001
Ovin	150	1 (0,67)		
Porcin	246	42 (17,07)		
Total	626	49 (7,83)		

N = effectif d'animaux testés, Nbre = nombre, X^2 : test chi-carré, P = valeur de la probabilité.

Tableau X : Prévalence parasitologique des trypanosomes détectés chez les espèces animales dans chaque foyer d'étude

Espèce animale	Foyer	N	Nbre d'animaux infectés (%)	<i>P</i>
Bovin	Sinfra	39	2 (5,13)	0,686
	Bonon	41	3 (7,32)	
Caprin	Sinfra	59	0 (0)	1
	Bonon	91	1(1,09)	
Ovin	Sinfra	50	0 (0)	1
	Bonon	100	1 (1)	
Porc	Sinfra	110	11 (10)	0,013
	Bonon	136	31 (22,8)	
Total		626	49 (7,83)	

N = effectif d'animaux testés, probabilités (*P*) significatives (< 0,05) sont indiquées en gras

3.1.2.2. Diagnostic moléculaire des trypanosomes

Au total, 626 animaux domestiques dont 80 bovins (12,78 %), 150 ovins (23,96 %), 150 caprins (23,96 %) et 246 porcs (39,30 %) ont été testés durant l'enquête de 2015.

La PCR mono-spécifique effectuée sur l'ensemble des 626 animaux domestiques, a permis de détecter des infections à *T. congolense* type forêt, *T. brucei* s.l. et *T. vivax*. . La prévalence globale d'infection aux trypanosomes est 19,33 % soit 121 animaux infectés. L'espèce *T. brucei* s.l. a été la plus infectante chez tous les groupes d'animaux.

La prévalence de l'infection à *T. brucei* s.l. a été de 17,57 % contre 7,67 % et 0,96 % respectivement pour *T. congolense* type forêt et *T. vivax*. Sur les quatre espèces animales examinées, les porcs ont constitué l'espèce la plus infectée par *T. brucei* s.l., soit 33,33 % ($p < 0,001$) suivis des bovins avec une prévalence de 10 %. Bien qu'étant l'espèce animale majoritairement infectée, aucune infection due à *T. vivax* n'a été détectée chez les porcs et

l'espèce *T. congolense* type savane n'a été détectée chez aucun des animaux domestiques testés (Tableau XI).

La répartition des infections à *T. brucei* s.l. a montré que les porcs et les ovins de Sinfra avec des prévalences respectives de 39,10 % et 8 % ont été plus infectés que ceux de Bonon avec 28,68 % et 4 %. Contrairement à ces résultats, les bovins et caprins de Bonon avec 14,63 % et 9,89 % ont été plus infectés que ceux de Sinfra, soit 5,13 % et 5,08 % respectivement. Aucune différence significative d'infection à *T. brucei* s.l. n'a été observée entre les deux foyers pour chaque groupe d'animaux (porcs : $p = 0,085$; bovins : $p = 0,297$; ovins : $p = 0,521$ et caprins : $p = 0,452$). Aucune infection à *T. congolense* type forêt n'a été observée chez les bovins examinés à foyer de Sinfra. Chez chaque espèce animale, les prévalences d'infection à *T. congolense* type forêt ne diffèrent pas significativement entre les foyers (porcs : $p = 0,098$; ovins : $p = 0,429$ et caprins : $p = 0,274$). Aucune infection à *T. vivax* n'a été observée chez les bovins et ovins du foyer de Sinfra et chez les caprins de Bonon (Tableau XII).

Tableau XI : Prévalence des espèces de trypanosomes identifiées chez les animaux domestiques

Espèce animale	Nombre d'animaux infectés (%)				Total
	N	TBR	TCF	TVW	
Bovin	80	8 (10)	3 (3,75)	3 (3,75)	
Ovin	150	8 (5,33)	6 (4)	2 (1,33)	
Caprin	150	12 (8)	3 (2)	1(0,67)	
Porc	246	82 (33,33)	36 (14,63)	0 (0)	
Total	626	110 (17,57)	48 (7,67)	6 (0,96)	121 (19,33)
X^2		70,36	28,25	9,30	
P		< 0,001	< 0,001	0,026	

N = effectif d'animaux testés, TBR : *Trypanosoma brucei.sl* ; TCF : *Trypanosoma congolense* type forêt; TVW : *Trypanosoma vivax* ; Prév = prévalence, X^2 : test chi-carré, p significatif ($< 0,05$) indiqué en gras.

Tableau XII : Prévalence des espèces de trypanosomes identifiées chez les animaux domestiques dans chaque foyer d'étude

Espèce animale	Foyer	N	Nombre d'animaux infectés (%)			<i>P</i>	
			TBR	TCF	TVW	TBR	TCF
Bovin	Sinfra	39	2 (5,13)	0(0)	0(0)	0,297	/
	Bonon	41	6 (14,63)	3 (7,32)	3 (7,32)		
Caprin	Sinfra	59	3 (5,08)	1 (1,69)	1 (1,69)	0,452	1
	Bonon	91	9 (9,89)	2 (2,20)	0(0)		
Ovin	Sinfra	50	4 (8)	2 (4)	0(0)	0,521	1
	Bonon	100	4 (4)	4 (4)	2 (2)		
Porc	Sinfra	110	43 (39,10)	12 (10,91)	0(0)	0,085	0,137
	Bonon	136	39 (28,68)	24 (17,65)	0(0)		
Total		626	110 (17,57)	48 (7,67)	6 (0,96)		
<i>X</i>			70,36	28,25	9,30		
<i>P</i>			< 0,001	< 0,001	0,026		

N = effectif d'animaux testés, TBR : *Trypanosoma brucei.sl* ; TCF : *Trypanosoma congolense* type forêt; TVW : *Trypanosoma vivax*, *P* = valeur de la probabilité

3.1.2.3. Trypanolyse

Le test de la trypanolyse effectué sur les 626 animaux domestiques a montré que chaque espèce animale a été en contact avec l'espèce *T. brucei* s.l. La prévalence globale d'animaux positifs à ce test a été de 18,85 %. Dans l'ensemble, le variant LiTat 1.6 (exprimé par *T. b. brucei*) avec une prévalence de 18,53 % a été le plus représenté chez toutes les espèces animales, suivi du variant LiTat 1.5 dont la prévalence a été de 6,71 %.

Les porcs ont été significativement positifs aux trois variants antigéniques ($p < 0,001$). Aucun bovin, ni ovin, ni caprin n'a été testé positif à la trypanolyse LiTat 1.3 (Figure 23).

Les résultats des différents variants de la trypanolyse ont montré que dans le foyer de Bonon, aucun caprin n'a été testé positif à *T. brucei* s.l. Le variant antigénique LiTat 1.3 et LiTat 1.5, avec des prévalences respectives de 4,55 % et 18,18 % ont été plus exprimés chez les porcs du foyer de Sinfra que chez ceux du foyer de Bonon avec 2,21 % et 11,03 % respectivement. (Figures 24-a et b). La différence de prévalence de trypanolyse positive par espèce animale a été statistiquement significative entre les deux foyers ($p < 0,001$). Seuls quelques cas positifs au LiTat 1.5 ont été observés chez les bovins du foyer de Sinfra. Bien que le LiTat 1.6 soit le variant le plus exprimé, aucun caprin du foyer de Bonon n'a été positif avec ce variant.

La prévalence chez les porcs testés positifs à la trypanolyse LiTat 1.3 ($p = 0,505$) et LiTat 1.5 ($p = 0,110$) ne diffère pas significativement entre les foyers de Sinfra et de Bonon, contrairement à la prévalence au LiTat 1.6 ($p = 0,0001$). De même, les prévalences chez les bovins ($p = 0,627$) et chez les ovins ($p = 1$) testés positifs à la trypanolyse LiTat 1.6 ne diffèrent pas significativement entre les deux foyers (Figure 24-c).

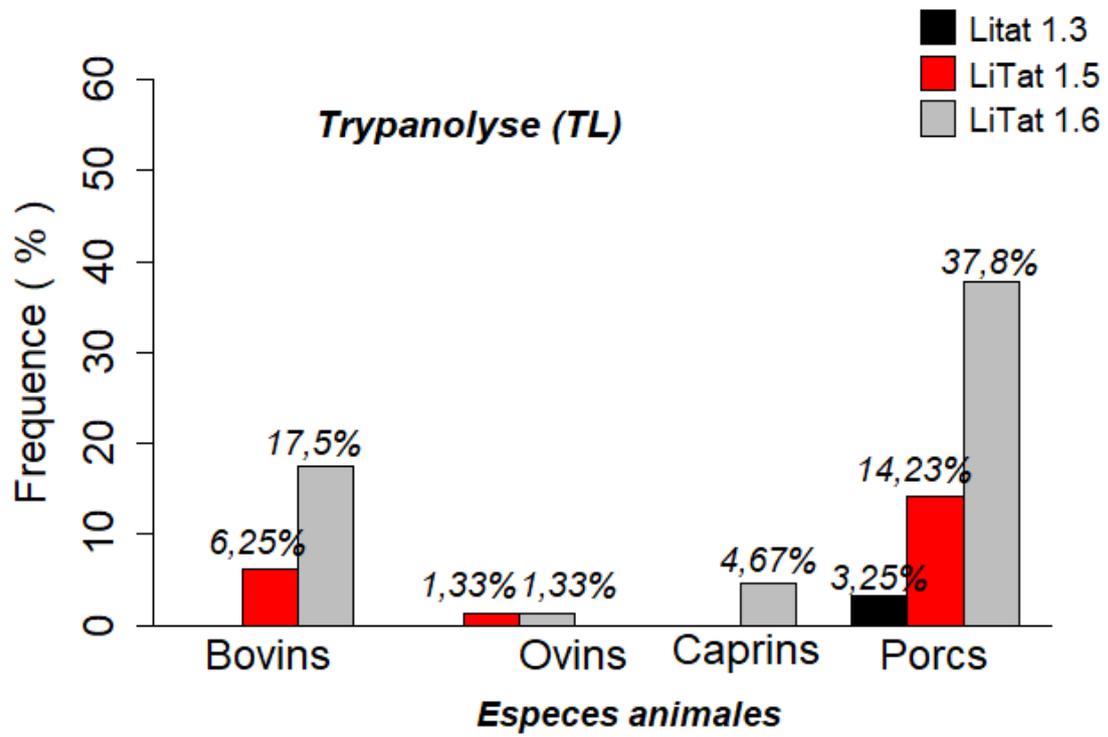


Figure 23 : Proportion d’animaux testés positifs aux trois variants antigéniques de la trypanolyse

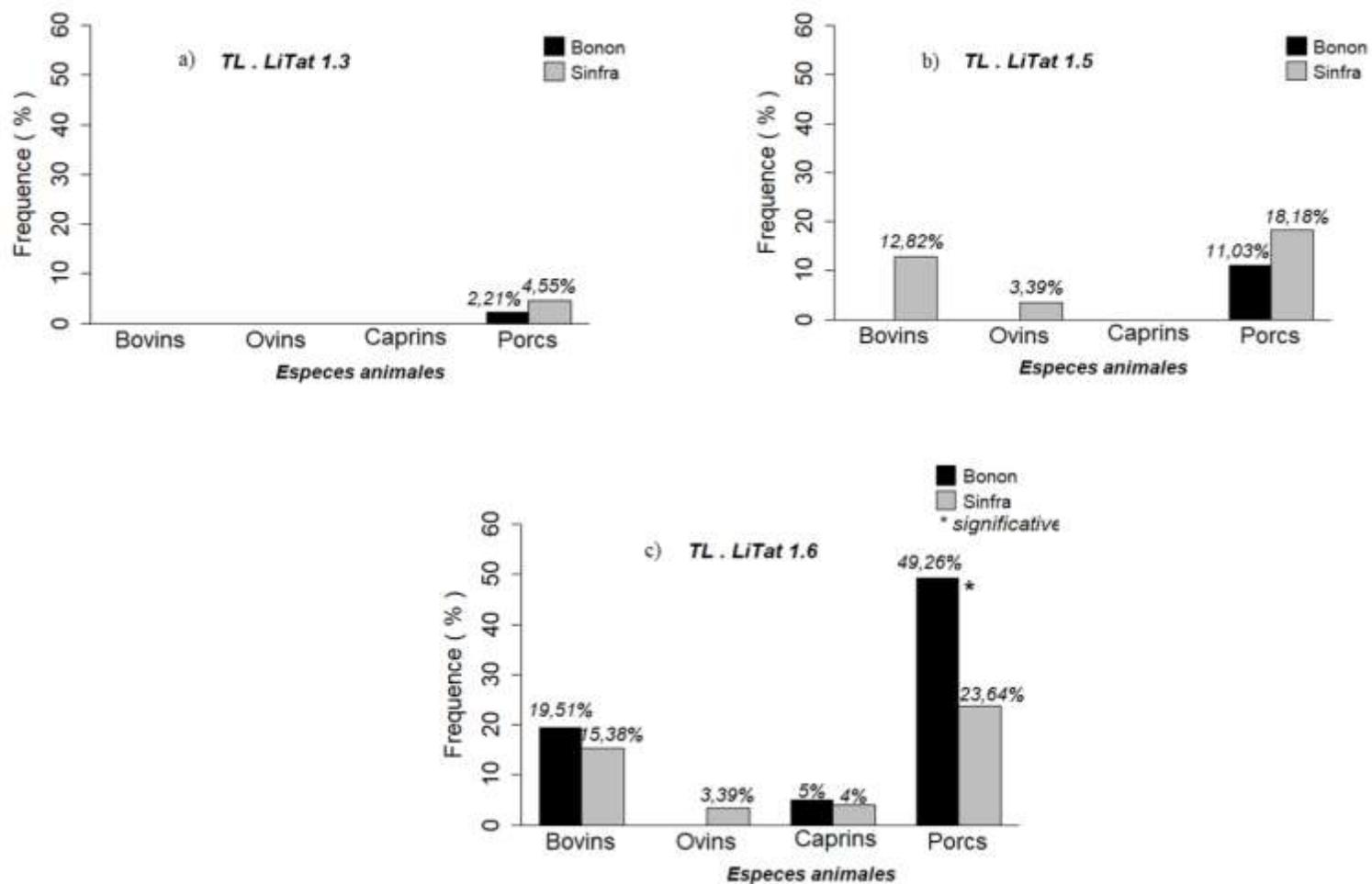


Figure 24 : Proportion d’animaux testés positifs aux variants LiTat1.3 (a), LiTat1.5 (b) et LiTat1.6 (c) par foyer

3.1.3. Comparaison des prévalences d'infection des enquêtes de 2013 et 2015

3.1.3.1. Parasitologie

En 2013, la prévalence globale de 10,33 % révélée par les techniques parasitologiques est nettement supérieure à celle de 7,83 % obtenue durant l'enquête de 2015. Toutefois ces prévalences obtenues au cours de ces deux périodes d'enquête ne sont pas significativement différentes ($p = 0,135$).

Les analyses parasitologiques ont montré que les porcs avec une prévalence de 29,93 %, les ovins avec 4,69 % et les caprins avec 1,47 % ont été plus infectés en 2013 par rapport en 2015 où des prévalences de 17,07 %, 0,67 % et 0,67 % ont été enregistrées respectivement chez les porcs, caprins et ovins. Seule l'infection bovine est ascendante avec 5,75 % d'animaux infectés en 2013 contre 6,25 % en 2015. Les prévalences d'infections observées chez les bovins ($p = 0,891$) et les caprins ($p = 0,606$) ne sont pas différentes significativement entre les deux enquêtes. Cependant, les prévalences observées chez les porcs ($p = 0,003$) et chez les ovins ($p = 0,047$) sont significativement différentes entre les deux périodes (Tableau XIII).

Tableau XIII : Prévalence parasitologique des trypanosomes détectés chez les espèces animales testés pendant les enquêtes de 2013 et 2015

Espèce animale	Enquête de 2013			Enquête de 2015			X^2	P
	N	Infectés	Prév (%)	N	Infectés	Prév (%)		
Bovins	87	5	5,75	80	5	6,25	0,02	0,891
Ovins	192	9	4,69	150	1	0,67	/	0,047
Caprins	136	2	1,47	150	1	0,67	/	0,606
Porcs	137	41	29,93	246	42	17,07	8,56	0,003
Total	552	57	10,33	626	49	7,83	2,24	0,135

N = Effectif d'animaux examinés, Prév (%) : Prévalence d'animaux infectés, X^2 : test chi-carré, Les p ($P =$ valeur de la probabilité) significatifs ($< 0,05$) sont indiqués en gras.

3.1.3.2. Diagnostic moléculaire des trypanosomes

Les infections à *T. brucei* s.l. observées chez les animaux domestiques testés en 2013 et 2015 n'ont révélées aucune différence significative ($p = 0,074$). Toutefois, la prévalence de 17,57 % obtenue en 2015 a été plus élevée que celle de 13,77 % enregistrée en 2013. En 2013, 8,51 % des animaux ont infectés à *T. congolense* alors que 7,67 % d'infection due à cette espèce ont été décelées en 2015. Concernant *T. vivax*, une prévalence de 2,36 % a été obtenue en 2013 alors cette prévalence a été de 0,96 % en 2015. Les infections à *T. vivax* ($p = 0,058$) et à *T. congolense* type forêt ($p = 0,594$) observées chez les animaux domestiques testés ne présentent pas des différences significatives entre les deux enquêtes. (Tableau XIV).

Les analyses par espèce animale ont montré que les porcs avec 36,50 % et les bovins avec 17,24 % ont été plus infectés par *T. brucei* s.l. pendant l'enquête de 2013 par rapport à celle de 2015 durant laquelle des prévalences respectives de 33,33 % et 10 % ont été obtenues. Néanmoins, les prévalences de l'infection à *T. brucei* s.l. observées au niveau des porcs ($p = 0,5324$) et au niveau des bovins ($p = 0,175$) n'ont révélée aucune différence significative entre les deux enquêtes (Tableau XIV).

Tableau XIV : Prévalence des espèces de trypanosomes identifiées chez les animaux domestiques testés pendant les enquêtes de 2013 et 2015

Espèce	Nombre d'animaux positifs (%)										
	Enquête de 2013				Enquête de 2015				<i>P</i>		
	N	TBR	TCF (%)	TVW	N	TBR	TCF	TVW	TBR	TCF	TVW
Bovin	87	15 (16,09)	9 (10,34)	3 (3,45)	80	8 (10)	3 (3,75)	3 (3,75)	0,175	0,001	1
Ovin	192	8 (4,17)	9 (4,69)	9(4,69)	150	8 (5,33)	6 (4)	2 (1,33)	0,612	0,758	0,151
Caprin	136	3 (2,21)	5 (3,68)	1 (0,73)	150	12(8)	3 (2)	1(0,67)	0,028	0,617	1
Porc	137	50 (36,50)	24 (17,52)	0(0)	246	82 (33,33)	36 (14,63)	0 (0)	0,532	0,457	/
Total	552	76 (13,77)	47 (8,51)	13 (2,36)	626	110 (17,57)	48 (7,67)	6 (0,96)	0,074	0,5943	0,058

N = Effectif d'animaux examinés, TBR : *Trypanosoma brucei* s.l., TCF : *T. congolense* type forêt, TVW : *T. vivax*, *P* = valeur de la probabilité

3.1.3.3. Trypanolyse

En 2013, 43 animaux domestiques, soit 7,80 % ont été testés positifs au LiTat 1.3 tandis que, seulement 8 animaux, soit 1,28 % ont été positifs en 2015. Cette différence observée entre les deux enquêtes est significative ($p = 0,0001$). D'ailleurs, en 2013, les porcs et les bovins ont été positifs au LiTat 1.3 alors qu'en 2015, seuls les porcs ont été testés positifs à ce variant. Concernant le LiTat 1.5, aucun cas de positivité n'a été observé chez les caprins et les ovins examinés en 2013 contrairement en 2015, seuls les ovins ont été testés négatifs au LiTat 1.5. Toutes les espèces animales ont été positives au LiTat 1.6 (Tableau XV).

Tableau XV : Prévalence d'animaux testés positifs aux variants antigéniques de la trypanolyse effectuée pendant les enquêtes de 2013 et 2015

Espèce	Nombre d'animaux positifs (%)									<i>P</i>		
	Enquête de 2013				Enquête de 2015							
	Animale	N	LiT1.3	LiT1.5	LiT1.6	N	LiT1.3	LiT1.5	LiT1.6	LiTat 1.3	LiTat 1.5	LiTat 1.6
Bovin	87	6 (6,90)	2 (2,30)	17 (19,54)	80	0 (0)	5 (6,25)	14 (17,50)	0,048	0,262	0,73	
Ovin	192	0 (0)	0 (0)	2 (1,04)	150	0 (0)	0 (0)	7 (4,67)	/	/	0,046	
Caprin	136	0 (0)	0 (0)	2 (1,47)	150	0 (0)	1 (0,67)	1 (0,67)	/	1	0,606	
Porc	137	37 (27)	23 (16,79)	60 (43,80)	246	8 (3,25)	36 (14,63)	94 (38,21)	0,001	0,576	0,285	
Total	552	43 (7,80)	25 (4,53)	81 (14,67)	626	8 (1,28)	42 (6,71)	116 (18,5)	0,001	0,107	0,077	

N = Effectif d'animaux examinés, LiT 1.3 (LiTat 1.3), LiT 1.5 (LiTat 1.5) et LiT 1.6 (LiTat 1.6) : Variants antigéniques de la trypanolyse, probabilités (*P*) significatives (< 0,05) sont indiquées en gras.

Conclusion partielle

L'infection aux trypanosomes est importante chez les animaux domestiques, notamment les bovins, caprins, ovins et porcs investigués dans le Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire. Les différentes espèces de trypanosomes dont *Trypanosoma brucei* s.l., *Trypanosoma congolense* forêt et *Trypanosoma vivax* ont été identifiées chez chaque espèce animale échantillonnée dans les foyers de Bonon et Sinfra au Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire. L'espèce *T. brucei* s.l. à laquelle appartient la sous-espèce pathogène pour l'homme a été la plus abondante chez tous les animaux domestiques. Les porcs ont été plus infectés par *T. brucei* et seraient susceptibles d'être des réservoirs de *Trypanosoma brucei gambiense*, contribuant ainsi au maintien de l'endémie dans les foyers du Centre-Ouest. Les analyses parasitologiques effectuées ont révélé une baisse globale de l'infection aux trypanosomes de 2013 à 2015. Cette baisse de l'infection a été observée chez les porcs, ovins et caprins. Seule l'infection bovine est ascendante. La technique PCR a révélé une baisse de l'infection à *T. brucei* s.l. de 2013 à 2015 au niveau des porcs et des bovins. La trypanolyse a révélé une importante baisse du contact porc et *T. b. gambiense* de 2013 à 2015.

3.1.4. Enquête de 2017

Cette enquête a été conduite dans le foyer endémique de Sinfra et hypo-endémique de Vavoua. En effet, les tendances générales des enquêtes de 2013 et 2015 ont montré que les porcs sont les animaux domestiques les plus infectés. Elles ont montré également que les porcs de Sinfra ont été plus infectés par *T. brucei* s.l. que ceux de Bonon. Cette dernière enquête s'est ainsi focalisée sur les porcs dans les foyers de Sinfra et Vavoua. L'enquête dans le foyer hypo-endémique de Vavoua a permis de comparer les prévalences d'infection aux trypanosomes entre un foyer endémique et un foyer hypo-endémique.

3.1.4.1. Diagnostic parasitologique

Au total, 60 porcs sur les 284 testés dans les foyers de Vavoua et de Sinfra ont été infectés par les trypanosomes. La prévalence parasitologique globale obtenue a été de 21,13 %. Les porcs du foyer endémique de Sinfra avec la prévalence de 22,22 % ont été plus infectés que ceux du foyer hypo-endémique de Vavoua avec 20,35 %. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les deux foyers ($p = 0,71$) (Tableau XVI).

3.1.4.2. Diagnostic moléculaire des trypanosomes

L'identification des trypanosomes par la technique PCR a révélé la présence de l'ADN de *T. congolense* type forêt, *T. brucei*.s.l. et *T. vivax* chez 127 animaux sur 284 échantillonnés, donnant une prévalence globale de 44,72 %. L'espèce *T. brucei* s.l. a été la plus infectante avec une prévalence de 27,11 %, suivie de *T. congolense* type forêt dont la prévalence a été de 20,07 %. Aucune infection à *T. congolense* type savane n'a été observée chez les porcs testés dans les deux foyers.

L'espèce *T. brucei* s.l. avec une prévalence de 47 % a été plus présente chez les porcs du foyer de Sinfra que ceux du foyer de Vavoua chez lesquels la prévalence a été de 34,13 %. *T. congolense* type forêt avec 26,50 % a été également plus infectante chez les porcs de Sinfra que ceux de Vavoua avec 15,57 %. Seuls, les animaux examinés dans le foyer de Vavoua ont présenté des infections à l'espèce *T. vivax* (Tableau XVI).

3.1.4.3. Trypanolyse

Le test de la trypanolyse effectué sur les 284 porcs a montré des cas positifs aux trois variants antigéniques : le LiTat 1.3, LiTat 1.5 et LiTat 1.6. La prévalence globale de porcs positifs à ce test a été de 24,30 %. Le variant antigénique LiTat 1.5 étant le plus exprimé avec une prévalence de 13,73% suivi du LiTat 1.6 avec 13,03 %. Le LiTat 1.3 a été le variant le moins exprimé avec une prévalence de 8,80 %.

Les résultats de la trypanolyse ont montré que les porcs du foyer hypo-endémique ont été positifs aux trois variants antigéniques avec des prévalences de 18,18 % pour le LiTat 1.3, de 23,55 % pour le LiTat 1.5 et 17,76 % pour le LiTat 1.6. Quant au foyer endémique de Sinfra, deux variants antigéniques ont été exprimés, LiTat 1.3 avec une prévalence de 6,64 % et le LiTat 1.6 avec 5,98 %.

La prévalence d'animaux testés positifs au variant antigénique LiTat 1.3 observée dans le foyer de Sinfra ne diffère pas significativement ($p = 0,328$) de celle enregistrée dans le foyer de Vavoua. Aucun cas de positif au variant LiTat 1.5 n'a été enregistré dans le foyer de Sinfra (Tableau XVI).

Tableau XVI : Prévalence des trypanosomes révélés par les différents tests de diagnostics effectués sur les porcs

Nombre de porcs testés positifs par foyer (%)								
Foyer	N	Parasitologie	PCR			Trypanolyse		
		BCT/mAECT	TBR	TVW	TCF	LiTat 1.3	LiTat 1.5	LiTat 1.6
Vavoua	167	34 (20,35)	57 (34,13)	4 (2,40)	26 (15,57)	17 (18,18)	39 (23,55)	30 (17,96)
Sinfra	117	26 (22,22)	55 (47)	0 (0)	31(26,50)	8 (6,64)	0 (0)	7 (5,98)
Total	284	60 (21,13)	77 (27,11)	4 (1,41)	57 (20,07)	25 (8,80)	39 (13,73)	37 (13,03)
X^2		0,14	4,78	/	5,12	0,96	31,67	8,72
P		0,71	0,029	0,146	0,024	0,328	< 0,001	0,003

N= Effectifs d'animaux testés, BCT : buffy-coat test ; mAECT : Technique de filtration sur mini-colonne échangeuse d'anions, TBR: *Trypanosoma brucei.sl* ; TVW : *Trypanosoma vivax* ; TCF : *Trypanosoma congolense* type forêt; T ; LiTat 1.3, LiTat 1.5 et LiTat 1.6 : Variants antigéniques de la trypanolyse ; X^2 : test chi-carré, les p significatifs ($< 0,05$) indiqué en gras, $X^2 = \text{Chi-2}$.

3.1.5. Diagnostic moléculaire de *Trypanosoma brucei gambiense*

La PCR TgsGP spécifique à *T. b. gambiense* a révélé que 8 % des souches isolées de porcs provenant du foyer hypo-endémique de Vavoua ont été positives. Une illustration d'un gel d'électrophorèse est donnée par la figure 25. Cependant, tous les ADN des échantillons biologiques (échantillons d'ADN obtenus à partir des prélèvements de sang d'animaux) positifs à la PCR spécifique à *T. brucei* s.l ont été négatifs à la PCR TgsGP (Tableau XVII). La souche de référence P26F isolée d'un porc et précédemment décrite comme *T. b. gambiense* groupe 1 infectant l'homme a été négative à la PCR TgsGP.

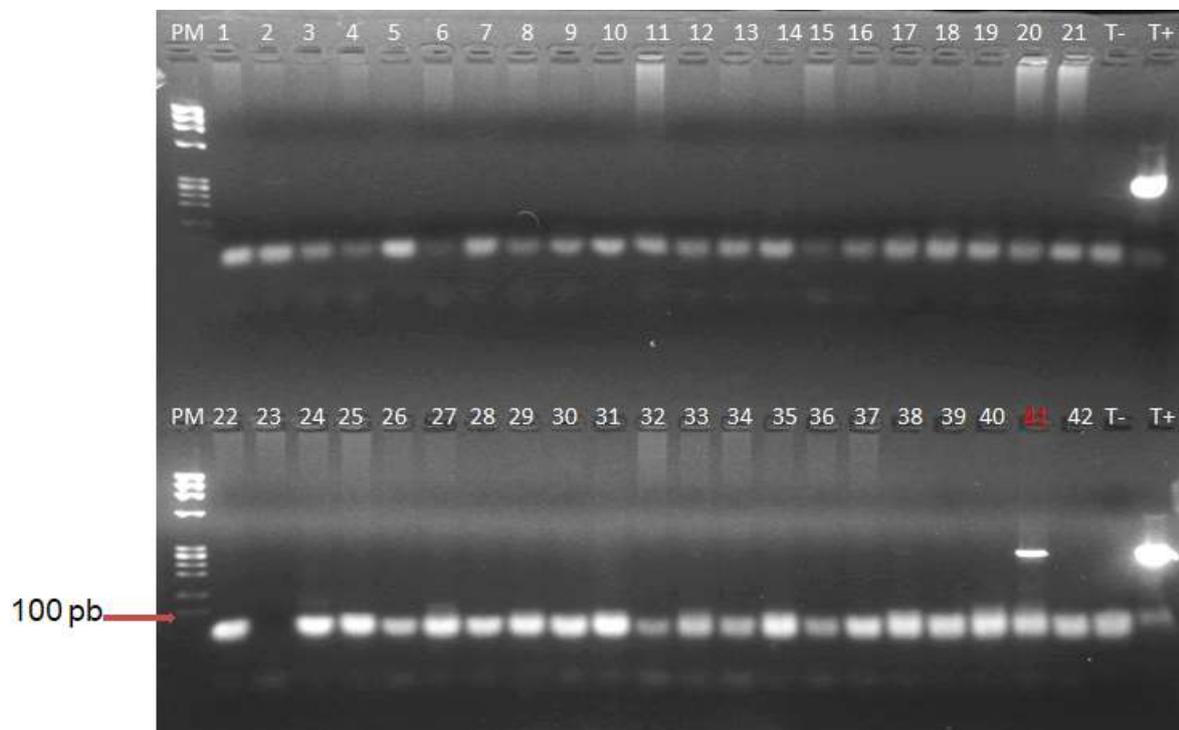


Figure 25 : Gel d'électrophorèse montrant les produits d'amplification de la PCR TgsGP

De la gauche vers la droite : PM : marqueur de poids moléculaires 100 paire de bases (100 pb), puits n° 2, 39, 40, 41 et 42 =ADN des souches isolées ; puits n° 1, 3, 4 à 38 = ADN des échantillons biologiques ; T- = témoin négatif PCR ; T+ = témoin positif PCR (B4F303 à 10ng/μL) ; Taille théorique TgsGP = 310 bp ; puits n° 41 : ADN positif à la PCR TgsGP.

