



Institut français de recherche scientifique
pour le développement en coopération



VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE
DE *TRYPANOSOMA CONGOLENSIS*,
AGENT DE LA TRYPANOSOMOSE ANIMALE :
IMPLICATIONS TAXONOMIQUES
ET ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Issa SIDIBÉ

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II

Sciences et Techniques du Languedoc

THESE

présentée à l'université des Sciences et Techniques du Languedoc en vue de l'obtention
du diplôme de DOCTORAT ès Sciences

Formation doctorale : Biologie de l'Evolution et Ecologie
Ecole doctorale : Biologie des Systèmes Intégrés, Agronomie, Ecologie
(BSAIE)

VARIABILITE GENETIQUE DE *TRYPANOSOMA CONGOLENSE*,
AGENT DE LA TRYPANOSOMOSE ANIMALE :
IMPLICATIONS TAXONOMIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES

par

Issa SIDIBE

Soutenu le 17 décembre 1996 devant le jury composé de :

M Thaler Louis, Professeur,	Université Montpellier II,	Président
M Godfrey David, Professeur,	MRC Bristol, U. K,	Rapporteur
Mme Cambon-Thomsen Anne,	Directeur de Recherche, CNRS	Rapporteur
M Frézil Jean-Louis,	Directeur de Recherche, ORSTOM,	Examinateur
M Duvallet Gérard,	Directeur de Recherche, CIRAD-EMVT,	Examinateur
M Tibayrenc Michel,	Directeur de Recherche, ORSTOM,	Directeur de thèse

4200079646
2 ep FDI
Noir / Jean



17 AVR. 1997



F

Les opinions exprimées dans ce document
n'engagent que la responsabilité de l'auteur

Ce travail de recherche a été effectué par Issa Sidibé au sein de l'Unité Mixte de Recherche CNRS-ORSTOM n°9926 «Laboratoire de Génétique moléculaire des parasites et des vecteurs» (UR des Maladies infectieuses et parasitaires ; Département Eau et Santé) du centre de recherche Orstom de Montpellier, sous la direction du Dr Michel Tibayrenc, directeur de l'UMR, pour l'obtention du Doctorat ès Sciences (Ecole doctorale : Biologie des systèmes intégrés, agronomie, écologie (Dir. Pr Louis Thaler)), de l'université des sciences et techniques du Languedoc-Montpellier II, le 17 décembre 1996.

Issa SIDIBÉ

VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE
DE *TRYPANOSOMA CONGOLENSE*,
AGENT DE LA TRYPANOSOMOSE ANIMALE :
IMPLICATIONS TAXONOMIQUES ET ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Je voudrais dédier cette thèse :

- à la mémoire de ma soeur Assita et de mon ami Oumar Louqué (ex-directeur du projet PDR/AFKM de Bobo-Dioulasso) que je n'ai pu accompagner à leurs dernières demeures pour cause : la distance. Je vous embrasse très cordialement. Reposez en paix.

- à ma grand-mère Khumani, qui, dès mes premiers pas sur le chemin de l'école, tu as su m'encourager, ne serait-ce par tes galettes « froufrou » de tous les matins. Saches que tu restes ma chérie de tous les temps.

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord adresser toute ma gratitude à tous les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

- Professeur Thaler : Vous m'avez déjà accepté dans votre école doctorale et avez toujours prêté attention à mes questions à chaque fois que je me suis adressé à vous. Aujourd'hui vous acceptez de juger personnellement mon travail. Trouvez ici ma très grande reconnaissance.

- Professeur Godfrey : je garde encore en mémoire l'accueil chaleureux dont j'ai bénéficié lors de mon séjour dans votre laboratoire pour m'initier à la culture *in vitro* de trypanosomes africains. En plus de cela vous êtes aujourd'hui un des deux rapporteurs de la thèse qui en sort. Je vous en remercie énormément et vous prie par la même occasion de transmettre mes reconnaissances à Joe McNamara, Jamie Stevens et les techniciennes de votre ancien laboratoire du MRC pour leur très bonne collaboration.

- Mme Cambon-Thomsen : vous m'avez vu, durant une année, pendant mon stage de DEA dans votre centre à Toulouse. Le fait d'accepter être rapporteur dans ce jury pour juger du travail que j'ai pu effectuer par la suite, constitue un honneur pour moi. Je vous en remercie énormément.

- M. Frézil : vous vous êtes toujours montré disponible à mon égard et vous m'exprimez aussi votre bonne humeur en me racontant des anecdotes apprises au contact de ce continent africain. Un double merci pour m'avoir fait profiter de votre grande expérience sur les trypanosomoses humaines africaines, à travers nos discussions de tous les jours.

- M. Duvallet : de ce jury vous êtes celui qui m'a connu dès mes premiers contacts avec les trypanosomes au CRTA de Bobo. Depuis ce temps vous n'avez cessé de m'encourager et aujourd'hui vous acceptez de prendre part au jugement de ma thèse. Toute ma profonde gratitude pour toutes ces actions qui me touchent profondément.

- Michel Tibayrenc : même étant mon directeur de thèse, j'ai quand même du mal à t'exprimer en une phrase toute ma reconnaissance pour ton entière disponibilité surtout à la fin de la rédaction de ce manuscrit. Je ne peux que dire : « dieu te le rendra au ...uple ». Vivement que naisse et grandisse le CEPM. ...|...

Je remercie également :

- Le Docteur Touré, directeur du CIRDES pour avoir facilité tous les séjours que j'ai effectués dans son centre au cours de cette thèse afin de collecter les stocks de trypanosomes qui font l'objet du précieux matériel biologique de ce travail. A travers vous je remercie mes collègues Lassina Ouattara et Zakaria Bengaly ainsi que tout le personnel technique de l'équipe épidémiologie pour leur parfaite collaboration.

- Docteur Cuisance : je ne peux passer sous silence la sympathie que vous avez exprimée à mon égard, tout le temps que nous nous sommes connus à l'ORSTOM. Vous m'avez surtout fait profiter de votre importante bibliographie sur les problèmes de trypanosomoses animales africaines. Acceptez mes sincères reconnaissances et merci une fois de plus.

- Je dois énormément au Professeur Fumoux qui est l'un des pionniers de mon arrivée en France. Jusqu'au dernier moment vous vous êtes toujours préoccupé de ce que je devenais. Maintenant je repars après avoir appris beaucoup de choses tant sur le plan scientifique que sur la culture générale et aussi à me connaître moi même. Mille et un merci.

- Peter Henning Clausen : C'est plus, par amour pour la vache et son compagnon, que par la profession, que nous nous sommes cotoyés. Mais les deux aspects se complétant, ils ont contribué à consolider notre amitié. C'est l'occasion pour moi, en cette fin de thèse sur T. congolense, de te dire que la vie continue de plus belle dans le même sens. Très amicalement.

- La famille Favard et Savigny, à Châtelleraut : il faut dire que j'ai toujours retrouvé mon environnement naturel à chaque fois que je suis parmi vous : famille nombreuse, solidarité familiale, sourires aux lèvres. Merci de m'avoir toujours considéré comme un des vôtres. J'en suis très ému. J'en profite également pour remercier Jean-Louis et Geneviève Moreau pour leur sympathie.

...|...

J'arrive maintenant à l'équipe du LQMPV avec qui j'ai vécu ces 4 années de thèse. Chacun de vous a su m'exprimer sa présence d'une manière ou d'une autre jusqu'au final de ce travail. Je veux parler de : Bruno Oury et Frédérique Tarrieu, Marta De Lana et Artur Dasilveira, Anne Garlot, Brigitte Bastrenta, Christian Barnabé, Virginie Zuesney, Kathleen Victoir, Lorena Perez et de Philippe Solano. Acceptez là mes sincères remerciements.

- s'agissant de Anne-Laure Bañals et Sylvain Brisse, avec qui nous avons constitué ce « trio infernal du RAPD », je vous remercie de vos remarques judicieuses tout le long de ce travail. Je vous souhaite une bonne fin de thèse et surtout beaucoup de chance dans l'après thèse. Très cordialement.

- à Sébastien Noël, je te demande plutôt de transmettre mon merci à Nabila pour avoir accepté, au moment où elle avait le plus besoin de toi, à côté d'elle, de te laisser t'occuper du traitement informatique de mes données. A ta famille aggrandie par l'arrivée de Marina, je souhaite plein de bonheur.

- Merci également à Jean-Marc Reifenberg, pour sa coopération de tous les temps et pour sa contribution à l'identification des stocks du Burkina par les sondes génomiques.

Tous les amis (ies) de l'ORSTOM ou pas, résidant en France (Cité Agropolis, Montpellier, Maurin, Toulouse, Marseille, Orléans, Paris), aux Etats-Unis (Memphis puis Seattle, Notre Dame), en Afrique (Cameroun, Kenya, Burkina Faso), au Ladakh, et qui, par un coucou, un coup de fil, un message électronique, ou une carte postale, m'ont témoigné leur amitié, je vous remercie et vous embrasse très fort.

C'est certain que j'aurai du mal à citer tout le monde sur cette liste mais personne n'est oubliée dans mon esprit. Tous ceux, avec qui, j'ai pu découvrir et ou aimer et ou pratiquer une des activités extra professionnelles ci-dessous, sachez que vous avez énormément contribué à mon épanouissement en France. Je vous resterai à jamais reconnaissant de ces souvenirs intarissables. Il s'agit de sport (tennis, volley-ball, basket-ball, squash, escalade, canoë, et même le ski), et loisirs (salsa, jazz et voyage en Espagne, en Belgique, en Angleterre, aux Etats Unis, à l'intérieur de la France et sur l'île de beauté qu'est la Corse).

Enfin, à mes parents et à celles ou ceux, à qui j'ai manqué durant mon absence du pays, sachez que je vous aime encore plus. A bientôt.

SOMMAIRE

RESUME

SUMMARY

CHAPITRE I. INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE II. CONNAISSANCES ACTUELLES	4
2.1. LES TRYPANOSOMES	4
2.1.1. Les trypanosomes du bétail	4
2.1.2. La taxonomie du sous-genre <i>Nannomonas</i>	5
2.1.3. Cycle biologique du parasite	8
2.1.3.1. Chez la glossine	8
2.1.3.2. Chez l'hôte mammifère	8
2.2. LES TRYPANOSOMOSES ANIMALES	11
2.2.1. Symptômes et lésions	11
2.2.2. Diagnostic	14
2.2.3. Epidémiologie de la Nagana	15
2.2.4. Méthodes de lutte	16
2.3. LE GENOME DU TRYPANOSOME	17
2.3.1. L'ADN nucléaire	17
2.3.2. L'ADN kinétoplastique	18
2.3.2.1. Les minicercles	18
2.3.2.2. Les maxicercles	19
2.3.3. Le mode de reproduction et la structure des populations des trypanosomes	19
2.4. LA DIVERSITE GENETIQUE DES TRYPANOSOMES DU SOUS-GENRE <i>NANNOMONAS</i>	21
CHAPITRE III. MATERIEL ET METHODES	23
3.1. LA CULTURE DES TRYPANOSOMES	23
3.1.1. Isolement et culture des formes sanguines	23
3.1.2. Culture de formes procycliques	23
3.1.3. Cryoconservation	24
3.1.3. Préparation des culots parasitaires	24
3.2. ELECTROPHORESE DES ISOENZYMES	29
3.2.1. Généralités	29
3.2.1.1. Electrophorèse isoenzymatique et génétique	29
3.2.1.2. Principe de la visualisation	30

3.2.2. Méthode utilisée	30
3.2.2.1. Préparation des extraits	30
3.2.2.2. Le support	31
3.2.2.3. La migration	31
3.2.2.4. La révélation	31
3.2.2.5. Les systèmes enzymatiques	36
3.2.2.6. La lecture des plaques	36
3.3. L'AMPLIFICATION DE L'ADN PAR LA TECHNIQUE DU RAPD	39
3.3.1. Principe du RAPD	39
3.3.2. Le matériel	39
3.3.3. Méthodes utilisées	40
3.3.3.1. L'extraction d'ADN	40
3.3.3.1.1. La lyse des cellules	40
3.3.3.1.2. Déprotéinisation	40
3.3.3.1.3. Précipitation de l'ADN	40
3.3.3.1.4. Dosage de l'ADN	40
3.3.3.2. L'amplification	41
3.3.3.3. Migration et révélation	41
3.3.3.4. Lecture des profils	41
3.4. METHODES D'ANALYSE DES RESULTATS	43
3.4.1. Variabilité génétique	43
3.4.1.1. Le taux de polymorphisme	43
3.4.1.2. La diversité génétique moyenne	43
3.4.1.3. La distance de Jaccard	44
3.4.2. Les méthodes de classification	44
3.4.2.1. Le dendrogramme : méthode phénétique	44
3.4.2.2. Le réseau de Wagner : méthode de parcimonie	44
3.4.3. Analyse de génétique des populations	45
CHAPITRE IV. RESULTATS	48
4.1. LA CULTURE DES TRYPANOSOMES	48
4.1.1. Le temps de production des stocks	48
4.1.2. Le choix du milieu de culture	49
4.2. IDENTIFICATION DES STOCKS	50
4.2.1. Résultats du typage des stocks par les isoenzymes	50
4.2.1.1. Les enzymes non révélées	50
4.2.1.2. L'expression de plusieurs locus d'une même enzyme	50
4.2.1.3. Enzymes monomorphes dans un groupe donné	50
4.2.1.4. La révélation des hétérozygotes	51
4.2.2. Résultat du typage des stocks par RAPD	51
4.2.2.1. Détection de fragments ou de profils monomorphes pour un groupe donné	52

4.2.3. Comparaison des identifications génétiques et morphologiques	54
4.2.4. Spécificités épidémiologiques des différents groupes de <i>T. congolense</i>	56
4.3. COMPARAISON PHYLOGENETIQUE	58
4.3.1. Comparaison des distances génétiques au sein du sous-genre <i>Nannomonas</i>	58
4.3.2. Comparaison des distances génétiques entre microorganismes	65
4.4. RESULTATS DES TESTS DE GENETIQUE DES POPULATIONS	68
4.4.1. Résultat du calcul des indices de diversité génétique	68
4.4.2. Résultat du taux de polymorphisme	69
4.4.3. Résultat des tests de déséquilibre de liaison	69
CHAPITRE V. DISCUSSION	72
5.1. CULTURE DES SOUCHES DE <i>T. CONGOLENSE</i>	72
5.2. SPECIFICITE DE CERTAINS CARACTERES ISOENZYMATIQUES CHEZ <i>T. CONGOLENSE</i>	73
5.3. LA SELECTION DES AMORCES RAPD	73
5.4. SIGNIFICATION DES PROFILS ISOENZYMATIQUES HETEROZYGOTES	74
5.5. PROFILS RAPD « HYBRIDES »	74
5.6. APPORT EPIDEMIOLOGIQUE DES ISOENZYMES ET DES RAPD	74
5.7. PHYLOGENIE ET TAXONOMIE DE <i>T. CONGOLENSE</i>	76
5.8. MODE DE REPRODUCTION ET STRUCTURE DES POPULATIONS DE <i>T. CONGOLENSE</i>	77
CHAPITRE VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	80
CHAPITRE VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	82
CHAPITRE VIII. ANNEXES	93
PUBLICATIONS ET RESUMES DE COMMUNICATION ET POSTERS	

RESUME

Trypanosoma congolense est une espèce de protozoaire parasite, qui est un des responsables majeurs de la trypanosomose animale sévissant en Afrique. Il fait partie du sous-genre *Nannonomas*, de la famille des *Trypanosomatidae*. Selon la taxonomie actuellement en vigueur il se subdivise en 3 groupes écogéographiques appelés: « Savannah », « Forest », et « Kilifi ».

Notre travail a eu pour objectif d'étudier la variabilité génétique de ce parasite par électrophorèse multilocus d'isoenzymes et par amplification de manière aléatoire de l'ADN ou Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), et surtout, d'appliquer à l'analyse de ces données les méthodes de la génétique de l'évolution. Nous avons analysé à cet effet 49 stocks d'origines géographiques diverses avec 18 systèmes isoenzymatiques polymorphes et 23 amorces RAPD. Nous avons d'abord commencé par mettre au point un milieu de culture qui permet de maintenir de façon pérenne *T. congolense in vitro*. Les résultats obtenus sur les analyses génétiques corroborent la subdivision actuelle de *T. congolense* en 3 groupes distincts. Dans l'analyse phylogénétique, *T. congolense* n'apparaît pas comme un groupe monophylétique distinct des autres espèces incluses dans notre analyse (*T. simiae*, *T. godfreyi*). Il est impossible de savoir si ce résultat est dû au fait que le niveau de résolution des isoenzymes et des RAPD est mal adapté pour étudier des niveaux de divergence phylogénétique aussi importants (horloge moléculaire trop rapide), ou si *T. congolense* est un groupe réellement polyphylétique.

Nous avons comparé la variabilité RAPD de *T. congolense* avec celles d'autres parasites voisins (*Trypanosoma brucei* sensu lato, agent de la trypanosomose africaine, *T. cruzi*, agent de la maladie de Chagas, et diverses espèces de *Leishmania*, agents des leishmanioses). La diversité phylogénétique intraspécifique de *T. congolense* est apparue très supérieure à celle de *T. brucei* s.l., supérieure à celle de *T. cruzi*, et comparable à celle qu'on observe pour des espèces de *Leishmania* radicalement différentes les unes des autres.

De nombreux caractères génétiques sont apparus comme spécifiques de subdivisions phylogénétiques données, soit au niveau de l'espèce, soit au niveau subsppécifique (caractères synapomorphes). Ceci a été observé pour les isoenzymes et pour les RAPD. Dans ce dernier cas, les fragments impliqués pourront être isolés et séquencés, dans le but d'élaborer des sondes et des diagnostics PCR spécifiques.

SUMMARY

Trypanosoma congolense is a parasitic protozoan and is one of the main the agents of African animal trypanosomiasis. It is included in the subgenus *Nannomonas* and in the family *Trypanosomatidae*. According to the presently accepted taxonomy, it is subdivided into 3 ecogeographical groups named: "Savannah", "Forest", and "Kilifi".

The goal of our work was to analyze this parasite's genetic variability by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) and by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)., and, most of all, to apply to the analysis of these data, the methods of evolutionary genetics. For this, we have analyzed 49 stocks of diversified geographical origin with 18 polymorphic enzyme systems and 23 RAPD primers. As a start, we have perfected a culture medium that permits to maintain *in vitro* *T. congolense* in the long run. The results obtained by genetic analysis corroborate the presently described subdivision of *T. congolense* into 3 distinct groups. By phylogenetic analysis, *T. congolense* does not appear as a monophyletic group, that would be distinguishable from other species included in our analysis (*T. simiae*, *T. godfreyi*). It is impossible to know whether this result is due to the fact that the level of resolution of MLEE and RAPD is not suited for analyzing such high levels of phylogenetic divergence (too fast molecular clock), or *T. congolense* is really a polyphyletic group.

We have compared the RAPD variability of *T. congolense* with that of related parasites (*T. brucei* sensu lato, the agent of African trypanosomiasis, *T. cruzi*, the agent of Chagas' disease, and various species of *Leishmania*, the agents of leishmanioses). Subspecific phylogenetic diversity of *T. congolense* appeared much higher than that of *T. brucei* s.l., higher than that of *T. cruzi*, and comparable to the one observed between radically distinct species of *Leishmania*.

Many genetic characters proved to be specific of given phylogenetic subdivisions, either at a specific level, or at a subspecific level (synapomorphic characters). This has been observed both for isoenzymes and for RAPD. In the case of RAPD, it will be possible to isolate and sequence the involved fragments, to design specific probes and PCR tools of identification.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

En Afrique, de nombreuses espèces de trypanosomes sanguicoles sont essentiellement transmises par les mouches tsé-tsé (*Glossina* sp.). La distribution des maladies dont ils sont responsables suit celle de leurs vecteurs (excepté *T. vivax* qu'on rencontre hors d'Afrique) et couvre une région d'environ 10 millions de km², soit un tiers du continent africain entre 15° de latitude nord et 20° de latitude sud (figure 1, page 3).

Chez l'homme, les trypanosomes sont responsables de la trypanosomose humaine africaine, ou maladie du sommeil. S'il existe aujourd'hui en Afrique des fléaux plus dévastateurs, la trypanosomose ne peut cependant être considérée comme une maladie du passé. Elle continue de sévir sous une forme endémo-épidémique, et l'on estime qu'environ 50 millions de personnes y sont exposées dans plus de 200 foyers. Une explosion épidémique est d'actualité en Afrique centrale où l'Organisation Mondiale de la Santé rapporte plus de 90% de malades dans certains villages du Zaïre.

Si la trypanosomose humaine est limitée à des foyers, la Nagana ou trypanosomose animale est, elle, largement distribuée. Cette maladie a probablement joué un rôle déterminant dans l'histoire du continent. Elle y a conditionné l'introduction du bétail, freinant la diffusion du bétail zébu (*Bos indicus*). Aujourd'hui, la Nagana demeure un obstacle majeur au développement. Elle affecte 37 pays situés dans les régions potentiellement les plus productives d'Afrique, dont 7 millions de km² de savane humide. On estime que 50 millions de bovins et 70 millions de petits ruminants y sont exposés. La productivité du bétail et l'utilisation des animaux pour l'agriculture (engrais, traction) sont affectées. Fuyant les zones infestées par les glossines, l'élevage tend à se concentrer dans les zones semi-arides aux ressources fourragères limitées, entraînant la dégradation progressive des pâturages.

Les trypanosomes du sous-genre *Nannomonas* constituent les agents principaux de la Nagana en Afrique subsaharienne, par leur fréquence, leur pathogénicité et leurs conséquences sur la productivité. Tous les membres de ce sous-genre développent un cycle dans l'intestin moyen et le proboscis de l'insecte vecteur. On distingue classiquement 2 espèces : *T. congolense*, qui provoque une infection aiguë chez les ruminants domestiques (bovins, ovins, caprins), et *T. simiae*, qui est responsable d'une infection similaire chez le porc. Une nouvelle espèce, *T. godfreyi*, qui provoque une maladie subaiguë chez le porc, a été récemment décrite (McNamara, Mohammed & Gibson, 1994). Les outils génétiques (isoenzymes, sondes d'ADN) ont révélé une diversité génétique considérable chez *T. congolense* (Young & Godfrey, 1983 ; Majiwa & Webster, 1987 ; Gashumba, Baker & Godfrey, 1988 ; Knowles *et al.*, 1988 ; Gibson, Dukes & Gashumba, 1988 ;

Majiwa *et al.*, 1993). Sur la base de ces caractères génétiques, trois principaux groupes écogéographiques ont été décrits, dont la valeur phylogénétique reste à démontrer (Savannah, Forest, Kilifi). *T. godfreyi* semble partager le même réservoir mammifère que *T. simiae* mais il provoque une maladie subaiguë chez le porc, et est classé comme une espèce à part entière par des critères biochimiques (McNamara *et al.*, 1994). Les marqueurs génétiques ont certes contribué à mieux connaître la phylogénie et la taxonomie actuelle de ces trypanosomes africains transmis par les glossines, mais de nombreux points obscurs demeurent, que nous avons tenté d'aborder dans le présent travail :

- (a) *Trypanosoma congolense* représente-il un groupe monophylétique individuel, facilement distinguable d'autres espèces proches (*T. simiae*, *T. godfreyi*)?
- (b) Quel est le statut phylogénétique des subdivisions (Savannah, Kilifi, Forest) distinguées au sein de *T. congolense* par les marqueurs génétiques, principalement les isoenzymes?
- (c) La structure des populations de *T. congolense* est-elle clonale, comme l'ont suggéré Tibayrenc *et al.* (1990), ou panmictique?

Les points (a) et (b) sont cruciaux pour estimer la possibilité d'élaborer des marqueurs moléculaires spécifiques de *T. congolense* ou de ses subdivisions ; si l'on n'a pas affaire à des groupes monophylétiques, on sera dans l'impossibilité d'individualiser des caractères moléculaires synapomorphes, qui pourraient être utilisés comme marqueurs spécifiques. Le point (c) conditionne l'utilisation des génotypes multilocus du parasite comme marqueurs épidémiologiques. Si l'espèce n'est pas clonale, ses génotypes seront instables, du fait de l'interférence constante de la recombinaison génétique. Ils ne seront donc pas utilisables comme marqueurs épidémiologiques (Tibayrenc *et al.*, 1990).

D'autres part, en menant cette étude en synergie avec d'autres projets sur des parasites voisins de la famille des *Trypanosomatidae* (*T. cruzi*, *Leishmania*, *T. brucei*) nous voudrions avoir une idée comparative entre la variabilité génétique au sein de *T. congolense* et celles existantes chez ces différents autres microorganismes. Est ce que les méthodes de classification actuelles au sein du sous-genre *Nannomonas* correspondent à celles pratiquées pour *Leishmania* ou pour *T. cruzi* en considérant surtout les caractères génétiques de ces parasites ?

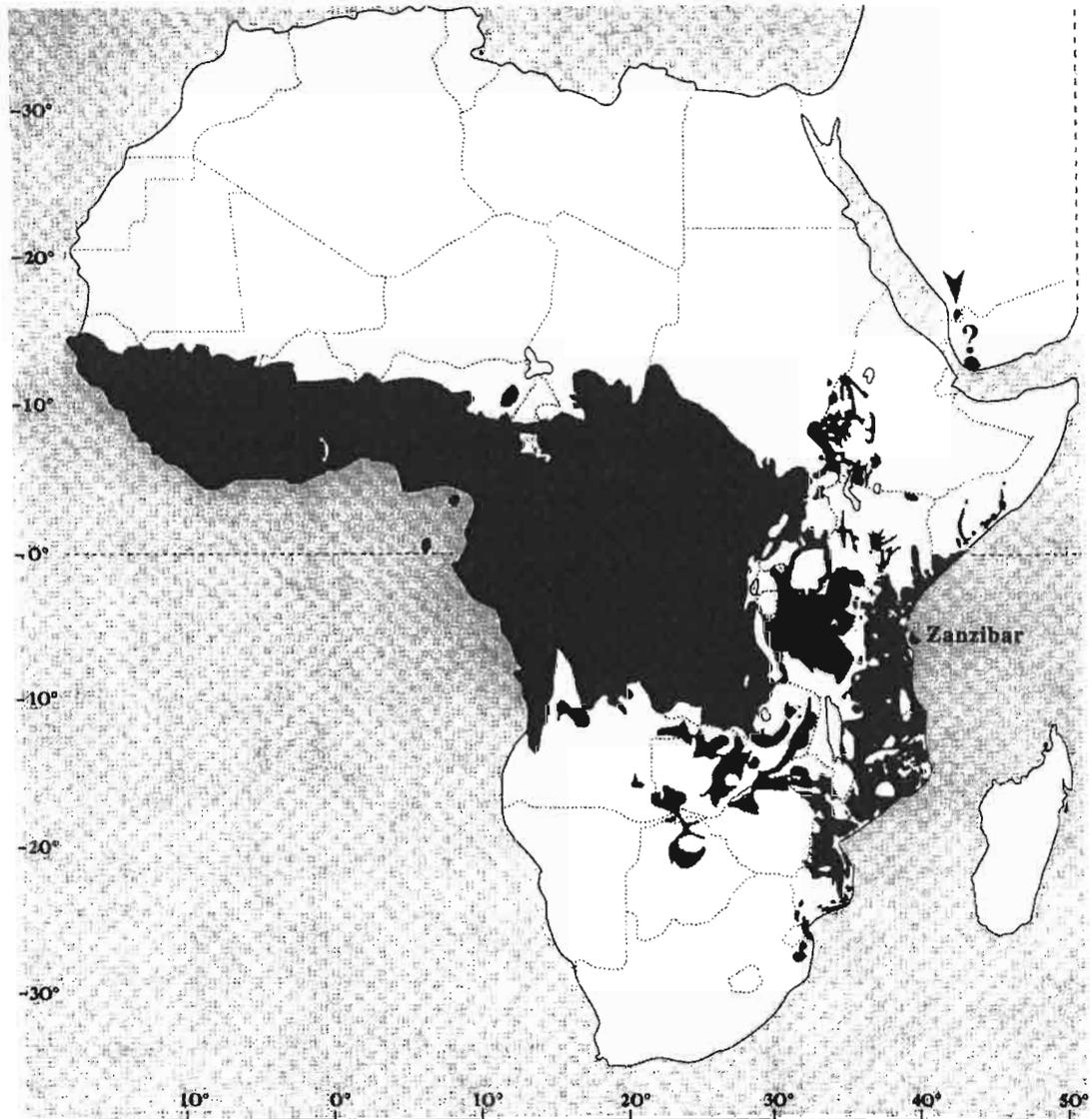


Figure 1 : aire de répartition des glossines responsables des trypanosomoses en Afrique (Brunhes et al. 1994).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CONNAISSANCES ACTUELLES

I. LES TRYPANOSOMES

1.1. LES TRYPANOSOMES DU BETAIL

En Afrique, les bovins peuvent être infectés par trois espèces de trypanosomes pathogènes du genre *Trypanosoma* : *T. congolense* (Brodin, 1904), *T. vivax* (Ziemann, 1905), *T. brucei* (notamment la sous-espèce *T. brucei brucei*) (Plimmer et Bradford, 1899), et une espèce non pathogène *T. theileri* (Laveran, 1902). Les deux premières espèces transmissibles essentiellement par les glossines sont les principaux agents de la Nagana. *T. theileri*, est une espèce cosmopolite, non pathogène, et transmissible de façon mécanique par des insectes hématophages.

L'espèce *T. brucei* comprend, outre *T. brucei brucei*, les agents de la maladie du sommeil de l'homme : *T. brucei gambiense* et *T. brucei rhodesiense*.