Tableau XVII : Résultat de la PCR spécifique à *T. b. gambiense*

		Nombre de positif (%)
Nature de l'ADN	N	PCR-TgsGP
Echantillons biologiques	88	0 (0)
Souches isolées	50	4 (8)

N : Effectif d'échantillons

Conclusion partielle

L'objectif de cette enquête était de comparer les prévalences d'infection aux trypanosomes entre un foyer endémique et un foyer hypo-endémique. Les observations microscopiques ont montré que les porcs examinés dans le foyer endémique de Sinfra ont été plus infectés que ceux du foyer hypo-endémique de Vavoua. L'analyse moléculaire a révélé une forte prévalence de l'espèce *T. brucei* s.l. chez les animaux de Sinfra que chez ceux de Vavoua.

La trypanolyse a montré que les porcs du foyer hypo-endémique de Vavoua ont été positifs aux trois variants antigéniques. La PCR TgsGP indique que les porcs sont ou ont été en contact avec *T. b. gambiense*. Ces résultats ont suggéré que la sous-espèce *T. b. gambiense* infectant l'homme circule chez ces animaux domestiques. Ceux-ci pourraient donc constituer un réservoir animal de THA.

3.2. Diversité génétique des populations de l'espèce *Trypanosoma brucei* s.l.

Les analyses de la diversité génétique du complexe *T. brucei* s.l. ont été effectuées avec 88 échantillons biologiques et 50 souches isolées positifs à la PCR spécifique à *T. brucei* s.l. Des souches de référence, au nombre de 32 ont été également utilisées pour l'étude de la diversité génétique.

3.2.1. Profils génotypiques obtenus

Le tableau XVIII donne le taux d'échantillons amplifiés par les marqueurs *T. gambiense* et *T. brucei*. Dans l'ensemble, deux types de profils génotypiques ont été obtenus pour chaque locus : les homozygotes caractérisés par deux allèles identiques et représentés un seul pic et les hétérozygotes avec deux allèles différents et caractérisés par deux pics (Figure 26).

Au total, 26 % des 50 échantillons de souches isolées ont présenté des génotypes complets à tous les loci. Aucun échantillon biologique (échantillon de sang d'animaux) n'a présenté des génotypes complets à tous les loci.

Au niveau des marqueurs de *T. gambiense*, les échantillons biologiques ont fourni beaucoup plus d'échecs d'amplification que les souches isolées. Cela se traduit par 49,11 % d'échecs pour les échantillons biologiques contre 13,21 % pour les souches isolées. De même, au niveau des marqueurs de *T. brucei*, les échantillons biologiques ont fourni beaucoup plus d'échecs d'amplification que les souches isolées. Soit 27,7 % d'échecs pour les échantillons biologiques contre 12,05 % pour les souches isolées (Tableau XVIII).

La proportion plus élevée de succès d'amplification a été obtenue avec les marqueurs de *T. brucei*. Le test de Mantel a révélé une corrélation positive et très significative ($\rho=0,23$; $p < 0,0001$) entre les matrices de distance génétique de *T. brucei* et celle de *T. gambiense*. Les marqueurs de *T. brucei* ont donné de meilleurs résultats d'amplification.

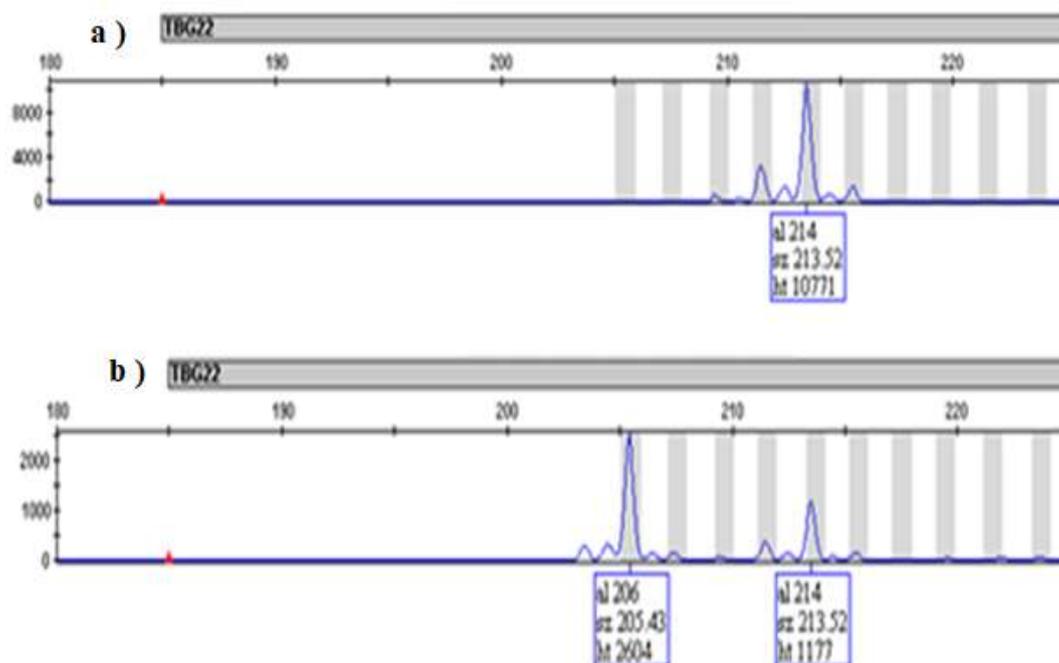


Figure 26 : Profil mono-allélique représentant un homozygote (a) et profil bi-allélique représentant un hétérozygote (b).

Tableau XVIII : Taux d'amplification obtenu avec les marqueurs *T. gambiense* et *T. brucei*

Nature échantillon	Types de marqueurs		P
	gambiense (%)	brucei (%)	
EB	Non amplifiés	605 (49,11)	< 0,001
	Amplifiés	627 (50,89)	
	Total	1232	
SI	Non amplifiées	111(13,21)	0,737
	Amplifiées	729 (86,79)	
	Total	840	

EB = échantillon biologique, SI = souches isolées, p = valeur de la probabilité (test exact de Fischer).

3.2.2. Nombre moyen d'allèles et taux de polymorphisme

Les 18 marqueurs microsatellites amplifiés ont permis d'obtenir 164 allèles pour une moyenne allélique de 9,11. Le nombre d'allèles observés à chaque locus varie entre un minimum de 3 allèles pour le locus TBG21 et un maximum de 20 pour Misatg9. Le locus le plus polymorphe est Misatg9 et le moins polymorphe est TBG21. La taille des allèles varie de 094 à 310 pb (Tableau XIX).

Le taux de polymorphisme observé est de 100 % (au seuil de 0,95) à tous les loci et dans toutes les sous-populations étudiées. La valeur moyenne de la richesse allélique est 7 pour la sous-population de Sinfra. Les valeurs moyennes obtenues pour la sous-population de Bonon et Vavoua sont 4,17 et 6,94 respectivement. Ces valeurs moyennes diffèrent significativement ($X^2 = 7,6$; $p = 0,0013$) entre les trois sous-populations (Tableau XX).

Tableau XIX : Nombre et taille des allèles obtenus avec les 18 marqueurs utilisés dans la population d'étude (Sinfra, Bonon et Vavoua)

Locus	Nombre d'allèles par locus	Taille des allèles en pb
TBG01	8	221 – 269
TBG02	5	242 – 255
TBG03	4	221 – 231
TBG04	7	294 – 310
TBG05	10	214 – 260
TBG08	13	243 – 269
TBG14	12	207 – 237
TBG15	9	216 – 246
TBG17	10	227 – 267
TBG18	6	185 – 203
TBG21	3	187 – 191
TBG22	11	206 – 228
TBG30	7	231 – 246
TBG34	9	216 – 240
Micbg5	15	94 – 156
Micgb6	10	168 – 199
Misatg4	5	147 – 163
Misatg9	20	102 – 148
Total	164	

Pb : Paire de base

Tableau XX : Nombre moyen d'allèles et taux de polymorphisme des sous-populations

Foyers	P (%)	A_m
Sinfra	100	$7 \pm 3,03$
Bonon	100	$4,17 \pm 1,62$
Vavoua	100	$6,94 \pm 2,62$
Moyenne \pm écart type	100	$6,04 \pm 1,617$

P (%) : Taux de polymorphisme, A_m = nombre moyen d'allèles.

3.2.3. Déséquilibres de liaison entre paire de loci au sein des populations

L'association non aléatoire entre différents loci a été testée dans les combinaisons cohorte/foyer et cohorte/village à partir du test de déséquilibre de liaison. Au total, 153 combinaisons possibles ($153 = 18(18-1) / 2$) ont été effectuées à partir des 18 loci.

Les résultats du test ont montré que dans la combinaison cohorte/foyer, sur les 147 associations alléliques, 96 % (147/153) de paires de loci ont été en déséquilibre de liaison au seuil de 5 %. Après la correction des valeurs des probabilités par la procédure de Benjamini et Yekutieli, 85 % (130/153) de ces paires de loci sont restés en déséquilibre de liaison. Pour la combinaison cohorte/village, la proportion de paires de loci en déséquilibre de liaison a été de 90 % (137/153) et 59 % (90/153) de ces paires de loci sont restées en déséquilibre de liaison après correction des probabilités par la procédure de Benjamini et Yekutieli (Tableau XXI). Ces résultats indiquent un déséquilibre de liaison global sur l'ensemble du génome de *T. brucei* dans les zones d'étude.

Tableau XXI : Test de déséquilibre de liaison par paires de loci

Cohorte/foyer			Cohorte/village		
Paire de loci	P	P-BY	Paire de loci	P	P-BY
TBG01 X TBG02	0,0001	0,005723136	TBG01 X TBG02	0,0001	0,005723136
TBG01 X TBG04	0,0001	0,005723136	TBG02 X TBG04	0,0001	0,005723136
TBG01 X TBG05	0,0001	0,005723136	TBG02 X TBG08	0,0001	0,005723136
TBG01 X TBG08	0,0001	0,005723136	TBG02 X TBG17	0,0001	0,005723136
TBG01 X TBG14	0,0001	0,005723136	TBG02 X MicBG5	0,0001	0,005723136
TBG01 X TBG17	0,0001	0,005723136	TBG04 X TBG08	0,0001	0,005723136
TBG01 X TBG18	0,0001	0,005723136	TBG08 X TBG30	0,0001	0,005723136
TBG01 X TBG22	0,0001	0,005723136	TBG08 X MicBG5	0,0001	0,005723136
TBG01 X TBG34	0,0001	0,005723136	TBG17 X TBG18	0,0001	0,005723136
TBG01 X MicBG5	0,0001	0,005723136	TBG18 X TBG34	0,0001	0,005723136
TBG01 X MicBG6	0,0001	0,005723136	TBG30 X TBG34	0,0001	0,005723136
TBG02 X TBG04	0,0001	0,005723136	MicBG5 X MicBG6	0,0001	0,005723136
TBG02 X TBG05	0,0001	0,005723136	MicBG5 X MisatG4	0,0001	0,005723136
TBG02 X TBG08	0,0001	0,005723136	MicBG6 X MisatG4	0,0001	0,005723136
TBG02 X TBG14	0,0001	0,005723136	MicBG6 X MisatG9	0,0001	0,005723136
TBG02 X TBG17	0,0001	0,005723136	TBG01 X TBG18	0,0002	0,008584705
TBG02 X TBG18	0,0001	0,005723136	TBG02 X TBG05	0,0002	0,008584705
TBG02 X TBG22	0,0001	0,005723136	TBG02 X TBG14	0,0002	0,008584705
TBG02 X TBG30	0,0001	0,005723136	TBG08 X TBG34	0,0002	0,008584705
TBG02 X TBG34	0,0001	0,005723136	TBG34 X MicBG5	0,0002	0,008584705
TBG02 X MicBG6	0,0001	0,005723136	TBG01 X TBG17	0,0003	0,012263864
TBG02 X MisatG4	0,0001	0,005723136	TBG14 X TBG22	0,0004	0,015608554
TBG03 X TBG04	0,0001	0,005723136	TBG05 X TBG30	0,0005	0,017169409
TBG03 X TBG08	0,0001	0,005723136	TBG22 X TBG30	0,0005	0,017169409
TBG03 X TBG30	0,0001	0,005723136	MicBG5 X MisatG9	0,0005	0,017169409
TBG03 X TBG34	0,0001	0,005723136	TBG01 X MicBG5	0,0006	0,017169409
TBG03 X MicBG5	0,0001	0,005723136	TBG02 X TBG22	0,0006	0,017169409
TBG03 X MicBG6	0,0001	0,005723136	TBG04 X MicBG5	0,0006	0,017169409
TBG04 X TBG05	0,0001	0,005723136	TBG05 X MicBG6	0,0006	0,017169409
TBG04 X TBG14	0,0001	0,005723136	TBG18 X TBG22	0,0006	0,017169409
TBG04 X TBG17	0,0001	0,005723136	TBG05 X TBG34	0,0007	0,018209979
TBG04 X TBG22	0,0001	0,005723136	TBG14 X TBG30	0,0007	0,018209979
TBG05 X TBG14	0,0001	0,005723136	TBG15 X MicBG5	0,0007	0,018209979
TBG05 X TBG17	0,0001	0,005723136	TBG02 X MicBG6	0,0008	0,019077121
TBG05 X TBG18	0,0001	0,005723136	TBG02 X MisatG4	0,0008	0,019077121
TBG05 X TBG22	0,0001	0,005723136	TBG01 X TBG04	0,0009	0,019077121
TBG05 X TBG30	0,0001	0,005723136	TBG02 X TBG03	0,0009	0,019077121
TBG05 X TBG34	0,0001	0,005723136	TBG08 X TBG14	0,0009	0,019077121
TBG05 X MicBG5	0,0001	0,005723136	TBG08 X TBG22	0,0009	0,019077121

Cohorte/foyer			Cohorte/village		
TBG05 X MicBG6	0,0001	0,005723136	TBG01 X TBG08	0,001	0,019077121
TBG05 X MisatG9	0,0001	0,005723136	TBG02 X TBG21	0,001	0,019077121
TBG08 X TBG14	0,0001	0,005723136	TBG02 X TBG30	0,001	0,019077121
TBG08 X TBG18	0,0001	0,005723136	TBG05 X MicBG5	0,001	0,019077121
TBG08 X TBG22	0,0001	0,005723136	TBG08 X TBG15	0,001	0,019077121
TBG08 X TBG30	0,0001	0,005723136	TBG15 X TBG22	0,001	0,019077121
TBG08 X MicBG5	0,0001	0,005723136	TBG01 X TBG03	0,0011	0,020091862
TBG14 X TBG18	0,0001	0,005723136	TBG03 X MicBG5	0,0011	0,020091862
TBG14 X TBG22	0,0001	0,005723136	TBG02 X TBG15	0,0012	0,020603291
TBG14 X TBG34	0,0001	0,005723136	TBG02 X TBG18	0,0012	0,020603291
TBG14 X MicBG6	0,0001	0,005723136	TBG15 X TBG30	0,0012	0,020603291
TBG17 X TBG18	0,0001	0,005723136	TBG05 X TBG17	0,0013	0,021056822
TBG17 X TBG22	0,0001	0,005723136	TBG05 X TBG18	0,0013	0,021056822
TBG17 X TBG34	0,0001	0,005723136	TBG14 X TBG34	0,0013	0,021056822
TBG17 X MicBG6	0,0001	0,005723136	TBG02 X TBG34	0,0014	0,022256641
TBG17 X MisatG4	0,0001	0,005723136	TBG01 X TBG15	0,0015	0,022591328
TBG18 X TBG22	0,0001	0,005723136	TBG03 X TBG08	0,0015	0,022591328
TBG18 X TBG34	0,0001	0,005723136	MisatG4 X MisatG9	0,0015	0,022591328
TBG18 X MicBG6	0,0001	0,005723136	TBG08 X TBG17	0,0016	0,023681944
TBG22 X TBG30	0,0001	0,005723136	TBG04 X TBG14	0,0017	0,024735589
TBG22 X TBG34	0,0001	0,005723136	TBG04 X TBG17	0,0018	0,025754114
TBG22 X MicBG6	0,0001	0,005723136	TBG17 X TBG21	0,0019	0,026307966
TBG30 X TBG34	0,0001	0,005723136	TBG17 X MisatG4	0,0019	0,026307966
TBG30 X MicBG5	0,0001	0,005723136	TBG17 X MicBG5	0,0021	0,028615682
TBG34 X MicBG5	0,0001	0,005723136	TBG01 X MisatG4	0,0022	0,029055923
TBG34 X MicBG6	0,0001	0,005723136	TBG17 X TBG34	0,0022	0,029055923
MicBG5 X MicBG6	0,0001	0,005723136	TBG04 X TBG34	0,0024	0,03057566
MicBG6 X MisatG4	0,0001	0,005723136	TBG15 X TBG17	0,0024	0,03057566
MicBG6 X MisatG9	0,0001	0,005723136	TBG04 X TBG22	0,0025	0,03057566
TBG01 X TBG30	0,0002	0,008584705	TBG08 X MisatG4	0,0025	0,03057566
TBG02 X TBG03	0,0002	0,008584705	TBG01 X TBG30	0,0026	0,03057566
TBG03 X TBG05	0,0002	0,008584705	TBG04 X TBG05	0,0026	0,03057566
TBG03 X TBG14	0,0002	0,008584705	TBG14 X TBG18	0,0026	0,03057566
TBG03 X TBG17	0,0002	0,008584705	TBG18 X TBG30	0,0026	0,03057566
TBG03 X TBG18	0,0002	0,008584705	TBG08 X TBG18	0,0027	0,031322571
TBG04 X TBG08	0,0002	0,008584705	TBG05 X TBG21	0,0029	0,033194191
TBG05 X TBG08	0,0002	0,008584705	TBG05 X MisatG9	0,0031	0,034561798
TBG05 X MisatG4	0,0002	0,008584705	TBG22 X MicBG5	0,0031	0,034561798
TBG08 X TBG34	0,0002	0,008584705	TBG04 X MisatG4	0,0033	0,036319904
TBG14 X TBG17	0,0002	0,008584705	TBG03 X TBG34	0,0034	0,03694683
TBG14 X TBG30	0,0002	0,008584705	TBG14 X MicBG5	0,0035	0,037558082
TBG17 X TBG30	0,0002	0,008584705	TBG01 X MicBG6	0,0036	0,038154242

Cohorte/foyer			Cohorte/village		
TBG21 X MisatG4	0,0002	0,008584705	TBG08 X TBG21	0,0038	0,039303467
MicBG5 X MisatG9	0,0002	0,008584705	TBG17 X TBG22	0,0038	0,039303467
TBG02 X MicBG5	0,0003	0,008584705	TBG01 X TBG14	0,0039	0,039388644
TBG03 X TBG22	0,0003	0,008584705	TBG03 X TBG30	0,0039	0,039388644
TBG08 X TBG17	0,0003	0,008584705	TBG03 X TBG21	0,0042	0,041925301
TBG14 X TBG15	0,0003	0,008584705	TBG01 X TBG22	0,0044	0,042923523
TBG22 X MicBG5	0,0003	0,008584705	TBG15 X TBG34	0,0044	0,042923523

P= p-values, p-BY = P = valeur de la probabilité après correction de Benjamini et Yekutieli

3.2.4. Déviation de la panmixie dans les foyers et les villages

La valeur moyenne du F_{IS} obtenue pour l'ensemble des foyers est -0,069 avec un intervalle de confiance (IC) à 95 % de [-0,118 - 0,02]. Le F_{IS} a été de -0,18 à 95 % de IC = [-0,251 - 0,107] pour le foyer de Vavoua et de -0,1 à 95 % de IC = [-0,171 - 0,03] pour celui de Sinfra (Figure 27). Du fait de la proportion importante de données manquantes, le F_{IS} n'a pu être calculé pour le foyer de Bonon.

La valeur moyenne du F_{IS} a été de -0,128 à 95 % de IC = [-0,175 - 0,078] pour l'ensemble des villages (Figure 28). Les valeurs négatives des F_{IS} obtenues pour les foyers et villages indiquent un excès d'hétérozygotes par rapport aux attentes de Hardy-Weinberg (écart à la panmixie). Le F_{IS} a été significativement plus élevé ($p = 0,0001$) dans les foyers que dans les villages. La variation entre les loci est très faible, malgré la petite taille des échantillons et la proportion des échecs d'amplification.

La valeur du F_{IS} a été de -0,147 à 95 % de IC = [-0,199 - 0,093] pour la Cohorte 7 (Figure 29). La valeur obtenue pour l'opération : $-F_{IS}/(1-F_{IS})$ est de 0,128 avec un intervalle de confiance à 95 % de [0,085 - 0,166]. Cette valeur n'est pas significativement différente de celle du F_{ST} qui est 0,098. De plus, la valeur -0,035 du F_{IT} n'est pas significativement différent de 0 selon l'intervalle de confiance (à 95 % de IC = [-0,081 - 0,01]). Toutes ces observations traduisent une clonalité totale dans une population fortement subdivisée. Ainsi, le nombre d'immigrants entrant dans une sous-population par génération est : $Nm = 1,5$ à 95 % de IC = [1 - 2,4].

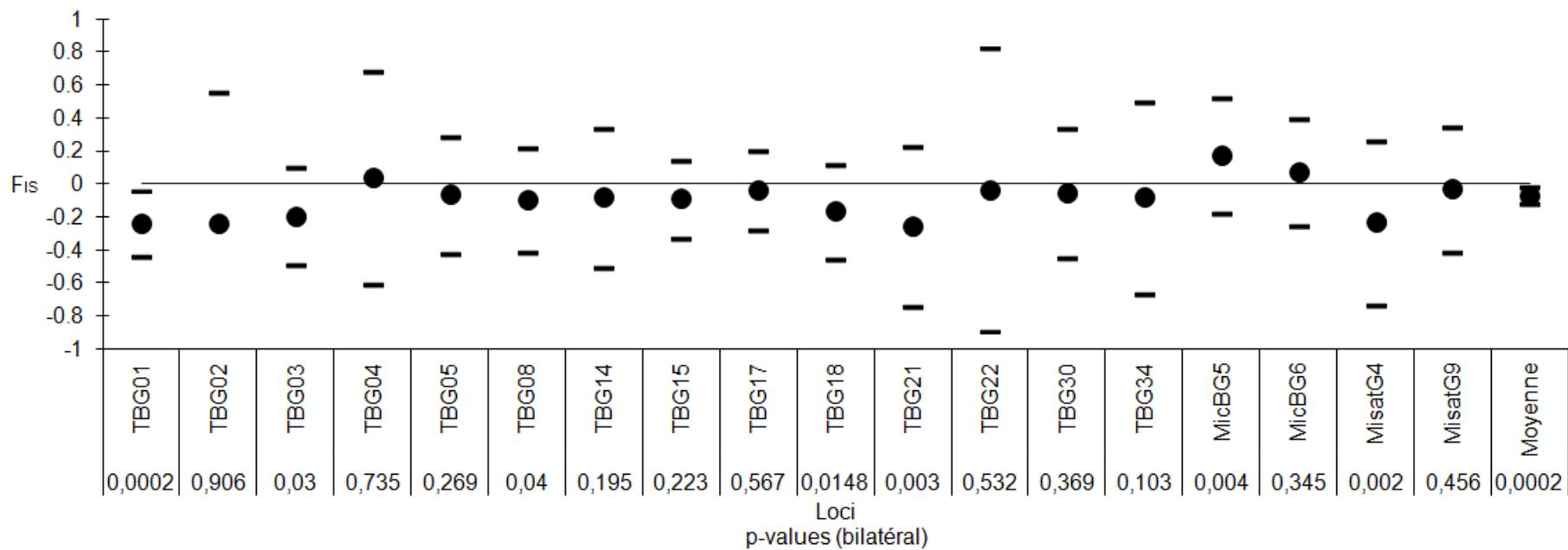


Figure 27 : Valeurs de F_{IS} par locus et sur l'ensemble des loci, intervalles de confiance (95 %) de jackknife sur les foyers (pour les loci) ou de bootstrap sur les loci (pour la moyenne globale)

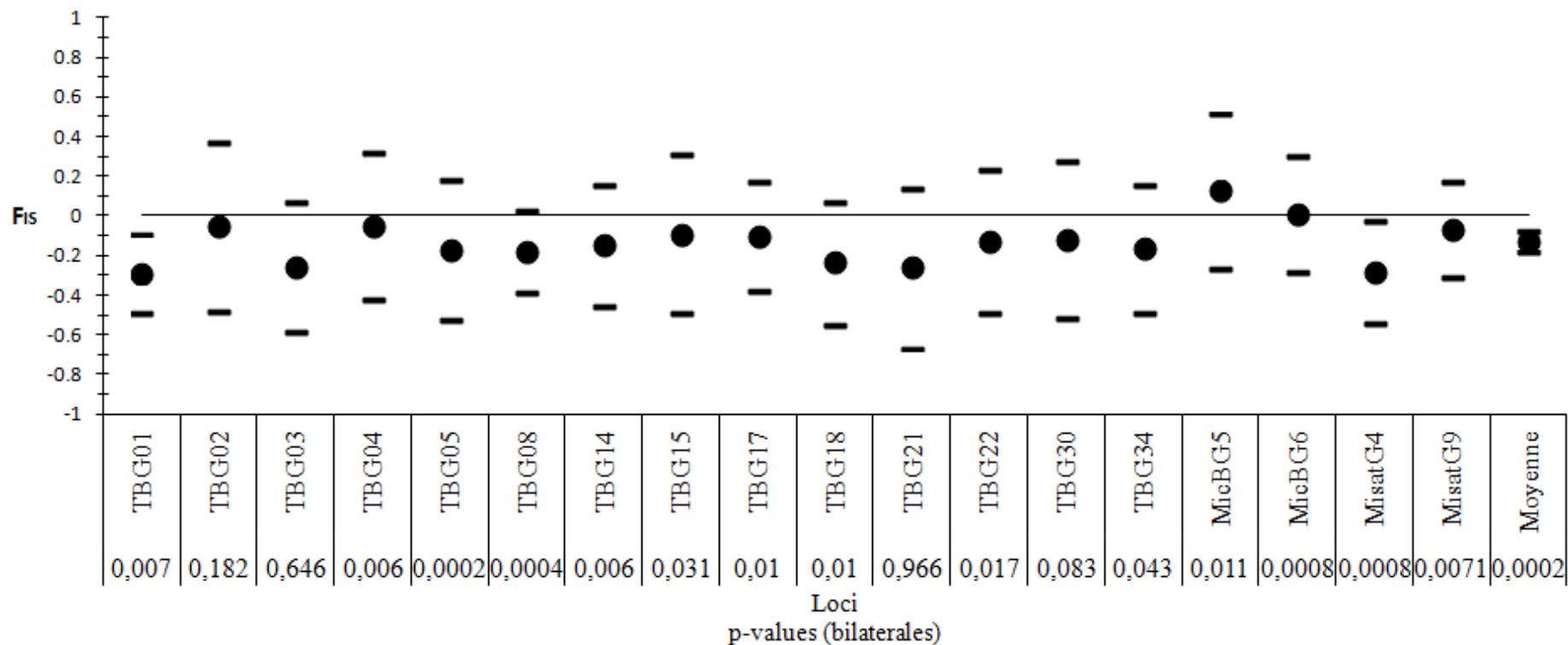


Figure 28 : Valeurs de F_{IS} par locus et sur l'ensemble des loci, intervalles de confiance (95 %) de jackknife sur les villages (pour les loci) ou de bootstrap sur les loci (pour la moyenne globale)

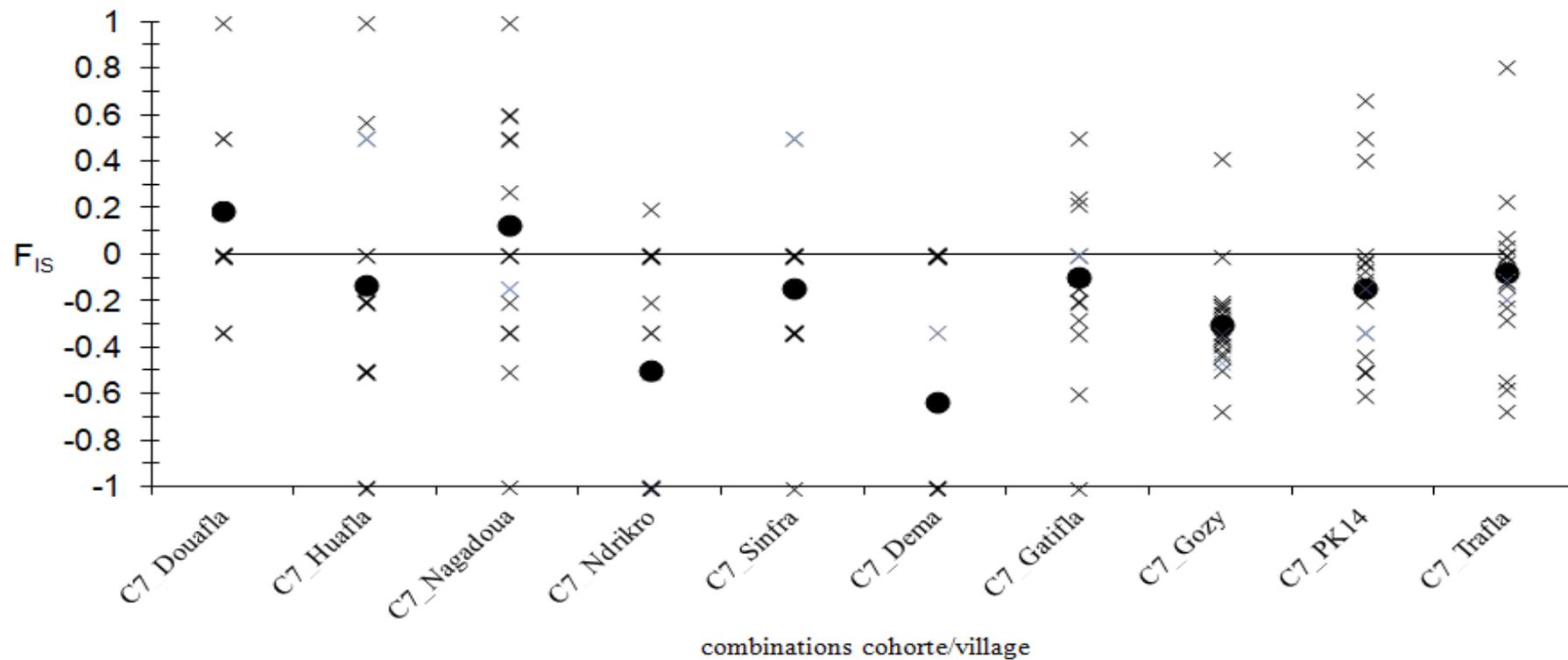


Figure 29 : Variation du F_{IS} d'un sous-échantillon à l'autre selon les combinaisons cohorte/village

Les moyennes sont en ronds pleins et les croix représentent chaque locus.

3.2.5. Isolement par la distance et subdivision

L'isolement par la distance n'est pas significatif selon la pente $b = 0,0058$ avec un intervalle de confiance à 95 % de $[-0,0103 - 0,0267]$, (figure 30). En outre, le F_{ST} moyen pour l'ensemble des paires de sous-échantillons contemporains, pour la cohorte 7 a été de 0.098 à 95 % de IC = $[0,079-0,115]$ et la subdivision est très significative ($p < 0,0001$). Il existe donc une subdivision importante, mais elle est faiblement liée à l'organisation spatiale des sites. Ceci signifie que les trypanosomes de certains sites éloignés sont génétiquement très proches et ceux provenant de certains sites géographiquement proches sont génétiquement éloignés. Le test de Mantel réalisé à partir de la matrice de distance génétique de Cavalli-Sforza et d'Edward (DCSE) a fourni une probabilité $p = 0,0019$ mais avec une pente faible $b = 0,0001$ et un coefficient de détermination $R^2 = 0,7$ indiquant une absence d'isolement par la distance.

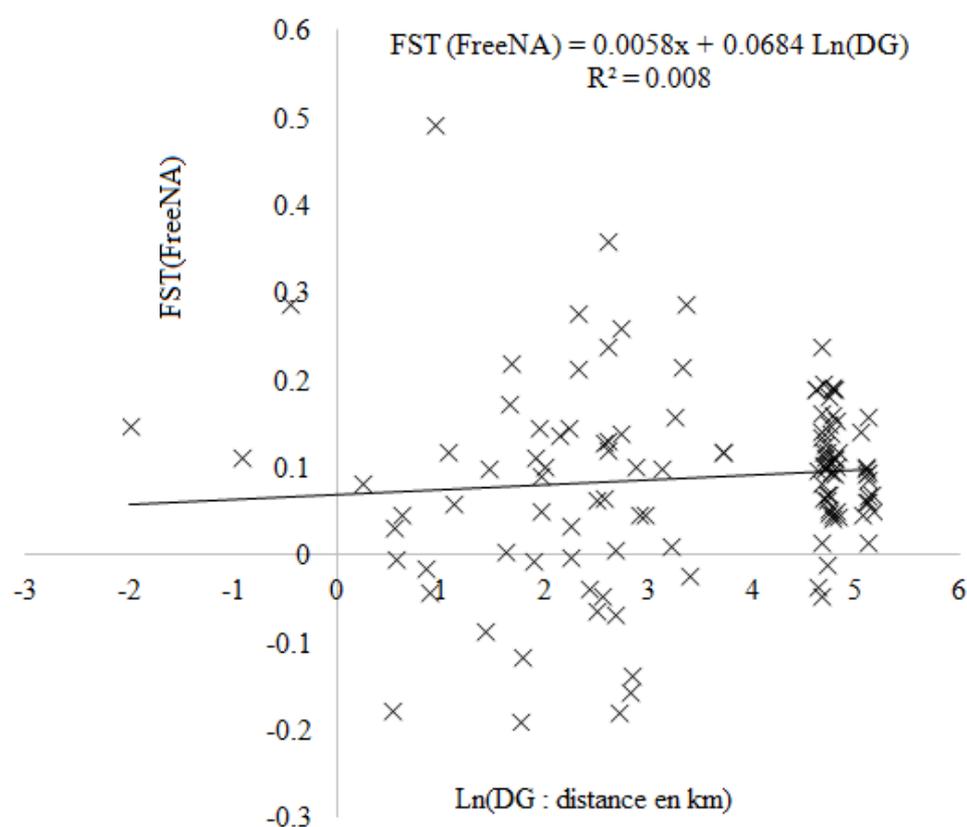


Figure 30 : Représentation de l'isolement par la distance entre les sous-échantillons Contemporains

3.2.6. Structuration génétique du complexe *Trypanosoma brucei* s.l.

L'analyse de la structuration génétique du complexe *T. brucei* s.l. a montré que les souches de référence du groupe 1 de *T. b. gambiense* pathogène pour l'homme forment un ensemble très homogène nommé groupe A (en bleu). Par contre, le groupe B formant un ensemble hétérogène est constitué de souche de référence de *T. b. brucei* en vert et de *T. b. gambiense* groupe 2 en orange et des souches isolées (en rouge) à partir des animaux domestiques. Ce groupe B comprend aussi des stocks de trypanosomes des échantillons biologiques (en noir) (Figure 31).

Le dendrogramme montre que les souches isolées positives à la PCR TgsGP spécifique à *T. b. gambiense* sont génétiquement éloignées des souches de référence du groupe 1 de *T. b. gambiense* (Figure 31).

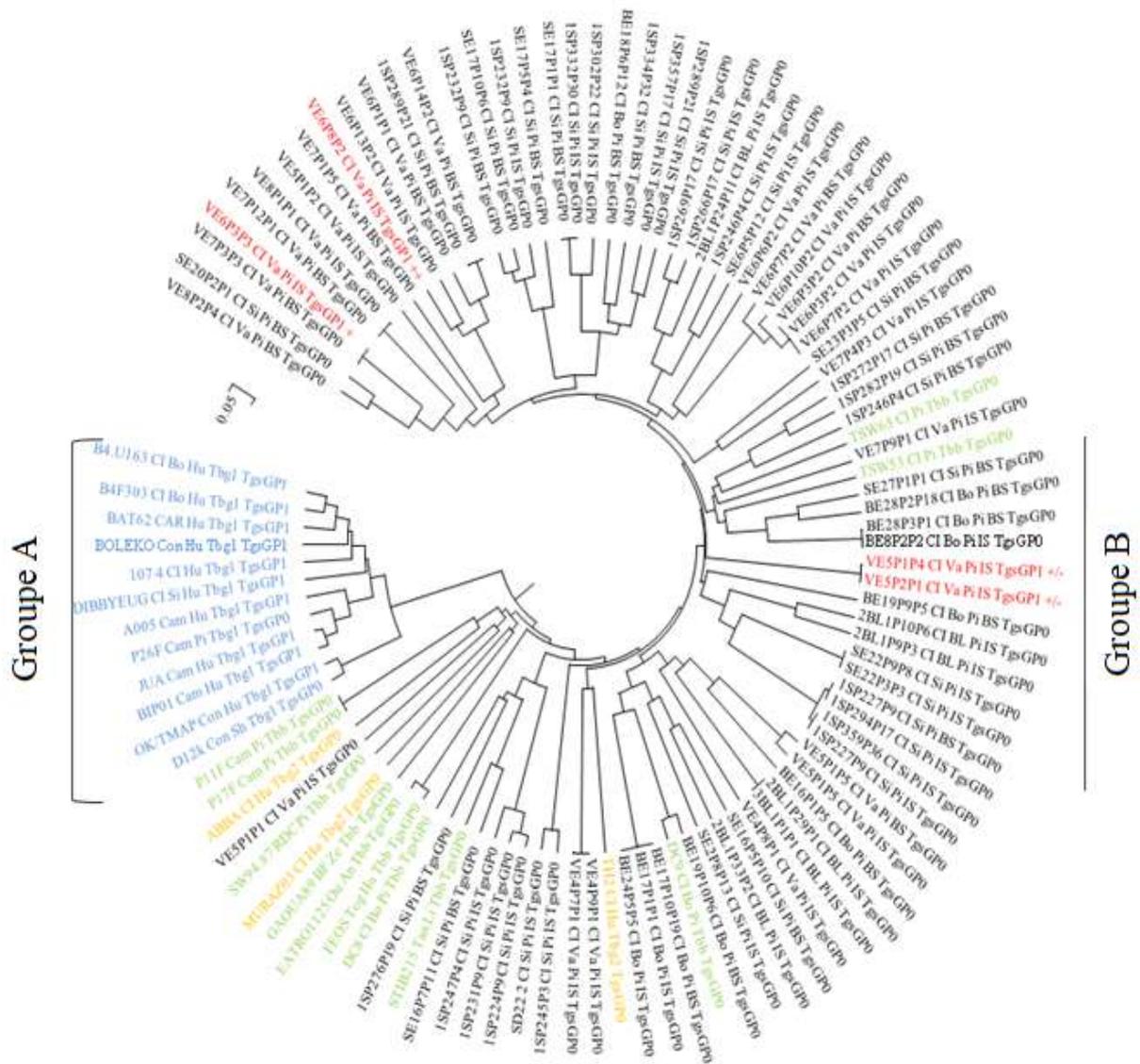


Figure 31 : Dendrogramme obtenu selon la méthode du NJTree sur la matrice de distance de Cavalli-Sforza et Edwards.

Les souches de référence de *T. b. gambiense* groupe 1 sont en bleu, *T. b. gambiense* groupe 2 en orange et *T. b. brucei* en vert. Les stocks de terrain négatifs à TgsGP sont en noir et ceux positifs en rouge, Hu = humain, Ze = zébu, An = antilope, Pi = porc, BS = échantillons biologiques, IS = échantillons isolés, ++ = fortement positif, + = positif, +/- = douteux, TgsGP1 = positif à la PCR TgsGP, TgsGP0 = négatif à la PCR TgsGP. Origine des échantillons utilisés : Cam = Cameroun, CI = Côte d'Ivoire, CAR = République centrafricaine, Con = Congo, RDC = République démocratique du Congo, Ou = Ouganda, Tan = Tanzanie, BF = Burkina-Faso, Tog = Togo, Si = Sinfra, Bo = Bonon, Va = Vavoua.

Conclusion partielle

Les analyses génétiques effectuées à l'aide des marqueurs microsatellites ont permis de mieux comprendre la distribution des génotypes du complexe *T. brucei* s.l. au sein des animaux domestiques des zones d'étude. Ces analyses ont montré une importante diversité génétique du complexe *T. brucei* s.l. circulant chez les animaux domestiques. L'analyse de l'hétérozygotie (Fis) montre qu'au sein de la population de *T. brucei* s.l., les individus sont extrêmement hétérozygotes. La présente étude confirme la reproduction clonale et la sous-structuration de *T. brucei* s.l. en fonction des sites d'études. L'étude de la structuration génétique des stocks des trypanosomes d'animaux domestiques suggère que ces trypanosomes sont génétiquement éloignés de ceux pathogènes pour l'homme.

3.3. Expérimentation animale : xénodiagnostic par mouches tsé-tsé

3.3.1. Suivi parasitologique des porcs

Les résultats des examens parasitologiques BCT/mAECT effectués sur les échantillons de sang prélevés chez les porcs ont montré pendant les suivis expérimentaux 4 et 5, aucun trypanosome n'a été détecté chez l'un des porcs infectés naturellement. Cependant, au suivi expérimental 6, les trypanosomes ont été détectés chez ce même porc à l'aide de la technique de la mAEC. Deux porcelets infectés expérimentalement ont été révélés infectés au cours de suivi 6. Le porcelet pris comme témoin a été testé négatif à l'examen parasitologique tout au long de l'expérimentation (Tableau XXII).

3.3.2. Efficacité du diagnostic des trypanosomes chez la glossine

Un total de 983 glossines a été nourri sur sept porcs durant toute l'expérimentation. Sur l'ensemble de ces glossines, 215 soit 21,87 % et 43 soit 4,37 ont été disséquées respectivement au deuxième et quinzième jour (J2 et J15) après le repas de sang. En somme, 258 glossines soit 26,25 % ont été disséquées au cours de cette expérimentation.

Aucune glossine n'a été disséquée trente jours (J30) après le repas de sang. Quarante (31,01 %), 76 (29,46 %), 58 (22,48 %) et 44 (17,05 %) glossines ont été disséquées au suivi 1, 2, 3 et au suivi 6 respectivement. Aucune mouche tsé-tsé n'a pris de repas de sang pendant les suivis 4 et 5 (Tableau XXIII).

Les résultats du xénodiagnostic ont révélé la présence de trypanosomes dans l'intestin moyen des mouches tsé-tsé disséquées deux jours après leur repas de sang sur les porcs infectés. Cette infection de l'intestin moyen a été observée à tous les suivis expérimentaux. Quinze jours après le repas de sang des glossines sur l'un porc infecté, des trypanosomes ont été détectés dans les intestins moyens analysés pendant les suivis 2 et 3. Aucun trypanosome n'a été détecté dans le proboscis et glandes salivaires des glossines. Le xénodiagnostic a révélé la présence de trypanosomes chez l'un des porcs (P5) tandis que chez ce même porc, le test parasitologique a été négatif (Tableau XXIV).

Tableau XXII : Résultats parasitologiques enregistrés pendant les différents suivis

	Périodes	Tests parasitologiques		
		ID	BCT	mAECT
Suivi 1	Février 2015	SE4P9P8 (M)*	+	/
		BE12P1P1 (F)*	+	/
Suivi 2	Avril 2015	SE4P9P8 (M) *	+	-/
		BE12P1P1 (F) *	+	-/
Suivi 3	Juin 2015	SE4P9P8 (M) *	+	-/
		BE12P1P1 (F) *	+	-/
Suivi 4	Juillet 2015	SE4P9P8 (M) *	-	-
		BE12P1P1 (F) *	+	-
		P2**	-	-
		P3**	-	-
		P4**	-	-
		P5**	-	-
		P6	-	-
Suivi 5	Octobre 2015	SE4P9P8 (M)*	-	-
		BE12P1P1 (F)*	/	/
		P2**	-	-
		P3**	-	-
		P4**	-	-
		P5**	-	-
		P6	-	-
Suivi 6	Décembre 2015	SE4P9P8 (M) *	-	+
		BE12P1P1 (F) *	/	/
		P2**	/	/
		P3**	-	-
		P4**	-	+
		P5**	-	+
		P6	-	-

ID : Identifiant animal ; P : Porcin ; / : Non réalisé; BCT : Buffy Coat technique ; mAECT : mini-Anion Exchange Centrifugation Test ; + : Positif ; M = mâle; F = femelle ; * = infection naturelle ; ** = infection expérimentale

Tableau XXIII : Infection expérimentale des glossines

Suivi	Période expérimentale	Glossines				
		Gorgées	Mortes	Disséquées		
				Jour 2	Jour 15	Effectif (%)
Suivi 1	Février 2015	240	160	80	0	80 (31,01)
Suivi 2	Avril 2015	300	224	59	17	76 (29,46)
Suivi 3	Juin 2015	199	141	44	14	58 (22,48)
Suivi 4	Août 2015	/	-	/	/	/
Suivi 5	Octobre 2015	/	-	/	/	/
Suivi 6	Décembre 2015	244	200	32	12	44 (17,05)
Total		983	725	215 (21,87 %)	43 (4,37 %)	258 (26,25)

/ = Non réalisé

Tableau XXIV : Détection des trypanosomes par examen microscopique du sang des porcs et des organes des glossines

Suivi experimental	ID	BCT/mAECT	Résultats du Xenodiagnostic					
			Jour 2			Jour 15		
			I.m	Pb	G.s	I.m	Pb	G.s
Suivi 1	SE4P9P8 (M)	+	+	-	-	/	/	/
	BE12-P1P1(F)	+	+	-	-	/	/	/
Suivi 2	SE4P9P8 (M)	+	+	-	-	-	-	-
	BE12-P1P1(F)	+	+	-	-	+	-	-
Suivi 3	SE4P9P8 (M)	+	+	-	-	-	-	-
	BE12P1P1(F)	+	+	-	-	+	-	-
Suivi 6	SE4P9P8 (M)	+	+	-	-	-	-	-
	Porcin P3	+	+	-	-	-	-	-
	Porcin P4	+	+	-	-	-	-	-
	Porcin P5	-	+	-	-	-	-	-
	Porcin P6	-	-	-	-	-	-	-

I.m : Intestin moyen, Pb : Proboscis ; G.s : Glande salivaire ; / : Non réalisé

Conclusion partielle

Dans cette étude, le xénodiagnostic a montré que les glossines peuvent s'infecter lors de leur repas sanguin sur des hôtes chez lesquels les trypanosomes restent indétectables par les techniques parasitologiques classiques. Ces hôtes peuvent être considérés comme des réservoirs de parasites. Cette expérimentation animale montre que le xénodiagnostic pourrait être d'une grande utilité pour mieux caractériser l'état parasitologique des animaux à des charges parasitaires faibles et pour évaluer leur rôle dans la transmission de la maladie du sommeil. Le risque de transmission verticale n'a donc pas été mis en évidence dans cette étude expérimentale.

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

Dans la présente étude, l'ensemble des résultats des examens parasitologiques (BCT/mAECT) ont montré que la transmission des trypanosomes est active chez les animaux domestiques (porcs, bovins, caprins et ovins) testés dans les foyers endémiques de Bonon et Sinfra et hypo-endémique de Vavoua, situés au Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Simo *et al.* (2012) dans le foyer de Fontem au Cameroun. En effet, ces auteurs ont trouvé des infections aux trypanosomes chez des animaux domestiques, notamment les caprins, les ovins et les porcs. La transmission des trypanosomes constitue en effet, un obstacle pour la production animale dans les régions agropastorales (Acapovi-Yao *et al.*, 2013 ; Koffi *et al.*, 2014). En Côte d'Ivoire, les pertes de productivité dues aux trypanosomoses sont de l'ordre de 30% (Douati *et al.*, 1986)

Les analyses de la spéciation des trypanosomes à l'aide de la technique PCR ont révélé des infections à *T. brucei* s.l., *T. congolense* type forêt et *T. vivax* chez les animaux domestiques dans les zones d'étude. Des résultats similaires ont été rapportés par Acapovi-Yao *et al.* (2016) qui ont identifié des infections à *T. brucei* s.l., *T. congolense* et *T. vivax* chez des animaux domestiques investigués dans différents départements du nord de la Côte d'Ivoire.

L'absence de l'espèce *T. congolense* type savane chez tous les animaux domestiques est relative aux zones d'études où le paysage est dominé par des forêts classées et des cultures de rente (cacao, café, hévéa etc.). En effet, *T. congolense* de type savane est présente dans le Nord de la Côte d'Ivoire qui est une zone de végétation de type savane (Koffi *et al.*, 2014). Bien que le porc soit l'espèce animale la plus infectée, aucun trypanosome de l'espèce *T. vivax* n'a été identifié chez cet animal. Ce résultat indique que dans les zones d'étude, cet hôte est réfractaire aux infections dues à cette espèce de trypanosome (Simukoko *et al.*, 2007).

L'analyse moléculaire (PCR) effectuée dans la présente étude a été décrite par plusieurs auteurs comme la technique la plus sensible pour le diagnostic et l'identification des trypanosomes (Solano *et al.*, 1997 ; Chappuis *et al.*, 2005 ; Koffi *et al.*, 2006 ; Simukoko *et al.*, 2007). Cette technique de diagnostic serait capable de détecter des infections précoces dues aux trypanosomes comme l'attestent les résultats des travaux de Solano *et al.* (1997) et ceux de Chappuis *et al.* (2005). Ces auteurs ont indiqué que cette méthode est considérée comme très fiable en termes de sensibilité et de spécificité dans le diagnostic et l'identification des

trypanosomes. De plus, elle constitue une alternative pour mettre en évidence la présence directe de l'ADN du parasite chez l'hôte lorsque les méthodes parasitologiques classiques s'avèrent insuffisamment sensibles (Simo *et al.*, 2000). Plus sensible que les tests parasitologiques classiques, la technique PCR révèle l'estimation réelle des infections trypanosomiennes même si ces résultats restent à posteriori car émanant de tests non applicables en routine. La faible sensibilité de la technique parasitologique comparée à la PCR mono-spécifique serait liée à plusieurs facteurs : Il y a d'abord la charge parasitaire de l'animal infecté. En effet, lorsque les parasitémies dans le sang sont faibles et largement inférieures au seuil de détection des techniques parasitologiques BCT/mAECT, les trypanosomes échappent à des observations microscopiques. Ces techniques parasitologiques seraient donc adaptées pour un diagnostic rapide de routine pour des animaux fortement infectés par les trypanosomes (Uilenberg, 1998) mais sous-estimeraient la réelle prévalence d'infection. A cet effet, les travaux de Simukoko *et al.* (2007) ont montré qu'une proportion non négligeable de bovins (20 %), de porcs (3,3 %) et de caprins (5,6 %) négatifs à l'examen parasitologique se sont révélés positifs par PCR. Ensuite, la capacité de détection des trypanosomes en parasitologie serait liée au temps mis depuis le prélèvement de l'animal jusqu'à la réalisation de l'examen diagnostic. En effet, cette période peut être plus ou moins longue en fonction du nombre d'animaux prélevés. Ainsi, elle pourrait être susceptible d'abaisser considérablement la charge parasitaire du fait de l'inamovibilité des trypanosomes morts.

Bien que très sensible, la technique PCR est malheureusement trop lourde et onéreuse pour être appliquée en routine (Truc *et al.*, 1999 ; Jamonneau *et al.*, 2001 ; Becker *et al.*, 2004 ; Claes *et al.*, 2007). Pour pallier ce facteur limitant, une équipe de chercheur a récemment utilisé la technique NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) couplée à une technique d'oligochromatographie afin d'amplifier et de détecter l'ARN du parasite. Cette technique avec un seuil de détection de 10 parasites/mL de sang avait été suggérée comme une alternative intéressante sur le terrain (Mugasa *et al.*, 2009 et 2012).

Les résultats de cette étude ont confirmé la forte prévalence de *T. brucei* s.l. chez toutes les espèces animales testées, suggérant l'existence de contacts multiples entre les animaux domestiques des foyers du Centre-Ouest et la glossine, vectrice de ce trypanosome. Ces

résultats sont conformes à ceux de Simo *et al.* (2006) qui ont montré que dans le foyer de maladie du sommeil de Fontem au Cameroun, un plus grand nombre des infections aux trypanosomes est dû à l'espèce *T. brucei* s.l. Par contre, les travaux de Simukoko *et al.* (2007) ont montré que la majorité des infections aux trypanosomes détectées chez les animaux domestiques (bovin, caprin et porc) des districts de Katete et Petauke en Zambie est due à *T. congolense*.

Les prévalences d'infection à *T. brucei* s.l. obtenues chez les porcs ont été de 36,50 % et de 33,33 % en 2013 et 2015 respectivement. Ces prévalences plus élevées chez l'espèce porcine montrent qu'il existe une grande sensibilité des porcs à l'espèce *T. brucei* s.l. et aussi, un contact plus élevé entre les porcs et *Glossina palpalis palpalis* (*G. p. palpalis*), l'espèce vectrice présente dans les zones d'étude. Ce contact pourrait s'expliquer par le fait que les porcs sont le plus souvent en divagation dans les zones humides, ombrageuses et les points d'eaux favorables aux glossines en périphérie des villages. Ils deviennent de ce fait les hôtes préférentiels de *G. p. palpalis*. En effet, des auteurs ayant travaillé sur l'analyse des repas de sang ont montré que *G. p. palpalis* se nourrit préférentiellement de sang de porcs (Laveissière *et al.*, 1985 ; Simo *et al.*, 2008 ; Njitchouang *et al.*, 2011). De ce fait, la présence de porcs réduirait le risque de la transmission à l'homme. La prédilection des glossines pour les porcs en divagation dans les villages a retenu l'attention depuis fort longtemps. Toujours en liberté du matin au soir, les porcs vont et viennent sans cesse du village aux bas-fonds et forêts sacrées.

La prévalence élevée d'infection à *T. brucei* s.l. chez les bovins comparés aux caprins et aux ovins pourrait s'expliquer par le fait que les bovins parcourent de longues distances pour leur alimentation, s'exposant davantage aux mouches tsétsé. Quant aux ovins et caprins, ils errent librement parmi les habitations où ils sont en partie nourris par les villageois, limitant ainsi leur présence avec la périphérie du village et le contact avec les mouches tsétsé.

Le test d'immuno-trypanolyse est une technique immunologique qui permet au sein de l'espèce *T. brucei* s.l. de faire la différence entre les signatures antigéniques des sous espèces *T. b. brucei* et *T. b. gambiense* indistinguables au niveau de leur morphologie (Van Meirvenne *et al.*, 1995 ; Jamonneau *et al.*, 2010). Dans cette étude, les quatre espèces animales ont été testées fortement positives au variant antigénique Litat 1.6. Cela suggère que les animaux ont

été en contact avec la sous-espèce *T. b. brucei* qui est en principe sans danger pour les hommes. Les porcs et les bovins ont été les seules espèces animales testées positives aux variants LiTat 1.3 et LiTat 1.5, deux variants exprimés par *T. b. gambiense*. Ce résultat confirme non seulement le rôle des porcs en tant que réservoirs potentiels de *T. b. gambiense* (Njiokou *et al.*, 2010 ; Simo *et al.* 2006 et 2012) mais suggère que d'autres espèces animales notamment les bovins pourraient jouer le rôle de réservoir de *T. b. gambiense* (Njiokou *et al.*, 2010). Le taux d'animaux domestiques positifs au LiTat 1.3 et LiTat 1.5 suggèrent une circulation de *T. b. gambiense* dans les foyers du Centre-Ouest alors que seuls quelques cas de THA y sont dépistés par an ces dernières années (Koffi *et al.*, 2016).

La comparaison des résultats microscopiques a montré que les animaux domestiques testés en 2013 étaient plus infectés que ceux de 2015. Les mêmes résultats ont été observés avec le variant LiTat 1.3 de la trypanolyse. En effet, ce test a révélé que les animaux domestiques examinés au cours de la période de 2015 auraient été moins en contact avec *T. b. gambiense*. Ces résultats pourraient résulter de la réduction de la transmission en raison de la surveillance médicale active et passive organisée dans les foyers endémiques de Bonon et de Sinfra. Parallèlement, la lutte antivectorielle basée sur l'utilisation de *tiny targets* (Rayaissé *et al.*, 2011) a réduit considérablement les densités de glossines dans ces foyers actifs (Coulibaly *et al.*, 2018). En outre, ces résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'après les enquêtes de 2013, certains propriétaires, ayant été informés de l'existence de la THA et des obstacles majeurs que pourrait causer la TAA sur leurs élevages, ont commencé à traiter eux-mêmes leurs animaux (principalement les bovins) avec des trypanocides ou par des services vétérinaires (Mungube, 2010).

L'espèce *T. brucei* s.l. a été plus présente chez les animaux domestiques échantillonnés en 2015 que chez ceux de 2013. Cette relative différence pourrait être due à l'effectif de porcs examinés. En effet, l'effectif de porcs testés en 2015 (246 porcs) est largement supérieur à celui de 2013 (137 porcs). Du fait que les porcs sont bien connus pour être les hôtes préférentiels de *T. brucei* s.l, l'inégalité entre les effectifs des échantillons de cette espèce animale pourrait biaiser les résultats de la comparaison.

Les résultats du diagnostic moléculaire de *T. b. gambiense* ont montré l'absence du gène TgsGP dans tous les échantillons biologiques et les souches isolées provenant des foyers

endémiques de Bonon et Sinfra. Cependant, ce gène TgsGP, spécifique de *T. b. gambiense* a pu être détecté dans quatre des souches isolées (8 %) de porcs provenant du foyer hypo-endémique de Vavoua. Ce résultat suggère un contact actif entre ces porcs et *T. b. gambiense*. De ce fait, cette espèce animale pourrait être un réservoir potentiel de *T. b. gambiense* et contribuer au maintien de la THA dans cette zone. En effet, des études utilisant des méthodes de biologie moléculaire (PCR), ont mis en évidence la présence de l'ADN de *T. b. gambiense* du groupe pathogène à l'homme chez des porcs provenant du foyer de Fontem au Cameroun suggérant ainsi que les porcs peuvent être des réservoirs potentiels de *T. b. gambiense* et contribuer au maintien de la THA (Nkinin *et al.*, 2002; Simo *et al.*, 2006). Comparativement aux résultats de la présente étude, *T. b. gambiense* a été identifié chez les caprins et les ovins examinés dans les foyers de Bipindi, Campo et de Fontem au Cameroun (Njiokou *et al.*, 2010 ; Simo *et al.*, 2006 et 2010). La prévalence (8 %) d'infection à *T. b. gambiense* obtenue dans le cadre de cette étude est supérieure aux taux de 0,32 % et 3,08 % rapportés respectivement par Simo *et al.* (2010) et par Njiokou *et al.* (2010). Par contre, les prévalences de 8,8% et 12,1% obtenues, respectivement dans les foyers de Rio Campo et de Mbini en Guinée Equatoriale par Cordon-Obras *et al.* (2015) sont nettement supérieures à celle enregistrée dans le cadre de la présente étude.

Les résultats de la PCR spécifique à *T. b. gambiense* suscitent des interrogations puisque selon les données d'archives du PRCT, depuis ces cinq dernières années, les cas de THA qui ont été dépistés proviennent essentiellement des foyers endémiques de Bonon et Sinfra. Aujourd'hui considérée comme un ancien foyer de THA, Vavoua demeure toujours une zone d'importante culture de rente (Cacao, café, hévéa etc.) favorisant ainsi une mobilité accrue de migrants agricoles. En outre, l'intensification de l'élevage d'animaux domestiques dans cette zone augmente le risque de la TAA qui partage le même vecteur avec la THA. Les populations vivantes dans ce foyer hypo-endémique de la THA, toujours en contact avec les mouches tsétsé sont exposées au risque de la maladie. Toutefois, les porcs pourraient constituer pour l'homme un écran protecteur contre les piqûres de glossines (Van Hoof *et al.*, 1937).

L'absence du gène TgsGP dans les échantillons de sang des animaux domestiques testés positifs à la PCR avec les amorces spécifiques de *T. brucei* s.l pourrait s'expliquer par la faible quantité d'ADN de *T. b. gambiense* dans ce type d'échantillon. En effet, la PCR

utilisant les amorces spécifiques de *T. brucei* s.l. ciblent une séquence répétée et est donc beaucoup plus sensible que les amorces TgsGP qui amplifient une séquence unique dans le génome de *T. b. gambiense* (Berberof *et al.*, 2001). Compte tenu de la faible parasitémie généralement observée chez les infections à *T. b. gambiense* (Deborggraeve & Büscher, 2012), il est donc possible que le gène TgsGP ne puisse pas être détecté par les amorces.

Dans les foyers actifs de Bonon et Sinfra, des résultats discordants ont déjà été observés entre la technique immunologique et la technique de biologie moléculaire utilisées dans cette étude. Les résultats de la trypanolyse ont indiqué la présence de *T. b. gambiense* chez les animaux domestiques dans ces foyers actifs de THA, tandis que les résultats de la PCR TgsGP et du génotypage ont suggéré que cette sous-espèce ne circulerait pas chez ces animaux. Cela pourrait s'expliquer une fois encore par le manque de sensibilité des amorces TgsGP, comme expliqué ci-dessus.

La souche de référence P26F précédemment identifiée comme *T. b. gambiense* dans plusieurs études (Godfrey *et al.*, 1990 ; Simo *et al.*, 2005 ; Koffi *et al.*, 2007 ; Simo *et al.*, 2008) s'est révélée négative à la PCR TgsGP spécifique à ce trypanosome. Cette souche isolée chez le porc a été utilisée pour démontrer l'existence de réservoir animal de *T. b. gambiense* (Truc *et al.*, 1991; Simo *et al.*, 2008).