T. brucei (sous-genre *Trypanozoon*) est le plus étudié des trypanosomes africains, du fait qu'il peut être facilement adapté et multiplié en culture en milieu axénique (Baltz *et al.*, 1985, Duszenko *et al.*, 1985) ou *in vivo* chez la souris (mais difficilement *T. b. gambiense*). Les trypanosomes de l'espèce *T. brucei* sont très proches les uns des autres aux plans morphologique et biochimique. Ils se distinguent essentiellement par leurs caractères d'infectiosité et de pathogénicité, et par leur distribution géographique. *T. b. gambiense* est l'agent de la maladie du sommeil en Afrique de l'Ouest. Il a été décrit au sein de ce groupe une individualité génétique appelé "groupe 1" qui regroupe 80% des stocks d'origine humaine et un « groupe 2 » très hétérogène correspondant à des stocks principalement isolées chez les animaux (Gibson *et al.*, 1986 ; Godfrey *et al.*, 1990, Mathieu-Daudé, 1991). A part l'Homme, *T. brucei gambiense* pourrait également infecter des animaux domestiques, qui seraient susceptibles de jouer le rôle de réservoir (Mehlitz, 1986). Il est donc responsable d'une anthroponose. *T. brucei brucei* n'infecte pas l'homme du fait de sa sensibilité au sérum humain, mais parasite les animaux domestiques et sauvages dans toute l'Afrique. *T. brucei rhodesiense*, qui peut être considéré comme un variant des stocks est-africaines de *T. brucei brucei* (Tait *et al.*, 1985), est l'agent de la maladie du sommeil dans sa forme aiguë d'Afrique de l'Est. A la différence de *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense* est responsable de zoonose. Il peut être infectieux dans l'espèce bovine, chez laquelle il provoque un syndrome de gravité allant de l'infection inapparente à une méningo-encéphalite comparable à celle observée dans la maladie du sommeil humaine (Wellde *et al.*, 1989).

T. vivax (sous-genre *Duttonella*), également fréquent chez les bovins, est de pathogénicité très variable. En Afrique centrale et occidentale, *T. vivax* est généralement moins pathogène que *T. congolense* (Touré *et al.*, 1978 ; Trail *et al.*, 1991). Il est souvent restreint aux Ongulés. Les stocks de *T. vivax* d'Afrique de l'Est se distinguent de celles d'Afrique de l'Ouest sur les plans antigénique et biochimique (Fasogbon *et al.*, 1990). La diversité antigénique de *T. vivax* serait beaucoup plus limitée que celle de *T. congolense* ou de *T. brucei* (Murray et Clarkson, 1982, Vos et Gardiner, 1990). Autrefois considéré comme parasite exclusivement vasculaire, *T. vivax* a été retrouvé dans le myocarde, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse (Gardiner, 1989).

T. congolense (sous-genre *Nannomonas*) est l'agent principal de la Nagana, par sa fréquence, sa pathogénicité et ses conséquences sur la productivité. Les trypanosomes du sous-genre *Nannomonas* faisant l'objet de notre étude, davantage de détails concernant *T. congolense* seront donnés dans les pages suivantes.

1.2. TAXONOMIE DU SOUS-GENRE *NANNOMONAS* (voir figure 2 page 6)

Le sous-genre *Nannomonas* regroupe deux espèces, non pathogènes pour l'homme : *Trypanosoma congolense* et *Trypanosoma simiae*

T. congolense (Broden, 1904) est probablement le trypanosome africain ayant la plus grande incidence économique en Afrique, car il affecte de très nombreuses espèces animales. Essentiellement pathogène chez les ruminants, cette espèce parasite aussi les Equidés et les Suidés de même que les Canidés et les Félidés (Euzéby, 1989). L'anémie sévère rencontrée chez les animaux malades caractérise cette parasitose.

T. simiae (Bruce, 1912) a été découvert pour la première fois chez le singe. Ce trypanosome parasite essentiellement les Suidés et est très pathogène pour le porc. La virulence chez le porc représente, en effet, un critère de discrimination entre *T. congolense* et *T. simiae*. Cette espèce est très rarement rencontrée chez les Bovidés, les Equidés et les Félidés. Les rongeurs de laboratoire ne semblent pas être affectés (Euzéby, 1989).

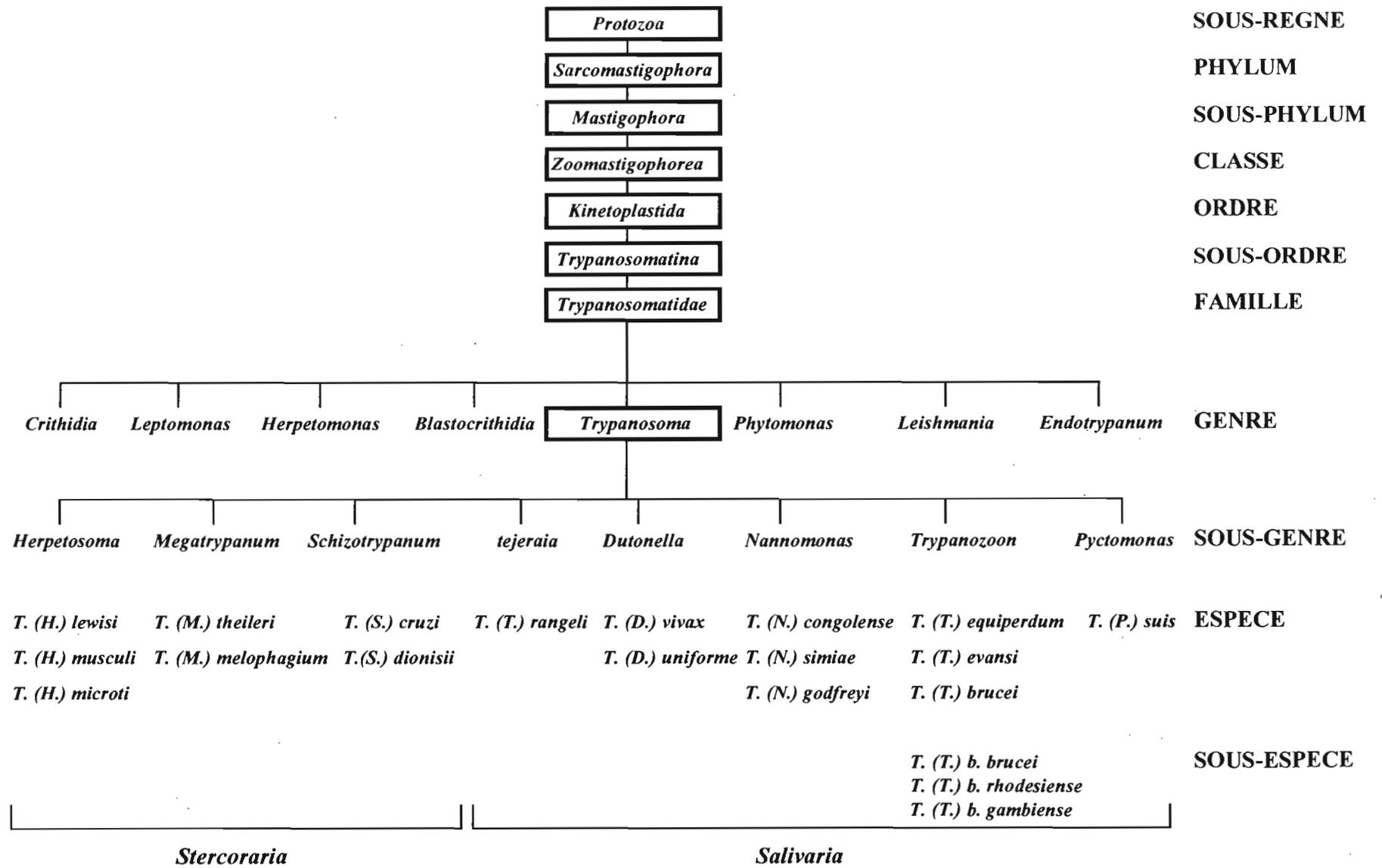


Figure 2 : Taxonomie des trypanosomes de mammifères (d'après Hoare, 1972 ; réactualisée pour le sous-genre *Nannomonas*)

A propos de la subdivision au sein de *T. congolense* :

Les études de Young & Godfrey (1983), de Gashumba (1986), de Gashumba *et al.*, (1988) et de Knowles *et al.*, (1988) portant sur l'analyse isoenzymatique de près de 140 stocks africains de *T. congolense*, ont mis en évidence l'existence de 3 subdivisions au sein de cette espèce, correspondant à des zones écogéographiques bien distinctes :

- le type "Savannah" : ce sont les trypanosomes rencontrés dans les zones de savane d'Afrique de l'Ouest et de l'Est (zone sèche) ;

- le type "Forest" (galerie forestière) : il regroupe les parasites des zones de forêt de toute l'Afrique (zones humides) ;

- le type " Kilifi " : initialement identifiés sur la côte Est du Kenya (Kilifi), les trypanosomes de ce groupe ont aussi été décrits en Ouganda (Nyeko *et al.*, 1990).

Majiwa *et al.*, (1985) et Gibson *et al.*, (1988) ont décrit des séquences répétées d'ADN génomique spécifiques de chacun de ces 3 sous-ensembles. Ces fragments d'ADN sont utilisés comme sondes génomiques en hybridation moléculaire (Kukla *et al.*, 1987 ; McNamara *et al.*, 1989 ; Nyeko *et al.*, 1990 ; McNamara & Snow, 1991) et les oligonucléotides correspondants sont utilisés dans la technique de polymérisation en chaîne pour la détection et l'identification des subdivisions de *T. congolense* (Masiga *et al.*, 1992).

Plus tard, deux autres catégories de trypanosomes du sous-genre *Nannomonas*, différant d'une part des groupes connus dans *T. congolense* ("Savannah", "Forest" et "Kilifi") et d'autre part de *T. simiae*, ont été décrits :

- Le groupe "Tsavo" : ces trypanosomes ont été identifiés chez *Glossina pallidipes* au Kenya. Les résultats des études du génome portant sur l'hybridation moléculaire de l'ADN kinétoplastique (minicercles), des séquences répétées d'ADN nucléaire, de caryotypage moléculaire ainsi que de l'amplification de l'ADN par RAPD ont montré que ces trypanosomes sont en fait inclus dans le sous-groupe "Savannah" de *T. congolense* (Majiwa *et al.*, 1992).

- Le groupe "Godfreyi" : isolés sur *Glossina morsitans submorsitans* en Gambie (McNamara *et al.*, 1989 ; McNamara & Snow, 1991), ces parasites ont reçu un statut d'espèce à part entière du sous-genre *Nannomonas* sur la base d'études isoenzymatiques, d'hybridation moléculaire avec des séquences spécifiques d'ADN génomique (Masiga *et al.*, 1996), de comportement chez l'animal, le porc en particulier, et de morphométrie (McNamara *et al.*, 1994).

1.3. CYCLE BIOLOGIQUE DU PARASITE (Figure 3 page 10)

1.3.1. Chez la glossine

Le cycle de développement des trypanosomes est le plus complexe et le plus long chez *T. brucei*. Dans la glossine, il dure environ 18 jours pour *T. congolense* alors qu'il est d'environ de 30 jours pour *T. brucei*.

Lors de son repas sanguin sur un mammifère parasitémique, la glossine absorbe des formes trypomastigotes courtes. Le sang infecté passe au bout de 10 mn dans l'intestin moyen de la glossine, puis arrive dans l'espace endopéritrophique. Il y a transformation des formes courtes en formes allongées (trypomastigotes procycliques). Celles-ci perdent leur membrane de glycoprotéine et deviennent non infectieuses. Elles connaissent une multiplication très active vers le 3ème-4ème jour pour *T. brucei* et vers le 10ème jour pour *T. congolense*, et se maintiennent environ 2 mois. Les formes procycliques de *T. congolense* passent ensuite dans l'espace ectopéritrophique, puis gagnent l'oesophage, le pharynx, et enfin le canal alimentaire. Elles se fixent sur les parois du labre et se transforment en épimastigotes. Ces formes pénètrent dans l'hypopharynx, se transforment en métatrypanosomes (métacycliques) infectants revêtus de la glycoprotéine de surface.

1.3.2. Chez l'hôte mammifère

Les trypanosomes africains pathogènes appartiennent à la section *Salivaria* : ils sont donc transmis par la salive des vecteurs. La glossine injecte dans le derme du mammifère à l'occasion d'un repas sanguin, les formes métacycliques infectieuses présentes dans ses pièces buccales. Les métacycliques se multiplient au point d'inoculation pendant plusieurs jours en déterminant parfois une réaction inflammatoire appelée chancre. Les trypanosomes migrent par voie lymphatique vers le ganglion de drainage et sont détectables dans la lymphe efférente de ce ganglion quelques jours avant leur détection dans le sang (Emery *et al.*, 1980 ; Akol et

Murray, 1986). La durée de la période prépatente (de l'inoculation à la détection du parasite dans le sang) varie généralement de 1 à 3 semaines, en fonction de l'espèce et du stock de trypanosome, du nombre de trypanosomes injectés et de l'état immunitaire de l'hôte (Clausen *et al.*, 1993). Les trypanosomes évoluent dans le sang par "vagues parasitémiques" correspondant à des phénomènes "d'échappement" aux défenses immunitaires de l'hôte.

Les phénomènes d'échappement sont contrôlés par la glycoprotéine variable de surface (ou VSG). Celle-ci est une enveloppe glycoprotéique dense recouvrant le trypanosome et son flagelle (Vickerman et Luckins, 1969 ; Vickerman, 1978). Elle est constituée d'environ 10^7 molécules identiques d'un poids moléculaire d'environ 60 kDa, et représente 10% des protéines totales du trypanosome. Les VSGs de *T. congolense* (Rovis *et al.*, 1978) et de *T. vivax* (Gardiner *et al.*, 1987) sont de tailles légèrement plus petites que celles de *T. brucei*.

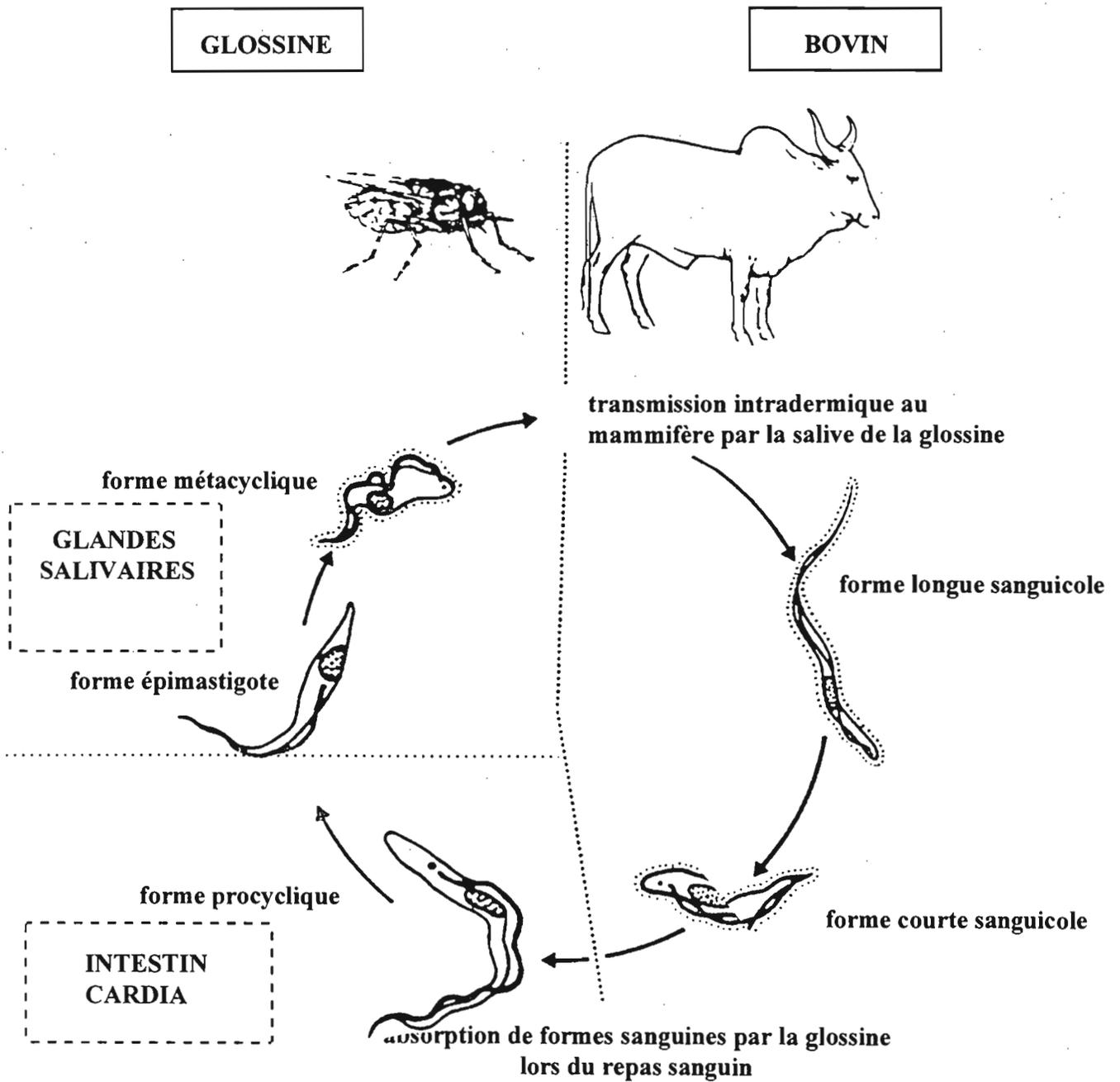


Figure 3 : Cycle biologique de *T. brucei* s.l.
(adapté de Vickerman & Luckins, 1969)

II. LES TRYPANOSOMOSES ANIMALES

2.1 SYMPTOMES ET LÉSIONS

La trypanosomose se traduit chez les bovins sensibles par un syndrome de gravité variable. Tous les modes d'évolution sont possibles : de l'infection aiguë mortelle en 3 à 4 semaines, à l'infection chronique durant des mois. Le mode d'évolution chronique, caractérisé par des parasitémies intermittentes, est le plus fréquent chez les bovins.

La maladie débute par une phase d'hyperthermie, correspondant au premier pic de parasitémie. Deux à trois semaines après la piqûre infectante, le taux d'hémoglobine et l'hématocrite chutent, reflétant l'anémie, symptôme majeur des trypanosomoses bovines. D'une valeur normale supérieure ou égale à 30% chez les bovins, l'hématocrite (ou PCV, « packed cell volume ») chute jusqu'à des valeurs de l'ordre de 20% après 3 à 8 semaines d'infection par *T. congolense*. L'hématocrite peut continuer à décroître jusqu'à la mort de l'animal ou se stabiliser entre 15 et 20%. Dans les cas les plus favorables l'hématocrite commence à se rétablir après 6 à 12 semaines d'infection et recouvre progressivement une valeur normale pendant que les parasitémies deviennent intermittentes.

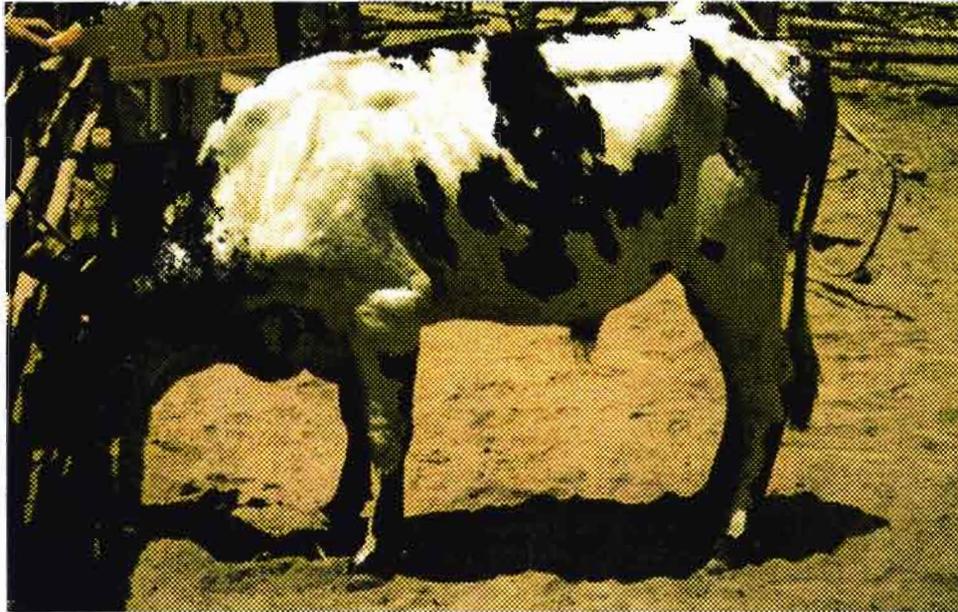
Les animaux chroniquement infectés sont souvent cachectiques et peu productifs. Il existe une corrélation entre le degré d'anémie et la baisse de productivité. La croissance des veaux infectés peut être affectée de façon irréversible. Chez les adultes, des effets sur la reproduction sont observés : arrêt de cyclicité chez les femelles, fertilité réduite des mâles et des femelles, nombreux risques d'avortement (Lorenzini *et al.*, 1988 ; Chicoteau *et al.*, 1990).

Le mode d'évolution de la maladie est fonction de la pathogénicité des trypanosomes, de la charge parasitaire mais aussi de la sensibilité intrinsèque de l'hôte et des conditions d'environnement. Les races bovines importées sont généralement plus sensibles à l'infection que les races africaines. Mais il existe aussi des variations individuelles et raciales parmi ces dernières (Clausen *et al.*, 1993). Dans les conditions favorables de nutrition et d'environnement, même les animaux de races plus sensibles peuvent tolérer le parasitisme et parfois guérir après avoir éliminé leurs parasites. Cependant, dans les conditions générales de stress nutritionnels (saison sèche), pathologiques (surinfections bactériennes ou parasitaires) ou physiologiques (sevrage, parturition, lactation, transhumance), les animaux infectés succombent à la maladie.

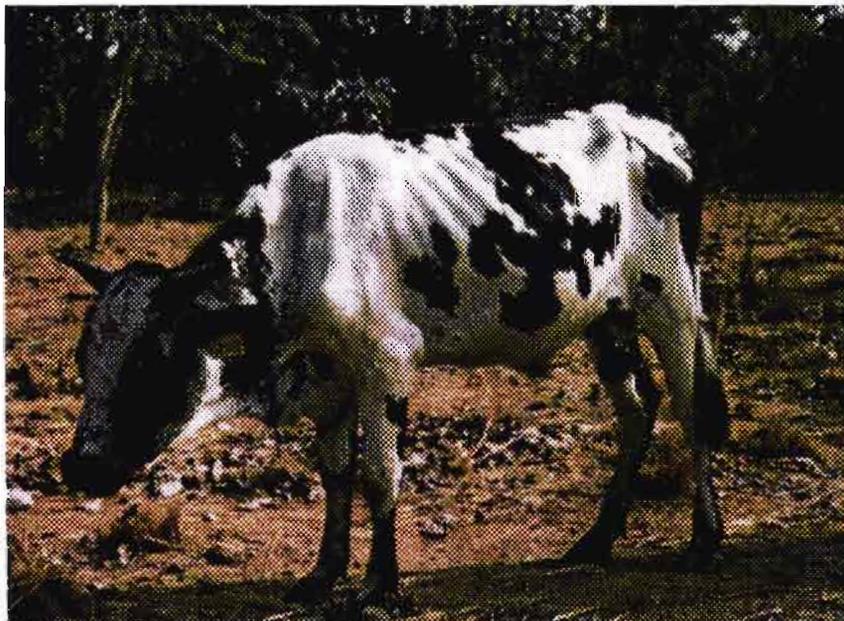
Il n'existe pas de lésion typique de la Nagana. Un chancre d'inoculation est parfois observé au point de piqûre de la glossine. Dans la phase initiale de la maladie, on observe

souvent une hypertrophie des ganglions, de la rate, et du foie. Les bovins porteurs d'une infection chronique présentent une hypoplasie des organes lymphoïdes. L'atteinte cardiaque, le plus souvent sous forme d'une myocardite dégénérative, est la cause de la mort dans de nombreux cas d'infection chronique. Des troubles endocriniens dus à un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire caractérisent l'infection par *T. congolense*. Ils sont probablement liés à des lésions hypophysaires (Masake 1980 ; Boly *et al.*, 1991). Des lésions dégénératives des gonades peuvent également contribuer à l'altération des différentes composantes de la fonction sexuelle des taureaux (Sekoni, 1990).

L'anémie dans la Nagana s'établit selon deux phases. Au cours de la première phase, elle accompagne la parasitémie, et résulte essentiellement d'une hémolyse extra-vasculaire. Les globules rouges sont détruits par phagocytose dans la rate, le foie, et même dans le système circulatoire et dans la moelle osseuse. A ce stade, l'anémie s'accompagne d'une érythropoïèse accrue et de la mise en circulation par la moelle osseuse de cellules immatures. Si l'animal est traité à ce stade, la récupération est généralement rapide. Sinon, au cours de la phase chronique, la moelle osseuse devient progressivement hypoplasique et l'anémie cesse d'être régénérative.



(a)



(b)

Figure 4 : bovin avant (a) et après (b) infection par *Trypanosoma congolense* (Clausen et al., 1993).
b : l'animal est au 7ème jour de parasitémie positive

2.2. DIAGNOSTIC

Le diagnostic des trypanosomoses est rendu difficile par l'absence de symptômes caractéristiques et par le nombre peu élevé et fluctuant des parasites présents dans le sang.

La méthode la plus couramment utilisée est la centrifugation différentielle en tube microhématocrite et l'examen des interfaces plasma/globules rouges au microscope à contraste de phase ou à fond noir (méthode de Woo). Encore appelée "méthode du buffy-coat", cette technique permet en première approche d'identifier l'espèce en cause d'après la motilité des parasites. L'identification de l'espèce est confirmée par l'examen d'un frottis coloré par le Giemsa. Les méthodes parasitologiques courantes manquent de sensibilité, rendant parfois indétectables les parasitémies fluctuantes et basses des animaux à infection chronique. L'inoculation à la souris de sang ou de sucs ganglionnaires constitue une méthode alternative sensible pour le diagnostic des trypanosomes (Welde *et al.*, 1989).

Les méthodes sérologiques visent à détecter les anticorps dirigés contre les antigènes communs du trypanosome, par immunofluorescence (Wilson, 1969) ou par des techniques immuno-enzymatiques (Luckins, 1977 ; Le Ray, 1985). Cependant, la présence d'anticorps ne signifie pas nécessairement une infection active. De plus, ces anticorps ne sont pas forcément spécifiques de l'espèce de trypanosome en cause. A l'heure actuelle, c'est l'association du buffy-coat et de la détection d'antigènes circulants (Nantulya *et al.*, 1992) qui fournit les résultats les plus fiables pour le diagnostic individuel.

Les méthodes biochimiques et de biologie moléculaire semblent les plus prometteuses en raison de leur sensibilité et de leur spécificité. La méthode à sélectionner dépend du nombre de trypanosomes présents dans l'échantillon et du niveau taxonomique (espèce, subdivisions de l'espèce) que l'on veut identifier. Les sondes d'ADN, basées sur les éléments d'ADN répétitifs, permettent l'identification aux niveaux sous-génériques (e.g. *Trypanozoon*), spécifiques (e.g. *T. congolense*, *T. simiae*) ou même, sous-spécifiques (e.g. *T. congolense* Savannah). Ces sondes sont particulièrement utiles pour l'identification des trypanosomes dans l'intestin moyen de la glossine, où ils se trouvent en quantité suffisante (>100) pour permettre une simple hybridation par "dot blot". Une plus grande sensibilité a été atteinte par l'amplification par PCR des séquences répétées d'ADN génomique permettant de ramener théoriquement le seuil de détection à un trypanosome (Nzila, 1995). Les isoenzymes ont été utilisés pour caractériser *T. congolense* (Young & Godfrey, 1983 ; Gashumba, 1986 ; Gashumba *et al.*, 1988 ; Knowles *et al.*, 1988). Au niveau subsppécifique, l'analyse par isoenzymes, et par la suite, l'analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP)

ont été largement utilisées pour caractériser des isolats de *T. brucei* (Gibson *et al.*, 1978 ; Godfrey *et al.*, 1985).

2.3. EPIDEMIOLOGIE DE LA NAGANA

La maladie frappe le bétail, mais aussi la faune de mammifères sauvages qui constitue un immense réservoir des 3 principaux trypanosomes (*T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei*). Certains animaux réceptifs présentent une moindre sensibilité à la Nagana (la faune sauvage et le bétail trypanotolérant) et jouent surtout un rôle de réservoirs. Les stratégies de lutte contre les trypanosomoses humaines et animales se heurtent à ce problème des réservoirs : la réceptivité du réservoir sauvage influence le maintien d'une espèce de trypanosome et sa prévalence chez le bétail dans une région donnée.

T. congolense et *T. brucei* sont essentiellement transmis par les mouches tsé-tsé, qui en sont les vecteurs biologiques. *T. vivax* est généralement transmis par les glossines mais peut l'être également par des vecteurs mécaniques (tabanides, stomoxes). Alors que seulement certaines espèces de glossine transmettent la trypanosomose humaine, toutes les espèces de glossines paraissent capables de transmettre la Nagana.