Les analyses génétiques effectuées dans cette étude ont révélé une importante diversité génétique au sein des populations de *T. brucei* s.l. circulant chez les animaux domestiques des foyers endémiques de Bonon et Sinfra et hypo-endémique de Vavoua. Tous les marqueurs microsatellites utilisés ont été polymorphes, se caractérisant par un nombre total d'allèles variant de 3 pour le marqueur TBG21 à 20 pour le marqueur Misatg9. Par ailleurs, les travaux de Takezaki & Nei. (1996) ont suggéré un nombre d'allèles par locus d'au moins quatre (4) pour réduire l'erreur standard commise dans l'estimation des distances génétiques entre populations. Ainsi, en se basant sur cette hypothèse, à l'exception du locus TBG21 avec trois (3) allèles, tous les autres marqueurs microsatellites utilisés dans cette étude sont informatifs. Le nombre moyen d'allèles dans la population totale est de 9,11 et varie entre les différentes sous-populations étudiées. Ceci indique une richesse allélique importante dans la population échantillonnée. Ces résultats révèlent l'intérêt de ces loci microsatellites pour une meilleure analyse de la diversité génétique de la population de *T. brucei* s.l.

Une forte proportion d'échecs d'amplifications a été observée dans cette étude. Ceci est particulièrement important pour les échantillons biologiques (Kaboré *et al.*, 2011). Ce résultat indique que pour une meilleure analyse de la génétique des populations des trypanosomes du complexe *T. brucei* s.l., il faut davantage de souches isolées. Le phénomène de dropouts alléliques ou d'allèles nuls pourrait être la cause des échecs d'amplifications (Séré *et al.*, 2014) observés. Ceci peut être la conséquence du fait que les amorces choisies ne correspondent pas parfaitement aux séquences cibles. C'est souvent le cas lorsque les amorces ont été conçues à partir d'espèces proches ou d'autres populations. Il est important de noter que ces phénomènes pourraient engendrer des génotypes manquants (Wang *et al.*, 2012) comme ce fut le cas dans ce travail. Le fait que certains marqueurs n'aient pas réussi à amplifier certains échantillons confirme les résultats d'autres études réalisées avec des échantillons de terrain sans isolement des parasites (Koffi *et al.*, 2007 ; Morrison *et al.*, 2009). La faible quantité d'ADN de certains génotypes de *T. brucei* s.l. peut également favoriser les échecs d'amplifications et peut expliquer l'absence de certains génotypes en raison de la présence d'allèles ininterprétables. Par ailleurs, les échecs d'amplification pourraient expliquer pourquoi les souches d'animaux domestiques se sont rangées en un dendrogramme moins résolutif avec des nœuds courts et de très longues feuilles.

Les résultats des analyses génétiques ont montré que le complexe *T. brucei* s.l. est clonale et fortement subdivisé (De Meeûs & Balloux., 2005 ; Koffi *et al.*, 2009). En outre, Il existe une bonne correspondance entre la matrice de distance génétique construite avec des loci définis à partir de *T. brucei* s.l. et la matrice construite avec des loci définis à partir de *T. b. gambiense* groupe 1. Une forte corrélation entre deux ensembles de marqueurs génétiques peut constituer une preuve solide d'un mode de propagation principalement clonal.

L'analyse de l'association allélique indique une forte proportion de paires de loci en déséquilibre de liaison. Ce résultat confirme la structure clonale du complexe *T. brucei* s.l. Ces résultats sont similaires à ceux de Koffi *et al.* (2009) qui ont montré qu'il existe un fort déséquilibre liaison entre paires de loci (18 tests significatifs sur 21) même après correction des probabilités par la procédure de Bonferroni, 12 tests sont restés significatifs.

Les valeurs du F_{IS} calculées sur l'ensemble des loci et par sous-population sont inférieures à zéro, traduisant un excès en hétérozygotes au sein du complexe *T. brucei* s.l. Ceci montre que la population étudiée ne répond pas aux attentes de Hardy-Weinberg. Des résultats similaires ont été obtenus par Koffi *et al.* (2009). En effet, les travaux de ces auteurs ont révélé un fort excès d'hétérozygote par rapport aux attentes de Hardy-Weinberg, avec une petite variance à travers les loci ($F_{IS} = -0,62$). La valeur moyenne du F_{IS} obtenue pour les foyers ($F_{IS} = -0,069$) est plus élevée que celle des villages ($F_{IS} = -0,128$). Ce qui se traduit par le fait que l'unité des sous-populations correspond davantage à des villages qu'à des foyers où un effet Wahlund évident augmente artificiellement les valeurs des F_{IS} à tous les loci.

La variation entre les loci a été beaucoup plus faible dans les données de cette étude que dans d'autres ensembles de données publiées, tandis que la diversité génétique semblait beaucoup plus petite (Capewell *et al.*, 2013) ou même très faible (Echodu *et al.*, 2015) comparativement à ce qui a été observé avec les 18 loci microsatellites utilisés.

L'isolement par distance peut structurer cette population de trypanosomes. Cependant, la taille des sous-populations, la faible connectivité entre elles, la propagation clonale qui tend à biaiser le F_{ST} vers des valeurs inférieures, ainsi que la petite taille des sous-échantillons peuvent expliquer l'absence de l'isolement par distance observée dans cette étude.

Les données obtenues indiquent une proportion importante de génotypes ininterprétables avec les marqueurs de brucei et gambiense, suggérant que de nouvelles séries d'amorces qui amplifieraient la plupart des souches sont nécessaires pour les études de la génétique des populations de *T. brucei* s.l. A l'issue de cette étude, la question de l'existence de *T. b. gambiense* pathogène pour l'homme chez les animaux domestiques reste toujours d'actualité puisque des résultats discordants ont été observés entre la trypanolyse, PCR TgsGP et le génotypage de microsatellites. En effet, les résultats de la trypanolyse et de la PCR TgsGP ont indiqué la présence de *T. b. gambiense* chez les animaux domestiques dans les foyers THA de Bonon, Sinfra et Vavoua, tandis que le génotypage à l'aide des marqueurs microsatellites a suggéré que le trypanosome pathogène pour l'homme ne circule pas chez ces animaux domestiques.

Tout au long de l'étude expérimentale, aucun animal n'a été infecté accidentellement. Ceci s'est traduit par les résultats négatifs observés chez le porc (P6) qui a été pris comme témoin. Aucune transmission mère-enfant (transmission verticale) n'a été révélée par cette étude expérimentale. En effet, la transmission des trypanosomes à un hôte sain, nécessite la présence de vecteur mécanique (tabanide et stomoxe) ou biologique (mouche tsé-tsé). La plupart des rapports de transmission congénitale datent de 1970 et 1980 (Lindner *et al.*, 2010). Selon Triolo *et al.* (1985), il semble que la transmission verticale de la THA se produise plus souvent que prévu.

La proportion de 26,25 % de glossines disséquées est inférieure à celle de 59,2 % rapportée par Simo *et al.* (2014). Les travaux de ces auteurs ont montré que sur les 2695 glossines capturées, 1596 ont pu être disséquées. Contrairement à la présente étude expérimentale où seulement 258 glossines ont été disséquées sur les 983 concernées.

Les résultats du xénodiagnostic ont montré que l'intestin moyen de la glossine est le premier organe d'hébergement des trypanosomes dans leur cycle de vie chez le vecteur biologique (Frezil, 1971 ; Wombou *et al.*, 2011). Durant cette expérimentation animale, des trypanosomes ont été détectés dans l'intestin moyen des glossines tandis qu'aucune infection n'a été observée dans le proboscis et les glandes salivaires de celles-ci. Des trypanosomes ont été observés dans l'intestin moyen des glossines nourries sur le porcelet P5, tandis que ce dernier a été négatif en parasitologie. Ce résultat confirme la grande sensibilité du xénodiagnostic (Frezil, 1971 ; Wombou *et al.*, 2011) déjà décrite par des études antérieures qui ont montré que cette méthode est plus sensible que le diagnostic parasitologique classique (Molina *et al.*, 2012 ; Maribel *et al.*, 2014 ; Sadlova *et al.*, 2015 et 2019). Des études antérieures ont montré que des glossines (*Glossina morsitans submorsitans*) étaient capables de s'infecter chez des porcs ou des bovins ayant de faibles parasitémies de *T. b. gambiense* ou de *T. congolense*, suggérant ainsi que le xénodiagnostic demeure positif même à de très faibles parasitémies (Wombou Toukam *et al.*, 2011).

Le xénodiagnostic a montré que les glossines peuvent être infectées au moment où la parasitémie sanguine ne peut être détectée par un test microscopique (Van den Bossche *et al.*, 2005). La détection des trypanosomes par les glossines à des parasitémies très faibles pourraient s'expliquer par la présence du parasite dans des tissus autres que les liquides

biologiques, notamment dans les tissus intradermiques ou sous cutanés (Caljon *et al.*, 2016 ; Capewell *et al.*, 2016). En effet, les glossines pourraient s'infecter au niveau de la peau de leur hôte (Aslan *et al.*, 2016 ; Lima *et al.*, 2013), faisant de cet organe un réservoir important de parasites. Si les mouches tsé-tsé sont capables de détecter les trypanosomes là où les techniques de diagnostic parasitologique les plus sensibles échouent, il convient ainsi de s'inquiéter de la présence d'individus séropositifs sans confirmation parasitologique (Ahouty *et al.*, 2017) et vivant dans le même environnement que les personnes saines. Etant donné que la mouche tsé-tsé est capable de s'infecter sur un individu à charge parasitaire très faible, la présence de personnes séropositives sur le long terme, représente un canal de maintien et/ou de résurgence de la maladie.

L'absence des trypanosomes dans le proboscis des glossines, suggère que ces parasites sont éliminés dans l'intestin moyen probablement par le système immunitaire de la mouche (Gibson & Bailey, 2003 ; Haines *et al.*, 2010). De plus, la majorité des glossines meurt avant que les trypanosomes atteignent le proboscis ou avant leur dissection, quinze jours (J15) après le repas de sang. Cette mortalité pourrait s'expliquer par le refus de certaines glossines à se nourrir lors du repas de sang. Elle pourrait être due aussi au fait que les glossines ne sont pas dans leur environnement naturel. Aucune glande salivaire n'a été testée positive car du fait des mortalités, aucun glossine n'a pu être disséquée au trentième jour post-infection (J30). Le maintien en vie des glossines trente jours après leur repas sanguin n'a pu être possible, ce qui n'a pas permis de réaliser le cycle de *T. brucei* s.l. jusqu'à la maturité.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

Cette étude a permis de montrer que les animaux domestiques des zones endémiques de trypanosomose humaine, notamment les foyers de Bonon et Sinfra et du foyer hypo-endémique de Vavoua sont de potentiels réservoirs de trypanosomes.

Les techniques moléculaires ont révélé la présence des espèces *T. brucei* s.l., *T. congolense* type forêt et *T. vivax* chez les animaux domestiques des zones d'étude. L'espèce *T. brucei* a été la plus répandue et les porcs ont été les plus infectés par ce trypanosome. Les prévalences générées par les tests de diagnostic de *T. b. gambiense* (PCR TgsGP et trypanolyse) montrent que les porcs seraient susceptibles d'être de potentiels réservoirs de cette sous-espèce de *T. brucei* s.l. Les résultats obtenus dans cette étude ne confirment pas l'implication des animaux domestiques, notamment les porcs dans le maintien et la circulation de *T. b. gambiense* pathogène pour l'homme. Néanmoins, dans le cadre de la lutte contre les trypanosomoses selon le concept One Health, il est nécessaire de prendre en compte les porcs comme réservoirs importants de trypanosomes.

Les analyses génétiques effectuées à l'aide des marqueurs microsatellites ont permis de mieux comprendre la distribution des génotypes du complexe *T. brucei* s.l. circulant chez les animaux domestiques des sites d'étude. Ces analyses ont montré une importante diversité génétique complexe *T. brucei* s.l. au sein des animaux domestiques. Cette diversité se caractérise par le polymorphisme observé à tous les loci et le nombre important d'allèle relevé par locus. Cette étude sur la diversité génétique des populations de l'espèce *T. brucei* s.l. a montré qu'il existe un déséquilibre de liaison global sur l'ensemble du génome de ce trypanosome. Aussi, l'analyse de l'hétérozygotie montre qu'au sein de la population de *T. brucei* s.l., les individus sont extrêmement hétérozygotes. La présente étude confirme la reproduction clonale et la sous-structuration de *T. brucei* s.l. en fonction des sites d'études.

L'étude de la structuration génétique des différentes sous-populations du complexe *T. brucei* a montré que les trypanosomes des animaux domestiques des sites d'études sont génétiquement éloignés de ceux du groupe 1 de *T. b. gambiense*, le pathogène humain.

Le xénodiagnostic a montré que les glossines peuvent s'infecter lors de leur repas sanguin sur des hôtes chez lesquels les trypanosomes restent indétectables par les méthodes parasitologiques conventionnelles. Ces hôtes sans confirmation parasitologique, peuvent être

considérés comme de potentiels réservoirs de parasites. Cette étude a montré que le xénodagnostic peut contribuer grandement à mieux caractériser l'état parasitologique des hôtes ne présentant aucun signe clinique. Dans tous les cas, lutter efficacement contre la THA passe par le diagnostic de *T. b. gambiense* pathogène pour l'homme. Dans le contexte de l'élimination de la THA, il est crucial de développer de meilleurs outils pour étudier le rôle épidémiologique du réservoir animal potentiel de *T. b. gambiense* pathogène pour l'homme.

PERSPECTIVES

Pour mieux comprendre l'implication épidémiologique des animaux domestiques dans la transmission de la THA :

- il est important de développer de meilleurs outils pour le diagnostic de *T. b. gambiense* pathogène pour l'homme ;
- de nouvelles d'amorces qui peuvent amplifier la plupart des échantillons doivent être conçues ;
- des infections expérimentales contrôlées pourraient être nécessaires pour évaluer la spécificité et la sensibilité des outils de diagnostic actuellement disponibles.

RECOMMANDATIONS

La Santé en général, celle des populations les plus vulnérables en particulier, contribuant à leur bien-être, fait partie intégrante du développement d'une nation. Afin que les maladies dites négligées ne freinent pas les objectifs du développement agricole, l'élimination de la THA doit être soutenue de manière forte et multisectorielle. Au regard des résultats de cette thèse, nous recommandons :

- Aux autorités sanitaires et vétérinaires, d'unir leur force dans le sens d'une santé unique, encore appelée concept OneHealth ;
- Au Programme National de Lutte contre la THA :
 - ✓ de mener une sensibilisation exhaustive des éleveurs sur les obstacles que pourraient engendrer les trypanosomoses animales afin que ceux-ci s'intéressent davantage aux activités de dépistage ;
 - ✓ de mener des campagnes de lutte antivectorielle pour faire baisser la densité des glossines sans toutefois oublier la nécessité de suivre les personnes séropositives sans confirmation parasitologiques afin d'assainir davantage le réservoir humain de la maladie.

REFERENCES

- Acapovi-Yao G., Cissé B., Mavoungou J.F, Kohagne Tongue L. & Coulibaly N. (2013). Situation de la trypanosomose bovine dans les principales régions d'élevage au Nord de la Côte d'Ivoire après la crise socio-militaire. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animale*, 11(1) : 17-22.
- Acapovi-Yao G., Cissé B., Zinga K. & Mavoungou J. (2016). Infections trypanosomiennes chez les bovins dans des élevages de différents départements en Côte d'Ivoire. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 167 : 289-295.
- Ahouty B., Koffi M., Ilboudo H., Simo G., Matovu E., Mulindwa J., Hertz-Fowler C., Bucheton B., Sidibe I., Jamonneau V., MacLeod A., Noyes H. & N'Guetta S.P. (2017). Candidate genes-based investigation of susceptibility to Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(10) : e0005992.
- Ajzenberg D., Banuls A.L., Tibayrenc M. & Dardé M.L. (2002). Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International Journal for Parasitology*, 32 : 27-38.
- Aka R., Danho F.R., Coulibaly K., N'Guessan F. & Kebe B. (2017). Inventaire et distribution des espèces de végétaux parasites et épiphytes du cacaoyer en Côte d'Ivoire. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 31(2): 5010-5020.
- Aslan H., Oliveira F., Meneses C., Castrovinci P., Gomes R., Teixeira C., Derenge C.A., Orandle M., Gradoni L., Oliva G., Fischer L., Valenzuela J.G. & Kamhawi S. (2016). New Insights Into the Transmissibility of *Leishmania infantum* From Dogs to Sand Flies: Experimental Vector-Transmission Reveals Persistent Parasite Depots at Bite Sites. *Journal Infectious Diseases*, 213(11) : 17, 52-61.
- Balmer O., Beadell J.S., Gibson W. & Caccone A. (2011). Phylogeography and taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(2) : e961.
- Balloux F., Lehmann L. & De Meeûs T. (2003). The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics*, 164 : 1635-1644.
- Becker S., Franco J.R., Simarro P.P., Stich A., Abel P. & Steverding D. (2004). Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 50(3) : 193-199.

- Benjamini Y. & Yekutieli, D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *The annals of statistics*, 29(4) : 1165-1188.
- Berberof M., Pérez-Morga D. & Pays E. (2001). A receptor-like flagellar pocket glycoprotein specific to *Trypanosoma brucei gambiense*. *Molecular and biochemical Parasitology*, 113(1) : 127-138.
- Biteau N., Bringaud F., Gibson W.C, Truc P. & Baltz T. (2000). Characterization of *Trypanozoon* isolates using a repeated coding sequence and microsatellite markers. *Molecular and biochemical Parasitology*, 105(2) : 187-202.
- Borst P., Fase-Fowler F. & Gibson W.C. (1981). Quantitation of genetic differences between *Trypanosoma brucei gambiense*, *rhodesiense* and *brucei* by restriction enzyme analysis of kinetoplast DNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 3(2) : 117-131.
- Brumpt E. (1914). Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la trypanosomose de Chagas. *Bulletin de la Société Pathologie exotique*, 7 : 706-710.
- Brun R., Blum J., Chappuis F. & Burri C. (2010). Human African trypanosomiasis. *Lancet*, 375: 148-159.
- Bucheton B., MacLeod A. & Jamonneau V. (2011). Human host determinants influencing the outcome of *Trypanosoma brucei gambiense* infections. *Parasite Immunology*, 33(8) : 438-447.
- Bulle B., Millon L., Bart J.M., Gallego M., Gambarelli F., Portus M., Schmur L., Jaffe C.L., Fernandez-Barredo S., Alunda J.M. & Piarroux R. (2002). Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9) : 3391-3397.
- Büscher P., Lejon V., Maudlin I., Holmes P.E. & Miles M.A. (2003). Diagnosis of human African trypanosomiasis. Wallingford, UK, and Cambridge, Mass., USA : *CABI Publishing*; 203-218.
- Büscher P., Mumba Ngoyi D., Kabore J., Lejon V., Robays J., Jamonneau V., Bebronne N., Van der Veken W. & Bieler S. (2009). Improved Models of Mini Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT) and Modified Single Centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(11) : e471.

- Büscher P., Cecchi G., Jamonneau V. & Priotto G. (2017). Human African Trypanosomiasis. *The Lancet*, 390(10110) : 2397-2409.
- Büscher P., Jean-Mathieu Bart JM., Boelaert M., Bucheton B., Cecchi G., Chitnis N., Courtin D., Figueiredo L., Franco JR., Grébaud P., Hasker E., Ilboudo H., Jamonneau V., Koffi M., Lejon V., MacLeod A., Masumu J., Matovu E., Mattioli R., Noyes H., Albert Picado., Rock K., Rotureau B., Simo G., Thévenon S., Trindade S., Truc P. & Van Reet N. (2018). Do Cryptic Reservoirs Threaten Gambiense-Sleeping Sickness Elimination? *Trends in Parasitology*, 34(3) : 197-207.
- Caljon G., Van Reet N., De Trez C., Vermeersch M., Pérez-Morga D. & Van Den Abbeele J (2016). The Dermis as a Delivery Site of *Trypanosoma brucei* for Tsetse Flies. *PLoS Pathogens*, 12 (7) : e1005744.
- Capewell P., Cooper A., Duffy C.W., Tait A., Turner C.M.R., Gibson W., Mehlitz D., MacLeod A. (2013). Human and animal trypanosomes in Côte d'Ivoire form a single breeding population. *Plos One* 8(7) : e67852.
- Capewell P., Cren-Travaillé C., Marchesi F., Johnston P., Clucas C., Benson R.A., Gorman T. A., Calvo-Alvarez E., Crouzols A., Jouvion G., Jamonneau V., Weir W., Stevenson M. L., O'Neill K., Cooper A., Swar N.R., Bucheton B., Ngoyi D.M., Garside P., Rotureau B. & MacLeod A. (2016). The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes. *ELife*, 5 : e17716.
- Cattand P., Jannin J. & Lucas P. (2001). Sleeping sickness surveillance : an essential step towards elimination. *Tropical medicine & international health*, 6(5) : 348-361.
- Cavalli-Sforza L.L. & Edwards A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis : model and estimation procedures. *Evolution*, 21(3) : 550-570.
- Chappuis F., Loutan L., Simarro P., Lejon V. & Buscher P. (2005). Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1) : 133-146.
- Chapuis M.P. & Estoup A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution*, 24(3) : 621-631.
- Chen K.K. & Donelson J.E. (1980). Sequences of two kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(5) : 2445-2449.

- Cibulskis R.E. (1992). Genetic variation in *Trypanosoma brucei* and the epidemiology of sleeping sickness in the Lambwe Valley, Kenya. *Parasitology*, 104 : 99-109.
- Claes F., Deborggraeve S., Verloo D., Mertens P., Crowther J.R., Leclipteux T. & Büscher P. (2007). Validation of a PCR- oligochromatography test for detection of *Trypanozoon* parasites in a multicenter collaborative trial. *Journal Clinical Microbiology*, 45 : 3785-3787.
- Cooper A., Tait .A, Sweeney L., Tweedie A., Morrison L., Turner CM & MacLeod A: (2008) Genetic analysis of the human infective trypanosome *Trypanosoma brucei gambiense*: chromosomal segregation, crossing over, and the construction of a genetic map. *Genome Biology*, 9(6) : R103.
- Cordon-Obras C., Rodriguez Y.F., Fernandez-Martinez A., Cano J. & Ndong-Mabale N (2015) Molecular evidence of a *Trypanosoma brucei gambiense* sylvatic cycle in the human african trypanosomiasis foci of Equatorial Guinea. *Frontiers in microbiology*, 6 : 765.
- Coulibaly B., Krouba D., Kouakou A., Ouattara A., Berté D., Ta Bi Tra D., Rayaisse J.B., Jamonneau V., Solano P., Koffi Y.J.J., Kaba D., Courtin F., Assi-Kaudjhis J. & Anoh K. (2018). Conséquences sanitaires de la dynamique du paysage rural dans le foyer de trypanosomiase humaine africaine (THA) de Bonon (Côte d'Ivoire) entre 2002 et 2015. *Revue Espace, Territoires, Sociétés et Santé*, 1 (2), 19-36
- 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 and International Health*, 10 : 340-346.
- Courtin F., Jamonneau V., Camara M., Camara O., Coulibaly B., Diarra A., Solano P. & Bucheton B. (2010). A geographical approach to identify sleeping sickness risk factors in a mangrove ecosystem. *Tropical Medicine and International Health*, 15 : 881-889.
- Cross G.A.M. (1975). Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, 71 : 393-412.
- Cunningham I. (1977). New culture medium for maintenance of Tsetse tissues and growth of Trypanosomatids. *Journal of Protozoology*, 21 : 325-329.

- Daniels JP., Gull K. & Wickstead B. (2010). Cell Biology of the Trypanosome Genome. *Microbiology and molecular Biology Reviews*, 74(4) : 552-569.
- Deborggraeve S. & Büscher P. (2010). Molecular diagnostics for sleeping sickness: where's the benefit for the patient? *Lancet Infectious Diseases*, 10 : 433-439.
- Deborggraeve S. & Buscher P. (2012). Recent progress in molecular diagnosis of sleeping sickness. *Expert review molecular diagnostics*, 12(7) : 719-730.
- De Meeûs T. & Balloux F. (2005). F-statistics of clonal diploids structured in numerous demes. *Molecular ecology*, 14 : 2695-2702.
- De Meeûs T., Lehmann L. & Balloux F. (2006). Molecular epidemiology of clonal diploids : A quick overview and a short DIY (do it yourself) notice. *Infection, Genetics and Evolution*, 6(2) : 163-170.
- Dero B., Zampetti-Bosseler F., Pays E. & Steinert M. (1987). The genome and the antigen gene repertoire of *Trypanosoma brucei gambiense* are smaller than those of *T. b. brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 26 : 247-256.
- Desquesnes M., Itard J., Cuny G., Solano P. & Authie E (2003). Trypanosomoses : Diagnostic. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et Régions chaudes. Tome 2 : *Maladies bactériennes, mycoses, maladies parasitaires*. Paris (France), 1679-1694.
- Dje N.N., Miezán T.W., N'Guessan P., Brika P., Doua F. & Boa F. (2002). Geographic distribution of trypanosomiasis treated in Ivory Coast from 1993 to 2000. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 95 : 359-361.
- Domergue-Cloarec D. (1986). La santé en Côte d'Ivoire, 1905-1958. Doctorat en histoire, Toulouse-le-Mirail, *Académie des Sciences d'Outre-mer édition* : 1319p.
- Douati A., Kupper W. & Kotia K. (1986): Contrôle des glossines (Glossina : Diptera, Muscidae) à l'aide d'écrans et de pièges (méthodes statiques) : Bilan de 2 années de lutte à Sirasso dans le Nord de la Côte-d'Ivoire. *Revue Elevage Médecine Vétérinaire*. Pays Tropical, 39 : 213-219.
- Dumas M. & Bouteille B. (1996). Human African trypanosomiasis. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses filiales*, 190 (4) : 395-408.
- Echodu R., Siström M., Bateta R., Murilla G., Okedi L., Aksoy S., Enyioha C., Enyaru J., Opiyo E., Gibson W. & Caccone A. (2015). Genetic Diversity and Population Structure

- of *Trypanosoma brucei* in Uganda: Implications for the Epidemiology of Sleeping Sickness and Nagana. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2) : e0003353.
- Enyaru J.C.K., Matovu E., Akol M., Sebikali C., Kyambadde J., Schmidt C., Brun R., Kaminsky R., Ogwal L.M. & Kansiime F. (1998). Parasitological detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in serologically negative sleeping-sickness suspects from north-western Uganda. *Annals Tropical Medicine Parasitology*, 92 : 845 - 850.
- Fauret P., Coulibaly B., Ouattara A., Krouba D., Kouakou C., Berté D., Ta Bi Tra D., Adopo R., Gabé A., Adingra P., N'Dri L., Kouadio K., Djohan V., Jamonneau V., Koffi M., Rayaisse JB., Gimonneau G., Kouakou L., Koffi J., Calas B., Assi-Kaudjhis J., Anoh P., Solano P., Kaba D. & Courtin F. (2018). Café-cacao de Côte d'Ivoire et trypanosomiase humaine africaine (2CI-THA) : Un atlas au service de l'élimination de la THA en Côte d'Ivoire. Marseille : IRD, 91 p.
- Fèvre E.M., Wissmann B., Welburn S.C. & Lutumba P. (2008). The burden of Human African Trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2 : e333.
- Fenn K & Matthews K.R. (2007). The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Current Opinion in microbiology*, 10 (6) : 539-546
- Foil L.D. (1989). Tabanids and Vectors of Disease Agents. *Parasitology today*, 5(3) : 88-96.
- Franco J.R., Simarro P.P., Diarra A., Ruiz-Postigo J.A. & Jannin J.G. (2014). The journey towards elimination of gambiense human African trypanosomiasis: not far, nor easy. *Parasitology*, 141 (6) : 748-760.
- Franco J.R., Cecchi G., Priotto G., Paone M., Diarra A., Grout L., Simarro P.P., Zhao W. & Argaw D. (2018). Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis: Update to 2016. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12 : e0006890.
- Frézil J.L. (1971). Application du xénodiagnostic dans le dépistage de la trypanosomiase à *T. b. gambiense* chez des sujets immunologiquement suspects. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 64 : 871-878.
- Frézil J.L. (1990). Epidémiologie des Trypanosomiasés Humaines Africaines. ORSTOM fonds documentaire, N° 31122. 33p
- García A., Jamonneau V., Magnus E., Laveissiere C., Lejon V., N'Guessan P., N'Dri L., Van Meirvenne N. & Buscher P. (2000). Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Cote d'Ivoire:

- evidence for a complex and heterogeneous population. *Tropical Medicine & International Health*, 5 (11) : 786-793.
- Garcia A., Courtin D., Solano P., Koffi M. & Jamonneau V. (2006). Human African trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics. *Trends Parasitology*, 22(9) : 405-409.
- Garside L., Bailey M. & Gibson W. (1994). DNA content and molecular karyotype of trypanosomes of the subgenus *Nannomonas*. *Acta Tropica*, 57(1) : 21-28.
- Gibson W.C., Osinga K.A., Michels P.A. & Borst P. (1985). Trypanosomes of subgenus *Trypanozoon* are diploid for housekeeping genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16(3) : 231-242.
- Gibson W.C. & Borst P. (1986). Size-fractionation of the small chromosomes of *Trypanozoon* and *Nannomonas* trypanosomes by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 18(2) : 127-140.
- Gibson W.C. & Bailey M. (2003). The development of *Trypanosoma brucei* within the tsetse fly midgut observed using green fluorescent trypanosomes. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2 : 1-13.
- Gibson W.C. (2007). Resolution of the species problem in African trypanosomes. *International Journal for parasitology* 37(8-9) : 829-838.
- Gibson W.C. (2015). Liaisons dangereuses: sexual recombination among pathogenic trypanosomes. *Research in Microbiology*, 166 : 459-466.
- Godfrey D.G., Baker R.D., Rickman L.R., Mehlitz D. (1990). The distribution, relationships and identification of enzymatic variants within the sub-genus *Trypanozoon*. *Advances in parasitology*, 29 : 1-74.
- Goudet J. (2003). Fstat (version. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> Updated from Goudet (1995).
- Haines L.R., Lehane S.M., Pearson T.W. & Lehane M.J. (2010). Tsetse EP protein protects the fly midgut from trypanosome establishment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6 (3) : e1000793.
- 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.

- Hervouët J.P., Laffty D. & Cardon. (2000). La maladie du sommeil en Côte d'Ivoire : à la recherche d'indicateur de risque. *Espèce, population, société*, 2 : 209 -225.
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S & Griffith R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10 : 413-417.
- Hoare C.A. (1972). The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. *Blackwell Scientific Publications, Alfred Street Oxford, UK*, 749.
- Holmes P H. (2014). First WHO Meeting of Stakeholders on Elimination of Gambiense Human African Trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10): e3244.
- Ilboudo H., Jamonneau V., Camara M., Camara O., Dama E., Leno M., Ouendeno F., Courtin F., Sakande H., Sanon R., Kabore J., Coulibaly B., N'Dri L., Diarra A., N'Goran E. & Bucheton B. (2011). Diversity of response to *Trypanosoma brucei gambiense* infections in the Forecariah mangrove focus (Guinea): perspectives for a better control of sleeping sickness. *Microbes and Infection*, 13(11) : 943-952.
- Itard J. & Cuisance D. (2003). Vecteurs cycliques des trypanosomoses. In : Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Éditions Tec & Doc /Éditions médicales internationales, Paris : 139 – 165.
- Jamjoom M.B., Ashford R.W., Bates P. A, Kemp S.J. & Noyes H.A. (2002). Towards a standart battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 96(3) : 265-270.
- Jamonneau V., Solano P. & Cuny G. (2001). Use of molecular biology in the diagnosis of human African trypanosomiasis. *Medecine Tropicale : Revue du Corps de santé colonial*, 61(4-5) : 347-354.
- Jamonneau V., Barnabe C., Koffi M., Sane B., Cuny G. & Solano P. (2003). Identification of *Trypanosoma brucei* circulating in a sleeping sickness focus in Cote d'Ivoire: assessment of genotype selection by the isolation method. *Infection Genetics and Evolution*, 3(2) : 143-149.
- Jamonneau V., Bucheton B., Kabore J., Ilboudo H., Camara O., Courtin F., Solano P., Kaba D., Kambire R., Lingue K., Camara M., Balmans R., Lejon V. & Buscher P. (2010). Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and

- control of sleeping sickness in West Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(12) : e917.
- Jamonneau V., Truc P., Grébaud P., Herder S., Ravel S., Solano P., & De Meeus T. (2019). *Trypanosoma brucei gambiense* group 2: the unusual suspect. *Trends in Parasitology*; doi: 10.1016/j.pt.2019.09.002.
- Jamot E. (1933). Contribution à l'étude de la maladie du sommeil en Afrique Occidentale
- Kaba D., Dje N.N., Courtin F., Oke E., Koffi M., Garcia A., Jamonneau V. & Solano P. (2006). The impact of war on the evolution of sleeping sickness in west-central Cote d'Ivoire. *Tropical Medicine and International Health : TM & IH*, 11(2) : 136-143.
- Kaboré J., Koffi M., Bucheton B., Macleod A., Duffy C., Ilboudo H., Camara M., De Meeus T., Belem AM. & 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(6) : 1250-1255.
- Kaboré J., De Meeus T., Macleod A., Ilboudo H., Capewell P., Camara M., Gaston Belem A.M., Bucheton B. & Jamonneau V. (2013). A protocol to improve genotyping of problematic microsatellite loci of *Trypanosoma brucei gambiense* from body fluids. *Infection, Genetics and Evolution*, 20 : 171-176.
- Kambiré R., Lingue K., Courtin F., Sidibe I., Kiendrébéogo D., N'gouan K.E., Blé L., Kaba D., Koffi M., Solano P., Bucheton B. & Jamonneau V. (2012). Human African trypanosomiasis in Cote d'Ivoire and Burkina Faso: optimization of epidemiologic surveillance strategies. *Parasite*, 19 (4) : 389-396.
- Kanmogne G.D., Asonganyi T. & Gibson W.C. (1996). Detection of *Trypanosoma brucei gambiense*, in serologically positive but aparasitaemic sleeping-sickness suspects in Cameroon, by PCR. *Annals of Tropical Medicine Parasitology*, 90 : 475 - 483.
- Kato C.D., Alibu V.P., Nanteza A., Mugasa C.M. & Matovu E. (2016). Population genetic structure and temporal stability among *Trypanosoma brucei rhodesiense* isolates in Uganda. *Parasites & Vectors*, 9 (1) : 259-266.
- Kennedy P.G.E. (2004). Human African Trypanosomiasis of the CNS : current issues and challenges. *Journal of Clinical Investigation*, 113 (4): 496-504.

- Kiendrébéogo D., Kambire R., Jamonneau V., Lingué K., Solano P. & Courtin F. (2012). History of an epidemiological route between Ivory Coast and Burkina Faso: the case of the Koudougou sleeping sickness foci. *Parasite*, 19 : 397-406.
- Koffi M., Solano P., Denizot M., Courtin D., Garcia A., Lejon V., Buscher P., Cuny G. & Jamonneau V. (2006). Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis : a potential human reservoir of parasites? *Acta Tropica*, 98(2) : 183-188.
- Koffi M. (2006). Caractérisation génétique de *Trypanosoma brucei* s.l. : implications épidémiologiques et nouvelles perspectives. Thèse de doctorat de l'Université Montpellier II, France, 34p.
- Koffi M., Solano P., Barnabe C., De Meeûs T., Bucheton B., Cuny G. & Jamonneau V. (2007). Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei* s.l. using microsatellite typing: new perspectives for the molecular epidemiology of human African trypanosomiasis. *Infection, genetics and evolution*, 7 (6) : 675-684.
- 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. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 106(1) : 209-214.
- Koffi M., Sokouri M., Kouadio I.K. & N'Guetta S.P. (2014). Molecular characterization of trypanosomes isolated from naturally infected cattle in the "Pays Lobi" of Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 83(1) : 7570-7578.
- Koffi M., N'Djetchi M., Ilboudo H., Kaba D., Coulibaly B., N'Gouan E., Kouakou L., Bucheton B., Solano P., Courtin F., Ehrhardt S. & Jamonneau V. (2016). A targeted door-to-door strategy for sleeping sickness detection in low-prevalence settings in Côte d'Ivoire. *Parasite*, 23 : 51.
- Kumar S., Stecher G. & Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular. Biology. Evolution*. 33(7) : 1870-1874.
- Kyambadde J.W., Enyaru J.C.K., Matovu E., Odiit M. & Carasco J.F. (2000). Detection of trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using the polymerase chain reaction. *Bulletin WHO*, 78 : 119-123.

- Lanham S.M. & Godfrey G. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology*, 28(3) : 521-534.
- Larivière M. (1978). Parasitologie tropicale les grandes endémies-épidémiologie, prophylaxie. Paris : *Les Editions Foucher*, 224.
- Laveissière C., Hervouët J.P., Couret D., Eouzan J.P. & Merouze F. (1985). La campagne pilote de lutte contre la trypanosomiase humaine dans le foyer de Vavoua (Côte d'Ivoire). La mobilisation des communautés rurales et l'application du piégeage. *Cahiers O.R.S.T.O.M., Série Entomologie médicale et Parasitologie*, 23 : 167-185.
- Laveissière C., Sané B. & Garcia A. (2003). Lutte contre la Maladie du Sommeil et Soins de Santé Primaires. *Didactiques. IRD éd*, 243 p.
- Lima P.L., Müller C.M., Holanda A.T., Harhay M., Costa C.H.N. & Costa D.L. (2013). Human immunodeficiency virus/*Leishmania infantum* in the first foci of urban American visceral leishmaniasis: clinical presentation from 1994 to 2010. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(2) : 156-160.
- Lindner AK. & Priotto G. (2010). The Unknown Risk of Vertical Transmission in Sleeping Sickness-A Literature Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(12) : e783.
- Louis. F.J. (2002). Technical reasons for re-emergence of sleeping sickness. *Tropical Medicine and International Health*, 6(5) : 342-347.
- Lumsden W.H.R., Kimber C.D. & Strange M. (1977). *Trypanosoma brucei* : detection of low parasitemias in mice by a miniature anion-exchange/centrifugation technique. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5) : 421-424.
- MacLeod A., Tweedie A., McLellan S., Hope M., Taylor S., Cooper A., Sweeney L., Turner C.M. & Tait A. (2005a). Allelic segregation and independent assortment in *T. brucei* crosses: proof that the genetic system is Mendelian and involves meiosis. *Molecular Biochemical Parasitology*, 143(1) : 12-19.
- MacLeod A., Tweedie A., McLellan S., Taylor S., Hall N., Berriman M., El-Sayed NM., Hope M., Turner CM. & Tait A: (2005b). The genetic map and comparative analysis with the physical map of *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research*, 33(21) : 6688-6693.
- MacLeod A., Tweedie A., Welburn S.C., Maudlin L., Turner C.M. & Tait A. (2000). Minisatellite marker analysis of *Trypanosoma brucei*: reconciliation of clonal,

- panmictic, and epidemic population genetic structures. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 97(24) : 13442-13447.
- Magnus E., Vervoort T., Van Meirvenne N. (1978). A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Annales de la société belge de Médecine Tropicale*, 58(3) : 169-176.
- Maillot L. (1973). Possibilités d'un "xénodiagnostic" dans la maladie du sommeil. *Bulletin de la Société Pathologie exotique*. 66, 291-296.
- Maribel J., González E., Martín-Martín I., Hernández S, Molina R. (2014). Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Veterinary Parasitology*, 202 : 296-300.
- Martin G., Leboeuf A. & Roubaud E. (1909). Rapport de la mission d'études de la maladie du sommeil au Congo français, 1906-1908. *Masson Compagnie*, Paris (France), 721 p.
- Masiga K.D., Smith A.J., Hayes P., Bromidge T.J. & Gibson W.C. (1992). Sensitive detection of Trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *International Journal for Parasitology*, 22 : 909-918.
- Mattioli R.C., Feldmann G., Hendrickx W., Wint J., Jannin J. and Slingenbergh J. (2004). Tsetse and Trypanosomiasis intervention policies supporting sustainable animal-agricultural development. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2 : 310-314.
- Maynard-Smith J., Smith N.H., O'Rourke M. & Spratt B.G. (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy Sciences*, 90(10): 4384-4388.
- McDermott S.M., Luo J., Carnes J., Ranish J.A. & Stuart K. (2016). The architecture of *Trypanosoma brucei* editosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(42) : E6476-E6485.
- Melville S.E., Gerrard C.S. & Blackwell J.M. (1999). Multiple causes of size variation in the diploid megabase chromosomes of African trypanosomes. *Chromosome Research*. 7(3) : 191-203.
- Michels P.A., Hannaert V., Ernest I. & Albert S. (1991). Organisation, structure and evolutionary aspect of genes in trypanosomes. *Biochemical Society Transactions*, 18(5) : 727-729.

- Molina R., Jiménez M.I., Cruz I., Iriso A., Martín-Martín I., Sevillano O., Melero S. & Bernal J. (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 190 : 268-271.
- Moloo S.K. (1981). Effects of maintaining *Glossina morsitans morsitans* on different hosts upon the vector's subsequent infection rates with pathogenic trypanosomes. *Acta Tropica*, 38 : 125-136.
- Morrison L.J., Tait A., McCormack G., Sweeney L., Black A., Truc P., Likeufack A., Turner M. & MacLeod A. (2008). *Trypanosoma brucei gambiense* Type 1 populations from human patients are clonal and display geographical genetic differentiation. *Infection Genetics and Evolution*, 8(6) : 847-854.
- Morrison L.J., Tweedie A., Black A., Pinchbeck G.L., Christley R.M., Schoenefeld A., Hertz-Fowler C., MacLeod A., Turner C.M. & Tait A. (2009). Discovery of mating in the major African livestock pathogen *Trypanosoma congolense*. *PLoS One* 4, e5564.
- Moser D.R., Cook G.A., Diane E.O., Cheryl P.B., Melissa R.M. & Donelson L.E. (1989). Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*, 99: 57-66.
- Mugasa C.M., Laurent T., Schoone G.J., Kager P.A., Lubega G.W & Schallig H.D.F.H. (2009). Nucleic acid sequence-based amplification with oligochromatography for detection of *Trypanosoma brucei* in clinical samples. *Journal Clinical Microbiology*, 47 : 630-635.
- Mugasa C.M., Emily R. Adams., Kimberly R. Boer., Heleen C. Dyserink., Büscher P., Schallig H.D.F.H & Leeflang M.M.G. (2012). Diagnostic accuracy of molecular amplification tests for human African trypanosomiasis-systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6 (1) : e1438.
- Mungube E.O. (2010). Management of trypanocidal drug resistance in cattle in identified chemoresistance hot spots in the administrative District of Sikasso, South- East Mali. Doctoral thesis. *Institute for Parasitology and Tropical in Veterinary Medicine*, 3419 : 195.
- Murray M., Murray P.K. & Mcintyre W.L.M. (1977). An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Transactions of the Royal. Society of Tropical. Medicine and Hygiene*, 71(4) : 325-326.

- Negash M., Girma M. & Seyoum E. (2007). Epizootiological importance of *Glossina morsitans submorsitans* (Diptera: Glossinidae) (Newstead) in the Ghibe River Valley, Southwest Ethiopia. *Acta Tropica*, 102 ; 100-105.
- 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.
- Njitchouang G.R., Njiokou F., Nana-Djeunga H., Asonganyi T. & Fewou-Moundipa P., Cuny G. & Simo G. (2011). A new transmission risk index for human African trypanosomiasis and its application in the identification of sites of high transmission of sleeping sickness in the Fontem focus of southwest Cameroon. *Medical and Veterinary Entomology*, 25(3) : 289-296.
- N'tambi J. & Englund P. (1985). A gap at a unique location in newly replicated kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma equiperdum*. *Journal of Biological Chemistry*, 260(9) : 5574-5579.
- Odiit M., Shaw A., Welburn S.C., Fèvre E.M., Coleman P.G. & McDermott J.J. (2004). Assessing the patterns of health-seeking behaviour and awareness among sleeping sickness patients in eastern Uganda. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 98(4) : 339-348.
- Odongo D., Oura C.A.L., Spooner P., Kiara H., Mburu D., Hanotte O. & Bishop R. (2006). Linkage disequilibrium between alleles at highly polymorphic mini and microsatellite loci of *Theileria parva* isolated from cattle in three regions of Kenya. *International Journal for Parasitology*, 36(8) : 937-946.
- 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 Tropical*, 39 : 307-316.
- Pays E. (1990). L'expression des gènes d'antigène variable chez les trypanosomes africains. *Médecine /sciences*, 6 : 510.
- Pays E. & Berberof M. (1995). Antigènes variables et non variables des trypanosomes africains. *Médecine /sciences*, 11 : 261-267.
- Pays E., Vanhollenbeke B., Vanhamme L., Paturiaux-Hanocq F., Nolan D.P & Pérez-Morga D. (2006). The trypanolytic factor of human serum. *Nat Rev Microbiol*, 4 : 477-486.

- Pays E. & Vanhollebeke B. (2009). Human innate immunity against African trypanosomes. *Current Opinion in Immunology*, 21 : 493–498.
- Peacock L., Ferris V., Sharma R., Sunter J., Bailey M., Carrington M. & Gibson W. (2011). Identification du stade du cycle de vie méiotique de *Trypanosoma brucei* in chez la mouche tsé-tsé. *Actes de l'Académie nationale des sciences*, 108 (9) : 3671-3676.
- Peacock L., Bailey M., Carrington M & Gibson W.C. (2014). Meiosis and haploid gametes in the pathogen *Trypanosoma brucei*. *Current Biology*, 24(2) : 181-186.
- Poitras E. & Houde A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology By The Moroccan Society of Biology in Canada*, 2(2) : 2-11.
- Pollard V.M. & Hadjuk S.L. (1991). *Trypanosoma equiperdum* minicircles encode three distinct primary transcripts which exhibit guide RNA characteristics. *Molecular and cellular biology*, 11(3) : 1668-1675.
- Pyana. P.P., Sere M., Kaboré J., De Meeûs T., MacLeod A., Bucheton B., Van Reet N., Büscher P., Belem G. & Jamonneau V. (2015). Population genetics of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness patients with treatment failures in the focus of Mbuji-Mayi, Democratic Republic of the Congo. *Infection, Genetics and Evolution*, 30 : 128-133.
- Radwanska M., Claes F., Magez S., Magnus E., Perez-Morga D., Pays E., Buscher P. (2002). Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(3) : 289-295.
- Rayaisse J.B., Esterhuize J., Tirados I., Kaba D., Salou E., Diarrassouba A., Vale G.A., Lehane M.J., Torr S.J., Solano P. (2011). Towards an optimal design of target for tsetse control: comparisons of novel targets for the control of Palpalis group tsetse in West Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Dis. 5(9) : e1332.
- Razakandrainibe F.G., Durand P., Koella J.C., De Meeus T., Rousset F., Ayala F.J. & Renaud F. (2005). "Clonal" population structure of the malaria agent *Plasmodium falciparum* in high-infection regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 : 17388-17393.

- R-Core-Team (2018). R A Language and Environment for Statistical Computing, Version 3.3.2 (2016-10-31) ed. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>.
- Rousset F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145 : 1219-1228.
- RGPH-CI. (2014). Recensement général de la population et de l'habitat en Côte d'Ivoire.
- Rudenko G., Blundell P.A., Taylor M.C., Klefth R. & Borst P. (1994). VSG gene expression site control in insect form *Trypanosoma brucei*. *EMBO Journal*, 13(22) : 5470-5482.
- Sadlova J., Seblova V., Votypka J., Warburg A. & Volf P. (2015). Xenodiagnosis of *Leishmania donovani* in BALB/c mice using *Phlebotomus orientalis*: a new laboratory model. *Parasites & Vectors*, 8(1) : 158.
- Sadlova J., Vojtkova B., Hrnčirova K., Lestínova T., Spitzova T., Becvar T., Votypka J., Bates P. & Volf P. (2019). Host competence of African rodents *Arvicanthis neumanni*, *A. niloticus* and *Mastomys natalensis* for *Leishmania major*. *Parasites and wildlife*, 8 : 118-126.
- Saitou N. & Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular. Biology and Evolution*, 4(4) : 406-425.
- Schwenkenbecher J.M., Wirth T., Schour L.F., Jaffe C.L., Schallig H, Al-Jawabreh A, Hamarsheh O., Kifaya A, Pralong F. & Schônian G. (2006). Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *International Journal for Parasitology*, 36 : 237-246.
- Séré M., Kaboré J., Jamonneau V., Belem A.M.G., Ayala F.J. & De Meeûs T. (2014). Null allele, allelic dropouts or rare sex detection in clonal organisms: simulations and application to real data sets of pathogenic microbes. *Parasites & Vectors*, 7(1), 331.
- Séré M., Thévenon S., Belem A.M.G. & De Meeûs, T. (2017). Comparison of different genetic distances to test isolation by distance between populations. *Heredity*, 119 : 55-63.
- 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.

- Simarro P.P., Cecchi G., Franco J.R., Paone M., Fevre E.M., Diarra A., Ruiz-Postigo J.A., Mattioli R.C. & Jannin J.G. (2011). Risk for human African trypanosomiasis, Central Africa, 2000-2009. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12) : 2322-2324.
- Simarro P.P., Cecchi G., Franco J.R., Paone M., Diarra A., Ruiz-Postigo J.A., Fevre E.M., Mattioli R.C. & Jannin J.G. (2012). Estimating and Mapping the Population at Risk of Sleeping Sickness. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10) : e1859.
- Simarro P.P., Franco J.R., Diarra A., Ruiz Postigo J.A. & Jannin J. (2013). Diversity of human African trypanosomiasis epidemiological settings requires fine-tuning control strategies to facilitate disease elimination. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 4 : 1-6.
- Simo G., Njiokou F., Nkinin S., Mgbédié M., Laveissiere C. & Herder S. (2000). Etude de la prévalence des infections à trypanosomes chez les animaux sauvages du foyer de la maladie du sommeil de Bipindi, Cameroun. *Doc. OCEAC*, 33 : 8-15.
- Simo G., Herder S., Njiokou F., Asonganyi T., Tilley A. & Cuny G. (2005). *Trypanosoma brucei* s.l.: Characterisation of stocks from Central Africa by PCR analysis of mobile genetic elements. *Experimental Parasitology*, 110 : 353-362.
- Simo G., Asonganyi T., Nkinin S.W., Njiokou F. & Herder S. (2006). High prevalence of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 in pigs from the Fontem sleeping sickness focus in Cameroon. *Veterinary Parasitology*, 139(1-3) : 57-66.
- Simo G., Cuny G., Demonchy R. & Herder S. (2008). *Trypanosoma brucei gambiense*: study of population genetic structure of Central African stocks using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Experimental Parasitology*, 118 : 172-180.
- Simo G., Njiokou F., Tume C., Lueong S., De Meeûs T., Cuny G. & Asonganyi T. (2010). Population genetic structure of Central African *Trypanosoma brucei gambiense* isolates using microsatellite DNA markers. *Infection Genetics and Evolution*, 10(1) : 68-76.
- Simo G., Njitchouang GR., Njiokou F., Cuny G. & Asonganyi T. (2011). *Trypanosoma brucei* s.l.: microsatellite markers revealed high level of multiple genotypes in the mid-guts of wild tsetse flies of the Fontem sleeping sickness focus of Cameroon. *Experimental Parasitology*, 128 : 272-278.
- Simo G., Silatsa B., Njiokou F., Lutumba P., Mansinsa P., Madinga J., Manzambi E., De Deken R. & Asonganyi T. (2012). Identification of different trypanosome species in the

- mid-guts of tsetse flies of the Malanga (Kimpese) sleeping sickness focus of the Democratic Republic of Congo. *Parasites & Vectors*, 5(1) : 201.
- Simo G., Fogue P.S., Melachio T.T., Njiokou F., Kuate J.R. & Asonganyi T. (2014). Population genetics of forest type of *Trypanosoma congolense* circulating in *Glossina palpalis palpalis* of Fontem in the South-West region of Cameroon. *Parasites and Vectors*, 7(1) : 385.
- Simpson L. (1987). The mitochondrial genome of Kinetoplastida protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Annual Review of Microbiology*, 41 : 363-382.
- Simukoko H., Marcotty T., Phiri I., Geysen D., Vercruysse J. & Van den Bossche. (2007). The comparative role of cattle, goats and pigs in the epidemiology of livestock trypanosomiasis on the plateau of eastern Zambia. *Veterinary Parasitology*, 147 : 231-238.
- Singh B. (1997). Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal for Parasitology*, 27 :1135-1145.
- Sugisaki H. & Le Ray D. (1987). Kinetoplast DNA minicircles of the insect *Trypanosomatid Crithidia fasciculata* contain two nearly identical 173 bp and 177 bp sequences involved in DNA replication. *Molecular and biochemical parasitology*, 23(3) : 253-263.
- Solano P., Duvallet G., Dumas V., Cuisance D. & Cuny G. (1997). Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Tropica*, 65(3) : 175-180.
- Tait A., MacLeod A., Tweedie A., Masiga D. & Turner C.M.R. (2007). Genetic exchange in *Trypanosoma brucei* : Evidence for mating prior to metacyclic stage development. *Molecular Biochemical Parasitology*, 151(1-4), 133-136.
- Tait A., Morrison L.J., Duffy C.W. Cooper A., Turner C.M. & Macleod A. (2011). Trypanosome genetics: populations, phenotypes and diversity. *Veterinary Parasitology*, 181 : 61-68.
- Takezaki N. & Nei M. (1996). Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 144 : 389-399.
- Tibayrenc M., Kjellberg F. & Ayala, F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa : the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*,

- Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 : 2414-2418.
- Tibayrenc M. & Ayala F.J. (1991). Towards a population genetics of microorganisms : the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitology Today*, 7 : 228-232.
- Tibayrenc M. (1999). Toward an integrated genetic epidemiology of parasitic protozoa and other pathogens. *Annual. Review. Genetics*, 33(1) : 449-77.
- Trindade S., Rijo-Ferreira F., Carvalho T., Pinto-Neves D., Guegan G., Aresta-Branco F., Bento F., Young S.A., Pinto A., Van Den Abbeele J., Ribeiro R.M., Dias S., Smith T.K. & Figueiredo L.M. (2016). *Trypanosoma brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. *Cell Host & Microbe*, 19 : 1-12.
- Triolo N., Trova P., Fusco C. & Le Bras J. (1985). [Report on 17 years of studies of human African trypanosomiasis caused by *T. b gambiense* in children 0-6 years of age]. *Medecine Tropicale* (Mars), 45 : 251–257.
- Truc P., Mathieu-Daude F. & Tibayrenc M. (1991). Multilocus isozyme identification of *Trypanosoma brucei* stocks isolated in central Africa: evidence for an animal reservoir of sleeping sickness in Congo. *Acta Tropica*, 49 : 127-135.
- Truc P., Jamonneau V., Cuny G. & Frezil J.L. (1999). Use of polymerase chain reaction in human African trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9) : 745.
- Truc P., Tiouchichine M.L., Cuny G., Vatunga G., Josenando T., Simo G. & Herder S. (2012). Multiple infections of *Trypanosoma brucei gambiense* in blood and cerebrospinal fluid of human African trypanosomiasis patients from Angola: consequences on clinical course and treatment outcome. *Infection Genetics Evolution*, 12 : 399-402.
- Uilenberg G. (1998). A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomiasis. Rome, Italie, FAO, 158 p.
- Van Hoof L., Henrard C. & Peel E. (1937). Rôle du porc comme réservoir de *Trypanosoma gambiense*. *Comptes Rendus de la Société de Biologie*, 126 : 72-75.
- Van Den Bossche P., Ky-Zerbo A., Brandt J., Marcotty T., Geerts S. & De Deken R. (2005). Transmissibility of *Trypanosoma brucei* during its development in cattle. *Tropical Medicine and International Health*, 10(9) : 833-839.

- Vanhollebeke B. & Pays E. (2010). The trypanolytic factor of human serum: many ways to enter the parasite, a single way to kill. *Molecular Microbiology*, 76 (4) : 806-814.
- Van Meirvenne N., Magnus E. & Büscher P. (1995). Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Tropica*, 60 : 189-199.
- Vickerman K. & Preston T.M. (1970). Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *Journal of cell sciences*, 6(2) : 365-383.
- Wang C., Schroeder K.B. & Rosenberg N.A. (2012). A maximum-likelihood method to correct for allelic dropout in microsatellite data with no replicate genotypes. *Genetics*, 192 : 651-669.
- Welburn S.C., Coleman P.G., Maudlin I., Fèvre E.M, Odiit M . & Eisler M.C. (2006). Crisis, what crisis? Control of Rhodesian sleeping sickness. *Trends in Parasitology*, 22(3) : 123-128.
- Wells J.M., Prospero D., Jenni L. & Le Page R.W.F. (1987). DNA contents and molecular karyotypes of hybrid *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, 24(1) : 103-116.
- WHO. (1998). Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization. *WHO Technical Report Series* 881: 119p.
- WHO. (2012). Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: a roadmap for implementation. Geneva, World Health Organization.
- WHO. (2013). Control and surveillance of human African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. *WHO technical report series*, no. 984 : 1-250.
- WHO. (2014). «Trypanosomiase humaine africaine: lutte et surveillance, Rapport d'un comité d'experts de l'OMS», Genève, Suisse. Organization 2000-2009: the way forward. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5 : e 1007.
- WHO. (2019). WHO interim guidelines for the treatment of gambiense human African trypanosomiasis. *Neglected Tropical Diseases*, 44 p.
- Wickstead B., Ersfeld K. & Gull K. (2004). The Small Chromosomes of *Trypanosoma brucei* Involved in Antigenic Variation Are Constructed Around Repetitive Palindromes. *Genome Research*, 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 Trop.*27, 384-386. Zambia. *Veterinary Parasitology*, 147 : 231-238.
- Wright S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 19 : 395-420.
- Yoni W., Bila C., Bouyer J., Desquesnes M. & Kaboré I. (2005). La dissection des glossines ou mouches tsé-tsé. Santé animale en Afrique de l'Ouest, Fiche N° 23.

ANNEXES

Annexe I : Questionnaires épidémiologiques et cliniques

Centre de prospection Date

Etat civil

Nom :

Prénom :

Age : Sexe : Ethnie : Profession :

Info socio-sanitaire

Depuis quand faites-vous de l'élevage ?.....

Avez-vous déjà participé à une séance de dépistage de la THA ?.....Quand ?.....

Lieu : Résultat :

Actuel ou ancien trypanosomé dans la famille proche :..... Leur nombre :

Leur date de dépistage : La période de la maladie :.....

Lien de parenté :

Leur lieu de résidence :

Autre remarques

.....
.....
.....
.....

Questionnaires épidémiologiques sur l'animal

Code identifiant l'animal (première lettre de la localité B/S ; chiffre correspondant au rang du propriétaire, première lettre de l'espèce, numéro d'ordre des animaux (01, 02, ...))