L'efficacité de la transmission dépend du taux d'infection des glossines et des interactions hôte-vecteurs. Dans la nature, le taux d'infection des tsé-tsé excède rarement 15%. D'une façon générale, les trypanosomes infectieux pour l'animal donnent des taux d'infection plus élevés que les trypanosomes infectant l'homme, chez lesquels les taux d'infection dépassent rarement 0,1% (Duvallat, 1987). Ceci contribue à la très large distribution de la trypanosomose animale. Les interactions hôte-vecteur dépendent des habitudes nutritionnelles des glossines qui, d'une façon générale, préfèrent les Suidés et les Bovidés. Il est probable que l'attractivité des Bovidés pour les glossines varie selon l'espèce, la race et même l'odeur des bovins. La saison offre des opportunités de transmission en mettant en contact les animaux et les mouches aux points d'eau en saison sèche.

La prévalence de la maladie correspond à la proportion d'animaux malades dans la population, et l'incidence, à la proportion d'animaux qui s'infectent au cours d'une période donnée (Rawlings *et al.*, 1991). La prévalence et l'incidence sont toujours plus élevées chez les bovins de races trypanosensibles que chez les animaux trypanotolérants, exposés à la même pression glossinienne ou "challenge" (Clausen *et al.*, 1993). Dans les régions où les deux espèces coexistent, *T. congolense* prédomine souvent chez les animaux adultes, alors que les jeunes sont infectés à la fois par *T. congolense* et *T. vivax*. Ce fait proviendrait de l'acquisition progressive d'une immunité vis-à-vis de *T. vivax* dont la diversité antigénique est plus limitée que celle de *T. congolense*. Par ailleurs, plusieurs observations indiquent que les

jeunes veaux sont moins réceptifs et moins sensibles à l'infection par *T. congolense* que les adultes. La prévalence augmente après le sevrage pour diminuer de nouveau à partir de l'âge de deux ans (Rowlands *et al.*, 1993).

2.4. METHODES DE LUTTE

La lutte contre la trypanosomose a toujours été axée sur la lutte anti-vectorielle et la chimiothérapie (et/ou la chimioprophylaxie).

La lutte anti-vectorielle a réellement débuté dans les années 1940, avec la découverte du DDT et des autres composés organochlorés de longue rémanence, puis des insecticides à rémanence plus courte (endosulfan). Les pulvérisations insecticides, terrestres ou aériennes, ont connu des succès, notamment au Nigeria, en Afrique du Sud, et au Zimbabwe. Quelques 100000 km² de savane ont pu être traités efficacement grâce aux épandages aériens. Mais le coût de ces méthodes, leur impact sur l'environnement et la difficulté de prévenir la réinvasion des zones traitées limitent l'efficacité de ces campagnes d'épandage. Les pièges à glossines inventés au Burkina Faso par Challier-Lavessiere et les écrans imprégnés de pyréthroides de synthèse offrent des rapports coût/bénéfice plus favorables et présentent des effets beaucoup plus limités sur l'environnement. Leur efficacité varie cependant en fonction des espèces de glossines. Les insecticides sont applicables sur le bétail sous forme de bain ou par la technique du "pour on". La technique du lâcher de mâles stériles, évaluée au CRTA de Bobo-Dioulasso, a connu des succès, mais il n'est raisonnable de l'utiliser que sur des régions peu étendues à cause de son coût. On s'oriente de plus en plus sur des méthodes visant à contrôler la densité de la population de glossines de façon à réduire la transmission de la maladie.

Sous faible pression glossinienne, l'application de la chimiothérapie et/ou de la chimioprophylaxie est conseillée. Deux trypanocides dominent le marché depuis près de 30 ans : l'acéturate de diminazène (Bérénil ND) et le chlorure d'isométymidium (Trypamidium ND ou Samorin ND). Le premier est utilisé à titre curatif et le second, à titre préventif et curatif. De nombreux cas de résistance aux médicaments ont été publiés depuis quelques années (Authié, 1984 ; Pinder, 1984 ; Clausen *et al.*, 1992). L'apparition de ces résistances résulte probablement de phénomènes génétiques spontanés, mais est certainement favorisé par l'emploi extensif et inapproprié de ces médicaments.

III. LE GENOME DES TRYPANOSOMES

3.1. L'ADN NUCLEAIRE

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 (Van der Ploeg *et al.*, 1984 ; Welldes *et al.*, 1987). Les chromosomes ainsi observés se répartissent en 3 catégories :

- les mini-chromosomes, au nombre d'une centaine, dont la taille varie entre 50 et 250 kilobases (Kb). Garside *et al.*, (1994) ont montré que, dans le sous-genre *Nannomonas*, *T. simiae* possède les plus petits mini-chromosomes (50 à 100 Kb), suivi par les groupes Savannah et Forest de *T. congolense* (50 à 100 Kb) ; que *T. godfreyi* et le groupe *T. congolense* Kilifi possèdent les plus gros mini-chromosomes (100 à 250 Kb).

- les chromosomes intermédiaires, en plus faible nombre (20 à 50), de taille comprise entre 250 et 700 Kb. Les caryotypes de *T. simiae*, *T. godfreyi* et du groupe Forest de *T. congolense* montrent une absence frappante en chromosomes de taille intermédiaire (Garside *et al.*, 1994). Les auteurs montrent par ailleurs que les caryotypes du groupe Kilifi se distinguent des autres par la présence d'un grand nombre de chromosomes de tailles comprises entre 300 et 400 Kb.

- les gros chromosomes, de taille supérieure à 1000 Kb, sont au nombre de 15 à 20.

- Le nombre de chaque catégorie de chromosomes n'est pas fixé de façon rigide. En effet, il peut varier notablement d'un stock de parasite à un 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).

Le caractère diploïde des trypanosomes a été proposé sur la base de la quantification de l'ADN et par l'analyse du polymorphisme des fragments de restriction (Borst *et al.*, 1981 ; Gibson *et al.*, 1985). Gottesdiener *et al.*, (1990) ont décrit l'existence de 7 paires de chromosomes homologues parmi les gros chromosomes et ont estimé à 6×10^7 pb la taille du génome nucléaire d'une cellule diploïde. Il faut souligner que la diploïdie dans les genres *Trypanosoma* et *Leishmania* reste en l'état actuel de nos connaissances une simple hypothèse de travail, même si des présomptions solides l'étayent (Tibayrenc, 1995).

3.2. L'ADN KINETOPLASTIQUE

L'ADN kinétoplastique des protozoaires correspond au génome mitochondrial des cellules eucaryotes (Fairlamb *et al.*, 1978). Il est formé de 2 types de molécules : les minicercles, en très grand nombre (5000 à 20000) et les maxicercles, en plus faible nombre (10 à 100). Ces deux types de molécules sont enchevêtrées les unes dans les autres en formant le réseau d'ADN kinétoplastique (ADNk).

3.2.1. Les minicercles

D'une taille d'environ 1 Kb, les minicercles sont très variables au sein d'une même espèce, et varient même au sein d'un même stock. Chez *T. brucei brucei* par exemple, on estime que le nombre de classes de séquences différentes varie entre 100 et 300 pour un stock donné de parasite (Stuart, 1979). Ces minicercles 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 (Kidane *et al.*, 1984 ; Sugisaki & Ray, 1987). N'tambi & Englund (1985) ont montré que cette séquence correspond à l'origine de la répllication 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 de Pollard *et al.*, (1990), Pollard & Hajduk (1991) et de Stuart (1991) ont démontré clairement le rôle joué par les minicercles, après transcription en ARN, dans le phénomène d'édition des ARN des trypanosomes.

3.2.2. Les maxicercles

A l'exception de *Trypanosoma evansi*, tous les trypanosomes de la section *Salivaria* possèdent des maxicercles (Simpson, 1987). Ces derniers sont au nombre de 20 à 50 par cellule. Leur taille est en moyenne 20 fois supérieure à celle des minicercles (20 à 23 Kb). Chez tous les *Kinetoplastidae*, ces maxicercles sont formés d'une région conservée de 17 Kb et d'une région variable de 3 à 6 Kb.

Les maxicercles portent les gènes codant pour les ARN ribosomiques des mitochondries. En plus, ils codent pour certaines protéines impliquées dans les phénomènes d'oxydation mitochondriale. L'ensemble de ces gènes sont portés par la région conservée. Aucun transcrit de la région variable n'a été, jusqu'à présent, mis en évidence. L'analyse du maxicercle par le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) a été proposée comme outil taxonomique (Borst *et al.*, 1981 ; Gibson *et al.*, 1985 ; Truc, 1991).

3.3. LE MODE DE REPRODUCTION ET LA STRUCTURE DES POPULATIONS DES TRYPANOSOMES

Les connaissances actuelles sur le mode de reproduction des trypanosomes africains sont surtout basées sur des études faites sur *T. brucei*. Il n'existe presque pas de documentation sur celui de *T. congolense* sauf par simulation. Notre travail constituera une importante documentation à cet effet.

La notion d'une reproduction purement clonale des trypanosomes africains a prévalu longtemps. Tait (1980, 1983) a émis que *T. brucei* était une espèce diploïde, sexuée et panmictique, en se basant sur l'analyse de certaines données isoenzymatiques montrant un accord apparent avec l'équilibre de Hardy-Weinberg dans la population étudiée, ainsi qu'une recombinaison apparemment libre des génotypes observés à des locus différents. Cette approche a été critiquée par Cibulskis (1988), qui a montré que vu la faible taille de la population étudiée, le résultat inféré par Tait pouvait être dû à un simple manque de puissance du test statistique (erreur statistique de type II). Jenni *et al.* (1986) ont apporté un élément nouveau important dans le débat, en obtenant pour la première fois des recombinants génétiques expérimentaux de *T. brucei* par des croisements de laboratoires, en faisant passer des variants génétiques différents du parasite par un cycle complet chez la glossine. Ceci, en fait, montre que la possibilité de recombinaison demeure chez ce parasite, mais ne dit rien sur l'impact réel de ce phénomène dans les populations naturelles (Tibayrenc *et al.*, 1990, Tibayrenc, 1995). Cibulskis (1988), a démontré que dans les populations naturelles de *T. brucei*, de nombreuses combinaisons multilocus qui devraient s'observer en cas de flux génique libre, étaient

totale­ment absentes. Il en a déduit qu'au sein de cette espèce, il y a coexistence de lignées évolutives indépendantes. Tibayrenc et *al.* (1990) ont postulé que *T. brucei* et *T. congolense*, comme plusieurs autres espèces majeures de protozoaires parasites, présentent une structure fondamentalement clonale. Cette hypothèse, basée principalement sur l'analyse statistique du déséquilibre de liaison (association non aléatoire de génotypes à des locus différents), ne stipule pas que les échanges géniques sont absents dans les populations naturelles des espèces étudiées, mais seulement, qu'ils ne sont pas suffisamment fréquents pour empêcher la pérennité de clones génétiques stables dans l'espace et dans le temps. L'hypothèse clonale, qui a été corroborée par des études très documentées chez *T. brucei* (Truc & Tibayrenc, 1993 ; Mathieu-Daudé & Tibayrenc, 1994), est actuellement admise en général dans le cas de cette espèce. Ce qui reste l'objet de débats est la question de la stabilité des clones. Cibulskis (1992) a postulé que les clones génétiques observés chez *T. brucei* sont fugaces, et ont une durée de vie n'excédant pas quelques années. Semblable hypothèse a été proposée également par Maynard Smith et *al.* (1993), qui décrivent 4 modèles de population chez les microorganismes : (a) le modèle d'évolution clonale, dans lequel les clones sont stables à l'échelle évolutive. Exemples possibles : *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas (cf Tibayrenc et *al.*, 1986), et chez les bactéries, les *Salmonella* ; (b) le modèle de spéciation cryptique, dans lequel l'espèce considérée renferme en fait deux ou plusieurs espèces biologiques sexuées (exemple : la bactérie *Rhizobium melliloti*) ; (c) le modèle de clonalité épidémique, dans lequel une espèce sexuée génère occasionnellement des clones fugaces à durée de vie courte (ce qui serait le cas de *T. brucei*) ; enfin, le modèle panmictique, dans lequel les échanges génétiques se font au hasard (exemples : la bactérie *Bacillus subtilis*, le protozoaire *Plasmodium falciparum*). L'approche proposée par Maynard Smith et *al.* (1993) a clarifié le débat portant sur la structure des populations naturelles de microorganismes. Cependant, les statistiques présentées par ces auteurs ne permettent pas, en l'état actuel des connaissances, de trancher nettement entre les différents modèles proposés, et donnent plutôt une évaluation quantitative non spécifique de l'importance du déséquilibre de liaison. Il convient par ailleurs de pondérer ces statistiques, car le pouvoir de résolution des tests concernés, comme c'est le cas de tout test statistique, est étroitement dépendant de la richesse du sondage : nombre d'individus, diversité génétique de l'échantillonnage (Tibayrenc, 1995). En ce qui concerne le mode de reproduction et la structure des populations naturelles de *T. congolense*, il n'y a aucun élément nouveau depuis la proposition de l'hypothèse clonale par Tibayrenc et *al.* (1990).

IV. LA DIVERSITE GENETIQUE DES TRYPANOSOMES DU SOUS-GENRE *NANNOMONAS*

Les premières observations des caractères phénotypiques de *T. congolense* ont été faites dès le début du siècle (Dutton & Todd, 1903 ; Broden, 1904, 1906 ; Balfour, 1906). Elles ont abouti à une nomenclature confuse et controversée de ce trypanosome. Différents noms comme *T. dimorphon*, *T. nanum*, *T. confusum* et *T. percorum* ont été, par la suite, utilisés par différents auteurs pour décrire ce parasite. La description de ces phénotypes était initialement basée sur des observations morphologiques et morphométriques, notamment sur la taille de l'organisme (Hoare, 1970 ; Stephen, 1986). Ces méthodes ont été conservées jusqu'aux années 1960 sans amélioration substantielle. C'est lorsqu'on a commencé d'observer un grand nombre de stocks, de types, de variétés ou de formes morphologiques et biologiques, qu'il a été décidé de les classer non plus seulement sur des critères morphologiques mais également sur la base de leurs propriétés biochimiques et immunologiques (Stephen, 1986).

Avec l'affinement des méthodes d'analyse des microorganismes, une étude basée sur de nombreux isolats d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique centrale a permis de distinguer tout d'abord deux groupes distincts l'un de l'autre par leurs profils isoenzymatiques. Ces groupes ont été désignés comme de type de forêt (riverine/forest type) et de type de savane (Savannah type) par Young et Godfrey (1983). Il a été proposé dans ces études que les différents types de *T. congolense* sont confinés dans certaines zones écologiques par les types de glossines qui y habitent. Ceci s'expliquerait par le fait que certaines espèces de glossines, habitant des niches écogéographiques spécifiques, sont meilleures vectrices de types donnés de *T. congolense*. Dans ce cas elles vont restreindre les trypanosomes qu'elles portent à leurs propres zones de vie. Mais cette explication semble insuffisante dans le cas du groupe Kilifi, qui aurait été retrouvé dans d'autres zones autres que la région d'origine des glossines qui le transmettent (Majiwa & Otieno 1990 ; Nyeko *et al.*, 1990).

Plus tard la taxonomie spécifique et subsécifique des trypanosomes africains a été approfondie par l'utilisation des techniques biochimiques et de biologie moléculaire : caryotypage et hybridation de séquences répétées d'ADN. La technique de l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE) a été utilisée dans l'analyse des chromosomes de *T. brucei* (Van der Ploeg *et al.*, 1984) et de *T. congolense* (Majiwa *et al.*, 1985). Elle a montré que les trypanosomes identifiés comme *T. congolense* ont des caryotypes qui diffèrent significativement de ceux des trypanosomes du sous-genre *Trypanozoon*. Chez *T. congolense*,

on distingue deux groupes caryotypiques. Cependant le caryotypage ne permet pas de différencier le groupe de forêt du groupe de savane, et même de *T. simiae*. Parmi les membres d'un même groupe caryotypique, il existe une variation chromosomale qui semble être associée à un répertoire antigénique donné. Ainsi il a été supposé que des clones de *T. congolense* possédant le même répertoire antigénique partagent le même caryotype (Majiwa *et al.*, 1986). Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement par combinaison de l'électrophorèse en champs pulsé et des méthodes sérologiques classiques (Masake *et al.*, 1988). Les résultats obtenus ne sont, par contre, pas valables pour le sous-genre *Trypanozoon*.

Les deux groupes de caryotypes de *T. congolense* se distinguent génétiquement par la possession de séquences répétées différentes d'ADN et de séquences de minicercles kinétoplastiques différentes (Majiwa *et al.*, 1985). Depuis lors, sur la base des études du polymorphisme isoenzymatique et des séquences répétées d'ADN, on distingue trois groupes génétiques dans l'espèce *T. congolense* (Savannah, Forest, Kilifi).

Il apparaît donc que le sous-genre *Nannomonas*, et l'espèce *T. congolense* présentent un polymorphisme génétique considérable. Cependant, les méthodes de la génétique de l'évolution (phylogénétique, génétique des populations) ont été peu ou pas appliquées pour l'analyse de cette diversité génétique. Ceci explique que les questions majeures évoquées dans l'introduction (caractère monophylétique ou non de *T. congolense* et de ses subdivisions, mode de reproduction et structure des populations naturelles du parasite) restent aujourd'hui sans réponse. C'est là l'objet du présent travail.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. LA CULTURE DES TRYPANOSOMES

La majorité des stocks ont été isolés au Burkina Faso dans le cadre d'études menées par le Centre International de Recherche - Développement de l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES). Les localités de prélèvement sont indiquées sur la carte de la figure 6, page 26 et le tableau 1, page 27. Une deuxième partie des stocks provenant d'origines diverses nous a été fournie par le Medical Research Center (M.R.C.) de Bristol en Angleterre. Les pays d'origine et l'identité de l'ensemble des stocks sont indiqués sur la carte de la figure 5, page 25 et dans le tableau 2, page 28.

Les prélèvements sanguins sont effectués dans des tubes Vacutainer^R (Becton Dickinson) contenant 2 µl d'héparine (1000 UI) puis conservés en azote liquide selon le protocole décrit plus loin (voir paragraphe cryoconservation).

1.1. ISOLEMENT ET CULTURE DES FORMES SANGUINES

Après décongélation des tubes à 37°C, la viabilité des parasites est contrôlée en observant au microscope une goutte de sang entre lame et lamelle. Ensuite 200 µl de sang sont injectés à une souris préalablement immunodéprimée par la cyclophosphamide (endoxanND : 80 mg/kg). La parasitémie est contrôlée tous les 2-3 jours par une prise de sang à la queue, jusqu'à ce que la charge parasitaire soit comprise entre 10⁷ et 10⁸ parasites par ml de sang. Cette charge parasitaire est atteinte entre 3 semaines et un mois selon l'espèce ou le stock de trypanosomes inoculé. Le sang de la souris est ensuite récolté par ponction cardiaque dans une seringue contenant de l'héparine, et les trypanosomes sont mis en culture en milieu axénique. Une partie est également congelée en azote liquide pour constituer la banque de stabilats.

1.2. CULTURE DE FORMES PROCYCLIQUES

La culture en milieu axénique des trypanosomes du sous-genre *Nannomonas* a été généralement la plus longue et difficile dans le cadre de notre étude. En effet, contrairement à *T. brucei*, qui se cultive bien en milieu de Cunningham (composition en annexe 1) ou du milieu CMEM (50% Cunningham + 50% MEM) (annexe 3), il n'existe pas de milieu synthétique adapté à la culture pérenne de *T. congolense*. Nous avons adapté tous les stocks

aux conditions de culture *in vitro* afin d'harmoniser les conditions expérimentales et d'utiliser le moins de souris possible.

300 µl de sang sont mis en culture à 27°C dans des tubes en verre contenant un milieu biphasique comprenant le milieu NNN semi-solide de Tobie, (2ml) (composition en annexe 2) (Tobie, 1950) et 2 ml de milieu liquide de Cunningham supplémenté avec 20% sérum de veau foetal décomplémenté. Après trois jours d'incubation, les trypanosomes sont prélevés en surface et remis dans un nouveau tube de culture afin de se débarrasser des cellules sanguines de la souris, les lysats de globules rouges étant toxiques pour les trypanosomes au bout de 5 à 7 jours. Deux à trois repiquages par dilution au 1/3 sont nécessaires pour obtenir des formes procycliques à 27°C en 3 à 4 semaines. Des stabilats sont faits dès que les parasites sont bien adaptés et peuvent être maintenus en culture permanente. Les parasites sont produits en masse dans des flacons pouvant contenir jusqu'à 100 ml de milieu parasitaire.

Toutes les cultures sont faites en présence d'antibiotiques afin d'éviter les risques de contamination par les bactéries (gentamycine : 20 µg/ml).

1.3. CRYOCONSERVATION

Les formes sanguines ainsi que les formes procycliques sont cryoconservées de la même façon, en présence, soit de 8% de glycérol, soit de 10% de DMSO (Diméthylsulfoxyde) selon une cinétique de décroissance de la température contrôlée de 1°C par minute jusqu'à -70°C. Les cryostabilats sont maintenus à cette température pendant un à deux jours puis transférés en azote liquide.

Lors de la congélation avec le glycérol, la suspension parasitaire est préalablement diluée de moitié avec du tampon PSG (PBS + 1% glucose).

1.4. PREPARATION DES CULOTS PARASITAIRES

Lorsque les parasites atteignent une densité optimale en culture de masse, ils sont centrifugés dans des tubes coniques de 50 ml à 4000 rpm, à 4°C, pendant 20 minutes. Le culot est remis en suspension dans du tampon PBS, puis centrifugé à 4000 rpm, à 4°C, pendant 20 minutes. Le culot est lavé à nouveau dans 15 ml de tampon PBS par centrifugation à 3000 rpm, à 4°C, pendant 20 minutes. Le dernier lavage est réalisé en tube eppendorf dans 1 ml de PBS par centrifugation à 10000 rpm, à 4°C, pendant 10 minutes. Le surnageant est aspiré, le culot est légèrement séché, puis directement congelé à -80°C. Il servira à l'extraction des isoenzymes et des ADN.



Figure 5 : Pays d'origine des souches de trypanosomes constituant notre échantillon

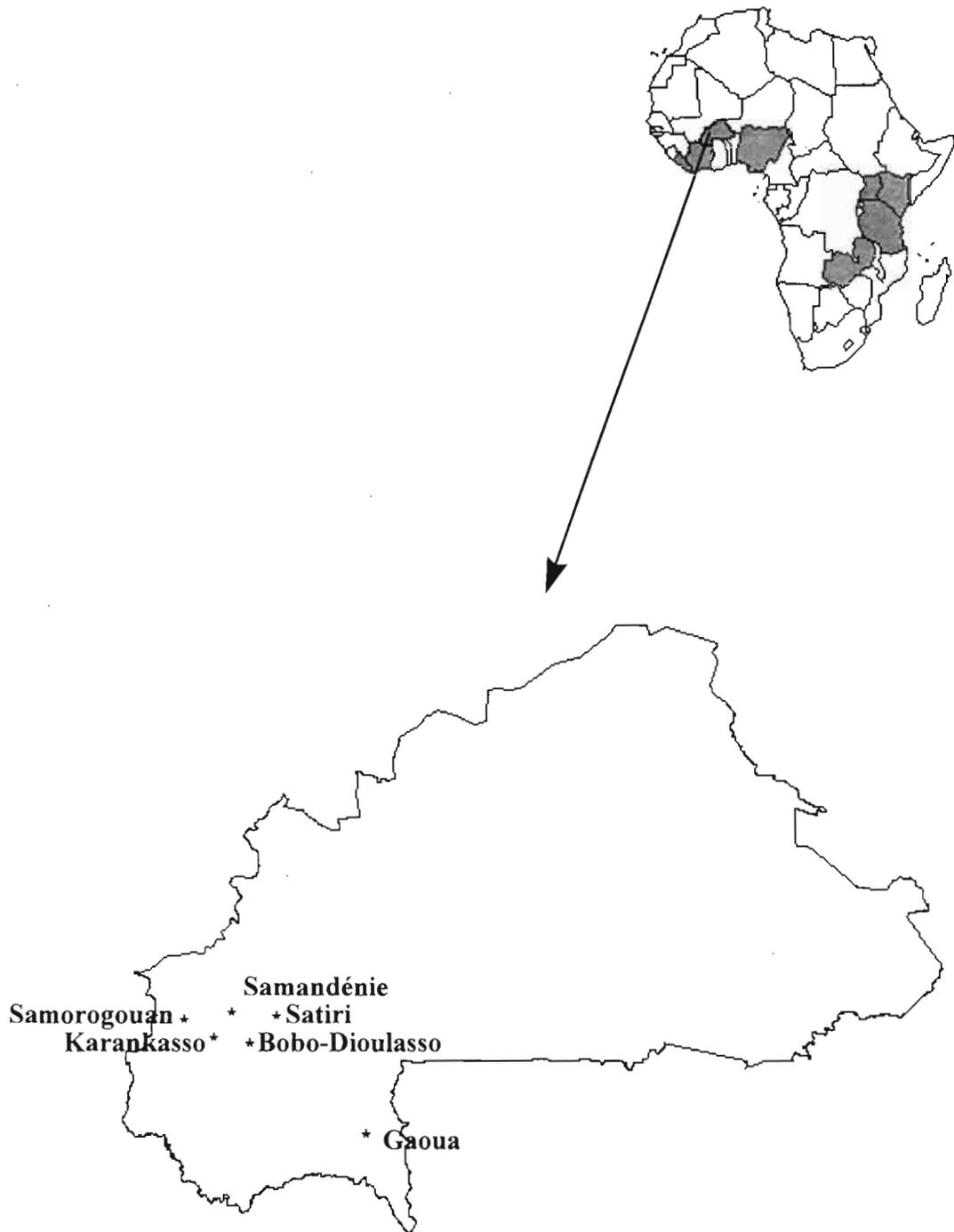


Figure 6 : Localités de collecte des souches du Burkina

Tableau 1 : **Historique des souches provenant du Burkina Faso**

Espèces	Code	Pays d'origine	Localité d'isolement	Hôte	autre Code	Date d'isolement
<i>T. (N). congolense</i>	BANAN/83/CRTA/67	BURKINA FASO	Banankélédaga	Bovin	BAN 67	1983
<i>T. (N). congolense</i>	DINDERESSO/80/CRTA/3	BURKINA FASO	Dinderesso	Chien	DIN 3	1980
<i>T. brucei</i>	GAOUA/89/CRTA/282	BURKINA FASO	Gaoua	Bovin	GAOUA 282	1989
<i>T. brucei</i>	GAOUA/89/CRTA/283	BURKINA FASO	Gaoua	Bovin	GAOUA 283	1989
<i>T. brucei</i>	GAOUA/89/CRTA/ 231	BURKINA FASO	Gaoua	Bovin	GAOUA 231	1989
<i>T. (N). congolense</i>	KARAN/83/CRTA/66	BURKINA FASO	Karankasso	Bovin	KAR 66	1983
<i>T. (N). congolense</i>	KARAN/83/CRTA/57	BURKINA FASO	Karankasso	Bovin	KAR 57	1983
<i>T. (N). congolense</i>	KARAN/83/CRTA/69	BURKINA FASO	Karankasso	Bovin	KAR 69	1983
<i>T. (N). congolense</i>	SAMAN/82/CRTA/33	BURKINA FASO	Samandeni	Bovin	SAM 33	1982
<i>T. (N). congolense</i>	SAMAN/82/CRTA/31	BURKINA FASO	Samandeni	Bovin	SAM 31	1982
<i>T. brucei</i>	SAMAN/82/CRTA/37	BURKINA FASO	Samandeni	Bovin	SAM 37	1982
<i>T. (N). congolense</i>	SAMAN/82/CRTA/55.2	BURKINA FASO	Samandeni	Bovin	SAM 55.2	1982
<i>T. (N). congolense</i>	SAMAN/85/CRTA/83.1	BURKINA FASO	Samandeni	Bovin	SAM 83.1	1985
?	SAMAN/82/CRTA/38.2	BURKINA FASO	Samandeni	Bovin	SAM 38.2	1982
<i>T. (N). congolense</i>	SAMAN/82/CRTA/32.1	BURKINA FASO	Samandeni	Bovin	SAM 32.1	1982
<i>T. (N). congolense</i>	SAMAN/82/CRTA/34.2	BURKINA FASO	Samandeni	Bovin	SAM 34.2	1982
<i>T. (N). congolense</i>	SAMAN/85/CRTA/82.2	BURKINA FASO	Samandeni	Bovin	SAM 82.2	1985
<i>T. (N). congolense</i>	SAMAN/82/CRTA/ 51	BURKINA FASO	Samandeni	Bovin	SAM51	1982
<i>T. (N). congolense</i>	SAMAN/82/CRTA/ 31.C1	BURKINA FASO	Samandeni	Bovin	SAM 31.C1	1982
<i>T. (N). congolense</i>	SAMAN/85/CRTA/49	BURKINA FASO	Samandeni	?	SAMAN 49	1985
<i>T. (N). congolense</i>	SAMAN/85/CRTA/52.1	BURKINA FASO	Samandeni	Bovin	SAMAN 52.1	1985
<i>T. (N). congolense</i>	SAMO/89/CRTA/253	BURKINA FASO	Samorogouan	Bovin	SAMO 253	1989
<i>T. (N). congolense</i>	SAMO/82/CRTA/53	BURKINA FASO	Samorogouan	Bovin	SAMO 53	1982
<i>T. (N). congolense</i>	SAMO/82/CRTA/51	BURKINA FASO	Samorogouan	Bovin	SAMO 51	1982
<i>T. (N). congolense</i>	SAMO/80/CRTA/23	BURKINA FASO	Samorogouan	Bovin?	SAMO 23	1980
<i>T. (N). congolense</i>	SAT/87/CRTA/193	BURKINA FASO	Satiri	Bovin	SAT 193	1987

Tableau 2 : **Historique des souches provenant d'Afrique de l'Est et d'Afrique de l'Ouest (Burkina Faso non inclus)**

Espèces	Code	Pays d'origine	Localité d'isolement	Hôte	autre Code	Date d'isolement
<i>T. (N). congolense</i>	MSUS/CI/78/TSW 152	COTE-d'IVOIRE	Koetinga	Cochon	TSW 152	1978
<i>T. brucei gambiense</i>	MHOM/CI/86/DAL 967	COTE d'IVOIRE		Homme	Dal 967	1986
<i>T. (N). congolense</i>	MBOT/GM/77/GAM 17	GAMBIE	Dutabulu	Bovin	GAM 17	1977
<i>T. (N). congolense</i>	MBOT/GM/77/GAM 20	GAMBIE	Essau	Bovin	GAM 20A	1977
<i>T. (N). congolense</i>	MBOT/GM/77/GAM 2 Cl A	GAMBIE	keneba	Bovin	GAM 2	1977
<i>T. (N). godfreyi</i>	GMOS/GM/88/KEN7	GAMBIE		G. m. submorsitans	KEN 7	1988
<i>T. (N). simiae</i>	GMOS/GM/88/KEN2	GAMBIE		G. m. submorsitans	KEN 2	1988
<i>T. (N). congolense</i>	MBOI/KE/80/WG 46	KENYA	Baringo	Bovin	WG 46	1980
<i>T. (N). congolense</i>	MBOI/KE/80/WG 45	KENYA	Baringo	Bovin	WG 45	1980
<i>T. (N). congolense</i>	MBOI/KE/83/JG 1	KENYA	Galana	Bovin	JG 1	1983
<i>T. (N). congolense</i>	MCAP/KE/83/JG 7	KENYA	Galana	Chèvre	JG 7	1983
<i>T. (N). congolense</i>	GPAL/KE/84/JG 30	KENYA	Galana	G. pallipides	JG 30	1984
<i>T. (N). congolense</i>	GPAL/KE/83/JG 8	KENYA	Lambwe	G. pallidipes	JG 8	1983
<i>T. (N). congolense</i>	MCAP/KE/80/WG 5	KENYA	Matuga	Chèvre	WG 5	1980
<i>T. (N). congolense</i>	MOVS/KE/81/WG 74	KENYA	Matuga	Mouton	WG 74	1981
<i>T. (N). congolense</i>	MOVS/KE/81/WG 84	KENYA	Matuga	Mouton	WG 84	1981
<i>T. (N). congolense</i>	IL-3000	KENYA	Transmara	Bovin	IL-3000	1983
<i>T. (N). congolense</i>	ILRAD/C49	KENYA	Transmara	Bovin	C-49	1983
<i>T. (N). congolense</i>	MSUS/LR/77/TSW 243	LIBERIA	Kissi	cochon	TSW 243	1977
<i>T. (N). congolense</i>	MBOI/NG/60/1-148	NIGERIA	River Donga	Bovin	I/148 Fly	1960
<i>T. brucei brucei</i>	MHOM/UG/66/EATRO 1125	OUGANDA		Mammifere sauvage	EATRO 1125	1966
<i>T. (N). congolense</i>	MBOI/TZ/72/EATRO 2026	TANZANIA	Ikoma	Bovin	EATRO 2026	1972
<i>T. (N). congolense</i>	SERENGETI/71/stib/212	TANZANIA	Serengeti	Lion	SERENG 212	1971
<i>T. (N). congolense</i>	MBOI/UG/73/EATRO 2098	UGANDA	Iyolwa	Bovin	EATRO 2098	1973
<i>T. (N). congolense</i>	MCAN/ZM/81/TRPZ 105	ZAMBIA	Kakumbi	Chien	TRPZ 105	1981
<i>T. brucei rhodesiense</i>	MHOM/ZM/74/058 (clA3)	ZAMBIE		Homme	058 cl A3	1974

II. L'ELECTROPHORESE DES ISOENZYMES

2.1. GENERALITES

2.1.1. Electrophorèse isoenzymatique et génétique

On désigne par le terme d'isoenzymes, des protéines présentant la même fonction enzymatique mais une migration différente en électrophorèse. La différence de mobilité électrophorétique traduit une différence de charge électrique globale de la molécule, qui reflète dans la plupart des cas une variation dans la structure primaire de la protéine. Ces variations dans l'enchaînement d'acides aminés de la protéine résultent des variations nucléotidiques de la molécule d'ADN du gène codant pour cette protéine. Les isoenzymes sont donc considérées comme des marqueurs génétiques puisqu'elles permettent indirectement de mettre en évidence des variations dans la structure du génome.

Les zymogrammes (profils isoenzymatiques) observés peuvent correspondre : soit aux produits de l'expression de plusieurs allèles du même gène à un seul locus, soit aux produits de l'expression de plusieurs gènes situés sur divers locus (Tibayrenc 1979 ; Pasteur *et al.*, 1987). En effet, les gènes qui codent pour des protéines enzymatiques, sont en grande partie polymorphes, c'est à dire qu'ils existent sous la forme de deux ou plusieurs allèles. Ceux-ci présenteront souvent à l'électrophorèse une migration différente. Ces isoenzymes représentant des allèles différents d'un gène à l'autre sont appelés "allozymes" ou "alloenzymes" (Prakash *et al.*, 1969, cité dans Richardson *et al.*, 1986). Mais ces isoenzymes peuvent aussi correspondre à l'expression de deux ou plusieurs locus, chaque locus pouvant présenter plusieurs allèles.

Les zymogrammes sont interprétés, dans la mesure du possible, en terme allélique. Ces allèles étant généralement codominants, chacun d'entre eux s'exprime chez les hétérozygotes, donnant des motifs électrophorétiques typiques. Cela permet d'associer les phénotypes observés à des génotypes alléliques, les "allozymes" subissant une ségrégation mendélienne au sein des populations.

Ces propriétés font des isoenzymes un matériel de choix pour l'étude génétique, les gènes étudiés représentant à priori un échantillon aléatoire de la structure du génome. Toutefois, il est intéressant de noter que la charge nette d'une protéine n'est modifiée que lorsqu'il se produit, au niveau de l'ADN, une mutation qui entraîne le remplacement d'un acide aminé par un autre de charge différente. Ainsi, une partie seulement des variations de la structure primaire de la protéine peut être décelée. Pasteur *et al.*, (1987) estiment que

l'électrophorèse détecte environ un tiers des remplacements d'acides aminés. De plus, tout zymogramme observé est fortement dépendant des conditions expérimentales utilisées (tampon, pH, voltage, etc). Une modification des conditions expérimentales est susceptible de révéler une variabilité additionnelle que l'on ne soupçonnait pas.

2.1.2. Principe de la visualisation des protéines

La visualisation de l'emplacement de la protéine sur le gel, après électrophorèse, s'effectue par des procédés histochimiques permettant d'obtenir un précipité coloré en utilisant les propriétés catalytiques spécifiques de cette protéine. Les protéines enzymatiques mises en présence de leur substrat et de divers corps chimiques nécessaires à leur activité, transforment ce substrat à l'emplacement même où elles se trouvent. Il suffit que l'un des composés de la réaction soit colorable pour mettre en évidence l'endroit où a migré la protéine. Certaines réactions enzymatiques produisent un corps qui se combine directement à un chromogène (Fast Blue BB ou Fast Black K salt) pour donner un précipité coloré. D'autres, comme c'est le cas pour la plupart des déshydrogénases, catalysent le transfert d'un atome d'hydrogène du substrat à un coenzyme. Cet atome peut être transféré sur un sel de tétrazolium qui donne alors un précipité insoluble de couleur bleue : le formazan (Pasteur et *al.*, 1987). Le système de révélation est donc une solution de coloration spécifique comportant : (i) le substrat spécifique de l'enzyme ; (ii) des cofacteurs : coenzymes, ions et autres composés nécessaires à l'activité de l'enzyme ("activateurs") ; (iii) un sel coloré susceptible d'être réduit ou de réagir avec le produit de la réaction. Pour certaines enzymes, on ajoute une enzyme de liaison dans la solution de révélation. Celle-ci est nécessaire quand la coloration se fait en deux étapes.

2.2. METHODE UTILISEE

2.2.1. Préparation des extraits enzymatiques

Les culots parasitaires sont lysés à froid, dans la glace, par addition d'un volume égal (volume/poids) de stabilisateur d'enzymes hypotonique : Dithiothreitol 2 mM, acide amino-n-caproïque 2 mM et EDTA 2 mM (Godfrey & Kilgour, 1976). Après 15 minutes d'incubation la suspension est centrifugée à 10000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant récupéré est réparti en volumes de 10 µl et conservé à -80°C. Il constitue l'extrait enzymatique à déposer sur les gels.

2.2.2. Le support

Les électrophorèses sont réalisées sur gels d'acétate de cellulose. Sur ce support, la migration s'effectue dans la pellicule de tampon à la surface du gel. Ce support présente plusieurs avantages : le gel est commercialisé prêt à l'emploi et se conserve après séchage sans aucun traitement particulier ; les temps de migrations sont relativement courts (40 minutes au maximum) et la quantité d'extrait déposée est très faible (environ 1 µl par système enzymatique). Le matériel d'électrophorèse (gel, cuve, support de gel et peigne applicateur) provient des laboratoires HELENA (Beaumont, Texas, Etats Unis) et les réactifs chimiques, des laboratoires SIGMA (Etats Unis).

2.2.3. La migration

La cuve contient dans les deux compartiments 50 ml de tampon d'électrophorèse. La liste de ces différents tampons et leur composition sont données dans les tableaux 3a et 3b, page 32. Le gel d'acétate de cellulose est imbibé dans le tampon de migration (pur ou dilué, selon le système enzymatique à l'étude) pendant 20 minutes. Ensuite il est légèrement épongé pour enlever l'excès de tampon, puis à l'aide du peigne, les échantillons sont déposés sur le gel (12 échantillons) : 1, 2, 3, ou 5 applications par plaque sont nécessaires selon les systèmes enzymatiques. Le gel est alors placé dans la cuve sur deux bandelettes de papier filtre autorisant le passage du courant. Les compartiments centraux de la cuve contiennent des éponges réfrigérées. En effet, un refroidissement est nécessaire pour certains systèmes enzymatiques afin d'éviter la distorsion des bandes au cours de leur migration. Une plaque de verre est posée sur le gel, et le courant est appliqué : voltage et temps de migration varient selon les systèmes enzymatiques étudiés. Toutes les conditions de migration (tampon, dilution, voltage, refroidissement et durée) sont réunies dans le tableau 4, page 33.

2.2.4. La révélation

Elle s'effectue en milieu solide. A la solution de coloration spécifique (tableaux 5 et 6, pages 33 et 34) d'un volume de 10 ml, est ajouté un volume identique d'agarose à 1,2% préalablement porté à ébullition, puis refroidi à 60°C. Le mélange est coulé dans une boîte de pétri, et est placé à l'obscurité. A la fin de la migration, la plaque d'acétate est appliquée sur le gel d'agarose (côté acétate) et l'ensemble est placé dans une étuve à 37°C.

Tableau 3a : **Tampons d'imbibition et de migration**

Appellation	Composition	pH
II de Lanham	Tris-HCl 0,66 M ; Acide citrique monohydraté 0,083 M	8,6
III de Shaw	Tris-Versène-Borate 0,5 M	8
I de Shaw	Tris-HCl 0,135 M ; Acide citrique 0,043 M	7
HR	Tris-Barbital-Sodium Barbital (HR Helena) i = 0,075 ou 3 sachets pour 2 litres	9
II de Kreutzer	Na H ₂ PO ₄ 0,2 M ; Na ₂ H PO ₄ 0,2 M	7
III de Kreutzer	Tris-HCl 0,1 M ; Acide maléique 0,1 M ; EDTA 0,01 ; MgCl ₂ 0,01 M	7,4
Tampon SOD	Tris-HCl 0,1 M ; Acide borique 0,3 M ; Sucrose 10 g (qsp 1 litre)	7,6
TTK	Tris-HCl 0,02 M ; Tricine 0,025 M ; KCl 0,01 M	8

Tableau 3b : **Tampons de réaction**

Appellation	Composition
Tris-HCl 1 M pH 7	Tris-HCl 1 M pH 7
Tris-HCl 1 M pH 8	Tris-HCl 1 M pH 8
Tampon de réaction ALAT	NaH ₂ PO ₄ 0,025 M + Na ₂ HPO ₄ 0,08 M pH = 7,4
Tampon de réaction SOD	NaH ₂ PO ₄ 0,1 M + Na ₂ HPO ₄ 0,1 M ; Riboflavine 0,0032%

Tableau 4 : Conditions de migration utilisées

Enzymes	Tampon	Dilution d'imbibition	Dilution de migration	Voltage	Temps de migration	Nbre de dépôts
ALAT	II de Lanham	50/100	pur	200 V	25'	3
GAPD	III de Shaw	25/100	80/100	200V	30'	5
6PGDH	I de Shaw	25/100	pur	200V	25'	2
G6PDH	HR	pur	pur	200V	25'	2
GPI	III de Shaw	25/100	pur	200V	40'	2
GOT	III de Shaw	50/100	80/100	160V	30'	3
GSR	II de Kreutzer	15/100	50/100	160V	35'	3
IDH	III de Shaw	30/100	pur	160V	30'	2
MDH	HR	90/100	pur	160V	40'	3
ME	III de Shaw	20/100	80/100	160V	40'	2
NHd	III de Shaw	75/100	pur	160V	30'	2
NHi	III de Shaw	75/100	pur	160V	30'	2
PEP1	III de Shaw	pur	pur	200V	35'	3
PEP2	III de Shaw	pur	pur	200V	35'	3
PGM	III de Kreutzer	30/100	70/100	200V	25'	2
SOD	Tampon SOD	pur	pur	200 V	30'	5
TDH	TTK	50/100	80/100	160V	35'	2
UGPP	HR	75/100	80/100	200V	30'	3

les cuves de migration sont refroidies par des éponges réfrigérées.

Tableau 5 : Récettes des colorations spécifiques

Enzymes	Tampon de réaction	Substrat	Activateur	Code
ALAT	10 ml tampon ALAT	5 mg alphakétoglutaric acid, 10mg L-alanine		E.C.2.6.1.2
GAPD	2,5 ml Tris-HCl 1 M pH8, qsp 10 ml	12,5 mg fructose-1-6-diphosphate Na4 salt	0,6 mg Arsenic acid Na2salt, 5mg sodium pyruvate	E.C.1.2.1.12
6PGDH	2,5 ml Tris-HCl 1 M pH8, qsp 10 ml	10 mg 6-phosphogluconic acid	250 ml MgCl2 1 M	E.C.1.1.1.44
G6PDH	5 ml Tris-HCl 1 M pH8, qsp 10 ml	10 mg glucose-6-phosphate	250 ml MgCl2 1 M	E.C.1.1.1.49
GPI	2,5 ml Tris-HCl 1 M pH7, qsp 10 ml	10 mg fructose-6-phosphate	250 ml MgCl2 1 M	E.C.5.3.1.9
GOT	10 ml Tris-HCl 0,1 M pH8	30 mg Aspartic acid, 25mg alphakétoglutaric acid	5 mg Pyridoxal 5 phosphate	E.C.2.6.1.1
GSR	2,5 ml Tris-HCl 1M pH8, qsp 10 ml	20 mg Glutathion forme oxydée		E.C.1.6.4.2
IDH	10 ml Tris-HCl 0,1 M pH8	10 mg DL-Isocitric acid	250 ml MgCl2 1 M	E.C.1.1.1.42
MDH	1 ml Tris-HCl 1 M pH 8, qsp 10 ml	900 ml Malate 1M (fait avec DL-malic acid)		E.C.1.1.1.37
ME	2,5 ml Tris-HCl 1 M pH7, qsp 10 ml	600 ml Malate 1M (fait avec DL-malic acid)	250 ml MgCl2 1 M	E.C.1.1.1.40
NIId	10 ml Tris-HCl 0,1 M pH8	40 mg deoxyinosine		E.C.2.4.2.2
NIIf	10 ml Tris-HCl 0,1 M pH8	40 mg inosine		E.C.2.4.2.1
PEP1	10 ml Tris-HCl 0,1 M pH8	5 mg Leu-Leu-Leu	150ml MgCl2 1 M, 150ml MnCl2 0,1 M	E.C.3.4.11*
PEP2	10 ml Tris-HCl 0,1 M pH8	5 mg Leu-ala	150ml MgCl2 1 M, 150ml MnCl2 0,1 M	E.C.3.4.13*
PGM	2,5 ml Tris-HCl 1 M pH8, qsp 10 ml	20 mg glucose-1-phosphate	250 ml MgCl2 1 M	E.C.2.7.5.1
SOD	10 ml tampon phosphate 0,1 M pH7,5	Riboflavine 0,0032%	100 ml EDTA 200 mM	E.C.1.15.1.1
TDH	1 ml Tris-HCl 1 M pH8, qsp 10 ml	L-threonine 100 mg, KCl 75 mg		E.C.1.1.1.10
UGPP	1 ml Tris-HCl 1 M pH8, qsp 10 ml	40 mg uridine 5'-diphosphate, 1 mg D-glucose 1,6 di-phosphate, 70 mg tetrasodium pyrophosphate, 10 UI glucose-6-P-DH, 60 UI phosphoglucomutase	250 ml MgCl2 1 M, 60 mg EDTA	E.C.2.7.7.9

Tableau 6 : Liste des enzymes de liaison, de coenzymes et de colorants utilisés

Enzymes	Enzymes de liaison	Coenzymes (qté)	colorants
ALAT	20 UI lactate-DH	NADH (4 mg)	PMS (9 mg) + MTT (3,6 mg) qsp 2 ml
GAPD	2,5 UI aldolase	NAD (4 mg)	NBT (5 mg) + PMS (3 mg)
6PGDH		NADP (5 mg)	NBT (5 mg) + PMS (3 mg)
G6PDH		NADP (5 mg)	NBT (5 mg) + PMS (3 mg)
GPI	5 UI glucose-6-P-DH	NADP (5 mg)	NBT (5 mg) + PMS (3 mg)
GOT			20mg fast-blue BB
GSR		NADPH (4 mg)	NBT (5 mg)
IDH		NADP (5 mg)	NBT (5 mg) + PMS (3 mg)
MDH		NAD (4 mg)	NBT (5 mg) + PMS (3 mg)
ME		NADP (5 mg)	NBT (5 mg) + PMS (3 mg)
NHd	1,5 UI xanthine oxydase		NBT (5 mg) + PMS (3 mg)
NHi	1,5 UI xanthine oxydase		NBT (5 mg) + PMS (3 mg)
PEP1	100 ml L-amino acid oxydase (1mg) + 100 ml peroxydase (1mg)		10 mg 3-amino-éthyl-carbazol dilué dans 400 ml éthanol
PEP2	100 ml L-amino acid oxydase (1mg) + 100 ml peroxydase (1mg)		10 mg 3-amino-éthyl-carbazol dilué dans 400 ml éthanol
PGM	8 UI glucose-6-P-DH	NADP (5 mg)	NBT (5 mg) + PMS (3 mg)
SOD	10 ml tampon SOD (9,2 ml + 0,8 ml riboflavine)*	EDTA (40 mM)	iodo-nitro-tétrazolium (5 mg)
TDH		NAD (4 mg)	NBT (5 mg) + PMS (3 mg)
UGPP	10 UI glucose-6-P-DH ; 60 UI phosphoglucomutase	NADP (5 mg)	NBT (5 mg) + PMS (3 mg)

*tampon de réaction SOD : NaH_2PO_4 0,1 M + Na_2HPO_4 0,1 M

*Riboflavine : 0,0032%

Quand la coloration est suffisamment intense, la révélation enzymatique est arrêtée en plongeant la plaque dans une solution d'acide acétique à 5% pendant 10 minutes. Après rinçage, la plaque est séchée à l'air.

Dans le cas de notre étude, il existe deux systèmes enzymatiques (ALAT et SOD) qui sont révélés à température ambiante. Le colorant de l'ALAT est versé sur la plaque (côté acétate) après incubation pendant une vingtaine de minutes à l'obscurité dans la boîte de pétri. Les bandes apparaissent immédiatement et la réaction est arrêtée par un premier rinçage de la plaque dans de l'eau tiède, puis en la plongeant ensuite dans la solution d'acide acétique à 5%. Quant à la SOD, les bandes sont visualisées au transluminateur et marquées au crayon. La plaque est ensuite immergée dans l'acide acétique à 5%.

2.2.5. Les systèmes enzymatiques

Les systèmes enzymatiques utilisés sont en règle des enzymes classiques du métabolisme cellulaire (glycolyse, cycle de Krebs) : ils ont été recherchés de manière empirique en adaptant aux trypanosomes africains les protocoles des électrophorèses isoenzymatiques appliquées à des organismes variés (homme, moustique, autres Kinétoplastidés,...) décrits par divers auteurs : Shaw & Prasad (1969) ; Harris & Hopkinson (1976) ; Gibson *et al.*, (1978) ; Kreutzer & Christensen (1980) ; Kreutzer et Sousa (1981) ; Kreutzer *et al.*, (1983) ; Lanham *et al.*, (1981) ; Tibayrenc *et al.*, (1985) ; Richardson *et al.*, (1986) ; Kaukas *et al.*, (1990). Les protocoles que nous avons choisis sont adaptés de ceux utilisés par Mathieu-Daudé (1991) (Ben Abderrazak *et al.*, 1993).

Les 18 systèmes enzymatiques étudiés sont : ALAT, GAPD, GOT, G6PD, GPI, GSR, IDH, MDH, ME, NHi, NHd, PEP1, PEP2, PGM, SOD, TDH, UGPP et 6PGD. Les noms et les codes officiels de ces enzymes sont donnés dans le tableau 7, page 38. Les deux nucléosides hydrolases catalysent des réactions transformant deux substrats différents : l'inosine pour la NHi et la déoxyinosine pour la NHd. Il en est de même pour les peptidases : ces substrats sont la L-leucyl L-leucyl L-leucine pour la PEP1, et la L-leucyl-L-alanine pour la PEP2.

2.2.6. La lecture des plaques

Les zymogrammes sont lus système isoenzymatique par système isoenzymatique (ce qui équivaut en règle à une lecture locus par locus). En se basant sur l'hypothèse de diploidie du génome des trypanosomes (Tait, 1980), il est logique de tenter d'associer tout phénotype observé à un génotype putatif et à une combinaison allélique. Toutefois, certains locus ne

permettent pas une interprétation en termes d'allèles. Les zymogrammes trop complexes ne permettent qu'une lecture génotypique globale : chaque profil isoenzymatique distinct et reproductible est assimilé à un génotype distinct dont la composition allélique reste inconnue.

- Pour les locus interprétés en terme allélique, les allèles sont numérotés de 1 pour l'allèle présentant la migration la plus rapide, à n pour le plus lent. Dans le cas d'un locus diallélique, l'allèle homozygote le plus rapide est numéroté 1 et l'allèle homozygote le plus lent est numéroté 2. L'hétérozygote pour ces deux allèles est noté 1-2.

- Pour les locus SOD, PEP1, PEP2, IDH, GAPD, GOT chacune des bandes observées est assimilée à un locus et codée par un chiffre allant de 1 à n.

- Pour certains locus, une absence totale d'activité enzymatique à été observée pour quelques isolats. Il se peut qu'il s'agisse d'allèles nuls (allèles ne présentant pas d'activité enzymatique, au moins dans les conditions expérimentales utilisées). Cependant, ces données ont été considérées simplement comme des données manquantes (génotype par défaut codé 99).

Tableau 7 : Noms, sigles et codes d'identification des 18 systèmes enzymatiques étudiés

E.C. = Enzyme Commission

NOM	SIGLE	CODE
Alanine aminotransferase	ALAT	E.C.2.6.1.2
Glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase	GAPD	E.C.1.2.1.12
6-Phosphogluconate deshydrogenase	6PGDH	E.C.1.1.1.44
Glucose-6-phosphate deshydrogenase	G6PDH	E.C.1.1.1.49
Glucose-phosphate isomerase	GPI	E.C.5.3.1.9
Aspartate aminotransferase	GOT	E.C.2.6.1.1
Glutathione reductase	GSR	E.C.1.6.4.2
Isocitrate deshydrogenase	IDH	E.C.1.1.1.42
Malate deshydrogenase	MDH	E.C.1.1.1.37
Malic enzyme	ME	E.C.1.1.1.40
Nucleoside hydrolase (deoxyinosine)	NHd	E.C.2.4.2.2
Nucleoside hydrolase (inosine)	NHi	E.C.2.4.2.1
Peptidases 1	PEP1	E.C.3.4.11*
Peptidases 2	PEP2	E.C.3.4.13*
Phosphoglucomutase	PGM	E.C.2.7.5.1
Superoxide dismutase	SOD	E.C.1.15.1.1
Threonine deshydrogenase	TDH	E.C.1.1.1.10
Uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase	UGPP	E.C.2.7.7.9

III. L'AMPLIFICATION DE L'ADN PAR LA TECHNIQUE DU RAPD

3.1. PRINCIPE DU RAPD

Le RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) est basé sur le principe de la PCR classique mais son originalité vient du fait qu'il n'est pas nécessaire de connaître la séquence de l'ADN cible pour choisir l'amorce. La réaction d'amplification utilise des amorces de 10 bases, de séquence arbitraire, qui amplifient des régions de l'ADN cible choisies au hasard. Les inventeurs de cette nouvelle méthode ont décrit pour la première fois les RAPD pour des applications de cartographie génétique ainsi que pour des diagnostics génétiques (Williams *et al.*, 1990 ; Welsh *et al.*, 1990 ; Williams *et al.*, 1991 ; Welsh *et al.*, 1991). Les RAPD ont été appliqués pour l'identification moléculaire de diverses espèces de protozoaires parasites par Tibayrenc *et al.* (1993).

3.2. MATERIEL

La Taq DNA Polymérase, son tampon spécifique et les dNTPs sont fournis, prêts à l'emploi, par Boehringer Mannheim (Mannheim, Allemagne). La séquence des amorces a été définie par Operon Technologies Inc. Les amorces des séries B, F, N, R, U ont été synthétisées par la société Bioprobe (France) et celles de la série A, par Appligène Oncor (France). La séquence des amorces et le % de GC sont décrits dans le tableau 8, page 42. Les 10 mers ont un pourcentage en GC de 60 et 70% car les meilleurs profils d'amplification sont obtenus avec un pourcentage en GC au moins égal à 60% (Williams *et al.*, 1993). Seules les amorces de la série F possède des sites de restriction aux enzymes BamH I (amorces F1 et F2), Bst I (amorces F1 et F2), Bcl I (amorces F3 et F4), EcoR I (amorces F5 et F6), EcoR V (amorces F7 et F8), Hind III (amorces F9 et F10), Asp 7181 (amorces F11 et F12), Kpn I (amorces F11 et F12), Pst I (amorces F13 et F14), Sca I (amorces F15 et F16), Hae III (amorces F17 et F18), Bsp R I (amorces F17 et F18), Pal I (amorces F17 et F18), Xba I (amorces F19 et F20).

L'ADN est extrait directement au laboratoire à partir des culots parasitaires provenant de nos propres cultures *in vitro* et *in vivo*.

3.3. METHODES UTILISEES

3.3.1. L'extraction d'ADN

3.3.1.1. La lyse des cellules

Le culot parasitaire est décongelé et remis en suspension dans 400 µl de solution de lyse (Tris-HCl 10 mM, pH 8 ; EDTA 1 mM, pH 8 ; SDS 1%). Le mélange est incubé à 55°C pendant une nuit en présence de 100 µg/ml de protéinase K.

3.3.1.2. Déprotéinisation

Deux extractions successives au phénol saturé sont effectuées, suivies de deux autres extractions au chloroforme-alcool isoamylique.

A la solution de parasites lysés, est ajoutée un volume de phénol. La solution est homogénéisée doucement pendant 5 minutes, puis centrifugée à 10000 rpm pendant 5 minutes à 20°C. La phase aqueuse supérieure est récupérée dans un nouveau tube, et l'opération est répétée une seconde fois.

Les lipides et les lipoprotéines sont éliminés par 2 extractions successives avec une solution de chloroforme/alcool isoamylique (24V/1V) selon la même procédure.

3.3.1.3. Précipitation de l'ADN

La phase aqueuse est récupérée et l'ADN est précipité en ajoutant de l'acétate de sodium 0,3 M final et 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. La précipitation de l'ADN a lieu au moins une heure à -70°C ou une nuit à -20°C. L'ADN précipité est récupéré par centrifugation à 15000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les traces de sels sont éliminées par 2 lavages dans l'éthanol 70%, le culot d'ADN est ensuite séché par centrifugation sous vide puis resuspendu dans de l'eau distillée stérile.

3.3.1.4. Dosage de l'ADN et contrôle de sa qualité

Le dosage de l'ADN est réalisé au spectrophotomètre en mesurant la densité optique (DO) à 260 nm. La concentration de l'ADN est estimée sur la base qu'une unité de D.O correspond à une solution d'ADN bicaténaire de 50 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1992)

La solution mère d'ADN est ramenée à une concentration maximum de 1 µg/µl avant d'être congelée à -20°C. Afin d'éviter plusieurs décongélations qui contribueraient à la dégradation de l'ADN de haut poids moléculaire, la solution d'ADN est répartie en petites aliquotes. Après décongélation, l'aliquot est dilué à 100 ng/µl et conservé à 4°C. Il servira à faire les dilutions de 10 ng/µl qui seront toujours utilisées pour les amplifications.