Espèce

Etat général de la santé :

➤ Bon état général

➤ Passable

➤ Mal en point

Ganglion (présence/absence)

Lieu de pâturage :

➤ Saison sèche

➤ Saison humide

Suivi sanitaire :

➤ Traitement reçu

➤ Fréquence

Test parasitologiques

BCT - + Nombre de trypanosomes :

Annexe II : Caractéristiques des souches de référence utilisées pour le génotypage

Souches	Hôte	Origine	Année d'isolement	Espèce	Références
P26F	Porc	Cameroun	1998	Tbg1	Nkinin et al. (2002)
D12k	Mouton	Congo	1980	Tbg1	Godfrey et al. (1990)
SW94.87	Porc	RDC	1987	Tbb	Truc et al. (1991)
DC8	Porc	Côte d'Ivoire	2001	Tbb	Jamonneau et al. (2004)
DC9	Porc	Côte d'Ivoire	2001	Tbb	Jamonneau et al. (2004)
EATRO1125	Antilope	Ouganda	1966	Tbb	Gibson et al.(1980)
P11F	Porc	Cameroun	1998	Tbb	Simo et al. (2005)
P17F	Porc	Cameroun	1998	Tbb	Nkinin et al. (2002)
GAOUA89	Zébu	Burkina-Faso	1989	Tbb	Simo et al. (2005)
FEO	Humain	Togo	1961	Tbb	ait et al. (1984)
STIB 215	Lion	Tanzanie	1971	Tbb	Gibson et al. (1980)
107.4	Humain	Côte d'Ivoire	1997	Tbg1	Jamonneau et al (2000)
BAT62	Humain	RCA	1999	Tbg1	Njokou et al. (2004)
BIP01	Humain	Cameroun	1999	Tbg1	Njokou et al. (2004)
B4.K5	Humain	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	Non publiée
B4.Y221	Humain	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	Non publiée
B4C191	Humain	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	Non publiée
B4F303	Humain	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	Koffi et al.(2007)
B4.U163	Humain	Côte d'Ivoire	2004	Tbg1	Koffi et al.(2007)
JUA	Humain	Cameroun	1979	Tbg1	Stevens et al. (1992)
A005	Humain	Cameroun	1988	Tbg1	Stevens et al.(1992)
OK/ITMAP	Humain	Congo	1974	Tbg1	Stevens et al. (1992)
BOLEKO1132	Humain	Congo	1996	Tbg1	Njokou et al. (2004)

Souches	Hôte	Origine	Année d'isolement	Espèce	Références
DIBBY EUG	Humain	Côte d'Ivoire	1998	Tbg1	Jamonneau et al. (2000)
TSW65	Porc	Côte d'Ivoire	1982	Tbb	Stevens et al.(1992)
TSW53	Porc	Côte d'Ivoire	1982	Tbb	Stevens et al.(1992)
ABBA	Humain	Côte d'Ivoire	1983	Tbg2	Hide et al. (1990)
MURAZ03	Humain	Côte d'Ivoire	1979	Tbg2	Godfrey et al. (1987)
TH2	Humain	Côte d'Ivoire	1978	Tbg2	Mehlitz et al. (1982)
IL3000	Bœuf	Kenya	1966	Tcs	Gibson et al. (2012)
IL1180	Lion	Tanzanie	1971	Tcs	Gibson et al. (2012)

RDC: République démocratie du Congo, RCA: République de la Centre Afrique, Tbg1: *Trypanosoma brucei gambiense* group 1, Tbg2:

Trypanosoma brucei gambiense group 2, Tbb: *Trypanosoma brucei brucei*, *T.b s.l*: *Trypanosoma brucei* s.l., Tcs: *Trypanosoma congolense savane*

Annexe III : Quantité des produits chimiques pour la composition du milieu Cunningham

	1 g/L	2 g/L
Ca Cl ₂ 2H ₂ O	0,150	0,300
DISSOUDRE DANS H₂O/L	0,050	0,100
Mg SO ₄ 7H ₂ O	3,700	7,400
MgCl ₂ 6H ₂ O	3,050	6,100
KCl	2,980	5,960
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,550	1,100
Hépès	4,770	9,540
DISSOUDRE DANS H₂O/L	0,100	0,200
fumaric acid	0,580	1,160
A-ketoglutaric acid (+4°C)	0,440	0,880
succinic acid	0,590	1,180
L(-) malic acid	0,130	0,260
DISSOUDRE DANS H₂O/L	0,090	0,180
D(-) fructose	0,360	0,720
D(+) glucose	0,720	1,440
Sucrose	0,340	0,680
DISSOUDRE DANS H₂O/L	0,050	0,100
L-asparagine	0,050	0,100
L-aspartic acid	0,100	0,200
L-arginine (HCl)	0,050	0,100
DL-alanine	1,200	2,400
L-alanine	2,200	4,400
L-cystine (2HCl)	0,030	0,060
L-cystéine (HCl)	0,130	0,260
DL-glutamic acid	0,020	0,040
Glycine	0,200	0,400
L-glutamine	1,460	2,920
L-histidine (HCl)	0,010	0,020
DL-isoleucine	0,180	0,360
L-phénylalanine	0,100	0,200
L-lysine (HCl)	0,100	0,200
L-leucine	0,180	0,360
DL-méthionine	0,100	0,200
L-proline (*)	1,500	3,000
DL-sérine	0,050	0,100
DL-thréonine	0,010	0,020
L-tyrosine	0,200	0,400
Taurine	0,200	0,400
L-tryptophan	0,130	0,260
DL-valine	0,050	0,100
DISSOUDRE DANS H₂O/L	0,650	1,300
	0,940	1,880
Vitamines (BME*100) /ML	2,000	4,000
rouge de phénol	0,020	0,040
Milieu sans glutamine , rajouter		
L-Glutamine stabilisée (+4°C)	50 ml	
Filtrer / 0,2u		
nb. Flacons 1l / 800 ml	1	2
nb. Flacons 0,5l / 400 ml		1

nb. Flacons 0,25 /200 ml		
<i>Stocker / -20°C</i>		
Gentamycine (50 mg/ml) /ML	0,200	0,400

Pour dissoudre la L-Proline, descendre à pH3 avec HCl et rééquilibrer avec NaOH à pH 7,2

Annexe IV : Protocole du Kit d'extraction QIAGEN

- 1- Dans des tubes de 1,5 mL, recueillir 500 µL de sang, puis ajouter 500 µL d'eau pure.
- 2- Vortexer 10 secondes pendant 10 min et centrifuger les tubes à 6000 rpm pendant 3 min.
- 3- Virer le surnageant et resuspendre le culot en vortexant rapidement.
- 4- Ajouter 20 µL de protéine K puis compléter le volume par ajout de 150 µL de PBS pour un volume total de 200 µL.
- 5- Vortexer et centrifuger 10 secondes pour faire tomber le liquide.
- 6- Ajouter 200 µL de tampon AL dans les tubes.
- 7- Vortexer vigoureusement et incuber à 56°C pendant 20 min au maximum. Après l'incubation, centrifuger pour faire tomber le liquide.
- 8- Ajouter 200 µL d'éthanol 100 %, vortexer et centrifuger pour faire tomber le liquide.
- 9- Transférer à l'aide des pipettes le contenu des tubes dans des colonnes numérotés.
- 10- Centrifuger la totalité à 13000 rpm, 1 min.
- 11- Jeter les collecteurs et récupérer les colonnes dans de nouveaux collecteurs.
- 12- Ajouter 500 µL de tampon AW1 et centrifuger à 13000 rpm, 1min.
- 13- Récupérer à niveau les colonnes sur des nouveaux collecteurs.
- 14- Ajouter 500 µL de tampon AW2 et centrifuger à 14000 rpm pendant 3 min.
- 15- Vider les collecteurs, replacer les colonnes et centrifuger à 14000 rpm pendant 1min.
- 16- Les colonnes sont maintenant posées sur les tubes dans lesquels sera élué l'ADN.
- 17- Ajouter 100 µL de tampon AE et laisser incuber 5 min à température ambiante.

- 18- Centrifuger à 14000 rpm pendant 1min puis remettre 100 μ L de tampon AE dans les colonnes, incubé 5 min à température ambiante.
- 19- Centrifuger à 14000 rpm pendant 1min.
- 20- Récolter 200 μ L d'éluât à la fin de la manipulation.

Annexe V : REA 1 de la plaque ADN n° A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	TH2O

Annexe VI: Conditions d'amplification PCR de l'ADN

Phases	Températures	Durée
Dénaturation initiale	95°C	3 minutes
Dénaturation	95°C	30 secondes
Ajustement 10 cycles	60°C	30 secondes
	59°C	
	58°C	
	72°C	1 minute
Dénaturation	95°C	30 secondes
Amplification 30 cycles	55°C	30 secondes
	54°C	
	53°C	
	72°C	1 minute
Elongation finale	72°C	5 minutes
Maintien	14°C	Fin

Annexe VII : Panel de trois et de quatre marqueurs microsatellites

1 μ L de PCR Misatg4

1 μ L de PCR
Misatg9 VIC

1 μ L de PCR
Micbg6

97 μ L de H₂O

REA2

2 μ L de PCR
TBG21 FAM

2,5 μ L de PCR TBG03 NED

2 μ L de PCR
TBG02 VIC

3,5 μ L de PCR TBG15 PET

22 μ L de H₂O

ARTICLES

RESEARCH ARTICLE

The study of trypanosome species circulating in domestic animals in two human African trypanosomiasis foci of Côte d'Ivoire identifies pigs and cattle as potential reservoirs of *Trypanosoma brucei gambiense*

Martial Kassi N'Djetchi¹, Hamidou Ilboudo², Mathurin Koffi¹, Jacques Kaboré^{2,3}, Justin Windingoudi Kaboré², Dramane Kaba⁴, Fabrice Courtin^{4,5}, Bamoro Coulibaly⁴, Pierre Fauret^{4,5}, Lingué Kouakou⁶, Sophie Ravel⁶, Stijn Deborggraeve⁷, Philippe Solano⁵, Thierry De Meeûs⁵, Bruno Bucheton⁵, Vincent Jamonneau^{4,5*}



OPEN ACCESS

Citation: N'Djetchi MK, Ilboudo H, Koffi M, Kaboré J, Kaboré JW, Kaba D, et al. (2017) The study of trypanosome species circulating in domestic animals in two human African trypanosomiasis foci of Côte d'Ivoire identifies pigs and cattle as potential reservoirs of *Trypanosoma brucei gambiense*. PLoS Negl Trop Dis 11(10): e0005993. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005993>

Editor: Marleen Boelaert, Institute of Tropical Medicine, BELGIUM

Received: April 16, 2017

Accepted: September 25, 2017

Published: October 18, 2017

Copyright: © 2017 N'Djetchi et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded by Programme d'Appui à l'Enseignement supérieur/Union Economique et Monétaire Ouest Africaine (<http://www.uemoa.int/>) to MK. This study also received support from a World Health Organization (WHO) - Institut de Recherche pour le Développement (IRD)

1 Laboratoire des Interactions Hôte-Microorganisme-Environnement et Evolution, Unité de Formation et de Recherche Environnement, Université Jean Lorougnon Guédé, Daloa, Côte d'Ivoire, **2** Unité de recherches sur les bases biologiques de la lutte intégrée, Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, **3** Unité de Formation et de Recherche Sciences et Techniques, Université Nazi Boni, Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso, **4** Unité de Recherche « Trypanosomoses », Institut Pierre Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire, **5** Unité Mixte de Recherche IRD-CIRAD 177, INTERTRYP, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France, **6** Programme National d'Élimination de la Trypanosomose Humaine Africaine, Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique, Abidjan, Côte d'Ivoire, **7** Biomedical Sciences Department, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium

* Vincent.jamonneau@ird.fr

Abstract

Background

Important control efforts have led to a significant reduction of the prevalence of human African trypanosomiasis (HAT) in Côte d'Ivoire, but the disease is still present in several foci. The existence of an animal reservoir of *Trypanosoma brucei gambiense* may explain disease persistence in these foci where animal breeding is an important source of income but where the prevalence of animal African trypanosomiasis (AAT) is unknown. The aim of this study was to identify the trypanosome species circulating in domestic animals in both Bonon and Sinfra HAT endemic foci.

Methodology/Principal findings

552 domestic animals (goats, pigs, cattle and sheep) were included. Blood samples were tested for trypanosomes by microscopic observation, species-specific PCR for *T. brucei* s.l., *T. congolense*, *T. vivax* and subspecies-specific PCR for *T. b. gambiense* and *T. b. gambiense* immune trypanolysis (TL). Infection rates varied significantly between animal species and were by far the highest in pigs (30%). *T. brucei* s.l. was the most prevalent trypanosome species (13.7%) followed by *T. congolense*. No *T. b. gambiense* was identified by PCR

collaborative project to VJ, MK, DK, HI, and JK are supported by the "Jeunes Equipes AIRD" JEAJ program (ERHATryp project). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

while high TL positivity rates were observed using *T. b. gambiense* specific variants (up to 27.6% for pigs in the Bonon focus).

Conclusion

This study shows that domestic animals are highly infected by trypanosomes in the studied foci. This was particularly true for pigs, possibly due to a higher exposure of these animals to tsetse flies. Whereas *T. brucei* s.l. was the most prevalent species, discordant results were obtained between PCR and TL regarding *T. b. gambiense* identification. It is therefore crucial to develop better tools to study the epidemiological role of potential animal reservoir for *T. b. gambiense*. Our study illustrates the importance of "one health" approaches to reach HAT elimination and contribute to AAT control in the studied foci.

Author summary

In Africa, significant efforts to control human African trypanosomiasis (HAT) over the past three decades have drastically reduced the prevalence of the disease and elimination seems today an achievable goal. However, potential animal reservoirs of *Trypanosoma brucei gambiense* may compromise this ambitious objective. In the Bonon and Sinfra HAT endemic foci in Côte d'Ivoire, no recent data are available about the prevalence of animal African trypanosomiasis (AAT). The aim of this study was to identify trypanosomes circulating in domestic animals in these two HAT foci using serological, parasitological and molecular tools. We showed that *T. brucei* s.l. and *T. congolense* were the most prevalent trypanosome species and that pigs and cattle were the most infected animals. Discordant results were observed between the *T. b. gambiense* specific molecular and serological tools and the presence of an animal reservoir for *T. b. gambiense* remains unclear. Nevertheless, improved control strategies can be proposed based on this study to reach HAT elimination and contribute to AAT control in the study areas.

Introduction

Human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is a vector borne parasitic disease caused by *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) in West and Central Africa and *T. b. rhodesiense* in East Africa. *T. b. gambiense* is responsible for 98% of all HAT cases reported in the last decade and remains an important public health concern in sub-Saharan Africa [1]. However, with less than 3000 cases reported in 2015 [2], HAT elimination seems an achievable goal [3]. A similar situation occurred in the 1960s but, after an early sense of victory, the disease reemerged. *Gambiense* HAT is generally considered as an anthroponotic disease, but the absence of animal reservoirs has never been demonstrated. The existence of an animal reservoir for *T. b. gambiense* could be one of the factors that causes reemergence of the disease after successful control campaigns [4].

In Côte d'Ivoire, significant efforts to control the disease over the past three decades have been made and drastically reduced the prevalence of HAT [5]. The last epidemic was contained in the Sinfra and Bonon foci at the early 2000s [6–8]. Despite continuous control efforts, few HAT cases are still passively diagnosed from these two foci as well as from historical foci of the Western-Centre part of the country [7–9]. Transmission persistence may be due to the

existence of a residual chronic human and/or animal reservoir of *T. b. gambiense* in these areas where tsetse flies are still present [10–13].

Several studies have highlighted the importance of wild and domestic animals in the transmission cycle of *T. b. rhodesiense* [14,15], but this is still under debate for *T. b. gambiense*. Noteworthy, the presence of *T. b. gambiense* in domestic and wild animals have been reported in Cameroun [16] and Equatorial Guinea [17–19]. In Côte d'Ivoire, such studies are scarce and the last report dates from the early 2000s in which the authors investigated the presence of trypanosomes in pigs in the Bonon HAT focus. High prevalence of *T. brucei* s.l. was observed but the presence of *T. b. gambiense* in this animal species remained unclear [20]. It is crucial to increase the efforts in studying the existence of an animal reservoir of *T. b. gambiense* as this could compromise HAT elimination.

No data are available regarding the prevalence of *T. b. brucei*, *T. congolense* and *T. vivax* animal African trypanosomiasis (AAT), in the Bonon and Sinfra foci, despite that animal breeding represents an increasing source of food and income in these areas with high human population densities.

In the context of the one health approach that was recently suggested for HAT and AAT control [21], the aim of the present study was to characterize trypanosomes circulating in domestic animals in the HAT foci of Bonon and Sinfra in Côte d'Ivoire. We used *Trypanosoma* species-specific PCR assays, microsatellite genotyping and immune trypanolysis (IT) with three variant antigenic types (VAT) of which two are specific for *T. b. gambiense* [22]. We show that *T. brucei* s.l. and *T. congolense* were the most prevalent trypanosome species in the two foci and that pigs and cattle were the most infected animals, with *T. brucei* s.l. and *T. congolense* respectively. Discordant results were observed between the *T. b. gambiense* specific PCR and IT tests and the existence of an animal reservoir of *T. b. gambiense* thus remains unclear.

Materials and methods

Study area

The study was carried out in September/October 2013 in the Sinfra and Bonon areas, which are located in the western-central part of Côte d'Ivoire (Fig 1). In recent decades, the mesophyle forest has been progressively replaced by cash crops (mainly cocoa and coffee, but also bananas, cassava, rice and yam) leading to a favorable environmental context for HAT development in these areas [23]. The evolution of HAT prevalence in Côte d'Ivoire is well documented since the 1950s. The number of cases diagnosed from 2000 to 2010 (Fig 1A) shows that these two foci were the most endemic during this period. Control efforts conducted from 1995 till present could largely contain the epidemic [7,11] but few cases are still passively diagnosed each year [2]. Based on the last 10 HAT cases who were diagnosed from 2011 to 2013, we identified 8 and 10 study sites in the Sinfra and Bonon foci, respectively (Fig 1B). These 18 study sites (less than 10 km from the last detected HAT cases) are expected to be those where transmission is still active and where we had the highest chance to detect *T. b. gambiense* in domestic animals.

We focused our study on cattle (Zebu), goats, sheep and pigs since they are the most common domestic animals in the study areas. They are mainly bred in the periphery of villages or along the small rivers crossing the villages, where tsetse flies are often abundant [10,12,24–26]. Generally, sheep, goats and cattle freely graze during the day and are kept in enclosures at night while pigs freely roam day and night.

Sample collection and parasitological investigation in the field

For each animal, 5ml of blood was taken from the jugular vein. Parasitological diagnosis was performed in the field by microscopic examination using the buffy coat technique (BCT) [22].

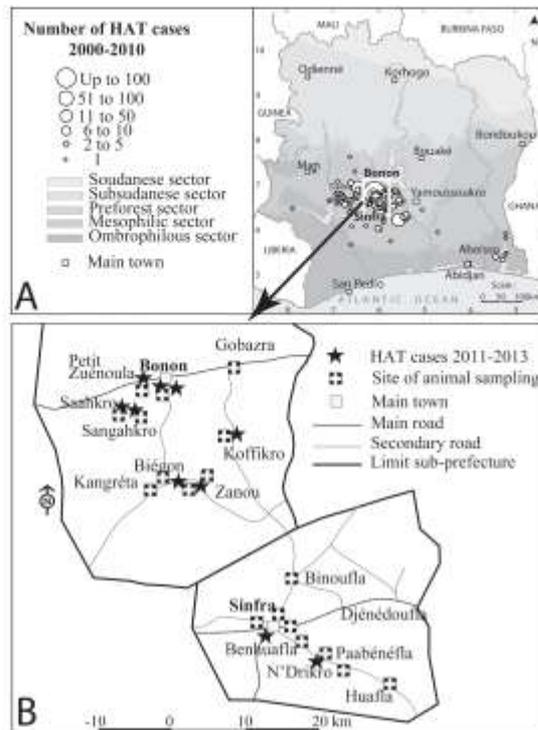


Fig 1. The study areas and sites of animal sampling. A. Localization of the Bonon and Sinfra foci which reported the highest number of HAT cases diagnosed from 2000 to 2010 in Côte d'Ivoire. B. Localization of the last HAT cases diagnosed from 2011 to 2013 and the sites of domestic animals sampling in the Bonon and Sinfra foci. This figure was created by the mapping service of our team based at Institut Pierre Richet (Bouaké, Côte d'Ivoire) specifically for this manuscript.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005993.g001>

BCT was considered positive when trypanosomes could be visually detected regardless of the species. In addition, 1 ml of plasma and 1 ml of blood were aliquoted and immediately frozen at -20°C during transport and subsequently at -80°C in the lab for PCR and immune trypanolysis testing.

PCR analysis

DNA from 500 µL of blood was extracted using the DNeasy Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) as described previously [28] and subjected to diagnostic PCR assays using *Trypanosoma* species specific primers for *T. brucei* s.l. (TBR1-2) [29], *T. congolense* forest type (TCF1-2) [30], *T. congolense* savannah type (TCS1-2) [31], *T. vivax* (TVW1-2) [30]. Positives samples for *T. brucei* s.l. were tested for *T. b. gambiense* using primers targeting the TgsGP gene [32]. All PCR reactions were carried out using 5 µL of DNA template in a reaction volume of 50 µL. 1xPCR

reaction buffer comprising 0.2 mM of dNTP, 0.2 μM of each primer and 2.5 U of Taq polymerase. A positive control was added to the corresponding PCR and distilled water was used as negative control. The PCR products were visualized by electrophoresis in a 2% agarose gel stained with GelRed and illuminated with UV light.

Microsatellite genotyping

Samples positive in the *T. brucei* s.l. specific TBR PCR were further characterized by seven microsatellite markers Ch1/18, Ch1/D2/7 [33], M6C8 [34], Micbg5, Micbg6, Misatg4, Misatg9 [35], as previously described [36]. Reference stocks of *T. b. gambiense* (n = 18), *T. b. gambiense* group 2 (n = 3), *T. b. brucei* (n = 1) and *T. b. rhodesiense* (n = 1) were included. A neighbor-joining tree was computed under multiple sequence alignment (MSA) [32] with Mega 5 [38] on a Cavalli-Sforza and Edward's chord distance matrix [39] as recommended by Takezaki et al. [40].

Trypanolysis test

Plasma samples were analyzed with the immune trypanolysis test (TL) using cloned populations of *T. b. gambiense* variant antigen type (VATs) LiTat 1.3, LiTat 1.5 and LiTat 1.6 as previously described [22,41]. LiTat 1.3 and LiTat 1.5 VATs are reported to be specific for *T. b. gambiense*, while LiTat 1.6 VAT can both be expressed in *T. b. gambiense* and *T. b. brucei* [22].

Statistical analysis

All statistical analyses were done with JMP11 (SAS Institute). Proportions of positive animals for BCT, PCR and TL were compared regarding foci and host species using the Chi-square analysis.

Ethics statement

Sample collection was conducted within the framework of epidemiological surveillance activities supervised by the HAT National Elimination Program (HAT NEP). No ethical statement is required by local authorities. Any veterinarian may carry out blood sampling on domestic animals, with the authorization of the owner, as it is performed during prophylaxis or diagnostic campaign. No samples other than those for routine screening and diagnostic procedures were collected. Breeders gave their consent for animal sampling after explaining the objectives of the study. For animal care, venous sampling was performed by a veterinary of the Laboratoire National d'Appui au Développement Rural (Ministry of Agriculture). A deworming treatment (Bolumisol, Laprovet) was provided free to all animals sampled and those positive with BCT were treated for trypanosomiasis.

Results

In total, 552 animals were sampled of which 251 from Bonon and 301 from Sinfra as presented in Table 1.

Parasitology

Out of the 552 animals sampled, 57 trypanosome infections (10.3%) were detected by BCT (Table 2). Highest prevalence was observed in pigs ($p < 0.0001$) with a prevalence of almost 30%. No significant differences were observed between the two foci in the infection rates (Fig 2A).

Table 1. Number of domestic animals sampled by species and foci.

	Bonon	Sinfra	Total
Cattle	35	52	87
Goats	47	89	136
Sheep	92	100	192
Pigs	77	60	137
Total	251	301	552

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005993.t001>

Molecular diagnosis

No animals were positive with the TCS specific primers. In total, 109 trypanosome infections (19.7%) were detected with at least one PCR (TBR, TCF or TVW) with the highest prevalence observed in pigs (41.6%, Table 2). *T. brucei* s.l. was the most prevalent trypanosome species (13.8%) followed by *T. congolense* forest type (8.5%) and *T. vivax* (2.4%). No *T. vivax* infection was detected in pigs. Mixed infections with positive results in at least two different PCR assays were observed in 29 animals. Most were mixed infections with *T. brucei* s.l. / *T. congolense* forest type and mainly observed in pigs (59%).

TBR, TCF and TVW PCR results for the different hosts in both foci are presented in Fig 2B, 2C and 2D. Pigs and cattle showed higher TBR and TCF-PCR positivity rates compared to sheep and goats. No significant differences were observed between the two foci except for TBR PCR positivity rates in cattle. The highest PCR positivity rate was observed in pigs in Sinfra (43.3%). All 76 DNA samples positive in the TBR PCR were further analyzed with the *T. b. gambiense* specific TgsGP PCR and all were negative.

Microsatellite genotyping

Among the 76 DNA samples positive in the TBR PCR, only 10 showed amplification in the microsatellite genotyping assays. The NJTree presented in Fig 3 presents a classical shape (e.g. [12]) with one monophyletic lineage that gathers all *T. b. gambiense* reference stocks and rake for other subspecies. No trypanosome genotypes from the domestic animals sampled in Bonon and Sinfra foci are members of this *T. b. gambiense* lineage.

Trypanolysis

Trypanolysis results for the three VAT types per host in the two foci are presented in Fig 4. No TL positive results were observed in goats and sheep with LiTat 1.3 and 1.5 VAT in both foci and only two goats and two sheep were positive with the LiTat 1.6 VAT. The LiTat 1.6 TL assay showed high positivity rates (more than 35%) in pigs in both foci and in cattle (more than 40%) in the Bonon focus, confirming the PCR-TBR results. We observed the same pattern, but with lower positivity rates, in the *T. b. gambiense*-specific LiTat 1.3 and 1.5 TL assays (0% for both 1.3 and 1.5 in cattle in Sinfra, 17.6 and 5.9% for 1.3 and 1.5 respectively in cattle

Table 2. BCT and PCR results per host species (percentage are given in brackets).

Host	BCT	TBR+TCF+TVW PCR	TBR PCR	TCF PCR	TVW PCR
Cattle	5 (5.75)	22 (25.28)	15 (17.24)	9 (10.34)	3 (3.45)
Goats	2 (1.47)	9 (6.61)	3 (2.21)	5 (3.68)	1 (0.73)
Sheep	9 (4.69)	21 (10.93)	8 (4.17)	9 (4.69)	9 (4.69)
Pigs	41 (29.93)	57 (41.6)	50 (36.50)	24 (17.52)	0 (0)
Total	57 (10.33)	109 (19.74)	76 (13.77)	47 (8.51)	13 (2.35)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005993.t002>

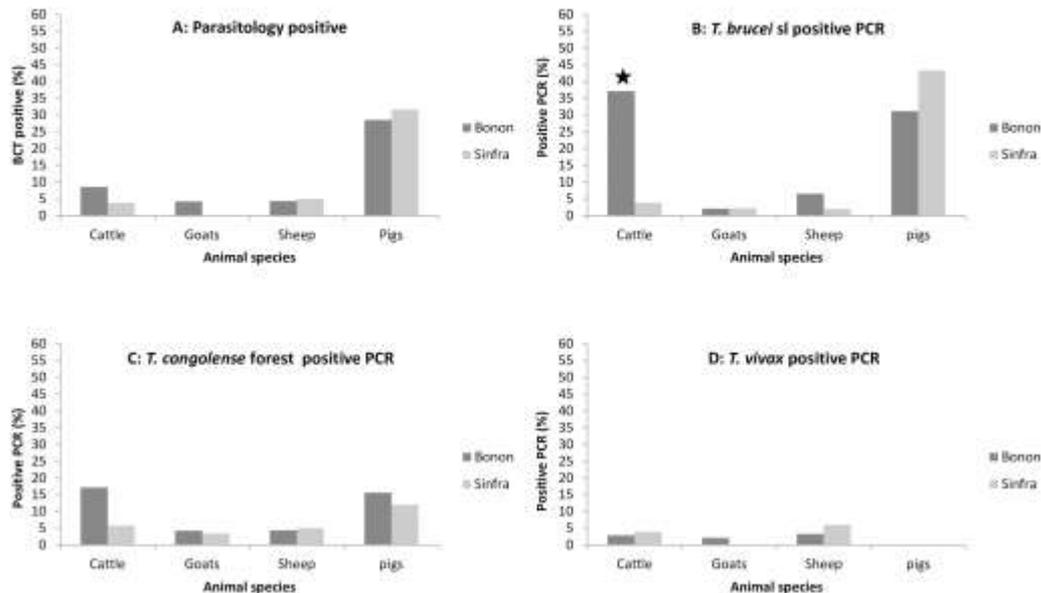


Fig 2. Parasitological and PCR results. Proportion of BCT (2A), *T. brucei* s.l. TBR-PCR (2B), *T. congolense* forest type TCF-PCR (2C) and *T. vivax* TVW-PCR (2D) positive results on the total sample collection for each host in the two foci. A significant difference between Bonon and Sinfra is indicated by a star.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005993.g002>

in Bonon and between 15.8 and 27.6% for both 1.3 and 1.5 in pigs in the two foci). The difference observed in cattle between Bonon and Sinfra is significant for Litat 1.3.

The distribution of LiTat 1.3 and/or LiTat 1.5 TL positive results in cattle (7 individuals = 8%) and pigs (39 individuals = 28.5%) is given in Table 3. Out of the seven cattle which tested positive to either LiTat 1.3 or LiTat 1.5, only one was positive to both variants (13.3%). This proportion was much higher in pigs with 21 of 39 (53.9%) positive animals tested positive to both variants. From these 21 pigs, 15 (10.9%) were also positive to LiTat 1.6 and thus positive to the three VAT types. Animals testing positive to LiTat 1.6 only were also observed for all domestic animal species but with higher proportion in cattle (13.8%) and pigs (22.6%). Nineteen of the 46 samples (43.3%) testing positive to Litat1.3 and/or 1.5 were negative in all species specific PCR assays (TBR, TCF and TVW). Positivity to Litat1.3 and/or 1.5 was the highest in animals testing positive to the TBR PCR (30.6%), it was zero in animals positive only to TVW PCR, but positive in 4/23 (17.4%) animals that were uniquely positive to TCF PCR (Fig 5).

Discussion

In this study, we showed that domestic animals are important carriers of trypanosomes in the Sinfra and Bonon HAT foci. *T. brucei* s.l. infections were highest in pigs in Sinfra and both in pigs and cattle in Bonon. The overall prevalence recorded by PCR was approximately twice the one observed with the parasitological BCT technique. This was expected due to the known

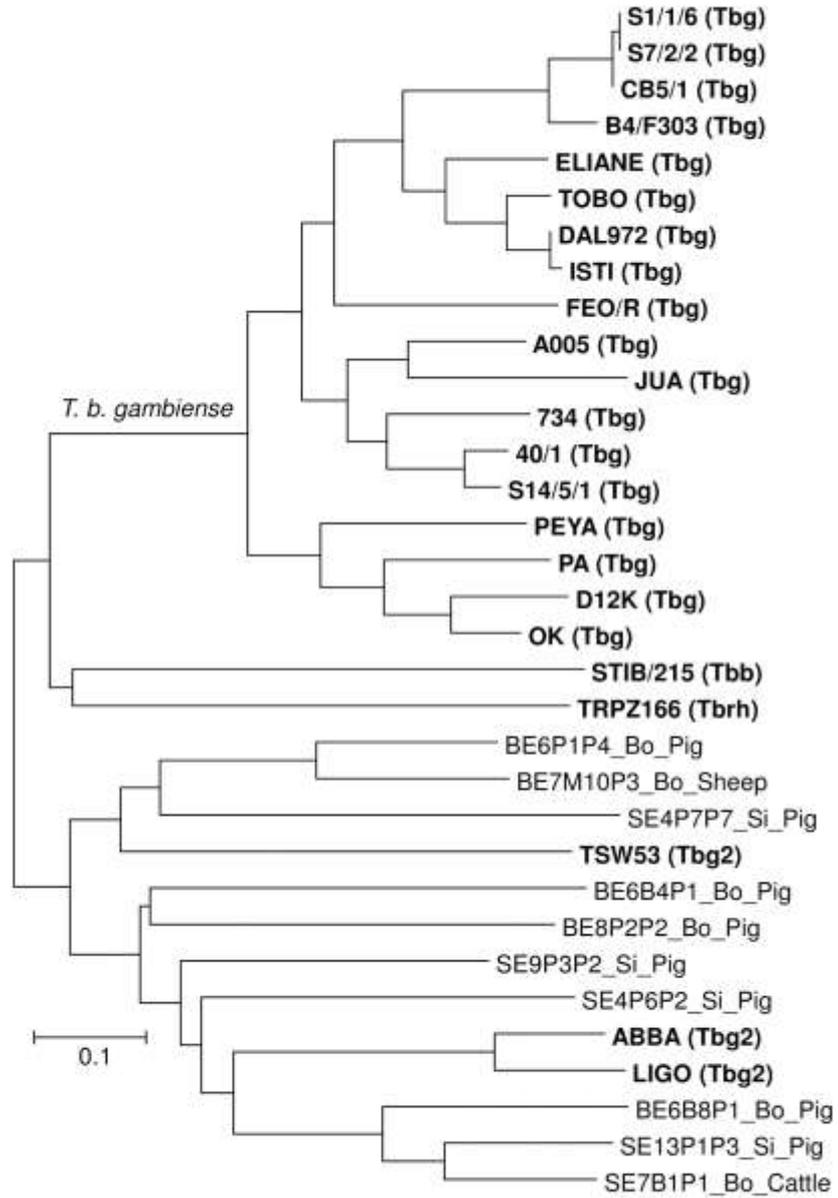


Fig 3. Microsatellite genotyping results. Neighbor-joining tree (NJTree), based on Cavalli-Sforza and Edwards Chord distance, of the amplified microsatellite genotypes. Reference stocks are in bold. The unique monophyletic lineage corresponds to *Trypanosoma brucei gambiense* and is indicated above the corresponding branch. The presence of several missing genotypes prohibited the use of bootstraps. Bo = Bonon, Si = Sinfra, Tbg = *Trypanosoma brucei gambiense*, Tbg2 = *Trypanosoma brucei gambiense* group 2, Tbb = *Trypanosoma brucei brucei*, Tbrh = *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005993.g003>

higher sensitivity of PCR [28,43]. Infection rates were higher in pigs and cattle than in sheep and goats. This may be related to differences in the host-vector contacts associated with different breeding practices and/or to differential host susceptibility to trypanosome infection. Sheep rather graze in the vicinity of the houses where they are partly nourished by the villagers, limiting the contact with tsetse flies. Goats are browsing freely across the vegetation in the periphery of villages and may be more exposed to tsetse flies. Noteworthy, low trypanosome infection rates have already been described for goats and this was attributed partly to the fact that goats are known to express individual defensive behavior against the bites of tsetse flies [43,44]. Cattle forage across long distances to reach pastures and are thus potentially more exposed to tsetse flies. However, in the Sinfra focus, the areas crossed by cattle herds are particularly anthropized with lower tsetse fly infestations. In contrast, in Bonon, the forest was more recently exploited and cattle are still in contact with tsetse populations [10]. This probably explains why cattle infection rates in Bonon are much higher than in Sinfra. Pigs roam freely in the more humid and shady areas around the villages or along the small rivers and are highly

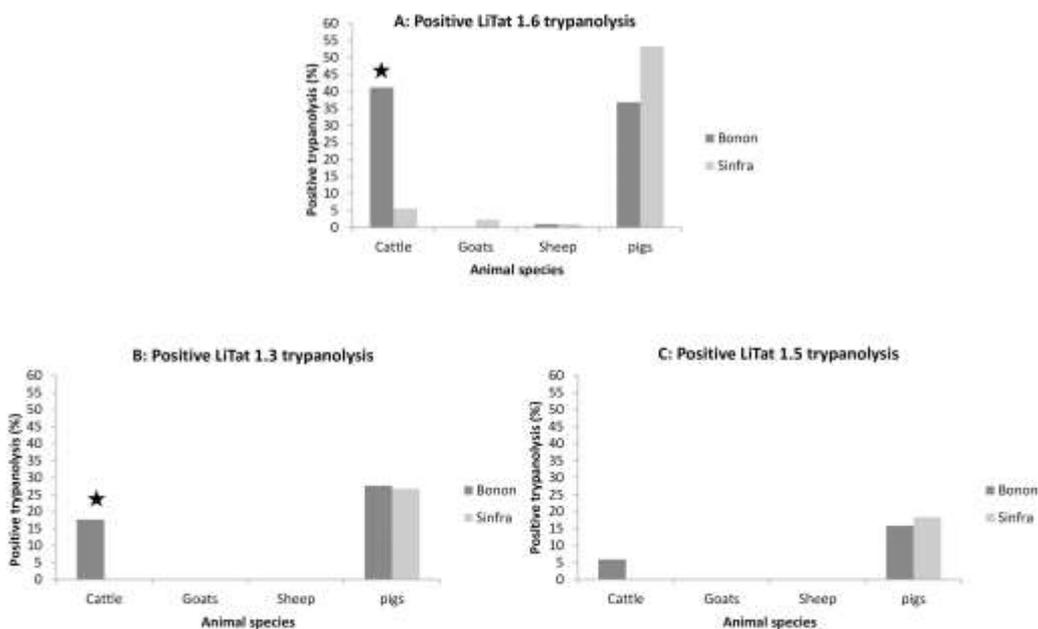


Fig 4. Immune trypanolysis (TL) results. Proportion of the LITat 1.6 (4A), LITat 1.3 (4B) and LITat 1.5 (4C) TL positive results on the total sample collection for each host in the two foci. A significant difference between Bonon and Sinfra is indicated with a star.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005993.g004>

Table 3. Distribution of the LiTat 1.3 and/or LiTat 1.5 trypanolysis positive results in cattle and pigs.