Pour vérifier la qualité de l'ADN, la D.O est prise à 230, 260 et 280 nm. Le rapport des D.O à 260/280 doit être compris entre 1,8 et 2. S'il est inférieur à 1,8, cela signifie que des protéines restent encore dans la solution. S'il est supérieur à 2, c'est probablement dû à des traces de phénol. Le rapport des D.O à 260/230 doit être compris entre 1,7 et 2. S'il est inférieur à 1,7 du chloroforme resterait dans la solution (Sambrook et *al.*, 1992).

3.3.2. L'amplification

20 ng d'ADN sont amplifiés dans un milieu réactionnel spécifique, d'un volume final de 60 µl (Tris-HCl 10mM pH 8,3 ; KCl 50 mM ; MgCl₂ 1,5 mM ; dNTP 4*100 nM, amorce 200 nM) en présence de 15 mUI/µl de Taq polymérase.

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur PTC-100TM (MJ Research Inc., Etats Unis) selon un programme comprenant 45 cycles de 3 phases : 1 minute de dénaturation à 94°C, 1 minute d'appariement à 36°C, et 2 minutes de synthèse à 72°C. La réaction est terminée par un cycle d'élongation de 7 minutes à 72°C.

3.3.3. Migration et révélation

Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,6% dans le tampon de migration TAE (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA). 25 ml de chaque échantillon sont mélangés à 3 ml de bleu de charge (0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylol cyanol FF, 15% Ficoll type 400 (Pharmacia) puis déposés dans un puits du gel. Les fragments amplifiés sont séparés à 3,2 volts par cm. Le gel est ensuite coloré dans un bain de TAE contenant du bromure d'éthidium (0,5 mg/ml). Les bandes d'ADN sont visualisées sous UV et le gel est photographié.

3.3.4. Lecture des profils

Les profils RAPD sont lus sur le même principe que les zymogrammes, mais de façon non allélique. Chaque profil d'ADN spécifique généré par une amorce donnée est considérée comme un génotype spécifique, dont la composition en locus et en allèles reste hypothétique. Ceci n'empêche pas (Tibayrenc, 1995) l'analyse de génétique des populations (déséquilibre de liaison : voir plus loin). L'ensemble des bandes est numéroté de 1 à n, de la bande de haut poids moléculaire (la plus lente) à la bande de faible poids moléculaire (la plus rapide). Par exemple, un profil RAPD avec 4 bandes différentes de tailles successives sera noté 1-2-3-4.

Tableau 8 : Noms et séquences des amorces utilisées dans les analyses génétiques

Amorces	Séquences
A1	CAGGCCCTTC
A7	GAAACGGGTG
A16	AGCCAGCGAA
B3	CATCCCCCTG
B7	GGTGACGCAG
B17	AGGGAACGAG
B18	CCACAGCAGT
F2	GAGGATCCCT
F3	CCTGATCACC
F16	GGAGTACTGG
N7	CAGCCCAGAG
N11	TCGCCGCAA
N14	TCGTGCGGGT
N15	CAGCGACTGT
N20	GGTGCTCCGT
R2	CACAGCTGCC
R14	CAGGATTCCC
R16	CTCTGCGCGT
U3	CTATGCCGAC
U6	ACCTTTGCGG
U7	CCTGCTCATC
U11	AGACCCAGAG
U13	GGCTGGTTCC
U18	GAGGTCCACA

IV. METHODES D'ANALYSE DES RESULTATS

4.1. VARIABILITE GENETIQUE

Nous avons mesuré la variabilité génétique au sein de l'échantillon à l'aide des paramètres suivants :

4.1.1. Le taux de polymorphisme

Le taux de polymorphisme est le pourcentage de locus polymorphes sur l'ensemble des locus étudiés. Les locus dont le polymorphisme repose uniquement sur des variants très rares ne sont pas considérés comme des locus polymorphes : seuls ceux dont le deuxième variant le plus fréquent présente une fréquence supérieure ou égale à 1% ou 5% (selon le critère retenu) sont considérés comme polymorphes.

4.1.2. La diversité génétique moyenne

Sa formule est identique à celle de l'hétérozygotie théorique moyenne, c'est à dire de la fréquence théorique moyenne des génotypes à l'état hétérozygote dans l'échantillon :

$$H = S h_i / r \quad h = 1 - \sum q_i^2$$

r = nombre de locus et h est égale à la diversité génétique à chaque locus. q_i = fréquence du $i^{\text{ème}}$ allèle (ou génotype, en cas de lecture non allélique) au locus considéré. La formule peut également être appliquée pour le cas des RAPD, en considérant chaque amorce comme un locus bien que : (a) chaque amorce amplifie un nombre inconnu de locus ; (b) il n'est pas certain que pour une amorce donnée les locus amplifiés soient les mêmes d'un génotype à l'autre, cette approche acceptant que les profils RAPD (assimilés ici à des génotypes élémentaires) recouvrent un nombre inconnu de locus et ne provoquant pas de biais, mais seulement une perte d'information (Tibayrenc, 1995) ; r est alors le nombre d'amorces, et q est la fréquence du $i^{\text{ème}}$ génotype RAPD pour une amorce donnée.

4.1.3. La distance génétique de Jaccard

Elle quantifie la dissemblance entre deux génotypes par le calcul du pourcentage de bandes communes sur le total de bandes (Jaccard, 1908).

$$D = 1 - \frac{a}{a+b+c}$$

dans laquelle

a = nombre de bandes communes aux deux génotypes comparés

b = nombre de bandes présentes dans le 1^e génotype et absentes dans le second

c = nombre de bandes absentes dans le 1^e génotype et présentes dans le second

Pour le calcul des distances, que ce soit pour les isoenzymes ou les RAPD, nous avons utilisé le programme informatique GENETICS du laboratoire, élaboré par Sébastien Noël.

4.2. LES METHODES DE CLASSIFICATION

4.2.1. Le dendrogramme : méthode phénétique

Le dendrogramme est construit à partir de la matrice de distances par classification hiérarchique. Celle-ci a pour but d'inclure chaque unité dans un groupe, puis de lier et hiérarchiser ces groupes. Différents dendrogrammes peuvent être construits sur la base de différentes distances génétiques. Mais c'est la matrice de distances de Jaccard qui a été choisie pour notre analyse. Les dendrogrammes ont été élaborés selon le procédé UPGMA = Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages (Sneath & Sokal, 1973). Ces dendrogrammes constituent un résumé visuel indispensable de la matrice de distances. Ils peuvent être considérés dans une certaine mesure comme des arbres phylogéniques, bien que certaines hypothèses de travail soient requises pour cela (en particulier, évolution indépendante des différentes lignées, similitude de vitesse évolutive entre les différentes lignées). La construction des dendrogrammes a été réalisée avec le programme GENETICS.

4.2.2. Le réseau de Wagner : méthode de parcimonie

La construction d'un arbre évolutif repose sur la prise en compte simultanée des caractères et des distances entre Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTO). Ainsi il considère non seulement le nombre, mais aussi la valeur intrinsèque des états des caractères

communs. Le calcul de l'éloignement entre UTO est basé sur la distance de Manhattan qui a pour formule : $d(A, B) = \sum |A_i - B_i|$ et représente en valeur absolue la somme des différences entre A et B après comparaison de la totalité n de leur caractère i. La structure dichotomique est édiflée par inclusion successive de toutes les unités. Un ancêtre putatif, ou Unité Taxonomique Hypothétique (UTH) prend place à chacun des embranchements. Dans le cas des protozoaires, on obtient un arbre non enraciné puisque l'on ne possède aucune trace d'un ancêtre commun (fossile). Le réseau dont la longueur est minimale est sélectionné, et l'arbre de Wagner est obtenu par optimisation de ce réseau. L'arbre le plus parcimonieux, c'est à dire dont le nombre de pas évolutifs ou de réversions est le plus faible est retenu (Wagner, 1961). En superposant les états de caractères aux UTO et aux UTH, il est possible d'apprécier la contribution de chaque gène à l'autonomie et à la liaison des groupes. On peut alors distinguer les caractères ancestraux des caractères nouveaux ou dérivés (Lanotte *et al.*, 1986).

L'arbre bootstrap est un réseau de Wagner réalisé par rééchantillonnage aléatoire des caractères. 100 arbres sont construits et un arbre consensus est tracé à partir de ces 100 arbres. Le pourcentage de regroupement correspond au nombre de fois où chaque groupe se retrouve dans les 100 arbres. C'est une méthode purement statistique qui permet d'avoir une idée de la solidité de la robustesse des noeuds de l'arbre.

Les arbres ont été construits grâce au programme informatique GENETICS et au programme PHYLIP (Felsenstein, 1978).

4.3. ANALYSE DE GENETIQUE DES POPULATIONS

Cette approche a pour but de donner un "instantané" de la structure des populations de l'organisme à l'étude. Dans le cas des microorganismes, l'analyse de génétique des populations s'est focalisée de façon préférentielle sur le débat clonalité/panmixie, dont les implications épidémiologiques ont déjà été exposées dans ce travail. Les statistiques utilisées prennent comme hypothèse nulle une situation panmictique (échanges génétiques libres), car c'est la seule situation dont les prédictions théoriques soient bien codifiées. L'analyse porte exclusivement sur le déséquilibre de liaison (association non aléatoire de génotypes à des locus différents), car les tests utilisés sont compatibles avec une lecture non allélique, et même, avec une lecture ne permettant pas d'individualiser les locus, ce qui est le cas des RAPD. Par ailleurs, il n'est pas besoin de faire d'hypothèse quant à la ploïdie de l'organisme. Ces raisons font de l'analyse du déséquilibre de liaison une approche robuste et parcimonieuse, bien

Variabilité génétique de *Trypanosoma congolense* : Implications taxonomiques et épidémiologiques adaptée à la génétique des populations des microorganismes (Tibayrenc, 1995). Les différents critères de déséquilibre de liaison retenus sont les suivants :

test d1 : probabilité d'échantillonner un génotype donné avec un effectif égal ou supérieur à celui qui est effectivement observé dans la population.

test d2 : probabilité d'échantillonner un génotype quelconque avec un effectif égal ou supérieur à celui qu'a effectivement le génotype dominant dans la population.

test e : probabilité d'échantillonner un nombre de génotypes égal ou inférieur à celui qui est effectivement observé.

test f : probabilité d'observer un déséquilibre de liaison aussi important, ou plus important que celui qui est effectivement observé.

test g : corrélation entre deux séries indépendantes de marqueurs génétiques.

Le test g' correspond au test g étendu au cas général d'une série de marqueurs génétiques quelconques séparés en deux par tirage aléatoire.

Le test d1 repose sur une analyse combinatoire utilisant la formule suivante :

$$P = \sum_{i=m}^n \frac{[n! \cdot x^i \cdot (1-x)^{n-i}]}{[i! \cdot (n-i)!]}$$

avec x = probabilité du génotype multilocus en question (produit des fréquences observées des génotypes élémentaires qui le composent), n est le nombre d'individus, et m est le nombre d'individus porteurs du génotype multilocus en question.

Les autres tests reposent sur une simulation de Monte Carlo avec 10^4 tirages. La corrélation du test g s'évalue avec un test non paramétrique de Mantel (Mantel, 1967). Brièvement, ce test consiste à comparer deux matrices de distances construites sur la base de deux jeux de caractères identiques. Il fait appel à une simulation de Monte Carlo avec 10^4 tirages, qui permute au hasard les différentes cellules d'une des deux matrices de distance. Il ne fait aucune inférence quant au degré de liberté, à la différence d'un test de corrélation classique. Le test g se pratique d'abord en évaluant la corrélation entre deux séries de distances génétiques obtenues pour des marqueurs différents (par exemple : isoenzymes et RAPD). Il peut être étendu au cas plus général d'une série quelconque de marqueurs génétiques, qu'on sépare en deux par tirage aléatoire (Tibayrenc, 1995). Dans ce cas nous l'avons appelé test g'.

En règle générale, un déséquilibre de liaison statistiquement décelable dans des populations naturelles, pour un nombre étendu de marqueurs génétiques sélectionnés au hasard, ne peut pas être imputable à une liaison physique sur le même chromosome. Pour que cette dernière situation génère un déséquilibre de liaison observable dans des populations

Variabilité génétique de *Trypanosoma congolense* : Implications taxonomiques et épidémiologiques naturelles, il faut que les deux locus en question soient très étroitement accolés l'un à l'autre sur le même chromosome. La probabilité en est très faible pour deux locus sélectionnés au hasard, et décroît géométriquement avec le nombre de locus sélectionnés (Tibayrenc, 1995). Un déséquilibre de liaison statistique est donc considéré comme traduisant une entrave au flux génique. Les obstacles peuvent être physiques (isolement par l'espace ou par le temps ou par les deux), ou biologiques (spéciation cryptique, clonalité). Différentes approches ont été proposées pour distinguer ces causes les unes des autres (Tibayrenc, 1995).

Le seuil de signification des tests a été fixé à 1% pour le f et 5% pour les autres (d1, d2, e, g et g').

RESULTATS

RESULTATS

I. LA CULTURE DES PARASITES

1.1. LE TEMPS DE PRODUCTION DES STOCKS

Tous les stocks, initialement issus de formes sanguines ont été amplifiés sur rongeurs avant la production de formes procycliques *in vitro*. Seuls les stocks de référence de *T. brucei*, de *T. godfreyi*, et de *T. simiae* étaient déjà sous formes procycliques. La croissance des parasites dans les souris immunodéprimées s'est montrée très variable d'un stock à l'autre. La durée des cultures est indiquée dans le tableau 9 ci- après :

Tableau 9 : **Comparaison du temps de croissance des parasites selon les groupes ou espèces étudiés (*in vivo* et *in vitro*)**

	Durée de la culture <i>in vivo</i>	Durée de la culture <i>in vitro</i>
<i>T. congolense</i>	42	127
<i>T. congolense</i> groupe de savane	46	180
<i>T. congolense</i> groupe de forêt	35	110
<i>T. congolense</i> groupe de kilifi	20	92
<i>T. simiae</i>	NF	NF
<i>T. godfreyi</i>	NF	NF
<i>T. brucei brucei</i>	21	47

NF = Non Fait

La durée de la culture *in vivo* correspond au nombre de jours entre le début et la fin de l'infection de la souris.

La durée de la culture *in vitro* correspond au nombre de jours entre la saignée de la souris et la récolte des formes procycliques (prêtes pour l'extraction d'isoenzymes et d'ADN).

En général, les premiers parasites sont détectés au microscope une semaine à 10 jours après infection. La fin de l'infection, qui correspond à la date de saignée de la souris, est en moyenne de 46 jours pour les stocks de savane et de 35 jours pour les stocks de forêt. Dans notre cas, le stock de savane le plus rapide a été récolté au bout de 9 jours alors que le stock le plus lent a été récolté après 210 jours post infection, ce qui montre une grande variation dans le temps de croissance des stocks de *T. congolense in vivo*. Quelquefois, il a été nécessaire de faire 2 infections pour obtenir une meilleure prolifération des parasites dans le sang. Bien que les stocks de forêt soient moins longs à produire que ceux de savane, nous n'avons pu en cultiver que 3 sur un ensemble de 11 stocks chez la souris (27%).

1.2. LE CHOIX DU MILIEU DE CULTURE

En milieu axénique on observe une forte prolifération des parasites les 3 premiers jours dans tous les milieux de culture que nous avons essayés. Mais cette phase de croissance exponentielle est suivie par une chute brutale et mortalité totale au bout du 4^{ème} ou 5^{ème} jour. Face à cette difficulté d'adaptation et de maintien en permanence nous avons essayé plusieurs combinaisons de milieu de culture :

- **le milieu de Cunningham** (annexe 1) : tous les stocks de *T. brucei* s'adaptent et se maintiennent de façon permanente dans ce milieu. Les stocks suivantes de *T. congolense* y ont été produites : GAM 2 ; WG 84 ; WG 5, ainsi que le stock KEN 2 de *T. simiae* et le stock KEN 7 de *T. godfreyi* tandis que le reste notre échantillon total ne s'y est pas adapté.

- **le milieu MEM modifié** (annexe 3) : à part les stocks de *T. brucei* et les stocks GAM2, IL-3000 et WG84 de *T. congolense* le reste des stocks ne s'est pas adapté à ce milieu.

- **le milieu CMEM** (50%MEM ; 50%Cunningham) : seules les stocks qui ont été produites dans le milieu MEM et le stock de savane 1/148 Fly ont pu être cultivées en CMEM.

- **le milieu de Tobie** (annexe 2) + **le milieu de Cunningham** : tous les stocks faisant partie de notre échantillon ont été produites dans ce milieu mixte dans les temps indiqués sur le tableau 9, page précédente. Le milieu biphasique de Tobie s'avère être un milieu polyvalent pour l'ensemble des trypanosomatidés car il est utilisé dans notre laboratoire pour la production de tous les stocks difficiles de *T. cruzi*, de *Leishmania*, et maintenant de *T. congolense*. Il a aussi l'avantage de ne pas nécessiter d'un renouvellement de milieu avant 10 à 15 jours sauf si la croissance des parasites est très rapide. L'utilisation du milieu de Tobie

nécessite un ou deux lavages supplémentaires au PBS au moment de la récolte des parasites pour être sûr d'éliminer toute trace de sang de lapin. En effet, lorsque les culots parasitaires sont mal lavés, on observe des bandes artefacts sur les plaques d'isoenzymes qui peuvent gêner la lecture des plaques.

II. IDENTIFICATION DES STOCKS

2.1. RESULTAT DU TYPAGE DES STOCKS PAR LES ISOENZYMES

Les 18 systèmes enzymatiques polymorphes utilisés ont été mis au point pour l'électrophorèse sur acétate de cellulose des stocks constituant notre échantillon total. Toutes les enzymes montrent un polymorphisme au sein du sous-genre *Nannomonas*. Tous les stocks étudiés ont montré des profils isoenzymatiques distincts.

2.1.1. Les enzymes non révélées :

Avec nos conditions de révélation nous n'avons pas pu mettre en évidence la LAP chez *T. congolense* alors que *T. brucei* sensu lato la révélait très bien. Il en est de même pour la GDH, qui ne se révèle, ni chez *T. congolense*, ni chez *T. brucei* sensu lato.

2.1.2. L'expression de plusieurs locus d'une même enzyme

Nous avons observé que pour la ME et le NHi, un seul locus est révélé par nos conditions chez le sous-genre *Nannomonas* alors que *T. brucei* sensu lato en exprime deux. Par ailleurs, deux locus différents sont révélés dans tout le sous-genre *Nannomonas* chez les enzymes suivantes : MDH, SOD, PEP1, PEP2. Ces résultats sont illustrés dans le chapitre des annexes (de l'annexe 4 à 13).

2.1.3. Enzymes monomorphes dans un groupe donné (caractères synapomorphes)

Dans nos conditions de migration, nous n'avons pas observé d'enzyme monomorphe pour l'ensemble de notre échantillon, ni pour le sous-genre *Nannomonas*, ni pour l'espèce *T. congolense*. Par contre la PGM s'est révélée monomorphe pour l'ensemble des stocks de savane + forêt. De même, la TDH a montré un profil monomorphe pour le groupe de savane. Ces différentes enzymes sont récapitulées dans le tableau 10a suivant :

Tableau 10a : Liste des enzymes spécifiques de groupe au sein de *T. congolense*

	groupe de savane	groupe de forêt	groupe de kilifi	savane + forêt
ME	oui	oui	oui	non
TDH	oui	non	non	non
GPI	oui	oui	oui	non
PGM	non	non	non	oui
NHd	oui	oui	non	non

2.1.4. La révélation d'hétérozygotes

La GPI a montré plusieurs profils typiques d'hétérozygotes. Ces derniers sont visibles sur l'annexe 4. Le stock 1/148 Fly s'est montré hétérozygote pour deux enzymes : GSR et MDH. 2 stocks sur 3 du groupe de forêt se sont révélés hétérozygotes pour l'enzyme NHd.

2.2. RESULTAT DU TYPAGE DES STOCKS PAR RAPD

L'ensemble des stocks ayant été analysé par isoenzymes a également été étudié par RAPD. Sur 120 amorces testées, 75 amorces ont donné des profils exploitables. Les 23 meilleures amorces ont été retenues pour les analyses de génétique. Elles ont été choisies selon les critères suivants :

- forte expression des fragments amplifiés
- parfaite reproductibilité des profils obtenus
- amorce ne générant pas un polymorphisme excessif, qui rendrait la lecture difficile (20 à 25 bandes différentes au maximum).

Les 23 amorces ont généré un total de 337 bandes sur 49 stocks appartenant à 4 espèces analysées : *T. congolense*, *T. simiae*, *T. godfreyi* et *T. brucei* sensu lato. Comme pour les isoenzymes, tous les stocks étudiés ont montré des profils RAPD distincts.

2.2.1. Détection de fragments ou de profils monomorphes pour un groupe donné (caractères synapomorphes) (voir illustration annexes 14 à 21)

La totalité des fragments spécifiques est résumée dans le tableau 10b, page 53 et les profils sont illustrés de l'annexe 4 à 14. Les différentes amorces peuvent produire des profils spécifiques à une ou plusieurs bandes ou un seul fragment spécifique d'une population donnée. Par exemple :

- L'amorce A1 permet de révéler un profil monomorphe à 3 bandes chez *T. brucei* sensu lato.
- L'amorce B18 amplifie 2 fragments spécifiques de *T. brucei* sensu lato.
- L'amorce R2 montre une bande spécifique de *T. brucei* sensu lato, une bande spécifique du groupe kilifi et une autre du groupe forêt de *T. congolense*.
- Pour l'ensemble du groupe de savane, plusieurs amorces telles que N7, N11, N15, R16 amplifient des fragments spécifiques monomorphes.
- Les amorces R16 et B17 révèlent des fragments communs conservés entre le groupe de savane et le groupe de forêt.
- L'amorce N15 est la seule qui montre une bande commune entre le groupe savane et le groupe de kilifi.
- L'amorce F3 révèle un fragment hautement conservé par une bonne partie des stocks isolés au Burkina (SAMO253, SAMO53, SAM31.C1, SAT193, SAM31, SAM33.1, SAM49, SAM51, SAM52.1, SAM55.2, SAM83.1).

On constate par ailleurs qu'il n'existe aucun fragment commun entre le groupe de forêt et le groupe kilifi, d'où l'absence de bande commune à l'ensemble de l'espèce *T. congolense*.

Tableau 10b : Fragments d'ADN spécifiques de groupes ou d'espèces des sous-genres *Trypanozoon* et *Nannomonas*

Amorces	Savane	Forêt	Kilifi	S + F	S + K	K + F	<i>T. congolense</i>	<i>T. brucei</i> s. l.	<i>T. brucei</i> n-g	Séquences
A1		1	2					3		CAGGCCCTTC
A7								3		GAAACGGGTG
A16								1		AGCCAGCGAA
B3										CATCCCCCTG
B7	1	1								GGTGACGCAG
B17			2	1						AGGGAACGAG
B18	2		1					2		CCACAGCAGT
F2										GAGGATCCCT
F3										CCTGATCACC
F16	1								1	GGAGTACTGG
N7				1						CAGCCCAGAG
N11	1	1	1							TCGCCGCAA
N14										TCGTGCGGGT
N15			1		1			2	3	CAGCGACTGT
N20		1								GGTGCTCCGT
R2		1	1					1		CACAGCTGCC
R14										CAGGATTCCC
R16	2	1						2		CTCTGCGCGT
U3								2		CTATGCCGAC
U6		2							1	ACCTTTGCGG
U7										CCTGCTCATC
U11	1									AGACCAGAG
U13	2							1		GGCTGGTTCC
U18	1									GAGGTCCACA
Total des bandes	11	8	8	2	1	0	0	17	5	

S = Savane ; K = Kilifi ; F = Forêt ; s. l. = sensu lato ; n-g = *T. brucei*. non gambiense

2.3. COMPARAISON DES IDENTIFICATIONS GENETIQUES ET MORPHOLOGIQUES

Les stocks originaires du Burkina ont, pour la plupart, été identifiés au microscope dès isolement avant d'être cryoconservés au Centre International de Recherches - Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES, ex CRTA). Certains stocks provenant de ces isolats ont également été criblés par différentes sondes génomiques disponibles. L'ensemble des résultats d'identification par microscopie, par criblage avec les sondes, ainsi que nos données en isoenzymes et RAPD sont résumés dans le tableau 11, page 55.

Les résultats du criblage par les sondes génomiques corroborent parfaitement nos résultats en isoenzymes et en RAPD. Les stocks qui n'ont pas pu être identifiés par microscopie optique l'ont été par les isoenzymes et les RAPD comme des stocks de *T. congolense*, type de savane (SAM82.2 ; SAM51 ; SAM49), de même que certains dont l'identification était douteuse (SAT193). Par contre, le stock SAM38.2 montre les caractéristiques de l'espèce *T. brucei* s.l. en isoenzymes et RAPD alors qu'elle avait été identifiée comme *T. congolense* ou *T. vivax* par microscopie optique.

Tableau 11: Résultats comparatifs de l'identification des souches du Burkina par 4 méthodes différentes

Code	Microscopie	Sonde génomique	Isoenzyme	RAPD	autre Code
BANAN/83/CRTA/67	<i>T. congolense</i>	sonde pgNRE-372 Type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	BAN 67
DINDERESSO/80/CRTA/3	<i>T. congolense</i>	sonde TSW103 Type forest	<i>T. congolense</i> /type forêt	<i>T. congolense</i> /type forêt	DIN 3
GAOUA/89/CRTA/282	<i>T. brucei</i> s.l.	NF	<i>T. brucei</i> non gambiense	<i>T. brucei</i> non gambiense	GAOUA 282
GAOUA/89/CRTA/283	<i>T. brucei</i> s.l.	NF	<i>T. brucei</i> non gambiense	<i>T. brucei</i> non gambiense	GAOUA 283
GAOUA/89/CRTA/ 231	<i>T. brucei</i> s.l.	NF	<i>T. brucei</i> non gambiense	<i>T. brucei</i> non gambiense	GAOUA 231
KARAN/83/CRTA/66	<i>T. vivax</i>	sonde pgNRE-372 Type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	KAR 66
KARAN/83/CRTA/57	<i>T. congolense</i>	sonde pgNRE-372 Type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	KAR 57
KARAN/83/CRTA/69	<i>T. congolense</i>	sonde pgNRE-372 Type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	KAR 69
SAMAN/82/CRTA/33	<i>T. congolense</i>	sonde pgNRE-372 Type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAM 33
SAMAN/82/CRTA/31	<i>T. congolense</i>	sonde pgNRE-372 Type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAM 31
SAMAN/82/CRTA/37	<i>T. vivax</i>	NF	<i>T. brucei</i> non gambiense	<i>T. brucei</i> non gambiense	SAM 37
SAMAN/82/CRTA/55.2	<i>T. congolense</i>	NF	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAM 55.2
SAMAN/85/CRTA/83.1	<i>T. vivax</i>	NF	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAM 83.1
SAMAN/82/CRTA/38.2	<i>T. congolense</i> / <i>T. vivax</i> ?	NF	<i>T. brucei</i> s.l.	<i>T. brucei</i> s.l.	SAM 38.2
SAMAN/82/CRTA/32.1	<i>T. congolense</i>	NF	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAM 32.1
SAMAN/82/CRTA/34.2	<i>T. congolense</i>	NF	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAM 34.2
SAMAN/85/CRTA/82.2	?	NF	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAM 82.2
SAMAN/82/CRTA/ 51	?	NF	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAM51
SAMAN/82/CRTA/ 31.C1	<i>T. congolense</i>	NF	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAM 31.C1
SAMAN/85/CRTA/49	?	NF	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAM 49
SAMAN/85/CRTA/52.1	<i>T. congolense</i>	NF	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAM 52.1
SAMO/89/CRTA/253	<i>T. congolense</i>	NF	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAMO 253
SAMO/82/CRTA/53	<i>T. congolense</i>	sonde pgNRE-372 Type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAMO 53
SAMO/82/CRTA/51	<i>T. congolense</i>	NF	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAMO 51
SAMO/80/CRTA/23	<i>T. congolense</i>	NF	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAMO 23
SAT/87/CRTA/193	<i>T. congolense</i> / <i>T. vivax</i> ?	NF	<i>T. congolense</i> /type savane	<i>T. congolense</i> /type savane	SAT 193

Les résultats de la microscopie correspondent à la première identification des isolats
 pgNRE-372 = sonde génomique de 320 pb (Majiwa et al., 1990) ; TSW103 = sonde génomique de 350 pb (Gibson et al., 1988)
 NF = non fait

2.4. SPECIFICITES EPIDEMIOLOGIQUES DES DIFFERENTS GROUPES DE *T. CONGOLENSE*

Les résultats précédents nous ont permis de confirmer au sein de notre échantillon l'existence des trois groupes qui subdivisent *T. congolense*. Afin de cerner leurs spécificités épidémiologiques, nous avons considéré notre échantillon du Burkina et celui analysé par Gashumba en 1988, puisque nous possédons des stocks de trypanosomes en commun.

Le tableau 12 ci-dessous montre que le groupe de savane est largement majoritaire au sein de *T. congolense*. Il représente 90% de l'échantillon total, le groupe de forêt 9% tandis que le groupe de kilifi est de 1%. Cette tendance est conservée même en considérant les deux échantillonnages séparément (celui du Burkina et celui de Gashumba).

Tableau 12 : **Importance numérique des groupes de savane, forêt ou kilifi**

	groupe de savane effectif (%)	groupe de forêt effectif (%)	groupe de kilifi effectif (%)	Total effectif (%)
Echantillon du Burkina	20 (95%)	1 (5%)	0 (0%)	21 (100%)
Echantillon de Gashumba <i>et al</i> , 1988	101 (89%)	11 (10%)	2 (1%)	114 (100%)
Total	121 (90%)	12 (9%)	2 (1%)	135 (100%)

Le tableau 13 suivant montre que 98% des infections des bovins sont dues à des trypanosomes du groupe de savane contre 2% pour le groupe de forêt. Par ailleurs, nous observons que 75% des infections des porcs sont dues aux trypanosomes du groupe de forêt contre 25 % par le groupe de savane. Les 2 stocks du groupe kilifi proviennent de petits ruminants (1 mouton et 1 chèvre). Cette tendance est confirmée par un test de X^2 , pratiqué en groupant les hôtes en deux catégories : non-bovins (mouton/chèvre, porc et chien) et bovins, afin d'obtenir des effectifs théoriques suffisants. Une différence hautement significative ($p < 0,001$) de spécificité d'hôte apparaît alors entre les groupes de savane et de forêt.

Tableau 13 : **Prévalence des groupes de savane, forêt, kilifi chez les principaux hôtes mammifères domestiques**

	groupe de savane effectif (%)	groupe de forêt effectif (%)	groupe de kilifi effectif (%)	Total effectif (%)
bovin	53 (98%)	1 (2%)	0 (0%)	54 (100%)
mouton/chèvre	15 (75%)	3 (15%)	2 (10%)	20 (100%)
porc	2 (25%)	6 (75%)	0 (0%)	8 (100%)
chien	15 (88%)	2 (12%)	0 (0%)	17 (100%)

Par ailleurs la répartition géographique de l'ensemble des stocks montre que le groupe de savane est fortement ubiquiste alors que le groupe de forêt ne se trouve qu'en Afrique de l'Ouest et le groupe kilifi, cloisonné à l'extrême Est de l'Afrique (Kenya et Ouganda). (voir tableau 14 ci-dessous).

Tableau 14 : **Répartition géographique des 3 groupes de *T. congolense* selon notre échantillon et selon la bibliographie**

	groupe de savane	groupe de forêt	groupe de kilifi
Afrique de l'Ouest	présent	présent	absent
Afrique de l'Est	présent	absent	présent

III. COMPARAISON PHYLOGENETIQUE

3.1. COMPARAISON DES DISTANCES GENETIQUES AU SEIN DU SOUS-GENRE *NANNOMONAS*

Sur le dendrogramme obtenu à partir des distances isoenzymatiques (figure 7, page 59), on retrouve les 3 groupes qui constituent l'espèce *T. congolense*. Dans le groupe de savane, on observe 2 sous-groupes dont le premier est composé en majorité de stocks du Burkina et le second sous-groupe, de stocks d'Afrique de l'Est. Le groupe Forêt semble moins distant du groupe de savane que du groupe de Kilifi. Le groupe Kilifi paraît aussi éloigné des groupes de savane et de forêt que *T. brucei*, *T. simiae* et *T. godfreyi*. La distance génétique maximum au sein du groupe de savane est de 0,72. Elle est de 0,97 pour l'ensemble de l'espèce *T. congolense*. Pour l'ensemble du sous-genre *Nannomonas*, la distance génétique maximum entre les 3 espèces (*T. congolense*, *T. simiae* et *T. godfreyi*) est également de 0,97. L'arbre consensus de bootstrap (figure 8, page 59) confirme la solidité des branches de chacun des groupes de *T. congolense*. Les valeurs de bootstrap indiquées correspondent au nombre d'arrangements effectués sur 100 tirages successifs : groupe Savane = 55,4 ; groupe Forêt = 100 ; groupe Kilifi = 100 ; *T. brucei* sensu lato = 80,7 ; *T. brucei* non *gambiense* = 83. Par ailleurs on observe une bonne concordance entre les deux arbres, UPGMA d'une part et bootstrap de l'autre (figures 7 et 8)

En RAPD, la répartition en groupes (dendrogramme figure 9, page 60) est quasiment identique à celle qui est observée en isoenzymes. La corrélation entre les deux méthodes, isoenzymes et RAPD, est excellente (coefficient de corrélation $r = 0,76$, test de Mantel $p < 10^{-4}$). Dans le groupe de savane, on observe 2 populations, dont une est surtout composée de stocks du Burkina, tandis que la seconde se subdivise en 2 sous-populations. Une de ces sous-populations comprend des stocks d'Afrique de l'Est et la deuxième, de stocks d'Afrique de l'Est et de l'Ouest. La distance génétique maximum au sein du groupe de savane est de 0,78 ; pour l'ensemble *T. congolense*, elle est de 0,94 et pour le sous-genre *Nannomonas*, de 0,98. Les valeurs de bootstrap corroborent les branchements de l'arbre UPGMA : groupe Kilifi = 100 ; groupe de savane = 79 ; groupe de forêt = 95 ; *T. brucei* = 96 ; *T. brucei* non *gambiense* = 43. Comme pour les isoenzymes, on observe une bonne concordance entre les deux arbres, UPGMA d'une part et bootstrap de l'autre (figure 10, page 61).

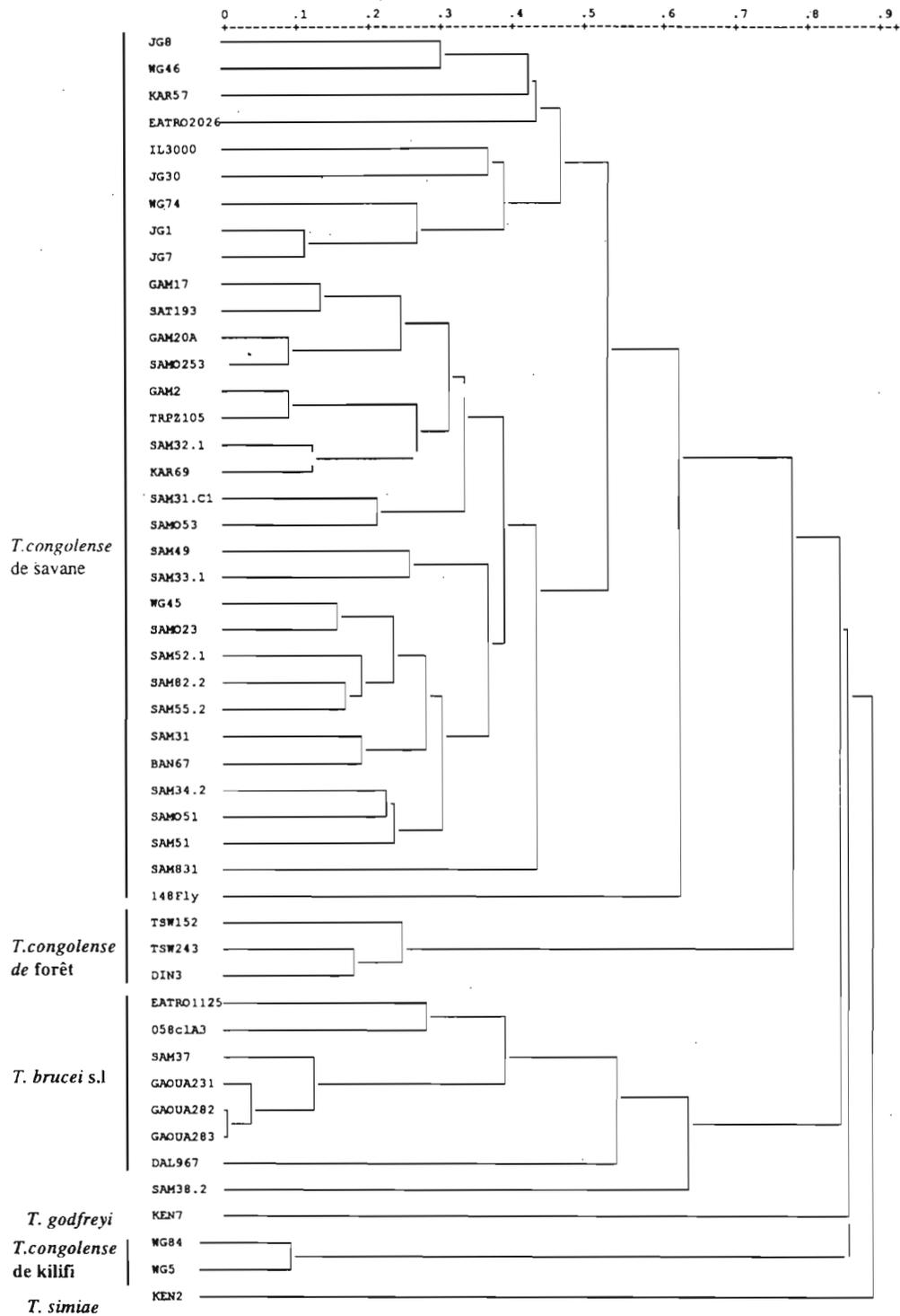


Figure 7 : **Dendrogramme UPGMA selon les données de 18 systèmes enzymatiques**
 (construit à partir de la matrice de distances de Jaccard par classification hiérarchique ascendante)

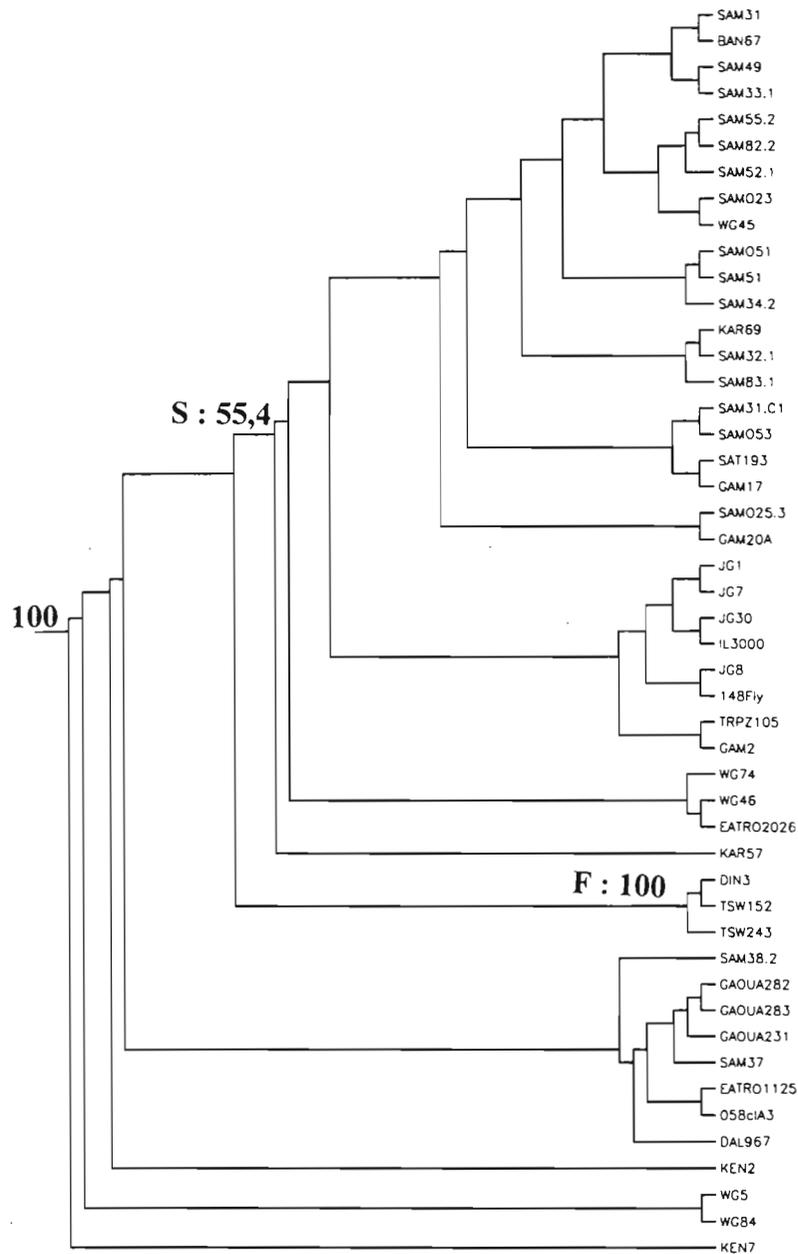


Figure 8 : **Méthode de parcimonie : bootstrap avec les données isoenzymatiques**

la solidité des branchements est indiquée en pourcentage au niveau des noeuds. Sa valeur est obtenue pourcentage sur 100 répétitions.

K = kilifi ; S = savane ; F = forêt ; B = *T. brucei*

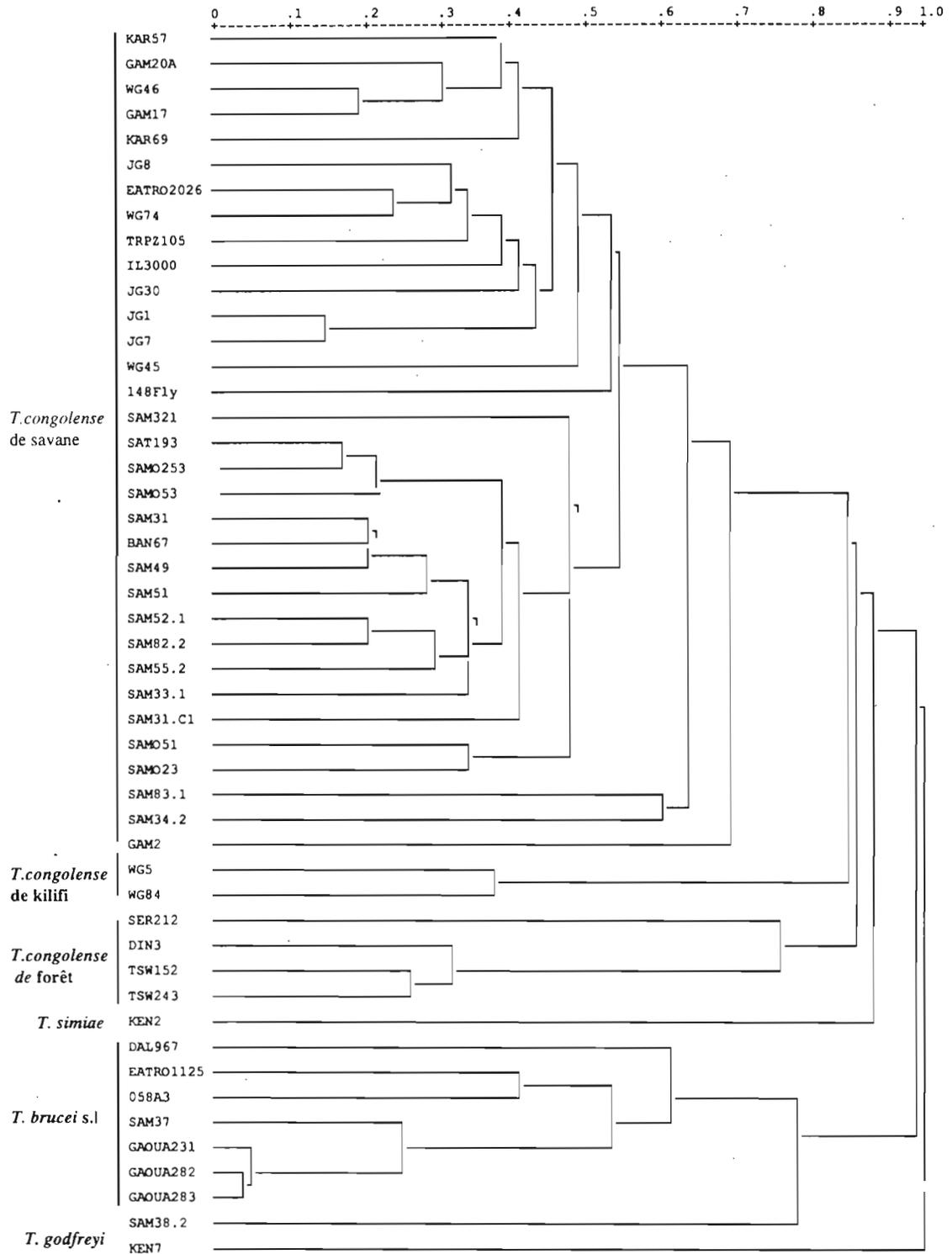


Figure 9 : **Dendrogramme UPGMA selon les données de 23 amorces RAPD**
(construit à partir de la matrice de distances de Jaccard par classification hiérarchique ascendante)

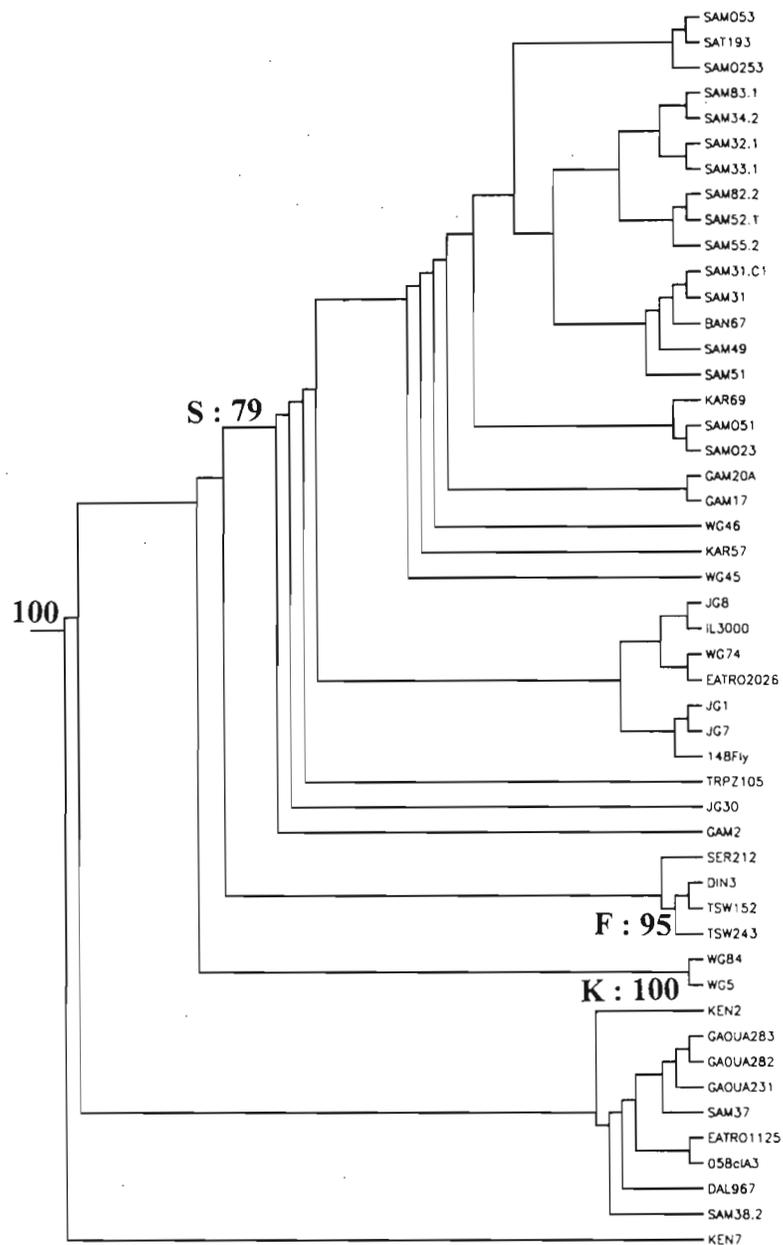


Figure 10 : **Méthode de parcimonie : bootstrap avec les données de RAPD**

la solidité des branchements est indiquée en pourcentage au niveau des noeuds. Sa valeur est obtenue sur 100 répétitions.

K = kilifi ; S = savane ; F = forêt ; B = *T. brucei*

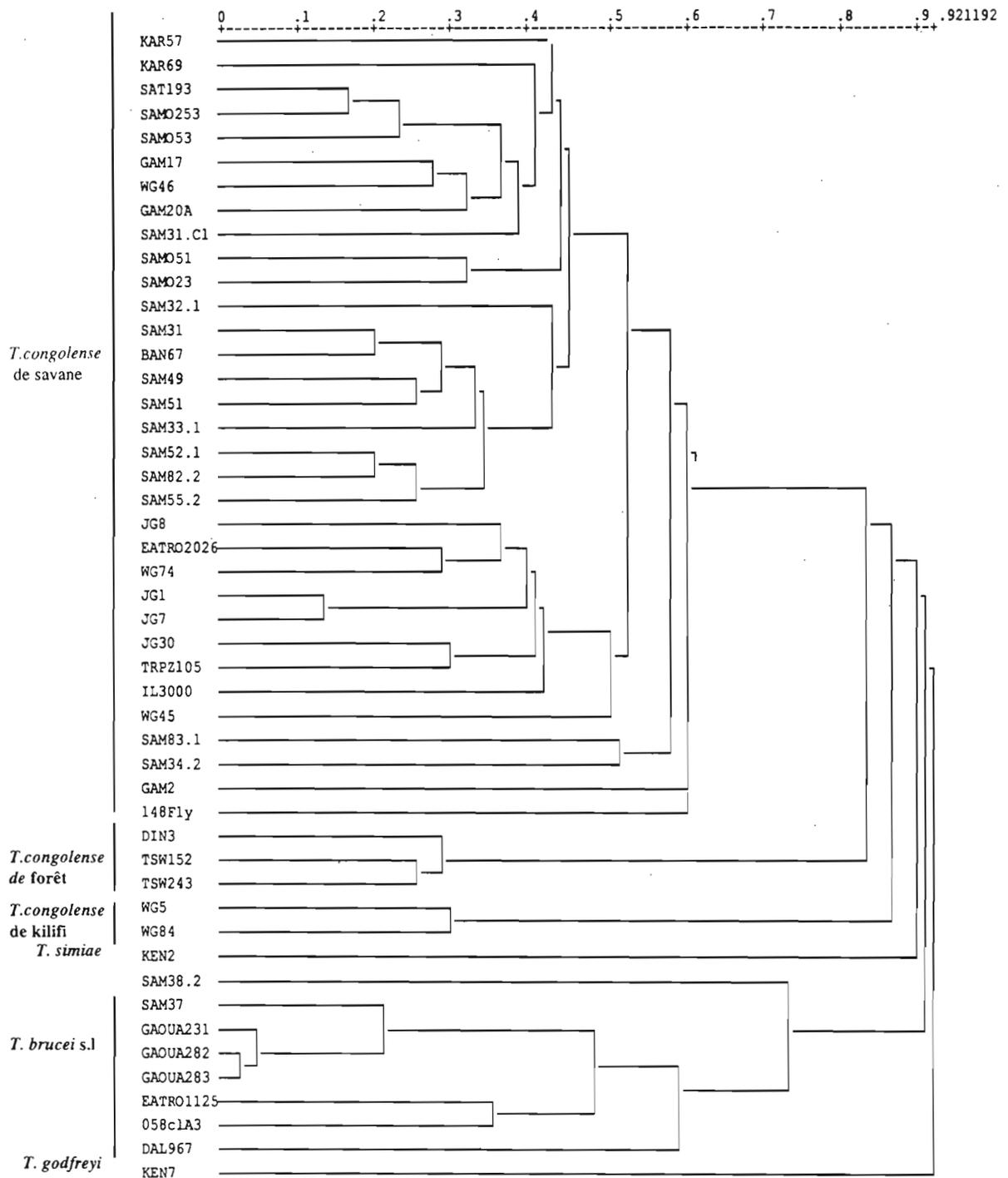


Figure 11 : **Dendrogramme UPGMA selon les données cumulées des isoenzymes et RAPD**
(construit à partir de la matrice de distances de Jaccard par classification hiérarchique ascendante)

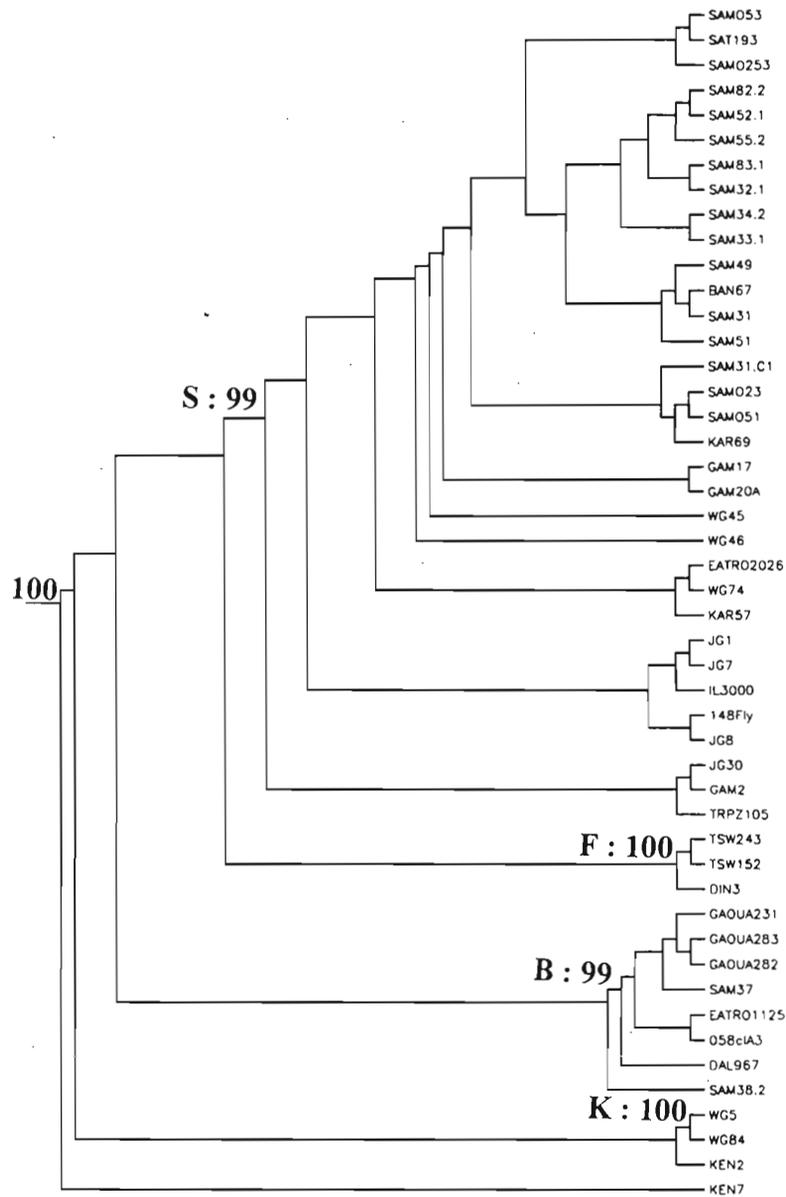


Figure 12 : **Méthode de parcimonie : bootstrap avec le cumul des données isoenzymatiques et de RAPD**

la solidité des branchements est indiquée en pourcentage au niveau des noeuds. Sa valeur est obtenue sur 100 répétitions.

K = kilifi ; S = savane ; F = forêt ; B = *T. brucei*

Le cumul des données isoenzymatiques et des RAPD (total de 41 locus ou groupes de locus) conforte davantage les résultats décrits ci-dessus avec soit les isoenzymes seules, soit les RAPD seuls. Sur l'arbre UPGMA synthétique (isoenzymes + RAPD) (figure 11, page 62) le groupe de savane est constitué de deux sous-populations bien distinctes, dont la première est composée de stocks du Burkina et la seconde, de stocks d'Afrique de l'Est uniquement. La distance génétique maximum au sein du groupe de savane est égale à 0,76. Au sein de l'espèce *T. congolense* dans son ensemble, elle est de 0,95 et celle au sein du sous-genre *Nannomonas*, elle est également de 0,95. Les valeurs du bootstrap indiquent que les branchements intergroupes ou interespèces sont robustes. Pour le groupe de savane, la valeur est de 99 ; pour le groupe de forêt de 100 ; pour le groupe Kilifi de 100 ; pour *T. brucei* sensu lato, de 99 ; pour *T. brucei* non *gambiense*, de 69,3. L'arbre synthétique UPGMA construit avec les données isoenzymes et RAPD donne un arbre semblable à celui du bootstrap (figure 12, page 63).

3.2. COMPARAISON DES DISTANCES GENETIQUES ENTRE MICROORGANISMES

L'étude simultanée par RAPD de plusieurs protozoaires parasites de la famille des Trypanosomatidés (*T. congolense*, *T. cruzi*, *Leishmania* spp.) avec 100 amorces nous donnent les distances génétiques suivantes dans le tableau 15:

Tableau 15 : Distances génétiques comparées de 3 Trypanosomatidés

	Maximum	Minimum	Moyenne	Ecart-type
<i>T. congolense</i> savane	0,76	0,14	0,52	0,11
<i>T. brucei</i>	0,71	0,11	0,65	0,18
<i>T. cruzi</i> phylum 1	0,79	0,01	0,59	0,24
<i>L. braziliensis</i>	0,38	0,18	0,3	0,08
<i>L. peruviana</i>	0,16	0,05	0,12	0,06
complexe <i>braziliensis</i>	0,38	0,18	0,29	0,08
<i>T. (N) congolense</i>	0,95	0,14	0,68	0,22
<i>T. Nannomonas</i>	0,95	0,14	0,74	0,22
<i>T. cruzi</i>	0,95	0,01	0,63	0,25
ss-genre <i>Leishmania</i>	0,96	0,27	0,74	0,28

On observe dans le tableau 15 (page 65) que la distance génétique maximum au sein du groupe Savane de *T. congolense* (= 0,76) est comparable à celle trouvée au sein de l'espèce

T. brucei (= 0,71) et au phylum le plus variable trouvé au sein de l'espèce *T. cruzi* (Brisse, communication personnelle). Elle est nettement supérieure à celles trouvées chez *Leishmania braziliensis* et *Leishmania peruviana* et même à la distance génétique maximum rencontrée au sein du complexe *L. braziliensis*. Si l'on prend comme critère la distance génétique maximum, l'espèce *T. congolense* est aussi variable que le sous-genre *Nannomonas* et se situerait au même niveau phylogénique que le sous-genre *Leishmania* (Bañuls, communication personnelle).