Animal species		TL profiles (LiTat 1.3/LiTat1.5/LiTat1.6)					Total
		(-/-/-)	(+/-/-)	(+/-/+)	(+/+/-)	(+/+/+)	
Cattle	n	1	2	3	0	1	7
	% positive	1.15	2.30	3.45	0	1.15	8.05
Pigs	n	2	4	12	6	15	39
	% positive	1.46	2.92	8.76	4.38	10.95	28.47

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005993.t003>

exposed to tsetse flies. Moreover, pigs have already been described as a preferential feeding host for *Glossina palpalis palpalis* [26,45], the only tsetse species present in the studied areas [26].

In the Sinfra and Bonon areas, the forest was progressively replaced by cocoa, coffee, banana plantations and food crops offering potential favorable conditions to the introduction of *T. congolense* savannah type from the north of the country where prevalence of this species is high [46]. However we did not detect this trypanosome which is considered as the most pathogenic *congolense* type [47], in the framework of this study. The prevalence of *T. vivax* was also low with only 13 infections, mainly detected in sheep. Noteworthy, no *T. vivax* infections were detected in pigs, confirming that this host is generally refractory to this trypanosome species [48]. *T. congolense* forest type was found in all host animals as previously observed in other forest areas [49] and mainly detected in pigs. *T. brucei* s.l. was the predominant species detected in our study areas, which is in line with studies conducted in other HAT forest foci from Cameroon and Equatorial Guinea [17,50].

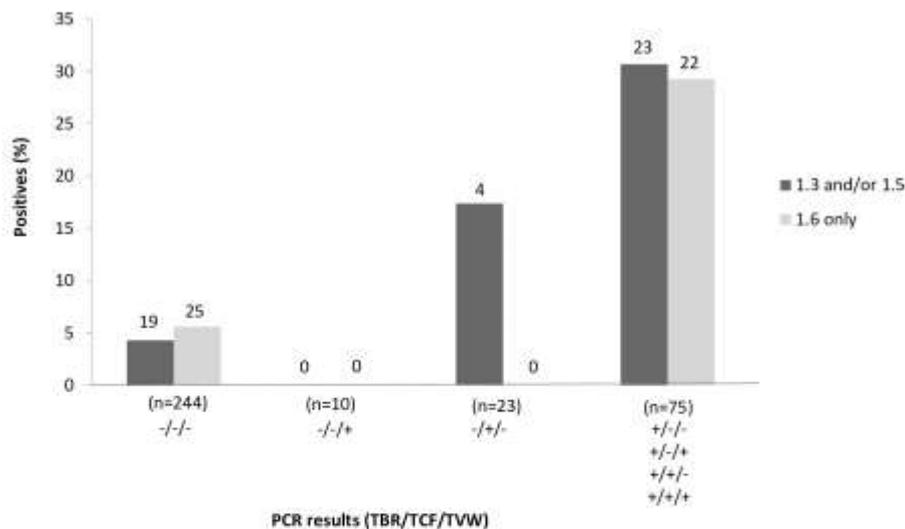


Fig 5. Reactivity to the Litat 1.3, 1.5 and 1.6 VAT according to the different PCR profiles. PCR profiles are given as follow: PCR TBR result/PCR TCF result/PCR TVW result. n = number of animals with the corresponding profile. Numbers on the top are the numbers of animal positives with Litat 1.3 and/or 1.5 TL or with LiTat 1.6 only.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005993.g005>

Among the *T. brucei* s.l. infections, *T. b. gambiense* could not be detected by the TgsGP PCR nor by microsatellite genotyping. At first sight, this could indicate that the human pathogenic trypanosome is not circulating in domestic animals in the HAT foci of Bonon and Sinfra. Similar results were reported in northwest Uganda where authors concluded an apparent absence of domestic animal reservoir for *T. b. gambiense* [51]. However, we observed high positivity rates (up to 28%) with both the *T. b. gambiense* specific LiTat 1.3 and LiTat 1.5 TL assays. Positivity to more than one *T. b. gambiense* variant is an indicator that the host was infected for a sufficient amount of time to allow VSG switching. Together, the high prevalence of LiTat 1.3 and/or 1.5 positivity observed in pigs and the fact that more than half of the animal tested positive to both variants, are thus pointing out that pigs could be potential reservoirs of *T. b. gambiense* in the study area.

Since very few HAT cases have been identified in these foci in the last years (Fig 1), the TL results may suggest an active circulation of *T. b. gambiense* in pigs and/or cattle in the Sinfra and Bonon foci, but with little contact with humans. In most studies describing the presence of *T. b. gambiense* in wild and domestic animals, prevalence in animals is often higher than in humans [18,19,50,52]. This may be explained by a higher nutritional preference of tsetse flies for animals and by the fact that humans are less exposed to tsetse flies in these areas. This is consistent with previous observations describing the protective role of pigs living at the periphery of villages since pigs are the preferential host of tsetse flies [24–26,53].

The TL results obtained in our study are consistent with recent population genetics data which showed that natural populations of *T. b. gambiense* are more important than those evidenced by the classical medical survey, suggesting hidden reservoirs of these parasites [42,54]. In the same way, a recent modeling study with animal and human data from a Cameroon focus showed that transmission of *T. b. gambiense* could not be maintained by humans as the only reservoir [55]. The existence of a domestic animal reservoir for *T. b. gambiense* could be responsible for the sporadic cases diagnosed in most of the Ivorian forest foci, sometimes a long time after the last epidemic HAT episode [7].

We observed a high discordance between the *T. b. gambiense* PCR and TL results. The *T. b. gambiense* specific TgsGP PCR targets a single copy gene [56] and may not be sensitive enough to exclude presence of *T. b. gambiense* in case of negative result, given the low parasitaemia generally observed in *T. b. gambiense* infections [57,58]. In addition, the microsatellite genotyping assays are known to lack sensitivity [59]. It is thus possible that *T. b. gambiense* parasites could have been missed by these two methods. In addition, the skin could be an important anatomical reservoir of *T. b. gambiense* as was recently demonstrated in experimentally infected mice [60–62]. We can thus not exclude that animals with negative PCR results on blood have trypanosomes in other body compartments such as the dermis. It is also possible that the presence of LiTat 1.3 and/or LiTat 1.5 specific antibodies indicates a previous transient infection. In addition, cross reactions of LiTat 1.3 and 1.5 with other trypanosome species cannot be excluded. Bromidge et al. showed in 1993 that a PCR targeting the LiTat 1.3 gene showed a positive result in two stocks described as *T. brucei brucei* isolated from pigs in Côte d'Ivoire [63]. We thus cannot exclude that *T. b. brucei* strains circulating in our study areas are expressing the LiTat 1.3 VAT resulting in TL positive results.

In the context of HAT elimination, it will be crucial to improve the sensitivity of the *T. b. gambiense* PCR in order to detect this species in biological samples of animals, tsetse flies and human. Further studies are also needed to validate the specificity of LiTat 1.3 and 1.5 TL assays in animals. Controlled infection experiments in domestic animals will be needed to more fully evaluate the specificity and sensitivity of the currently available tools and evaluate their usefulness in research on the role of animals in the transmission of *T. b. gambiense*.

Our data suggest the existence of a potential domestic animal reservoir for *T. b. gambiense* HAT and provides indications for areas where the transmission may occur in the Sinfra and Bonon foci: the small wet and shady areas around the villages and the forest relics. Vector control using tiny targets [63,65] which are particularly favorable to disrupt the contact between domestic animals and tsetse flies may have a considerable impact on tsetse fly densities and trypanosome transmission in these areas. The concomitant treatment of pigs in the Sinfra focus and both pigs and cattle in the Bonon focus would furthermore help clearing out the potential reservoir of *T. b. gambiense* but also would contribute to animal trypanosomiasis control. This clearly illustrates the usefulness of applying a one health strategy for both HAT and AAT control.

However, these control measures have to be adapted to the study area and epidemiological context. In the endemic focus of Boffa [66] and in the historical focus of Loos Islands [67] in Guinea, domestic animals seem not to play a role in the epidemiology of HAT. In Cameroun [49,50,68], Congo [69], and Equatorial Guinea [17–19], the presence of human and animal infecting trypanosomes in domestic and/or wild animals could be evidenced, but important differences between study areas were highlighted regarding prevalence in hosts and their geographical distribution. We thus suggest, in low prevalence foci where HAT elimination seems reachable, to conduct animal surveys to define the most appropriate control measures to be implemented.

Conclusion

We have investigated the distribution of animal trypanosomes and the possible existence of a domestic animal reservoir of *T. b. gambiense* in two hypo-endemic HAT foci in Côte d'Ivoire. Our results show that *T. brucei* s.l. and *T. congolense* forest type circulate in the study areas and mainly infect pigs and cattle. Discordant results were obtained on the presence of *T. b. gambiense*, between PCR and TL methods. PCR did not detect *T. b. gambiense* while high seroprevalence was observed in TL. In the context of HAT elimination, it will be crucial to further investigate this discordance and to develop better tools and strategies to fully characterize the epidemiological role of an animal reservoir for *T. b. gambiense*.

Acknowledgments

We acknowledge all the technicians from the HAT teams of CIRDES (Bobo-Dioulasso), IPR (Bouaké), UJLoG (Daloa), CSU of Bonon, General Hospital of Sinfra and National Elimination Program (Abidjan). The authors also thank Saule Ibrah for helpful advice in writing the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Martial Kassi N'Djetchi, Hamidou Ilboudo, Mathurin Koffi, Philippe Solano, Thierry De Meeüs, Bruno Bucheton, Vincent Jamonneau.

Data curation: Hamidou Ilboudo, Jacques Kaboré, Bamoro Coulibaly, Pierre Fauret, Bruno Bucheton.

Formal analysis: Hamidou Ilboudo, Stijn Deborggraeve, Thierry De Meeüs.

Funding acquisition: Mathurin Koffi, Dramane Kaba, Lingué Kouakou, Bruno Bucheton, Vincent Jamonneau.

Investigation: Martial Kassi N'Djetchi, Mathurin Koffi, Justin Windingoudi Kaboré, Dramane Kaba, Fabrice Courtin, Lingué Kouakou, Sophie Ravel, Stijn Deborggraeve, Vincent Jamonneau.

Methodology: Martial Kassi N'Djetchi, Jacques Kaboré, Justin Windingoudi Kaboré, Fabrice Courtin, Bamoro Coulibaly, Pierre Fauret, Sophie Ravel, Stijn Deborggraeve, Bruno Bucheton, Vincent Jamonneau.

Project administration: Philippe Solano, Vincent Jamonneau.

Supervision: Hamidou Ilboudo, Mathurin Koffi, Sophie Ravel, Philippe Solano, Thierry De Meeüs, Vincent Jamonneau.

Validation: Bruno Bucheton.

Visualization: Bamoro Coulibaly, Pierre Fauret.

Writing – original draft: Martial Kassi N'Djetchi, Hamidou Ilboudo, Mathurin Koffi, Stijn Deborggraeve, Bruno Bucheton, Vincent Jamonneau.

Writing – review & editing: Jacques Kaboré, Dramane Kaba, Fabrice Courtin, Lingué Kouakou, Sophie Ravel, Philippe Solano, Thierry De Meeüs.

References

1. Franco JR, Simarro PP, Diarra A, Jannin JG (2014) Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clin Epidemiol* 6: 257–275. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S39728> PMID: 25125685
2. WHO (2016) Lowest caseload recorded as the world prepares to defeat sleeping sickness. http://www.who.int/neglected_diseases/news/HAT_lowest_caseload_recorded/en/.
3. Franco JR, Simarro PP, Diarra A, Ruiz-Postigo JA, Jannin JG (2014) The journey towards elimination of gambiense human African trypanosomiasis: not far, nor easy. *Parasitology* 141: 748–760. <https://doi.org/10.1017/S0031182013002102> PMID: 24709291
4. Molyneux DH (1973) Animal reservoirs and Gambian trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* 53: 605–618. PMID: 4204667
5. Simarro PP, Cecchi G, Franco JR, Paone M, Diarra A, et al. (2015) Monitoring the Progress towards the Elimination of Gambiense Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003785. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003785> PMID: 26056823
6. Dje NN, Miezán TW, N'Guessan P, Brika P, Doua F, et al. (2002) [Geographic distribution of trypanosomiasis treated in Ivory Coast from 1993 to 2000]. *Bull Soc Pathol Exot* 95: 359–361. PMID: 12696376
7. Kambire R, Lingué K, Courtin F, Sidibe I, Kiendrebeogo D, et al. (2012) [Human African trypanosomiasis in Cote d'Ivoire and Burkina Faso: optimization of epidemiologic surveillance strategies]. *Parasite* 19: 389–396. <https://doi.org/10.1051/parasite/2012194389> PMID: 23193524
8. Simarro PP, Franco JR, Diarra A, Ruiz Postigo JA, Jannin J (2013) Diversity of human African trypanosomiasis epidemiological settings requires fine-tuning control strategies to facilitate disease elimination. *Research and Reports in Tropical Medicine* 4: 1–6.
9. Koffi M, N'Djetchi M, Ilboudo H, Kaba D, Coulibaly B, et al. (2016) A targeted door-to-door strategy for sleeping sickness detection in low-prevalence settings in Cote d'Ivoire. *Parasite* 23: 51. <https://doi.org/10.1051/parasite/20160255> PMID: 27849517
10. Courtin F, Jamonneau V, Oke E, Coulibaly B, Oswald Y, et al. (2006) Towards understanding the presence/absence of Human African Trypanosomiasis in a focus of Cote d'Ivoire: a spatial analysis of the pathogenic system. *Int J Health Geogr* 4: 27. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-4-27> PMID: 16269078
11. Kaba D, Dje NN, Courtin F, Oke E, Koffi M, et al. (2006) [The impact of war on the evolution of sleeping sickness in west-central Cote d'Ivoire]. *Trop Med Int Health* 11: 136–143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01549.x> PMID: 16451337
12. Laveissière C, Sané B, Garcia A (2003) *Lutte contre la Maladie du Sommeil et Soins de Santé Primaires*. Didactiques IRD ed, Paris: 243p.
13. Ravel S, de Meeus T, Dujardin JP, Zeze DG, Gooding RH, et al. (2007) The tsetse fly *Glossina palpalis* is composed of several genetically differentiated small populations in the sleeping sickness

- focus of Bonon, Cote d'Ivoire. *Infect Genet Evol* 7: 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.07.002> PMID: 16890499
14. Ruiz JP, Nyirigilli HS, Mbata GH, Malele II (2015) The role of domestic animals in the epidemiology of human African trypanosomiasis in Ngorongoro conservation area, Tanzania. *Parasit Vectors* 8: 510. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1125-6> PMID: 26444416
 15. Welburn SC, Coleman PG, Maudlin I, Fevre EM, Oditi M, et al. (2006) Crisis, what crisis? Control of Rhodesian sleeping sickness. *Trends Parasitol* 22: 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.01.011> PMID: 16458071
 16. Njokou F, Nimpaye H, Simo G, Njitichouang GR, Asonganyi T, et al. (2010) Domestic animals as potential reservoir hosts of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness foci in Cameroon. *Parasite* 17: 61–66. <https://doi.org/10.1051/parasite/2010171051> PMID: 20387740
 17. Cordon-Obras C, Berzosa P, Ndong-Mabale N, Bobuakasi L, Buatliche JN, et al. (2009) *Trypanosoma brucei gambiense* in domestic livestock of Kogo and Mbini foci (Equatorial Guinea). *Trop Med Int Health* 14: 535–541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02271.x> PMID: 19320872
 18. Cordon-Obras C, Garcia-Estebanez C, Ndong-Mabale N, Abaga S, Ndong-Asumu P, et al. (2010) Screening of *Trypanosoma brucei gambiense* in domestic livestock and tsetse flies from an insular endemic focus (Luba, Equatorial Guinea). *PLoS Negl Trop Dis* 4: e704. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000704> PMID: 20544031
 19. Cordon-Obras C, Rodriguez YF, Fernandez-Marinez A, Cano J, Ndong-Mabale N, et al. (2015) Molecular evidence of a *Trypanosoma brucei gambiense* sylvatic cycle in the human african trypanosomiasis foci of Equatorial Guinea. *Front Microbiol* 6: 765. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00765> PMID: 26257727
 20. Jamonneau V, Ravel S, Koffi M, Kaba D, Zaze DG, et al. (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. PMID: 15648692
 21. Simo G, Rayaisse JB (2015) Challenges facing the elimination of sleeping sickness in west and central Africa: sustainable control of animal trypanosomiasis as an indispensable approach to achieve the goal. *Parasit Vectors* 8: 640. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1254-y> PMID: 26671582
 22. Van Meirvenne N, Magnus E, Buscher P (1996) Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop* 60: 189–199. PMID: 8907397
 23. Kiendrebeogo D, Kambire R, Jamonneau V, Lingue K, Solano P, et al. (2012) [History of an epidemiological route between Ivory Coast and Burkina Faso: the case of the Koudougou sleeping sickness foci]. *Parasite* 19: 397–406. <https://doi.org/10.1051/parasite/2012194397> PMID: 23193525
 24. Gouteux JP (1985) [Ecology of tsetse flies in the preforested area of the Ivory Coast. Relation to human trypanosomiasis and possibilities for control]. *Ann Parasitol Hum Comp* 60: 329–347. <https://doi.org/10.1051/parasite/1985603329> PMID: 2998259
 25. Laveissiere C, Couret D, Staak C, Hervouët JP (1985) *Glossina palpalis* et ses hôtes en secteur forestier de Côte d'Ivoire: relations avec l'épidémiologie de la trypanosomiase humaine. *Cahiers ORSTOM-Série Entomologie Médicale et Parasitologie* 23: 297–303.
 26. Sane B, Laveissiere C, Meda HA (2000) [Diversity of feeding behavior of *Glossina palpalis palpalis* in the forest belt of the Ivory Coast: relation to the prevalence of human African trypanosomiasis]. *Trop Med Int Health* 5: 73–78. PMID: 10672209
 27. Murray M, Murray PK, McIntyre WJ (1977) An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71: 325–326. PMID: 563634
 28. Koffi M, Solano P, Denizot M, Courtin D, Garcia A, et al. (2006) Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: a potential human reservoir of parasites? *Acta Trop* 98: 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.04.001> PMID: 16723098
 29. Moser DR, Cook GA, Ochs DE, Bailey CP, McKane MR, et al. (1989) Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology* 99 Pt 1: 57–66.
 30. Masiga DK, Smyth AJ, Hayes P, Bromidge TJ, Gibson WC (1992) Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int J Parasitol* 22: 909–918. PMID: 1459784
 31. Majiwa PA, Thatthi R, Moloo SK, Nyeiko JH, Otieno LH, et al. (1994) Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy-coat samples from antigenaemic but aparasitaemic cattle. *Parasitology* 108 (Pt 3): 313–322.
 32. Radwanska M, Claes F, Magez S, Magnus E, Perez-Morga D, et al. (2002) Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am J Trop Med Hyg* 67: 289–295. PMID: 12408699

33. MacLeod A, Tweedie A, McLellan S, Taylor S, Hall N, et al. (2005) The genetic map and comparative analysis with the physical map of *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 33: 6688–6693. <https://doi.org/10.1093/nar/gki980> PMID: 16314301
34. Biteau N, Bringaud F, Gibson W, Truc P, Baltz T (2000) Characterization of *Trypanosoma* isolates using a repeated coding sequence and microsatellite markers. *Mol Biochem Parasitol* 105: 185–201. PMID: 10293742
35. Koffi M, Solano P, Barnabe C, de Meues T, Bucheton B, et al. (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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.07.001> PMID: 17704009
36. Kabore J, Koffi M, Bucheton B, Macleod A, Duffy C, et al. (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. *Infect Genet Evol* 11: 1250–1255. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.014> PMID: 21530681
37. Dieringer D, Schlotterer C (2003) Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol Ecol Notes* 3: 167–169.
38. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092> PMID: 17488738
39. Cavalli-Sforza LL, Edwards AW (1967) Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet* 19: 233–257. PMID: 6026583
40. Takezaki N, Nei M (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144: 389–399. PMID: 8878702
41. Jamonneau V, Bucheton B, Kabore J, Iboudo H, Camara O, et al. (2010) Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e917. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000917> PMID: 21209417
42. Koffi M, De Meues T, Bucheton B, Solano P, Camara M, et al. (2009) Population genetics of *Trypanosoma brucei* gambiense, the agent of sleeping sickness in Western Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 209–214. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811080106> PMID: 19106297
43. Simukoko H, Marcotty T, Phiri L, Geysen D, Verduyck J, et al. (2007) The comparative role of cattle, goats and pigs in the epidemiology of livestock trypanosomiasis on the plateau of eastern Zambia. *Vet Parasitol* 147: 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.005> PMID: 17493757
44. Ravel S, Mediamnikov O, Bossard G, Desquesnes M, Cuny G, et al. (2015) A study on African animal trypanosomiasis in four areas of Senegal. *Folia Parasitol (Praha)* 62.
45. Simo G, Njikou F, Mbida Mbida JA, Njitouang GR, Herder S, et al. (2008) Tsetse fly host preference from sleeping sickness foci in Cameroon: epidemiological implications. *Infect Genet Evol* 8: 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.09.005> PMID: 17977803
46. Koffi M, Sokouri M, Kouadio IK, N'Guetta SP (2014) Molecular characterization of trypanosomes isolated from naturally infected cattle in the "Pays Lobi" of Côte d'Ivoire. *J Appl Biosci* 83: 7570–7578.
47. Bengaly Z, Sidibe I, Ganaba R, Desquesnes M, Boly H, et al. (2002) Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: clinical observations and haematological changes. *Vet Parasitol* 108: 1–19. PMID: 12191895
48. Hoare CA (1972) The trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 749.
49. Nimpaye H, Njikou F, Njine T, Njitouang GR, Cuny G, et al. (2011) *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* "forest type" and *T. simiae*: prevalence in domestic animals of sleeping sickness foci of Cameroon. *Parasite* 18: 171–179. <https://doi.org/10.1051/parasite/2011182171> PMID: 21678793
50. Simo G, Asonganyi T, Nkinin SW, Njikou F, Herder S (2006) High prevalence of *Trypanosoma brucei* gambiense group 1 in pigs from the Fontem sleeping sickness focus in Cameroon. *Vet Parasitol* 139: 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.025> PMID: 16567049
51. Balyeidhusa AS, Kironde FA, Enyaru JC (2012) Apparent lack of a domestic animal reservoir in Gambiense sleeping sickness in northwest Uganda. *Vet Parasitol* 187: 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.005> PMID: 22245071
52. Njikou F, Laveissiere C, Simo G, Nkinin S, Grebaut P, et al. (2006) Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei* gambiense in Cameroon. *Infect Genet Evol* 6: 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.04.003> PMID: 16236560
53. Mehlitz D, Zilman U, Sachs R (1985) The domestic pigs as carriers of *Trypanosoma brucei* gambiense in West Africa. *Tropenmed Parasitol* 36: 18.

54. Koffi M, De Meeus T, Sere M, Bucheton B, Simo G, et al. (2015) Population Genetics and Reproductive Strategies of African Trypanosomes: Revisiting Available Published Data. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003985. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003985> PMID: 25491968
55. Funk S, Nishiura H, Heesterbeek H, Edmunds WJ, Checchi F (2013) Identifying transmission cycles at the human-animal interface: the role of animal reservoirs in maintaining gambiense human african trypanosomiasis. *PLoS Comput Biol* 9: e1002855. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002855> PMID: 23341760
56. Berberof M, Perez-Morga D, Pays E (2001) A receptor-like flagellar pocket glycoprotein specific to *Trypanosoma brucei gambiense*. *Mol Biochem Parasitol* 113: 127–138. PMID: 11254961
57. Deborggraeve S, Buscher P (2010) Molecular diagnostics for sleeping sickness: what is the benefit for the patient? *Lancet Infect Dis* 10: 433–439. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70077-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70077-3) PMID: 20510283
58. Deborggraeve S, Buscher P (2012) Recent progress in molecular diagnosis of sleeping sickness. *Expert Rev Mol Diagn* 12: 719–730. <https://doi.org/10.1586/erm.12.72> PMID: 23153239
59. Kabore J, De Meeus T, Macleod A, Ilboudo H, Capewell P, et al. (2013) A protocol to improve genotyping of problematic microsatellite loci of *Trypanosoma brucei gambiense* from body fluids. *Infect Genet Evol* 20: 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.006> PMID: 23954418
60. Caljon G, Van Reet N, De Trez C, Vermeersch M, Perez-Morga D, et al. (2016) The Dermis as a Delivery Site of *Trypanosoma brucei* for Tsetse Flies. *PLoS Pathog* 12: e1005744. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005744> PMID: 27441953
61. Capewell P, Cren-Travalle C, Marchesi F, Johnston P, Clucas C, et al. (2016) The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes. *Elife* 5.
62. Trindade S, Rijo-Ferreira F, Carvalho T, Pinto-Neves D, Guegan F, et al. (2016) *Trypanosoma brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. *Cell Host Microbe* 19: 837–848. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.002> PMID: 27237364
63. Bromidge T, Gibson W, Hudson K, Dukes P (1993) Identification of *Trypanosoma brucei gambiense* by PCR amplification of variant surface glycoprotein genes. *Acta Trop* 53: 107–119. PMID: 8098897
64. Lehane M, Alfaroukh I, Bucheton B, Camara M, Harris A, et al. (2016) Tsetse Control and the Elimination of Gambian Sleeping Sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004437. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004437> PMID: 27128795
65. Rayaisse JB, Esterhuizen J, Tirados I, Kaba D, Salou E, et al. (2011) Towards an optimal design of target for tsetse control: comparisons of novel targets for the control of Palpalis group tsetse in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1332. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001332> PMID: 21949896
66. Kagbadouno MS, Camara M, Rouamba J, Rayaisse JB, Traore IS, et al. (2012) Epidemiology of sleeping sickness in Boffa (Guinea): where are the trypanosomes? *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1949. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001949> PMID: 23272259
67. Kagbadouno M, Camara M, Bouyer J, Hervouet JP, Courtin F, et al. (2009) Tsetse elimination: its interest and feasibility in the historical sleeping sickness focus of Loos Islands, Guinea. *Parasite* 16: 29–35. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008161029> PMID: 19353949
68. Njitichouang GR, Njikou F, Nana-Djeunga H, Asonganyi T, Fewou-Moundipa P, et al. (2011) A new transmission risk index for human African trypanosomiasis and its application in the identification of sites of high transmission of sleeping sickness in the Foriem focus of southwest Cameroon. *Med Vet Entomol* 25: 289–296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00936.x> PMID: 21198712
69. Noireau F, Paindavaine P, Lemesre JL, Toudic A, Pays E, et al. (1989) The epidemiological importance of the animal reservoir of *Trypanosoma brucei gambiense* in the Congo. 2. Characterization of the *Trypanosoma brucei* complex. *Trop Med Parasitol* 40: 9–11. PMID: 2740734

A targeted door-to-door strategy for sleeping sickness detection in low-prevalence settings in Côte d'Ivoire

Mathurin Koffi^{1,*}, Martial N'Djetchi¹, Hamidou Ilboudo², Dramane Kaba³, Bamoro Coulibaly³, Emmanuel N'Gouan⁴, Lingué Kouakou⁵, Bruno Bucheton⁶, Philippe Solano², Fabrice Courtin², Stephan Ehrhardt⁷, and Vincent Jamonneau²

¹ Université Jean Lorougnon Guédé, UFR Environnement, Laboratoire des Interactions Hôte-Microorganisme-Environnement et Évolution (LIHME), BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire

² Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Unité Mixte de Recherche IRD-CIRAD 177, INTERTRYP/Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), Unité de recherches sur les bases biologiques de la lutte intégrée, 01 BP 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

³ Institut Pierre Richet, Unité de Recherche « Trypanosomoses », 01 BP 1500, Bouaké 01, Bouaké, Côte d'Ivoire

⁴ Projet de Recherche Clinique sur les Trypanosomoses (PRCT), BP 1425, Daloa, Côte d'Ivoire

⁵ Programme National d'Élimination de la Trypanosomose Humaine Africaine, 17 BP 934, Abidjan, Côte d'Ivoire

⁶ Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Unité Mixte de Recherche IRD-CIRAD 177, INTERTRYP, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

⁷ Department of Epidemiology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, United States of America

Received 13 October 2015, Accepted 30 October 2016, Published online 16 November 2016

Abstract – Significant efforts to control human African trypanosomiasis (HAT) over the three past decades have resulted in drastic reductions of disease prevalence in Côte d'Ivoire. In this context, the costly and labor-intensive active mass screening strategy is no longer efficient. In addition to a more cost-effective passive surveillance system being implemented in this low-prevalence context, our aim was to develop an alternative targeted active screening strategy. In 2012, we carried out a targeted door-to-door (TDD) survey focused on the immediate vicinities of former HAT patients detected in the HAT focus of Bonon and compared the results to those obtained during classical active mass screening (AMS) surveys conducted from 2000 to 2012 in the same area. The TDD that provides a friendlier environment, inviting inhabitants to participate and gain awareness of the disease, detected significantly more HAT cases than the AMS. These results suggest that the TDD is an efficient and useful strategy in low-prevalence settings where very localized transmission cycles may persist and, in combination with passive surveillance, could help in eliminating HAT.