Les dendrogrammes (figure 13, page 67) construits à partir de la matrice des distances de Jaccard montrent que, pour un niveau de divergence phylogénétique donné (une même valeur de distance génétique), les descriptions taxonomiques sont très divergentes d'une catégorie de parasite à l'autre. Ainsi, le niveau de divergence génétique observé au sein de *T. congolense* correspond à celui observé au sein du sous-genre *Leishmania*.

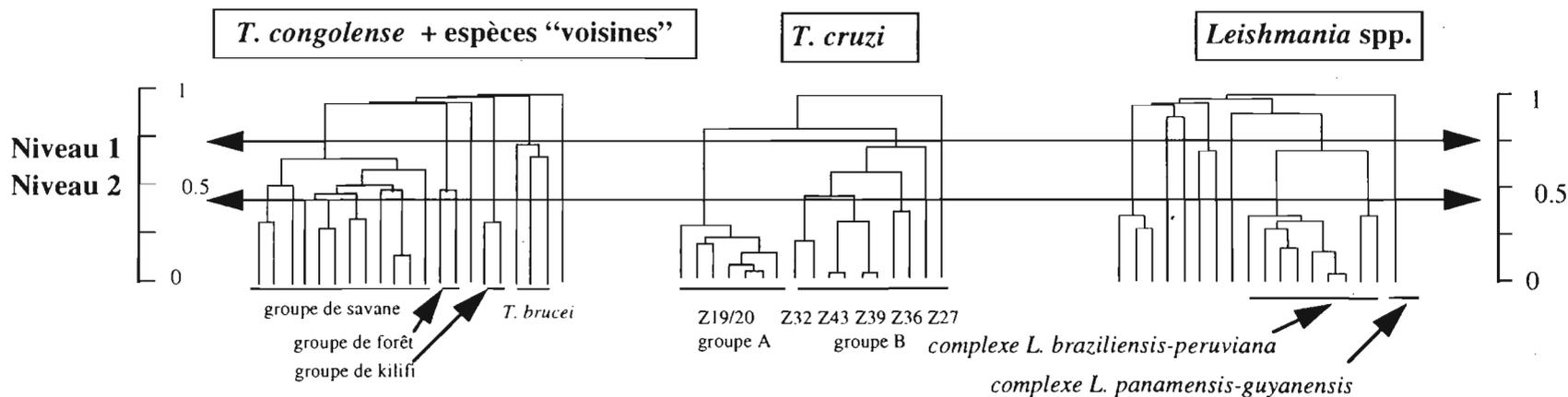


Figure 13 : **Diversité génétique comparée de *T. congolense*, *T. cruzi*, et *Leishmania* spp. par la méthode du RAPD.**

Le niveau 1 correspond à la divergence entre complexes de *Leishmania*, entre les principaux sous-groupes de *T. cruzi*, et les 3 groupes de l'espèce *T. congolense*.

Le niveau 2 correspond à la divergence entre les espèces de *Leishmania* et entre les groupes au sein de *T. cruzi* et au sein de *T. congolense*.

Le seuil de résolution de la technique est différent d'un microorganisme à l'autre.

IV. RESULTATS DES TESTS DE GENETIQUE DES POPULATIONS

Dans l'analyse de génétique des populations, qui repose entièrement dans le cas de notre étude sur les tests de déséquilibre de liaison, le but principal est de mettre en lumière le type de structure : clonalité, spéciation, panmixie. On s'efforce pour cela d'écarter les causes d'écart à la panmixie imputables à des obstacles physiques (allopatric, séparation dans le temps). Par ailleurs, pour différencier une spéciation cryptique d'une clonalité, on pratique les tests, non seulement dans l'ensemble *T. congolense*, mais également, dans chacune de ses subdivisions prises séparément, l'hypothèse de travail sous-jacente étant que chacune de ces subdivisions (Savane, Kilifi, Forêt) pourrait correspondre à une espèce biologique sexuée. Pour l'analyse de génétique des populations, notre échantillon est ainsi subdivisé en 5 populations différentes :

Une population comprenant l'ensemble des stocks de l'espèce *T. congolense*

Une population comprenant les stocks de savane + forêt

Une population composée uniquement du groupe de savane

Une population composée de stocks de savane isolées au Burkina

Une population composée de stocks de savane isolées au Burkina et apparaissant comme un sous-groupe très homogène.

4.1. RESULTAT DU CALCUL DES INDICES DE DIVERSITE GENETIQUE

Tableau 16 : **Indices de diversité génétique au sein de *T. congolense***

	isoenzymes	RAPD	isoenzymes + RAPD
<i>T. congolense</i>	0,52	0,78	0,67
groupe de savane + forêt	0,48	0,76	0,64
groupe de savane	0,43	0,73	0,6
groupe 1 de savane du Burkina	0,29	0,59	0,46
groupe 2 de savane du Burkina	0,32	0,66	0,49

On observe une variabilité nettement moins importante dans nos populations du Burkina que dans l'ensemble du groupe de savane de notre échantillon.

4.2. RESULTAT DU TAUX DE POLYMORPHISME

Tableau 17 : **Taux de polymorphisme révélé par nos différentes méthodes d'étude**

	isoenzymes	RAPD	isoenzymes + RAPD
<i>T. congolense</i>	1	1	1
groupe de savane + forêt	1	1	1
groupe de savane	0,94	1	0,97
groupe 1 de savane du Burkina	0,66	1	0,85
groupe 2 de savane du Burkina	0,88	1	0,95

Le taux de polymorphisme a été calculé à 5% (voir dans le chapitre matériel et méthodes). On observe un polymorphisme légèrement moins important en isoenzymes qu'en RAPD mais dans l'ensemble il est proche de 100% dans l'espèce *T. congolense*.

4.3. RESULTAT DES TESTS DE DESEQUILIBRE DE LIAISON

Nous n'avons pas effectué les tests d1, d2 et e parce que nos populations ne montrent pas de génotypes répétés. Il existe autant de stocks que de génotypes différents dans ces populations. Ces tests, qui sont basés sur l'observation de génotypes répétés, sont donc sans objet dans ce cas. En rappel, le test g' correspond au test g étendu au cas général d'une série de marqueurs génétiques quelconques séparés en deux par tirage aléatoire (voir matériel et méthodes). Trois types de tirage ont été pratiqués pour ce test : une partition aléatoire avec 10000 itérations, 10 partitions aléatoires avec 1000 itérations pour chacune, 100 partitions aléatoires avec 100 itérations pour chacune. Le g' a été pratiqué : (i) avec les données isoenzymatiques seules ; (ii) avec les données RAPD seules ; (iii) avec les données isoenzymes et RAPD mêlées.

Tableau 18 : **Résultat du test g (corrélation isoenzymes/RAPD) au sein de *T. congolense***

	<i>T. congolense</i>	groupe savane + forêt	groupe de savane	groupe 1 de savane du Burkina	total du groupe de savane du Burkina
Nombre de stocks	38	36	33	14	18
test g	$r = 0,76$ $p < 10^{-4}$	$r = 0,6$ $p < 10^{-4}$	$r = 0,29$ $p < 10^{-4}$	$r = 0,02$ $p = 0,43$	$r = 0,08$ $p = 0,3$

Dans l'espèce *T. congolense*, le coefficient de corrélation est très élevé. Le test est fortement significatif avec une probabilité $p < 10^{-4}$. La seule exception est constituée par la population du Burkina Faso chez qui le test n'est pas significatif.

Tableau 19 : **Résultat des tests f et g' avec les données isoenzymatiques**

	Nombre de stocks	Nombre de locus	test f	test g' (1*10000)	test g' (10*1000)	test g' (100*100)
<i>T. congolense</i>	38	18	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$
groupe de savane + forêt	36	18	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$
groupe de savane	33	18	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p = 0,002$	$p = 0,002$
groupe 1 de savane du Burkina	14	18	$p = 0,2$	$p = 0,0414$	$p = 0,65$	$p = 0,65$
Total de savane du Burkina	18	18	$p = 0,01$	$p = 0,0065$	$p = 0,16$	$p = 0,16$

Les résultats des tests f et g' ne montrent pas d'écart apparent à la panmixie dans les populations du Burkina. La plus petite valeur de p est égale à 0,2 dans la population 1 de savane du Burkina. Par contre l'ensemble des stocks Savane du Burkina montre une probabilité à la limite du seuil de signification ($p = 0,01$).

Tableau 20 : **Résultat des tests f et g' avec les données RAPD**

	Nombre de stocks	Nombre de locus	test f	test g' (1*10000)	test g' (10*1000)	test g' (100*100)
<i>T. congolense</i>	38	23	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$
groupe de savane + forêt	36	23	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$
groupe de savane	33	23	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$
groupe 1 de savane du Burkina	14	23	$p = 0,0001$	$p = 0,0004$	$p = 0,0015$	$p = 0,0015$
Total de savane du Burkina	18	23	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$

En RAPD, tous les résultats des tests f et g' donnent une probabilité p très significative. Le plus faible écart à la panmixie correspond à 15 tirages sur 10000 répétitions, soit $p = 1,5 \times 10^{-3}$ (tableau 20 ci dessus).

Tableau 21 : **Résultat des tests f et g' avec les données isoenzymes + RAPD**

	Nombre de stocks	Nombre de locus	test f	test g' (1*10000)	test g' (10*1000)	test g' (100*100)
<i>T. congolense</i>	38	41	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$
groupe de savane + forêt	36	41	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$
groupe de savane	33	41	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$
groupe 1 de savane du Burkina	14	41	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p = 0,0026$	$p = 0,0026$
Total de savane du Burkina	18	41	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p = 10^{-4}$	$p = 10^{-4}$

En cumulant les données isoenzymatiques et RAPD on obtient des résultats du test f hautement significatifs avec $p < 10^{-4}$ dans les 5 populations. Le test g' est également très significatif pour les 3 types de tirages effectués ; c'est à dire : 1*10000 ; 10*1000 ; 100*100. La probabilité p de la plus petite population du Burkina est égale à 0,0026 (tableau 21 ci-dessus).

DISCUSSION

DISCUSSION

I. CULTURE DES STOCKS DE *T. CONGOLENSE*

Notre travail a commencé par une mise au point de la culture de *Trypanosoma congolense* *in vivo* et *in vitro*. Les cultures sur souris ont été enrichies en réinjectant des trypanosomes aux souris déjà infectées. Par ailleurs, bien sûr, les défenses immunitaires des souris ont été abaissées par traitement immunodépresseur. L'adaptation à la culture sur souris a été très variable d'un stock à l'autre. Certains stocks ont proliféré très rapidement, en 9 jours, tandis que d'autres ont pris 42 jours, avec réinfections successives. Enfin, certains stocks ne se sont jamais adaptés. Par ailleurs, certains stocks très pathogènes tuaient la souris sans qu'une parasitémie satisfaisante puisse être atteinte.

Dans le souci d'épargner des animaux de laboratoire, nous nous sommes attaché à mettre au point un système de culture *in vitro*. Les formes ainsi produites sont des procycliques, qui se trouvent à l'état naturel chez l'insecte vecteur. Ces formes se caractérisent par l'absence de membrane glycoprotéique, et ne sont pas transmissibles à l'hôte mammifère.

Plusieurs travaux antérieurs ont essayé de mettre au point des milieux pour la culture *in vitro* des trypanosomes africains : Tobie, (1950) ; Cunningham, (1977) ; Fish et *al.* (1989) ; Hirumi et *al.*, (1991). Mais la transformation des formes sanguines en formes procycliques s'est montrée sensible à divers paramètres : présence de fer, de l'hème de l'hémoglobine, et aussi température. C'est pourquoi les procycliques sont produits *in vitro* à 27°C tandis que les métacycliques sont produits entre 34°C et 37°C (Hirumi et *al.*, 1991). Hunt, (1993) montre que le passage de 37°C à 27°C plus l'addition de cis-aconitate au milieu permettait d'obtenir un rendement nettement plus élevé de *T. brucei* après 72 heures. Plusieurs des milieux mis au point sont utilisables pour la culture de formes procycliques de *T. brucei*. Leur composition est surtout basée sur différents milieux de bases enrichis en composants du cycle de Krebs, en glutamine, proline, hémine. Mais *T. congolense* s'est avéré toujours fragile dans ces milieux. Hirumi, (1991) est parvenu à produire des métacycliques de *T. congolense* du stock IL-3000, stock faisant partie de notre échantillon, dans du milieu MEM (annexe 3) enrichi en acides aminés non essentiels. Hesse a publié en 1995 une nouvelle technique de culture *in vitro* de formes métacycliques de trypanosomes (Hesse et *al.*, 1995). Selon sa technique, il est possible de maintenir des trypanosomes en milieu axénique au moins 2 mois à condition de changer de milieu toutes les 6 à 48 heures. Ayant connaissance de tous les milieux préalablement

Variabilité génétique de *Trypanosoma congolense* : Implications taxonomiques et épidémiologiques énoncés, nous les avons testés soit individuellement soit en combinaison. Nous avons finalement trouvé que le milieu de Tobie (composition en annexe 2), contenant des éléments figurés du sang et riches en oligoéléments, plus le milieu de Cunningham (composition en annexe 1) qui est déjà bien adapté à la culture de *T. brucei* par sa richesse en composants du cycle de Krebs, en glutamine, proline et vitamines, convient parfaitement à nos stocks. *T. congolense* semble métaboliser beaucoup plus rapidement les constituants du milieu de culture que *T. brucei* et serait plus exigeant en minéraux, en dérivés de fer contenus dans l'hémoglobine. Tous nos stocks sont maintenant produits dans ce milieu mixte et se maintiennent en permanence avec un renouvellement du milieu toutes les 2 semaines.

II. SPECIFICITE DE CERTAINS CARACTERES ISOENZYMATIQUES CHEZ *T. CONGOLENSIS*

Par rapport à d'autres espèces de *Trypanosomatidae*, nous avons relevé certaines particularités chez *T. congolense*. Ainsi, il ne nous a pas été possible d'obtenir de révélation pour le système LAP, alors qu'il est très actif chez *T. brucei*. Soit ce système enzymatique n'existe pas chez *T. congolense*, soit, plus simplement, il ne se révèle pas dans nos conditions expérimentales. Toujours est-il qu'il peut être utilisé comme un véritable locus diagnostic, permettant de distinguer au premier coup *T. congolense* de *T. brucei*. Le second cas est la GDH : lorsque nous appliquons les conditions de révélation favorables à *T. cruzi*, nous n'observons rien, ni chez *T. congolense*, ni chez *T. brucei*. Enfin, les systèmes ME et NHi révèlent deux locus chez *T. brucei*, et un seul chez *T. congolense* (des zymogrammes illustratifs sont données dans les annexes 4 à 9).

III. LA SELECTION DES AMORCES RAPD

Sur 120 amorces testées, 75 ont donné des résultats satisfaisants. Nous en avons gardé 23 pour les analyses de routine, en les sélectionnant sur des critères de reproductibilité et de lisibilité. La composition moléculaire des amorces sélectionnées ne présente pas de spécificité. Leur pourcentage en CG étant de 60% ou 70% comme toutes les autres amorces. Seule la série F possède des sites de restriction comme indiqué dans le chapitre matériel et méthodes, page 39 ; mais dans cette série il n'y a pas moins ou plus de succès que dans les autres. Les meilleurs profils obtenus sont donnés dans les annexes 14 à 21 dont celui de l'amorce F16 de cette série F.

IV. SIGNIFICATION DES PROFILS ISOENZYMATIQUES HETEROZYGOTES

Comme dans les études antérieures (Gashumba, Baker & Godfrey, 1988), de nombreux profils hétérozygotes ont été mis en évidence avec les isoenzymes. Le système GPI est celui qui est le plus riche en aspects hétérozygotes typiques (voir annexe 4). Comme dans le cas des autres protozoaires parasites : *T. brucei* (Tait, 1980), *T. cruzi* (Tibayrenc, Cariou & Solignac, 1981), *Leishmania* spp. (Tibayrenc, Cariou & Solignac, op. cit., Maazoun *et al.*, 1981), l'explication qui vient naturellement à l'esprit est l'existence d'une structure diploïde. Il faut cependant garder à l'esprit que d'autres explications sont possibles pour rendre compte de tels aspects : duplication du gène concerné dans un génome haploïde, aneuploïde.

V. PROFILS RAPD "HYBRIDES"?

Nous avons observé dans certains cas des stocks possédant deux fragments amplifiés par une même amorce et dont l'un des fragments existe chez une population A et l'autre fragment chez une autre population B. Mais les stocks en question ne montrent pas de profils hétérozygotes en isoenzymes. On ne peut exclure que ces profils RAPD composites soient le signe de phénomènes d'hybridation, comme ceux qui ont été mis en évidence chez les *Leishmania* par la méthode des isoenzymes (Evans *et al.*, 1987 ; Baiñuls *et al.*, 1996). Cependant, une évolution mutationnelle simple peut engendrer de tels profils apparemment hybrides. Il se peut également que de tels profils traduisent tout simplement des mélanges de génotypes au sein d'un même stock, les stocks étudiés dans notre échantillon n'ayant pas été clonés. Dans ce cas de figure ce problème peut être résolu par clonage même si la culture *in vitro* de *T. congolense* se montre difficile à réaliser. François (1995) a montré que des mélanges de génotypes de *T. cruzi* pratiqués au laboratoire peuvent être détectés avec les RAPD alors qu'ils n'apparaissent pas avec les isoenzymes.

VI. APPORT EPIDEMIOLOGIQUE DES ISOENZYMES ET DES RAPD

Notre travail apporte une contribution majeure au niveau de l'identification multilocus (typage) des stocks de *T. congolense* : le polymorphisme révélé par les isoenzymes comme par les RAPD est considérable, puisqu'aucune paire de stocks n'a montré de profil identique, que ce soit par isoenzymes ou RAPD. Nous disposons donc d'un outil épidémiologique à

Variabilité génétique de *Trypanosoma congolense* : Implications taxonomiques et épidémiologiques haute résolution pour distinguer les stocks les uns des autres. Ceci pourra être appliqué aux études de terrain, pour le suivi des épidémies. Dans le cas de notre étude, le pouvoir discriminant des deux méthodes, isoenzymes et RAPD, est apparu comme égal, les deux méthodes identifiant autant de génotypes que de stocks (diversité génotypique = 1).

Au delà du typage par une batterie de marqueurs, notre étude a révélé l'existence de nombreux caractères synapomorphes (caractères dérivés spécifiques de clades, permettant de caractériser par exemple les trois groupes de *T. congolense* : Savannah, Kilifi et Forest. Ces différents marqueurs synapomorphes sont listés dans les tableaux 10a et 10b, pages 51 et 53. Ils pourront être intégrés dans des "clefs biochimiques" d'identification pour les groupes concernés. Par exemple, le système GPI révèle des allèles dont la migration est très différente entre les 3 groupes de *T. congolense*. Dans le cas des RAPD, cette démarche pourra être approfondie et affinée par séquençage des fragments impliqués. Cela pourrait permettre d'élaborer des sondes et des diagnostics PCR spécifiques des groupes incriminés.

Les résultats obtenus par l'analyse de l'ensemble de notre échantillon en isoenzymes et RAPD montrent que tous les stocks de *T. congolense* du Burkina appartiennent au groupe de savane sauf DINDERESSO/80/CRTA/3, qui se comporte comme un stock du groupe de forêt. La grande majorité de ces stocks provient de bovins à l'exception du stock de forêt, qui est isolé d'un chien. En complétant nos données avec celles de la bibliographie, nous observons que la prévalence du groupe de savane est plus élevée chez les bovins tandis que celle du groupe de forêt est plus importante chez le porc.

Par ailleurs, les données cliniques en notre possession ne permettent pas d'établir une corrélation entre les symptômes et les différents groupes.

Selon la répartition géographique des stocks, le groupe de savane est ubiquiste. Les stocks de forêt sont originaires d'Afrique de l'Ouest et ne sont pas retrouvés en Afrique de l'Est. Le groupe de kilifi est exclusivement localisé dans la région de kilifi au Kenya et occasionnellement rencontré en Ouganda..

VII. PHYLOGENIE ET TAXONOMIE DE *T. CONGOLENSE*

De l'analyse phylogénétique de notre échantillon, on peut tirer les enseignements majeurs suivants :

(i) l'ensemble des données corrobore l'existence de 3 groupes discrets au sein de l'ensemble identifié comme *T. congolense*. Ces 3 groupes sont étiquetés de façon spécifique par plusieurs caractères synapomorphes, tant en isoenzymes (tableau 10a) qu'en RAPD (tableau 10b). La robustesse de ces subdivisions phylogéniques est attestée par l'étude de bootstrap, mais également par la congruence remarquable entre les dendrogrammes basés sur les isoenzymes et les RAPD (figures 7, 9 et 11, pages 55, 57, 59). Cette congruence est vérifiée statistiquement par la corrélation mise en évidence par le test de Mantel pratiqué sur l'ensemble de notre échantillonnage ($p < 10^{-4}$). Nos résultats, basés sur un éventail étendu de marqueurs génétiques et sur une analyse phylogénétique approfondie, confirment les hypothèses de subdivision en trois groupes de *T. congolense*; hypothèses émises antérieurement par d'autres auteurs (Gashumba, Baker & Godfrey, 1988). Ces derniers avaient trouvé 3 sous-groupes au sein du groupe Savannah (Savannah d'Afrique de l'Est; Savannah d'Afrique de l'Est/Ouest; Savannah d'Ouganda) mais que le sous-groupe Savannah d'Afrique de l'Est/Ouest était génétiquement plus proche du groupe Forest que du groupe savannah d'Afrique de l'Est. Ces études avaient été faites sur la base de 6 systèmes enzymatiques. Avec plus de marqueurs génétiques nos résultats montrent que le groupe savannah constitue un ensemble beaucoup plus homogène subdivisé essentiellement en deux sous-groupes (Afrique de l'Est et Afrique de l'Ouest) et qui sont nettement plus proches entre eux qu'avec le groupe Forest et encore moins qu'avec le groupe Kilifi.

(ii) On ne peut affirmer, au vu de nos données, que l'ensemble *T. congolense* constitue un groupe monophylétique. Sur les dendrogrammes RAPD et isoenzymes + RAPD (figures 9 et 11, pages 57 et 59), l'ensemble *T. congolense* est à part, mais ne s'individualise pas nettement. Par ailleurs, sur le dendrogramme construit à partir des données isoenzymatiques seules (figure 7, page 55), l'ensemble *T. congolense* n'est pas individualisé. On peut souligner d'autre part que nous n'avons pu mettre en évidence de caractères synapomorphes pour l'ensemble *T. congolense*. Deux explications peuvent être avancées pour rendre compte de ces résultats : soit *T. congolense* est un taxon artificiel, un groupe polyphylétique ; soit, *T. congolense* est un groupe monophylétique mais ce résultat ne peut être mis en évidence par le fait que le pouvoir de résolution des isoenzymes et des RAPD est ici manifestement dépassé. En effet ces deux méthodes n'ont pas un niveau de résolution adapté pour l'étude de degrés de divergence phylogénique si élevés : du fait de leur horloge moléculaire trop rapide, leur

pouvoir de résolution est trop fort, ce qui fait que leur niveau de résolution maximum est saturé dans ce cas. Les branchements hiérarchiques supérieurs deviennent alors non significatifs. Il faudra, pour trancher la question, utiliser un marqueur d'évolution plus lente, tel que les gènes de l'ARN ribosomique. Ce dernier est une molécule composée de deux unités présentes dans toutes les espèces. Les deux unités de l'ARN ribosomique contiennent une alternance de régions extrêmement conservées qui peuvent servir à étudier les relations phylogénétiques les plus distantes, jusqu'au niveau de l'interrègne (Denamur, 1995 ; Maslov et al., 1996).

(iii) Les isoenzymes et les RAPD constituent des marqueurs polyvalents, utilisables quel que soit l'organisme à l'étude. Ils permettent donc dans une certaine mesure des comparaisons entre organismes différents (marqueurs "généralistes" : Tibayrenc, 1995). Notre étude RAPD ayant été développée en synergie étroite avec des projets portant sur d'autres parasites (*Leishmania* avec Anne-Laure Bañuls et *T. cruzi* avec Sylvain Brisse), les conditions techniques étant parfaitement homogènes, nous pouvons faire les inférences suivantes : d'un parasite à l'autre, pour un niveau de divergence phylogénique comparable, les habitudes de description taxonomique peuvent différer fortement. Pour les forts niveaux de divergence phylogénétique mis en évidence dans notre travail entre les 3 groupes de *T. congolense* (distances génétiques d'environ 0,95), les chercheurs travaillant sur *T. cruzi* n'ont pas cru bon de décrire plusieurs entités taxonomiques, alors que les spécialistes des *Leishmania* décrivent des entités taxonomiques de niveau très élevé avec nomenclature linnéenne binominale (complexes d'espèces).

VIII. MODE DE REPRODUCTION ET STRUCTURE DES POPULATIONS DE *T. CONGOLENSE*

Tant au niveau de l'espèce *T. congolense* dans son ensemble qu'au sein de chacune des subdivisions que nous avons sélectionnées, nous retrouvons dans la majorité des cas des niveaux de déséquilibre de liaison importants. Aucune des populations à l'étude ne peut donc être considérée comme panmictique, et le niveau de signification élevé retrouvé dans beaucoup de cas autorise à dire que les entraves au flux génique sont très fortes.

On peut considérer comme peu parcimonieuse l'hypothèse que les 3 groupes Savannah, Kilifi et Forest correspondent à des espèces cryptiques sexuées. En effet, le déséquilibre de liaison persiste quand les tests sont pratiqués séparément pour chacun de ces groupes.

Nos résultats soulignent un fait important sur la structure des populations des microorganismes : le pouvoir de résolution des tests, comme pour tout test statistique, est très dépendant de la richesse du sondage, non seulement au niveau du nombre d'individus, mais également, au niveau de la diversité génétique disponible. Ainsi, la population du Burkina Faso, si elle est analysée seulement avec les données isoenzymatiques, ne montre pas de déséquilibre de liaison apparent. Elle pourrait donc être considérée comme "panmictique". Cependant, ceci est démenti par les analyses faites sur les RAPD, et sur l'ensemble des données isoenzymes + RAPD. Il apparaît alors un déséquilibre de liaison très significatif, en dépit de la faible taille de l'échantillonnage. Ce risque d'erreur statistique de type II (c'est à dire ne pas pouvoir rejeter l'hypothèse nulle ne dit pas qu'elle est juste) a été souligné par Tibayrenc (1995).

Rien ne permet de suspecter dans nos résultats l'existence d'une clonalité de type "épidémique", c'est-à-dire l'existence de clones fugaces au sein d'une espèce fondamentalement sexuée. En effet, la caractéristique présentée comme spécifique de cette clonalité épidémique est la présence de génotypes répétés en grande abondance, avec disparition du déséquilibre de liaison quand ces génotypes ne sont comptés qu'une fois dans les test statistiques (Maynard Smith *et al.*, 1993). Une telle situation n'apparaît pas ici, puisqu'il y a autant de génotypes que d'individus, avec présence d'un fort déséquilibre de liaison.

L'hypothèse la plus parcimonieuse pour rendre compte de l'ensemble des résultats est donc de considérer que *T. congolense*, comme il avait été proposé antérieurement (Tibayrenc *et al.*, 1990), présente une structure clonale classique (clones pérennes dans l'espace et dans le temps). Une restriction s'impose cependant ; bien que l'échantillon du Burkina Faso répond à des conditions de sympatrie relativement satisfaisantes (superficie relativement réduite, brassage des parasites par mouvements de troupeaux importants), notre étude devra absolument être complétée par des échantillonnages pratiqués de façon plus rigoureuse, par exemple échantillonnage d'au moins 50 stocks pratiqué dans un seul village en quelques semaines. De plus, un tel sondage devra être répété dans différents pays, pour chacun des 3 groupes de *T. congolense*, Savannah, Kilifi et Forest. Ce n'est qu'après une telle étude que nous pourrions affirmer de façon parfaitement rigoureuse que les populations de *T. congolense* ont une structure typiquement clonale.

Comme il a été souvent souligné (Tibayrenc, 1995), ceci ne veut pas dire que les échanges génétiques sont absents chez ce parasite, mais seulement, que la propagation uniparentale est prépondérante chez lui. Mis à part l'intérêt d'une telle donnée pour notre

Variabilité génétique de *Trypanosoma congolense* : Implications taxonomiques et épidémiologiques
connaissance de la biologie fondamentale du parasite, les implications de la clonalité en termes de recherche appliquée méritent d'être rappelés ici :

(i) si *T. congolense* est clonal, ses génotypes se reproduisent à l'identique comme des "photocopies génétiques", les seules modifications possibles étant dues aux mutations, ou à des échanges génétiques rares. La stabilité de ces génotypes multilocus rend possible leur utilisation comme marqueurs épidémiologiques.

(ii) Du point de vue taxonomique (description des espèces), il est important de savoir si une espèce est sexuée ou clonale. En effet, dans ce dernier cas, le critère mixiologique (Mayr, 1940) ne s'applique pas. La description des espèces est alors une simple affaire de convenance.