Key words: Human African trypanosomiasis, *Trypanosoma brucei gambiense*, Diagnosis, Elimination strategy, Côte d'Ivoire, Medical survey.

Résumé – Stratégie médicale ciblée en porte-à-porte pour la détection de la trypanosomiase humaine africaine dans des régions de faible prévalence en Côte d'Ivoire. D'importants efforts pour contrôler la trypanosomiase humaine africaine (THA) au cours des trois dernières décennies ont permis une réduction importante des prévalences en Côte d'Ivoire. Dans ce contexte, les prospections médicales classiques de masse ne sont plus adaptées en termes de coût-efficacité. En plus de développer un système de surveillance passive plus rentable dans ce contexte, notre but était de soutenir l'élimination de la THA en élaborant une stratégie active alternative basée sur une détection ciblée de cas. Dans le foyer de Bonon, nous avons mené en 2012 une surveillance médicale en porte-à-porte ciblée sur le voisinage immédiat d'anciens cas de THA et comparé les résultats à ceux des prospections médicales classiques de masse menées entre 2000 et 2012 dans la même zone. La stratégie ciblée en porte-à-porte, qui contribue à une meilleure sensibilisation des populations, a détecté significativement plus de cas de THA que la prospection médicale classique de masse. Ceci montre que la stratégie ciblée en porte-à-porte est une stratégie efficace dans les contextes de faibles prévalences où des cycles de transmission très localisés peuvent persister, qui est complémentaire à la surveillance passive pour atteindre l'objectif d'élimination de la trypanosomiase humaine africaine.

*Corresponding author: m9koffi@yahoo.fr

Introduction

Human African trypanosomiasis (HAT), commonly known as sleeping sickness, is a debilitating and deadly disease that affects people in sub-Saharan Africa, mainly in rural areas [2, 7]. There is no vaccine and no chemoprophylaxis available. Significant efforts to control the disease over the past three decades have drastically reduced the prevalence of HAT in recent years [22]. The elimination of the disease as a public health problem by 2020 is now regarded as an achievable goal and has been included in the WHO roadmap on neglected tropical diseases [8, 22, 26]. However, one condition of success is the use of the most sensitive and specific diagnostic tools and the most cost-effective strategies, taking into account local epidemiological contexts and the current decrease in prevalence [8, 26].

The chronic form of HAT is assumed to be mainly an anthroponosis due to *Trypanosoma brucei gambiense*, today causing more than 95% of all reported cases in West and Central Africa [7]. Control is mainly based on active case detection and treatment of the human reservoir of the parasites [26]. Such active case detection, mainly based on the Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT) serological test [19] followed by parasitological investigation, is usually done by mobile teams that move from village to village to examine the entire population in the HAT foci aiming to detect and treat cases as early as possible. Although it is recognized that this active mass screening (AMS) strategy has saved thousands of lives [2, 8], it is also recognized that in low-prevalence contexts, such a costly and labor-intensive strategy that detects so few cases, is no longer efficient. Moreover, with decreasing disease prevalence, the population no longer perceives HAT as a threat and shows reluctance toward repeated AMS, leading to a decrease in participation rates [14, 21]. This was clearly the case in the Bonon focus where the last epidemic situation observed in Côte d'Ivoire was contained at the beginning of the 2000s [13, 22, 24]. No HAT cases were detected in 2012 during an AMS; nevertheless, several HAT cases are still regularly diagnosed passively, most of them in the second stage of the disease [15].

In such a context, it is important to reinforce passive surveillance strategies integrating HAT control activities into the general healthcare system and focusing on patients self-presenting for consultation [7, 20, 23, 26]. However, integration of this strategy encounters political and technical challenges partly due to difficulties in diagnosing the disease as well as the capacity of health facilities to cover the population at risk, generally living in remote rural areas far from the main health structures [12, 20]. Moreover, case detection in passive surveillance is first based on clinical symptoms leading to the detection essentially of late stage cases that were probably parasite reservoirs for years before diagnosis and treatment was made [15].

With the objective of reaching HAT elimination in the Bonon focus and based on the hypothesis that subjects living close to HAT patients, and sharing the same environment at risk, have a higher probability of being bitten by infected tsetse flies [9], we implemented a door-to-door strategy in 2012 focused on the immediate vicinities of former HAT patients

previously detected in the focus. In this paper, we describe this targeted door-to-door (TDD) strategy and compare the results with those of AMS performed from 2000 to 2012.

Methods

Ethics statement

All samples were collected within the framework of medical surveys and epidemiological surveillance activities supervised by the HAT National Control Program (HAT NCP). No samples other than those for routine screening and diagnostic procedures were collected. All participants were informed of the objective of the study in their own language and signed an informed consent form. This study is part of a larger project aimed at improving HAT control by assessing the role of the human reservoir in the emergence and/or re-emergence of HAT, for which approval was obtained from the Ivorian National Ethics Committee, No. 0308/MSLS/CNER-P, January 30, 2012.

Study site and epidemiological context

The Bonon HAT focus is located in the mesophyll forest in the western-central part of Côte d'Ivoire. The disease has long been endemic and the first cases were detected in 1956 [6]. The evolution of the number of HAT cases reported in this focus since the 1950s is well documented based on data supplied by the HAT NCP and partners (see Figure 1). Due to cash crop interests (coffee, cocoa, bananas, etc.) and the associated human settlements, HAT found ideal geographic conditions for its development and Bonon became the most active focus in Côte d'Ivoire at the end of the 1990s [24]. Control efforts conducted between 2000 and 2006 by HAT NCP in collaboration with Institut Pierre Richet (IPR), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), and Projet de Recherche Clinique sur la Trypanosomiase (PRCT) managed to contain the epidemic. Since 2007, the disease is hypoendemic with only very few cases passively diagnosed yearly (six cases between 2010 and 2011) [15]. These cases were diagnosed passively (all in an advanced neurological stage of the disease) at the PRCT, the only HAT treatment center in Côte d'Ivoire, located in Daloa, 80 km east of Bonon.

Classical active mass screening strategy

Specialized mobile teams conducted large-scale screening of all populations considered at risk. Targeted communities then consisted of entire villages or urban neighborhoods. The population at risk was tested using CATT performed on blood (CATT-B) collected by finger prick. For CATT-B-positive persons, blood was collected in heparinized tubes and a twofold plasma dilution series in CATT buffer was tested to assess the end titer, i.e., the highest dilution still positive on plasma (CATT-P). All CATT-P $\geq 1/4$ underwent parasitological examinations by direct examination of a lymph node aspirate and/or mini-anion exchange centrifugation technique (mAECT) [18] in blood. From the remaining blood of all

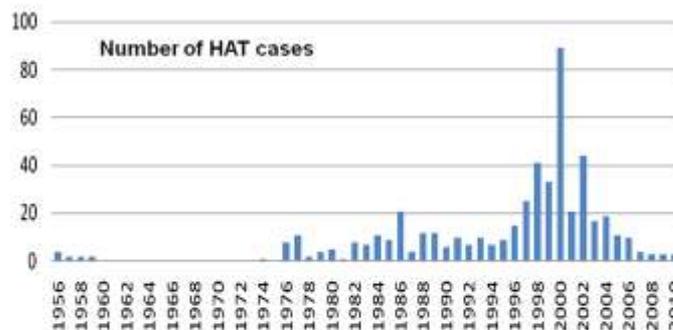


Figure 1. Evolution of the number of HAT cases diagnosed in the Bonon focus from 1956 to 2010.

CATT-P $\geq 1/4$, 500 μ L of plasma was collected and kept at -20°C for subsequent trypanolysis testing in 2012. AMS was performed eight times from 2000 to 2012 (2000, 2002, 2003, 2004, 2007, 2008, 2009, and 2012).

Targeted door-to-door strategy

Using the database of HAT NCP, IPR, IRD, and PRCT, 109 former HAT cases (FHAT) actively and passively diagnosed since 2000 were referenced. In 2012, two months after the last AMS, a mobile team visited the focus to localize inhabitants and inform them about the aim of the study. The close neighborhood of each localized FHAT, i.e., all subjects living in the same house and subjects living in immediate vicinities and sharing the same daily activities, was then also informed and sensitized about our targeted door-to-door (TDD) strategy. For the subjects who gave their agreement to participate, the same diagnostic procedure as described above was applied. Because most FHAT patients did not participate in post-therapeutic follow-up, we investigated possible treatment failures by clinical, serological, and parasitological means. From the remaining blood of all CATT-P $\geq 1/4$ subjects, 500 μ L of plasma was collected and kept at -20°C for subsequent trypanolysis analysis.

New parasitologically confirmed HAT cases (AMS or TDD) were called NHAT and new seropositive cases (CATT-B positive, CATT-P $\geq 1/4$ but negative by parasitological tests) were called NSERO.

Immune trypanolysis test

Plasma samples collected in the field from all NHAT and NSERO individuals were sent to the Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en Zones Subhumides (CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso) to be tested by the immune trypanolysis test (TL), highly specific for *T. b. gambiense*, which constitutes a routine surveillance test used nowadays [11]. The TL was performed on plasma as previously described [25] with LiTat 1.3, 1.5, and 1.6 variable antigen types (VAT).

Statistical analysis

The prevalence (number of NHAT/total population surveyed) and seroprevalence (number of NSERO/total population surveyed) data between AMS and TDD were compared using a chi-square test. A Fisher's exact test was performed when the expected number in a field was ≤ 5 . The level of significance was set at 0.05.

Results

The number of persons surveyed, as well as prevalence and seroprevalence of AMS and TDD performed in Bonon from 2000 to 2012, is given in Table 1. While the first AMS performed in 2000 took into account the whole Bonon area, because the disease distribution was unknown, the subsequent programs progressively focused on at-risk localities, explaining the variations of the population screened in each survey. Since 2004, the population considered the most at risk (regarding the geographic distribution of previous HAT cases) and surveyed by AMS and TDD is the same. Using AMS, 123 NHAT cases were detected from 2000 to 2004, with prevalence varying from 0.48 to 0.15%. From 2007 to 2009, only six NHAT cases were detected with prevalence less than 0.05%. In 2012, no NHAT cases were detected. Using the TDD in 2012, two months after the last AMS, 1058 individuals were tested in the neighborhood of 72 FHAT cases that were successfully localized and four NHAT cases were detected with 0.4% prevalence, significantly higher ($p = 0.002$) than the AMS performed the same year (Table 1).

From 2003 to 2012, the seroprevalence observed in AMS progressively decreased from nearly 2% to 0.25%, while seroprevalence was 0.94% in 2012 using the TDD. Considering the highly specific TL test now used to differentiate false-seropositive (TL-) and true seropositive (TL+) individuals [8, 9], significantly more SERO TL+ individuals (0.66%) were detected by the TDD in 2012, as compared with AMS (0.12%; $p \leq 0.001$).

The 72 FHAT cases were tested and no parasites were detected by parasitological investigations. Moreover, no neurological disorder was observed in clinical investigations.

Table 1. Results of medical surveys in the Bonon focus from 2000 to 2012.

Strategy and year	Total population surveyed	NSERO	Seroprevalence (%)	NHAT	Prevalence (%)
*AMS 2000	15,289	170	1.11	74	0.48
*AMS2002	8284	96	1.16	33	0.4
*AMS2003	1369	25	1.83	2	0.15
AMS2004	6289	40	0.64	14	0.22
AMS 2007	6738	29	0.43	3	0.04
AMS 2008	3276	17	0.52	1	0.03
AMS 2009	4537	28	0.62	2	0.04
AMS 2012	3919	10 (5TL+)	0.25 (0.12) [†]	0	0 ^{**}
TDD 2012	1058	10 (7TL+)	0.94 (0.66) [†]	4	0.4 ^{**}

[†] $\chi^2 = 9.87, p = 0.001$.

^{**} Fisher's exact test, $p = 0.001$.

* Data already published in [11].

AMS: Active mass screening, TDD: Targeted door-to-door, NSERO: New HAT seropositive individuals, NHAT: New HAT cases, TL+: Positive to the immune trypanolysis test.

Sixty FHATs were still positive on the TL (at least one VAT) and only six remained with CATT-P $\geq 1/4$.

Discussion

In 2012, HAT was included in the WHO's roadmap on neglected tropical diseases with a 2020 target date for elimination as a public health problem, and a 2030 target date for the interruption of disease transmission [8, 22, 26]. It therefore appears more than ever a priority for those working in the field to find the best strategies to achieve this goal. In Bonon, we confirmed that the prevalence of disease has become very low over the past few years and that AMS are no longer efficient to detect infected individuals, even though HAT patients are still occasionally diagnosed passively [15], indicating that transmission of *T. h. gambiense* may still be occurring.

This study describes an alternative active screening strategy consisting of visiting former patients at their home and testing the people living in their close neighborhood using a targeted door-to-door strategy (TDD), and compares it with classical active mass screening (AMS) in the same area. While zero patients were detected by AMS in 2012, four patients were detected by TDD 2 months later with fewer people screened. In addition, TDD also enabled the detection of significantly more NSERO TL+ cases that are believed to be asymptomatic carriers of parasites [3, 12]. The four NHAT patients detected by TDD were clinically healthy and refused to go to the treatment center where lumbar puncture is performed for staging. Although we do not have CSF results, the patients were likely in stage 1 since they had no neurological symptoms. Interestingly, three of them could be tested again in 2015 and they were negative by parasitology and still asymptomatic, but remained positive by serology (data not shown). Such infection processes have already been described previously in this area [12].

One of the reasons why *T. h. gambiense*-infected individuals are missed by AMS is related to the chronic nature of the disease, with severe clinical symptoms usually appearing late during the infection course, and to the existence of

asymptomatic individuals able to control their infection over sometimes very long periods [1, 10]. Therefore, a number of infected individuals are either asymptomatic or paucisymptomatic [16] and are not interested in spending time participating in repeated and restrictive medical surveys. Other reasons could be social (attitudes toward the disease and the mobile team, fear of being ill, etc.) and economic (no time to attend the screening because of daily activities). These results also suggest and confirm the lack of interest of the at-risk population regarding repeated AMS in a given area [21]. In contrast, TDD that targets the close neighborhood of FHAT patients is a home-based approach and provides a friendlier environment, inviting inhabitants to participate and gain awareness of the disease. Furthermore, the presence of an FHAT case in the direct neighborhood generally prompts others to accept testing.

The fact that the prevalence of infection is increased in the immediate neighborhood of HAT patients as compared to the general population also provides important information on *T. h. gambiense* transmission in this disease focus. Although the prevalence of disease has been markedly reduced by the control measures implemented since the beginning of the outbreak in 2000, our data suggest that very localized transmission cycles may persist in the environment of FHAT patients. It is important to note here that all FHAT patients were successfully cured and therefore probably did not contribute for a long time to the maintenance of transmission in their environment. Interestingly, the NHAT cases were diagnosed in the immediate neighborhood of FHAT cases detected in 2000 when most cases were diagnosed. This suggests that such localized transmission areas can last for long periods of time. Such hypotheses were already proposed to explain the fact that HAT cases often cluster in particular families [9, 17]. It is also possible that the NHAT cases were infected a long time ago and were not detected by AMS for the reasons described above. In this context, targeted vector control measures, such as the deployment of insecticide-impregnated targets where FHAT or NHAT individuals are exposed to tsetse flies, could significantly reduce the risk of secondary infections and help interrupt transmission. Reducing human-tsetse contacts with impregnated targets was recently shown to be efficient in

reducing new infections in the active HAT focus of Boffa in Guinea [4].

Côte d'Ivoire is currently a country where fewer than 10 HAT cases have been detected yearly since 2009 [7], although it is difficult to estimate the true number of cases present because of lack of medical investigation in older HAT foci. In this low-prevalence context, the mass screening approach appears unrealistic to maintain because of low efficiency in detecting the last infected individuals. In such settings, the current strategy is to switch to a passive detection system integrated into the national health structures [22, 26]. An important drawback of the passive approach, however, is that, because it is based on the willingness of HAT patients to present themselves to the local health facilities, these HAT patients are usually diagnosed in the late stage of the disease (increasing the time during which they can act as reservoirs for tsetse flies). The door-to-door approach described here therefore appears to be a useful complementary alternative to maintain targeted active screening across the population. It is therefore very important to carefully geo-localize HAT and SERO TL+ individuals diagnosed during medical surveys and/or by the passive detection system that is likely to be scaled up in the coming years, in order to construct databases on which TDD implementation can rely. In Côte d'Ivoire, we propose the following reactive active case-finding survey strategy, as suggested by WHO [8]: once a HAT case or a SERO TL+ is detected, a small mobile team is sent to screen the immediate neighborhood. Combined with tsetse control measures aimed at reducing human tsetse contacts in their risk environment, as was suggested by [5] in the Forécariah focus (Guinea), we believe that such measures may greatly speed up and ensure a more sustainable elimination process, especially in areas where the disease prevalence is becoming low.

Acknowledgements. The completion of this paper was made possible thanks to a grant from the European Foundation Initiative for NTDs (EFINTD) and the support of the JEAI program of the Institut de Recherche pour le Développement (IRD). It was undertaken within the HAT elimination project in West Africa supported by WHO and IRD. We acknowledge all the technicians from the HAT teams of IPR, University Jean Lorougnon Guédé of Daloa, Centre de Santé Urbain of Bonon, CIRDES, and HAT NCP of Côte d'Ivoire. The authors also thank Val Pierre for helpful advice in writing the manuscript.

References

- Berthier D, Peylhard M, Dayo GK, Flori L, Sylla S, Bolly S, Sakandé H, Chantal I, Thevenon S. 2015. A comparison of phenotypic traits related to trypanotolerance in five West African cattle breeds highlights the value of shorthorn taurine breeds. *PLoS One*, 10(5), e0126498.
- Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C. 2010. Human African trypanosomiasis. *Lancet*, 375(9709), 148–159.
- Bucheton B, MacLeod A, Jamonneau V. 2011. Human host determinants influencing the outcome of *Trypanosoma brucei gambiense* infections. *Parasite Immunology*, 33(8), 438–447.
- Courtin F, Camara M, Rayaisse JB, Kagbadoumo M, Dama E, Camara O, Traore IS, Rouamba J, Peylhard M, Somda MB, Leno M, Lehane MJ, Torr SJ, Solano P, Jamonneau V, Bucheton B. 2015. Reducing human-tsetse contact significantly enhances the efficacy of sleeping sickness active screening campaigns: a promising result in the context of elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(8), e0003727.
- Courtin F, Jamonneau V, Camara M, Camara O, Coulibaly B, Diarra A, Solano P, Bucheton B. 2010. A geographical approach to identify sleeping sickness risk factors in a mangrove ecosystem. *Tropical Medicine and International Health*, 15(8), 881–889.
- Courtin F, Jamonneau V, Oke E, Coulibaly B, Oswald Y, Dupont S, Cuny G, Doumenge JP, Solano P. 2005. Towards understanding the presence/absence of Human African Trypanosomiasis in a focus of Cote d'Ivoire: a spatial analysis of the pathogenic system. *International Journal of Health Geographics*, 4, 27.
- Franco JR, Simarro PP, Diarra A, Jannin JG. 2014. Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clinical Epidemiology*, 6, 257–275.
- Franco JR, Simarro PP, Diarra A, Ruiz-Postigo JA, Jannin JG. 2014. The journey towards elimination of gambiense human African trypanosomiasis: not far, nor easy. *Parasitology*, 141(6), 748–760.
- Gouteux JP, Noireau F, Malonga JR, Frézil JL. 1988. « Effet de case » et « contamination familiale » dans la maladie du sommeil : essai d'interprétation du phénomène : exemple de trois foyers congolais. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 63(5), 315–333.
- Ilboudo H, Jamonneau V, Camara M, Camara O, Dama E, Leno M, Ouendeno F, Courtin F, Sakandé H, Sanon R, Kabore J, Coulibaly B, N'Dri L, Diarra A, N'Goran E, Bucheton B. 2011. Diversity of response to *Trypanosoma brucei gambiense* infections in the Forécariah mangrove focus (Guinea): perspectives for a better control of sleeping sickness. *Microbes and Infection*, 13(11), 943–952.
- Jamonneau V, Bucheton B, Kabore J, Ilboudo H, Camara O, Courtin F, Solano P, Kaba D, Kambire R, Lingue K, Camara M, Baelmans R, Lejon V, Buscher P. 2010. Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in West Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(12), e917.
- Jamonneau V, Ilboudo H, Kabore J, Kaba D, Koffi M, Solano P, Garcia A, Courtin D, Laveissiere C, Lingue K, Buscher P, Bucheton B. 2012. Untreated human infections by *Trypanosoma brucei gambiense* are not 100% fatal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6), e1691.
- Kaba D, Dje NN, Courtin F, Oke E, Koffi M, Garcia A, Jamonneau V, Solano P. 2006. L'impact de la guerre sur l'évolution de la THA dans centre-Ouest de la Côte d'Ivoire. *Tropical Medicine and International Health*, 11(2), 136–143.
- Kagbadoumo MS, Camara M, Rouamba J, Rayaisse JB, Traore IS, Camara O, Onikoyamou MF, Courtin F, Ravel S, de Meeus T, Bucheton B, Jamonneau V, Solano P. 2012. Epidemiology of sleeping sickness in Boffa (Guinea): Where are the trypanosomes? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12), e1949.
- Kambire R, Lingue K, Courtin F, Sidibe I, Kiendrebeogo D, N'Gouan KE, Ble L, Kaba D, Koffi M, Solano P, Bucheton B, Jamonneau V. 2012. La Trypanosomiose Humaine Africaine dans l'espace ivoiro-burkinabé: optimisation des stratégies de surveillance épidémiologique. *Parasite*, 19(4), 389–396.

16. Koffi M, Solano P, Denizot M, Courtin D, Garcia A, Lejon V, Buscher P, Cuny G, Jamonneau V. 2006. Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: A potential human reservoir of parasites? *Acta Tropica*, 98(2), 183–188.
17. Laveissiere C, Sane B, Diallo PB, Truc P, Meda AH. 1997. Le risque épidémiologique dans un foyer de maladie du sommeil en Côte d'Ivoire. *Tropical Medicine and International Health*, 2(8), 729–732.
18. Lumsden WH, Kimber CD, Evans DA, Doig SJ. 1979. *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: adaptation for field use. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(3), 312–317.
19. Magnus E, Vervoort T, Van Meirvenne N. 1978. A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 58(3), 169–176.
20. Mitashi P, Hasker E, Lejon V, Kande V, Muyembe JJ, Lutumba P, Boelaert M. 2012. Human African trypanosomiasis diagnosis in first-line health services of endemic countries, a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), e1919.
21. Robays J, Bilengue MM, Van der Stuyf P, Boelaert M. 2004. The effectiveness of active population screening and treatment for sleeping sickness control in the Democratic Republic of Congo. *Tropical Medicine and International Health*, 9(5), 542–550.
22. Simarro PP, Franco JR, Diarra A, Ruiz Postigo JA, Jannin J. 2013. Diversity of human African trypanosomiasis epidemiological settings requires fine-tuning control strategies to facilitate disease elimination. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 4, 1–6.
23. Simarro PP, Jannin J, Cattand P. 2008. Eliminating human African trypanosomiasis: Where do we stand and what comes next? *PLoS Medicine*, 5(2), e55.
24. Solano P, Kone A, Garcia A, Sane B, Michel V, Michel JF, Coulibaly B, Jamonneau V, Kaba D, Dupont S, Fournet F. 2003. Représentation spatiale des déplacements des malades dans un foyer de Trypanosomose Humaine Africaine en Côte d'Ivoire. *Médecine Tropicale*, 63(6), 577–582.
25. Van Meirvenne N, Magnus E, Buscher P. 1995. Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Tropica*, 60(3), 189–199.
26. WHO. 2013. Control and surveillance of human African trypanosomiasis. WHO Technical Report Series 984. WHO, Geneva, Switzerland.

Cite this article as: Koffi M, N'Djetchi M, Ibouido H, Kaba D, Coulibaly B, N'Gouan E, Kouakou L, Bucheton B, Solano P, Courtin F, Ehrhardt S & Jamonneau V: A targeted door-to-door strategy for sleeping sickness detection in low-prevalence settings in Côte d'Ivoire. *Parasite*, 2016, 23, 51.

PARASITE

An international open-access, peer-reviewed, online journal publishing high quality papers on all aspects of human and animal parasitology

Reviews, articles and short notes may be submitted. Fields include, but are not limited to: general, medical and veterinary parasitology; morphology, including ultrastructure; parasite systematics, including entomology, acarology, helminthology and protistology, and molecular analyses; molecular biology and biochemistry; immunology of parasitic diseases; host-parasite relationships; ecology and life history of parasites; epidemiology; therapeutics; new diagnostic tools.

All papers in Parasite are published in English. Manuscripts should have a broad interest and must not have been published or submitted elsewhere. No limit is imposed on the length of manuscripts.

Parasite (open-access) continues Parasite (print and online editions, 1994-2012) and *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* (1923-1993) and is the official journal of the Société Française de Parasitologie.

Editor-in-Chief:
Jean-Lou Justine, Paris

Submit your manuscript at
<http://parasite.edmgr.com/>

RESUME

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil est une maladie tropicale négligée dont l'agent pathogène, le trypanosome, est transmis à l'homme par la glossine ou mouche tsé-tsé. En Côte d'Ivoire, grâce aux efforts des différentes structures de contrôle et de recherche agissant dans les foyers de la THA, moins de 10 cas sont dépistés par an ces dernières années et il est possible de parler d'élimination de la THA comme souhaitée par l'OMS à l'horizon 2020. Dans ce contexte, il apparaît indispensable de recenser et d'étudier toutes les composantes du complexe pathogène pouvant faire obstacle au projet d'élimination de la THA. Les animaux domestiques en contact avec le vecteur de trypanosomes, pourraient jouer un rôle important dans le maintien et la résurgence de la Maladie. C'est au vue de ce qui précède que cette étude a été initiée pour investiguer l'importance épidémiologique des animaux domestiques dans la chaîne de la THA dans les foyers endémiques en Côte d'Ivoire. Pour ce faire, des échantillons de sang et de plasma ont été prélevés sur 1462 animaux domestiques comprenant 667 porcs, 286 caprins, 342 ovins et 167 Bovins et analysés à l'aide d'examen parasitologiques, immunologiques et biologie moléculaire par PCR. Les examens parasitologiques ont permis de mettre en évidence des trypanosomes chez 11,35 % des animaux échantillonnés. L'analyse moléculaire par PCR, plus sensible, a révélé l'ADN de l'espèce *T. brucei* s.l. à laquelle appartient la sous espèce pathogène pour l'homme, chez 249 animaux sur 1462, soit une prévalence de 17,03 %. Les porcs ont été les animaux hébergeant le plus de souches de *T. brucei* s.l. La PCR à partir des marqueurs TgsGP a détecté la présence de l'ADN de *T. b. gambiense* chez quatre animaux domestiques (porcs). La structuration génétique des populations a révélé que les souches de trypanosomes étudiées se retrouvaient dans le même groupe que *T. b. brucei* et *T. b. gambiense* groupe 2. Bien que ces souches n'appartiennent pas au groupe homogène de *T. b. gambiense* groupe 1, elles peuvent bien être infectantes pour l'homme à l'instar des souches de *T. b. gambiense* groupe 2. Dans cette étude, le xénodagnostic a montré que des porcs infectés avec de faibles parasitemies de trypanosomes pouvaient transmettre l'infection via les mouches tsé-tsé à partir de repas infectieux. Cette expérience prouve que la mouche tsé-tsé peut être infectée à partir d'hôtes mammifères avec des charges parasitaires indétectables par les méthodes parasitologiques classiques. Ces hôtes peuvent être considérés comme des réservoirs de parasites et maintenir la propagation de la maladie à un niveau faible. Il convient donc de mettre en place une stratégie de surveillance en intégrant le concept *One Health* ou santé unique encore appelée santé écosystémique pour une élimination durable de la THA en Côte d'Ivoire.

Mots Clés : Trypanosomes, réservoir animal, *T. brucei* s.l, *T. b. gambiense*, marqueurs microsatellites, génétique des populations, épidémiologie.

ABSTRACT

Human African Trypanosomiasis (HAT), or sleeping sickness, is a neglected tropical disease which pathogen, the trypanosome, is transmitted to humans by the tsetse flies. In Côte d'Ivoire, less than 10 cases have been detected per year in recently and it is possible to talk about the elimination of HAT as desired by WHO for 2020. Thus, it appears essential to identify and study all the components of the pathogenic complexity that could hamper the project of eliminating HAT. Domestic animals in contact with the tsetse flies could play an important role in maintaining and resurging of the disease. With regard to above state, this study was initiated to investigate the epidemiological importance of domestic animals in the HAT chain in endemic foci in Côte d'Ivoire. To do this, blood and plasma samples were collected from 1462 domestic animals including 667 pigs, 286 goats, 342 sheep and 167 cattle and were analyzed by parasitological, immunological and molecular biology tests. Parasitological examinations revealed trypanosomes in 11.35% of the animals sampled. More sensitive, molecular analysis by PCR revealed the DNA of *T. brucei* s.l., which the human pathogenic subspecies belongs to in 249 animals out of 1462, showing prevalence of 17.03%. Pigs emerged as the animals harboring most of *T. brucei* s.l strains. PCR from TgsGP markers detected *T. b. gambiense*, DNA in four domestic animals (pigs, goats). The genetic structure of the populations revealed that the strains of trypanosomes studied were in the same group as *T. b. brucei* and *T. b. gambiense* group 2. Although these strains do not belong to the homogeneous group of *T. b. gambiense* group 1, they may well be infective for human like the strains of *T. b. gambiense* group 2. In this study, xenodiagnosis showed that pigs infected with low parasitaemias of trypanosomes could transmit infection via tsetse flies from infectious meals. Although only a small number of flies have been dissected, this experiment proves that the tsetse fly could be infected from mammalian hosts with parasite loads undetectable by conventional parasitological methods. These hosts could be considered as reservoirs of parasites and keep the spread of the disease at low level. It is therefore necessary look for strategy integrating the concept of One Health also called ecosystem health, for the sustainable elimination of HAT in Côte d'Ivoire.

Key words: Trypanosome, animal reservoir, *T. brucei* s.l, *T. b. gambiense*, microsatellite markers, population genetics, epidemiology.