(iii) Dans une espèce clonale, les clones, isolés génétiquement les uns des autres, tendent à accumuler toujours davantage de divergence génétique. Ceci implique logiquement les gènes codant pour des propriétés médicalement importantes comme la virulence ou la résistance aux drogues. Dans un tel modèle, on peut prévoir que statistiquement, les génotypes clonaux montrant le maximum de divergence génétique tendront également à avoir de fortes différences quant à leurs propriétés biologiques. C'est ce qui semble se passer chez *T. cruzi* (Laurent, 1994 ; Revollo, 1995).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre travail de thèse avait pour objet un parasite encore peu connu, bien que son importance économique en Afrique soit considérable. La somme de connaissances fondamentales dont nous disposons pour *Trypanosoma brucei*, agent de la maladie du sommeil, est sans commune mesure avec ce que nous savons de *T. congolense*. Ceci n'est pas seulement dû au fait que *T. brucei* est agent d'une maladie humaine très grave. Des raisons techniques peuvent également être inférées, en particulier la difficulté de cultiver *T. congolense in vitro*. Notre travail apporte un progrès dans ce sens, bien que ce parasite demeure moins aisément cultivable que d'autres trypanosomes ou des *Leishmania*.

Notre étude apporte un substrat phylogénétique solide aux trois groupes décrits antérieurement chez *T. congolense* : Savannah, Kilifi et Forest. Ces trois entités semblent bien correspondre à des clades distincts, identifiables par plusieurs marqueurs synapomorphes. Nous n'avons pas pu par contre apporter d'élément probant quant à la question du monophylétisme de *T. congolense*. Mais ceci est imputable au fait que la limite supérieure de résolution de nos marqueurs est atteinte. Ce cas de figure se retrouve chez d'autres espèces de protozoaires, car des diversités phylogénétiques intraspécifiques considérables semblent être très fréquentes chez les microorganismes, ce qui pose du reste la question de la définition de l'espèce en microbiologie. Chez *T. cruzi* également, la diversité phylogénétique intraspécifique est telle que ni les isoenzymes ni les RAPD ne permettent de l'appréhender de façon rigoureuse (Tibayrenc, Barnabé, Brisse, communications personnelles). Comme pour *T. congolense*, l'espoir de dépeindre une image plus rigoureuse de ces hiérarchies phylogénétiques de niveau élevé repose sur l'emploi de marqueurs à évolution plus lente. Ceci illustre le fait qu'il n'y a pas de "bons" et de "mauvais" marqueurs, mais plutôt, des marqueurs plus ou moins bien adaptés pour répondre à des questions données (Tibayrenc, 1995).

Notre étude est la plus documentée qui ait été publiée sur la question de la clonalité chez *T. congolense*, avec toutes les implications épidémiologiques et taxonomiques que nous avons soulignées. Nous proposons ici, avec prudence, l'hypothèse que ce parasite présente une structure clonale classique, telle que celle qu'on observe chez *T. cruzi*, les *Leishmania*, les *Giardia*, entre autres. Cependant, nous projetons de continuer cette étude par l'analyse d'échantillons conçus dès le départ pour aborder cette question, ce qui n'était pas le cas de la présente collection de stocks.

Les retombées immédiates de notre travail en termes de recherche appliquée concernent (i) le développement de méthodes de typage multilocus à haute résolution pour l'identification des stocks de *T. congolense* dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques ; (ii) l'identification de marqueurs spécifiques pour les groupes Savannah, Kilifi et Forest (caractères synapomorphes). Bien évidemment, une information taxonomique même négative, comme l'impossibilité d'affirmer le caractère monophylétique de *T. congolense*, est importante en termes de recherche appliquée.

Enfin, notre étude, menée de front et en étroite synergie avec des programmes portant sur d'autres parasites au sein de notre équipe d'accueil, illustre la valeur de l'approche comparative privilégiée actuellement par l'UMR 9926 : il est très informatif par exemple de montrer que les 3 groupes de *T. congolense* montrent autant de divergence phylogénétique que des taxons de rang aussi élevé que le sous-genre *Leishmania*. Le développement de cette approche comparative sur une grande échelle porte l'espoir de générer une génétique évolutive unifiée et consensuelle des microorganismes, et de codifier davantage ce champ de recherche qui s'est développé jusqu'à présent de manière excessivement cloisonnée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akol G. W. O. & Murray, M. (1986). Parasite kinetics and immune responses in efferent prefemoral lymph draining skin reactions induced by tsetse transmitted *Trypanosoma congolense*. *Veterinary Parasitology*, **19**, 281-293.
- Authié E. (1984). Mise en évidence d'une résistance aux trypanocides parmi des stocks de *Trypanosoma congolense* récemment isolées au Burkina Faso. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **37**, 219-235.
- Ayala F. J. (1993). *Trypanosoma* and *Leishmania* have clonal population structures of epidemiological significance. *Biology Research*, **26**, 47-63.
- Balfour A. (1906). Trypanosomiasis in the Anglo-Egyptian Sudan. *Report to wellcome Tropical Research Laboratory, Khartoum*, **2**, 113.
- Baltz T., Baltz D., Giroud C. & Crockett J. (1985). Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *EMBO Journal*, **4**, 5, 1273-1277.
- Bañuls A.L., Guerrini F., Le Pont F., Barrera C., Espinel, I., Guderian R., Echeverria R., & Tibayrenc M. (1996). Evidence for hybridization by Multilocus enzyme electrophoresis and Random amplified polymorphic DNA between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis/guyanensis* in Ecuador. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* (accepté).
- Ben Abderrazak S., Guerrini F., Mathieu-Daudé F., Truc P., Neubauer K., Lewicka K., Barnabé C. & Tibayrenc M. (1993). Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. *Methods in Molecular Biology*, **21**, 361-382.
- Boly H., Thombiano D., Humblot P. & Thibier M. (1991). Influence de *Trypanosoma congolense* sur la fonction sexuelle de taurins Baoulé. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **44**, 475-480.
- 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**, 117-131.
- Broden A. (1904). Les infections à trypanosomes au Congo chez l'homme et les animaux (communication préliminaire). *Bulletin de la Société d'Etudes Coloniales*, 116-139.
- Bruce D., Harvey D., Hamerton A. E., Davey J. & Bruce M. (1912). The morphology of *Trypanosoma simiae* sp. nov. *Proceedings of the Royal Society of London*, **B 85**, 477.
- Brunham R. C., Plummer F. A. & Stephens R. S. (1993). Bacterial antigenic variation, host immune response, and pathogen-host coevolution. *Infection and Immunity*, **61**, 2273-2276.
- Brunhes J., Cuisance D., Geoffroy B., Hervy H. P., & Lebbe J. (1994). Les Glossines ou mouches tsétsé. Identification assistée par ordinateur. Manuel d'utilisation. *Collections « Didactiques », ORSTOM, Paris*.
- 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**, 2445-2449.

Chicoteau P., Bassinga A., Sidibé I., Pobel T., Richard X. & Clausen P. (1990). Influence de l'exposition à un risque trypanosomien élevé sur la reproduction de vaches Baoulé au Burkina Faso. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **43**, 4, 473-477.

Cibulskis R. E. (1988). Origins and organisation of genetic diversity in natural populations of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, **96**, 000-000.

Clausen P. H., Sidibé I., Kaboré I. & Bauer B. (1992). Development of multiple drug resistance of *Trypanosoma congolense* in Zebu cattle under high natural tsetse fly challenge in the pastoral zone of Samorogouan, Burkina Faso. *Acta Tropica*, **51**, 229-236.

Clausen P. H., Sidibé I., Bassinga A., Richard X., Bauer B. & Pohlit H. (1993). Pathogenesis and pathology of African trypanosomiasis in Baoulé, N'Dama/Baoulé, cross bred and zebu cattle in Burkina Faso I. Clinical performance under high natural tsetse challenge. *Tropical Medicine and Parasitology*, **44**, 99-107.

Cunningham I. (1977). New culture medium for maintenance of tsetse tissues and growth of trypanosomatids. *Journal of Protozoology*, **24**, 325-329.

Denamur E. & Picard B. (1995). De la génétique des populations bactériennes à l'épidémiologie des maladies infectieuses. *médecine/sciences*, **11**, 1399-1406.

Duszenko M., Fergusson M. A. J., Lamont G. S., Rifkin M. R. & Cross G. A. M. (1985). Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms *in vitro*. *Journal of Experimental Medicine*, **162**, 1256-1263.

Dutton J. E. & Todd J. L. (1903). Glands puncture in trypanosomiasis compared with other methods of demonstrating the presence of parasites. *Fourth Interim Report, Expedition of the Liverpool School of Tropical Medicine to the Congo*, **20**, 387.

Duvallet G. (1987). Trypanosomoses humaine et animale en Afrique de l'Ouest. Recherches épidémiologiques et immunoparasitologiques. *Thèse de Doctorat, Université de Paris-Sud, Orsay*.

Emery D. L., Wells P. W. & Tenywa T. (1980). *Trypanosoma congolense*: specific transformation *in vitro* of leukocytes from infected or immunized cattle. *Experimental Parasitology*, **50**, 358-368.

Euzeby J. (1986). Protozoologie médicale comparée. Vol 1 : Généralités - Sarcocystidophores (flagellés, rhizopodes) - Ciliés. *Collections Fondations Marcel Mérieux*.

Fairlamb A. H., Weislogel P. O., Hoeijmakers J. H. J. & Borst P. (1978). Isolation and Characterization of kinetoplast DNA from bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Journal of cell Biology*, **76**, 293-309.

Fasogbon A. I., Knowles G. & Gardiner P. R. (1990). A comparison of the isoenzymes of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* isolates from East and West Africa. *International Journal for Parasitology*, **3**, 389-394.

Felsenstein J. (1978). The number of evolutionary trees. *Systematic Zoology*, **27**, 27-33.

- François C. (1995). Mélanges expérimentaux de clones naturels de *Trypanosoma cruzi* : cinétiques et détection par des marqueurs moléculaires. *Rapport de DEA, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier II*.
- Gardiner P. R., Pearson T. W., Clarke M. W. & Muthalia L. M. (1987). Identification and isolation of a variant surface glycoprotein from *Trypanosoma vivax*. *Science*, **235**, 774-777.
- Gardiner P. R. (1989). Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. *Advances in Parasitology*, **28**, 229-316.
- Garside L., Bailey M. & Gibson W. (1994). DNA content and molecular karyotype of trypanosomes of the subgenus *Nannomonas*. *Acta Tropica*, **57**, 21-28.
- Gashumba J. K., Gibson W. C. & Opiyo, E. A. (1986). A preliminary comparison of *Trypanosoma simiae* and *T. congolense* by isoenzyme electrophoresis. *Acta Tropica*, **43**, 15-19.
- Gashumba J. K., Baker R. D. & Godfrey D. G. (1988). *Trypanosoma congolense* : the distribution of enzymic variants in East and West Africa. *Parasitology*, **96**, 475-486.
- Gibson W. C., Mehlitz D., Lanham S. M. & Godfrey D. G. (1978). The identification of *Trypanosoma brucei gambiense* in Liberia pigs and dogs by isoenzymes and by resistance to human plasma. *Tropenmedizin und Parasitologie*, **29**, 175-246.
- Gibson W.C., Osinga K.A., Michels P.A.M. & Borst P. (1985). Trypanosomes of subgenus *Trypanozoon* are diploid for housekeeping genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **16**, 231-242.
- Gibson W. C. & Miles M. A. (1986). The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO Journal*, **5**, 6, 1299-1305.
- Gibson W. C., Dukes P. & Gashumba J. K. (1988). Species-specific DNA probes for the identification of African trypanosomes in tsetse flies. *Parasitology*, **97**, 1-11.
- Gibson W. C. (1989). Analysis of a genetic cross between *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitology*, **99**, 391-402.
- Godfrey D. G. & Kilgour V. (1976). Enzyme electrophoresis in characterizing the causative agent of Gambia trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of the Tropical Medicine and Hygiene*, **71**, 217-225.
- Godfrey D. G. (1978). Identification of economically important parasites. *Nature*, **273**, 5664, 600-604.
- Godfrey D. G., Baker R. D., Rickman L. R. & Mehlitz D. (1990). The distribution, relationships and identification of enzymic variants within the subgenus *Trypanozoon*. *Advances in Parasitology*, **29**, 1-73.
- Gottesdiener K., Garcia-Anoveros J., Lee M. G.-S. & van der Ploeg L. H. T. (1990). Chromosome organisation of the protozoan *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology*, **10**, 6079-6083.

- Harris, H. & Hopkinson, D. A. (1976) Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. *North-Holland Publishing Co. Amsterdam*.
- Hesse F., Selzer P. M., Mühlstädt K. & Duszenko M. (1995). A novel cultivation technique for long-term maintenance of bloodstream form trypanosomes *in vitro*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **70**, 157-166.
- Hirumi H. & Hirumi K. (1991). *In vitro* cultivation of *Trypanosoma congolense* bloodstream forms in the absence of feeder cell layers. *Parasitology*, **102**, 225-236.
- Hoare C. A. (1970). Systematic description of the mammalian trypanosomes in Africa. In: *Mullighan, H.W. ed. The African Trypanosomiases. London of Overseas Development*, 24-59.
- Hoare C. A. (1972). The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. *Blackwell Scientific Publications (ed.)*, Oxford and Edinburgh.
- Hunt M., Brun R. & Köhler P. (1994). Studies on compounds promoting the *in vitro* transformation of *Trypanosoma brucei* from bloodstream to procyclic forms. *Parasitology Research*, **80**, 600-606.
- Jaccard P. (1908). Nouvelles Recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise de Science Naturelle*, **44**, 223-270.
- Jenni L., Marti J., Schweizer J., Betschart B., Le Page R. W. F., Wells J. M., Tait A., Paindavoine P., Pays E. & Steinert M. (1986). Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature*, **322**, 173-175.
- Kaukas A., Gashumba J. K., Lanham S. M. & Dukes P. (1990). The substitution of procyclic form for bloodstream form *Trypanosoma brucei gambiense* in isoenzyme studies. *Transactions of the Royal Society of the Tropical Medicine and Hygiene*, **84**, 242-245.
- Kidane G., Hugues D. & Simpson L. (1984). Sequence heterogeneity and anomalous electrophoretic mobility of kinetoplast minicircle DNA in *Leishmania tarentolae*. *Gene*, **27**, 265-277.
- Knowles G., Betschart B., Kukla B. A., Scott J. R. & Majiwa P. A. O. (1988). Genetically discrete populations of *Trypanosoma congolense* from livestock on the Kenyan coast. *Parasitology*, **96**, 461-474.
- Kreutzer R. D. & Sousa O. E. (1981). Biochemical characterization of *Trypanosoma* spp. by isoenzyme electrophoresis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **30**, 308-317.
- Kreutzer R. D. & Christensen H. A. (1980). Characterization of *Leishmania* spp. by isoenzyme electrophoresis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **29**, 199-208.
- Kreutzer R. D., Semko M. E. & Hendricks L. D. (1983). Identification of *Leishmania* spp. by multiple isoenzyme analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **32**, 703-715.

- Kukla B. A., Majiwa P. A. O., Young J. R., Moloo S. K. & Ole-Moiyoi O. K. (1987). Use of specific DNA probes for detection and identification of trypanosome infection in tsetse flies. *Parasitology*, **95**, 1-16.
- Lanham S. M., Grendon J. M., Miles M. A., Pova M. M. & De Souza A. A. A. (1981). A comparison of electrophoretic methods for isoenzyme characterization of trypanosomatids. I: standard stocks of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from northeast Brazil. *Transactions of the Royal Society of the Tropical Medicine and Hygiene*, **75**, 5, 742-750.
- Lanotte G., Rioux J. A. & Serres E. (1986). Approche cladistique du genre *Leishmania* (Ross, 1903). A propos de 192 stocks originaires de l'Ancien Monde. In: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Rioux, J.A., Ed IMEEE, Montpellier, 269-288.
- Laveran A. (1902). Sur un nouveau trypanosome des bovidés. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **134**, 512.
- Le Ray D. (1975). Structure antigénique de *Trypanosoma brucei* (Protozoa, Kinetoplastida). Analyse électrophorétique et étude comparative. *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, **55**, 129-311.
- Lorenzini E., Scott J. R., Paling R. W. & Jordt T. (1988). The effects of *Trypanosoma congolense* infection on the reproductive cycle of N'Dama and Boran heifers. In: the african trypanotolerant livestock network. Livestock production in tsetse affected areas of Africa. ILCA/ILRAD eds., Nairobi, Kenya.
- Luckins A. G. (1977). Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Tropical Animal Health and Production*, **9**, 53-62.
- MacKenzie P. K. I., Boyt W. P., Nesham V. W. & Pirie E. (1978). The aetiology and significance of the phagocytosis of erythrocytes and leukocytes in sheep infected with *Trypanosoma congolense*. *Research in Veterinary Science*, **24**, 4-7.
- Majiwa P. A. O., Masake R. A., Nantulya V. M., Hamers R. & Mathyssens G. (1985). *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*: identification of two karyotype groups. *Embo Journal*, **4**, 12, 3307-3315.
- Majiwa P. A. O., Hamers R., van Meirvenne N. & Mathyssens G. (1986). Evidence for genetic diversity in *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*. *Parasitology*, **93**, 291-304.
- Majiwa P. A. O. & Webster P. (1987). A repetitive deoxyribonucleic acid sequence distinguishes *T. simiae* from *T. congolense*. *Parasitology*, **95**, 543-598.
- Majiwa P. A. O. & Otieno L. H. (1990). Recombinant DNA probes reveal simultaneous infection of tsetse flies with different trypanosome species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **40**, 245-254.
- Majiwa P. A. O., Maina M., Waitumbi J. N., Mihok S. & Zwegarth E. (1993). *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*: molecular characterization of a new genotype from Tsavo, Kenya. *Parasitology*, **106**, 151-162.

- Mantel N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209-220.
- Masake R. A. (1980). The pathogenesis of infection with *Trypanosoma vivax* in goats and cattle. *Veterinary record*, **107**, 551-557.
- Masake R. A., Nyambati V. M., Nantulya V. M., Majiwa P. A. O., Moloo S. K. & Musoke A. J. (1988). The chromosome profiles of *Trypanosoma congolense* isolates from Kilifi, Kenya and their relationship to serodeme identity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **30**, 105-112.
- 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.
- Masiga D. K., McNamara J. J. & Gibson W. C. (1996). A repetitive DNA sequence specific for *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi*. *Veterinary Parasitology*, **62**, 27-33.
- Maslov D. A., Avila H. A., Lake J. A. & Simpson L. (1994). Evolution of RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Nature*, **368**, 345-348.
- Maslov D. A., Lukes, J., Jirku M. & Simpson L. (1996). Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **75**, 197-205.
- Mathieu-Daudé F. (1991). Mode de reproduction de *Trypanosoma brucei* dans ses populations naturelles : implications taxonomiques et épidémiologiques. Thèse de doctorat. *Université, Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc*.
- Maynard Smith J., Smith N. H., O'Rourke M., Spratt B. G. (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 4384-4388.
- McNamara J. J., Dukes P., Snow W. F. & Gibson W. C. (1989). Use of DNA to identify *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma simiae* in tsetse flies from the Gambia. *Acta Tropica*, **46**, 55-61.
- McNamara J. J. & Snow W. F. (1991). Improved identification of *Nannomonas* infections in tsetse flies from The Gambia. *Acta tropica*, **48**, 127-136.
- McNamara, J. J., Mohammed, G. & Gibson W. C. (1994). *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi* sp. nov. from tsetse flies in the Gambia: biological and biochemical characterisation. *Parasitology*, **109**, 497-509.
- Mehlitz D. (1986). Le réservoir animal de la maladie du sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense*. *Etude et Synthèse de l'I.E.M.V.T.*, **18**.
- Michels P. A. M., Hannaert V., Ernest I. & Allert S. (1991). Organisation, structure and evolutionary aspects of genes in trypanosomes. *Biochemical Society Transactions*, **18**, 727-729.

- Molyneux D. H. & Ashford R.W.(1983). The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania* parasites of man and domestic animals. *Taylor and Francis, Ed (London)*.
- Murray M., Morrison W. I. & Whitelaw D. D. (1982). Host susceptibility to African trypanosomiasis: Trypanotolerance. *Advances in Parasitology*, **21**, 1-68.
- Nantulya V. M., Doua F. & Molisho S. (1992). Diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness using an antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay. *Transactions of the Royal Society of the Tropical Medicine and Hygiene*, **86**, 42-45.
- Ntambi J. & Englund P. (1985). A gap of unique location in newly replicated kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma equiperdum*. *Journal of Biological Chemistry*, **260**, 5574-5579.
- Nyeko J. H. P., Ole-Moiyoi O. K., Majiwa P. A. O., Otieno L. H. & Ociba P. M. (1990). Characterisation of trypanosomes isolates from cattle in Uganda by species-specific DNA probes reveals predominance of mixed infections. *Insect Science Applied*, **11**, 3, 271-280.
- Nzila Mouanda A. (1995). Détection et identification des trypanosomes africains par les techniques d'hybridation moléculaire et d'amplification génique (PCR). *Thèse de Doctorat, Université Montpellier II*.
- Paindavoine P., Pays E., Laurent M., Geltmeyer Y., Le Ray D., Mehlitz D. & Steinert M. (1986). The use of DNA hybridization and numerical taxonomy in determining relationships between *Trypanosoma brucei* stocks and subspecies. *Parasitology*, **92**, 31-50.
- Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J. & Davidian B. (1987). Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. *TEC et DOC (Lavoisier), Paris*, pp 217.
- Pinder M. (1984). *Trypanosoma congolense*: genetic control of resistance to infection in mice. *Experimental Parasitology*, **57**, 185-194.
- Plimmer H. G. & Bradford J. R. (1899). A preliminary note on the morphology and the distribution of the organism found in the tsetse fly disease. *Proceedings of the Royal Society of London*, **B 65**, 274.
- Pollard V. M., Rohrer S. P., Michelotti E. F., Hancock K. & Hadjuk S. L. (1990). Organisation of minicircle genes for guide RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Cell*, **63**, 783-790.
- Pollard V. M. & Hadjuk S. L. (1991). *Trypanosoma equiperdum* minicircles encode three distinct primary transcripts which exhibit guide RNA characteristics. *Molecular and Cellular Biology*, **9**, 1365-1367.
- Rawlings P., Dwinger R. H. & Snow W. F. (1991). An analysis of survey measurements of tsetse challenge to trypanotolerant cattle in relation to aspects of analytical models of trypanosomiasis. *Parasitology*, **102**, 371-377.
- Richardson B. J., Baverstock P. R. & Adams M. (1986). Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematics and population studies. *Academic Press Australia (Harcourt Brace Jovanovich, Publishers)*, pp 410.

- Rovis L., Barbet A. F. & Williams R. O. (1978). Characterisation of the surface coat of *Trypanosoma congolense*. *Nature*, **271**, 654-656.
- Rowlands G. J., Woudyalew M., Authié E., d'Iteren G. D. M., Leak S. J. & Nagda S. M. (1993). Epidemiology of cattle trypanosomiasis in the Ghibe Valley, Southwest Ethiopia. 4. Effects of trypanosomiasis and others factors on liveweight and mortality from birth to three years of age. *Preventive Veterinary Medicine*,
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1992). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Harbor, Ny*, 388.
- Sekoni V. O. (1990). Effect of Novidium (homidium chloride) chemotherapy on genitals lesions induced by *Trypanosoma vivax* and *trypanosoma congolense* infections in zebu bulls. *British Veterinary Journal*, **146**, 181-185.
- Selander R. K. & Levin B. R. (1980). Gene diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Sciences*, **210**, 545-547.
- Shaw J. J., Lainson R. & Fraiha H. (1969). Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autoctones de doença de Chagas registrados em Belem, Para, Brasil. *Rev. Saude Publica*, **3**, 153-157.
- Simpson L. (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa : genomic organization, transcription, replication and evolution. *Ann. Rev. Microbiol.*, **41**, 363-382.
- Stephen L. E. (1986). Observations on the resistance of West African N'Dama and Zebu cattle to trypanosomiasis following challenge by wild *Glossina morsitans* from an early age. *1966*, **60**, 230-246.
- Sternberg J., Turner M. C., Wells J. M., Randford-Cartwright L. C., Le Page R. W. F. & Tait A. (1989). Gene exchange in African trypanosomes: frequency and allelic segregation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **34**, 269-280.
- Stevens J. R., Mathieu-Daudé F., McNamara J. J., Mizen V. H. & Nzila A. (1994). Mixed populations of *Trypanosoma brucei* in wild *Glossina palpalis palpalis*. *Tropical Medicine and Parasitology*, **45**, 4, 313-318.
- Stevens J. R. & Tibayrenc M. (1995). Detection of linkage disequilibrium in *Trypanosoma brucei* isolated from tsetse flies and characterized by RAPD analysis and isoenzymes. *Parasitology*, **110**, 181-186.
- Stuart K. (1979). Kinetoplast DNA of *Trypanosoma brucei*: Physical map of maxicerle. *Plasmid*, **2**, 520-528.
- Stuart K. (1991). RNA Editing in Trypanosomatid mitochondria. *Ann. Rev. Microbiol.*, **45**, 327-344.
- 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**, 253-264.

- Tait A. (1980). Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. *Nature*, **287**, 536-538.
- Tait A. (1983). Sexual processes in the kinetoplastida. *Parasitology*, **86**, 29-57.
- Tait A., Barry J. D., Wink R., Sanderson A. & Crowe J. S. (1985). Enzyme variation in *T. brucei* spp. II. Evidence for *T. b. rhodesiense* being a set of variants of *T. b. brucei*. *Parasitology*, **90**, 89-100.
- Tibayrenc M. (1979). Les isoenzymes et l'entomologie médicale. *Cahier de l' O.R.S.T.O.M., série Entomologie médicale et Parasitologie*, **XVII**, 4, 249-256.
- Tibayrenc M. (1985). On the microdistribution and sexuality of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of the Tropical Medicine and Hygiene*, **79**, 882-883.
- Tibayrenc M., Ward P., Moya A. & Ayala F. J. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**, 115-119.
- Tibayrenc M. & Ayala F. J. (1988). Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution*, **42**, 277-292.
- Tibayrenc M., Neubauer K., Barnabé C., Guerrini F., Skarecky D. & Ayala F. J. (1990). Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 1335-1339.
- Tibayrenc M., Kjellberg F. & Ayala F. J. (1991). The clonal theory of parasitic protozoa. *BioScience*, **41**, 11, 767-774.
- Tibayrenc M. (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advances in Parasitology* **36**, 48-115.
- Tibayrenc M., Cariou M.L., & Soullignac M. (1981). Interprétation génétique des zymogrammes de flagellés des genres *Trypanosoma* et *Leishmania*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **292**, 623-625.
- Tobie E. J., Von Brandt T. & Mehlman B. (1950). Cultural and physiological observations on *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *Journal of Parasitology*, **36**, 48-54.
- Touré S. M., Gueye A. & Seye M. (1978). Expérience de pathologie comparée entre des bovins zébus et N'Dama soumis à l'infection naturelle par des trypanosomes pathogènes. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **31**, 293-313.
- Trail J. C. M., d'Ieteren G. D. M., Féron A., Kakiese O., Mulungo M. & Pelo M. (1991). Effect of trypanosome infection, control of parasitemia and control of anemia development on productivity of N'Dama cattle. *Acta Tropica*, **48**, 37-45.
- Truc P., Mathieu-Daudé 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.

- Van de Zande L. & Bijlsma R. (1995). Limitations of the RAPD technique in phylogeny reconstruction in *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology*, **8**, 645-656.
- Van der Ploeg L. H. T., Liu A. Y. C. & Borst P. (1984). Structure of the growing telomeres of Trypanosomes. *Cell*, **36**, 459-468.
- Vickerman K. L., & Luckins A. G. (1969). Localization of variable antigens on the surface coat of *Trypanosoma brucei* using ferritin-conjugated antibody. *Nature*, **224**, 1125-1126.
- Vickerman K. & Preston, T. M. (1970). Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *Journal of Cell Sciences*, **6**, 365-383.
- Vickerman, K. (1978). Antigenic variation in trypanosomes. *Nature*, **224**, 613-617.
- Vos G. J. & Gardiner P. R. (1990). Antigenic relatedness of stocks and clones of *Trypanosoma vivax* from East and West Africa. *Parasitology*, **100**, 101-106.
- Wagner W. H. (1961). Problems in the classification of ferns. In: recent advances in botany. *University Toronto Press, Montréal*, 841-844.
- Wellde B. T., Reardon M. J. & Chumo D. A. (1989). Cerebral trypanosomiasis in naturally infected cattle in the lambwe Valley, South Nyanza, Kenya. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **83**, suppl. 1, 151-160.
- 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**, 103-116.
- Welsh J. & McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**, 24, 7213-7218.
- Welsh J., Honeycutt R. J., McClelland M. & Sobral B. W. S. (1991). Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theoretical and Applied Genetics*, **82**, 473-476.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A. & Tingey S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**, 22, 6531-6535.
- Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski J. A. & Tingey V. S. (1991). Genetic analysis with RAPD markers. In J.W. Bennett and L. L. Lasure eds. *Academic press, San Diego*, 433-439.
- Williams J. G., Reiter R. S., Young R. M. & Scolnik P. A. (1993). Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. *Nucleic Acids Research*, **21**, 2697-2702.
- Wilson A. J. (1969). Value of the indirect fluorescent antibody test as a serological aid to diagnosis of *Glossina* transmitted bovine trypanosomiasis. *Tropical Animal Health and Production*, **1**, 89-95.

Young C. J. & Godfrey D. G. (1983). Enzyme polymorphism and the distribution of *Trypanosoma congolense* isolates. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **77**, 5, 467-481.

Ziemann H. (1905). Beitrag zur Trypanosomenfrage. *Cbl. Bakt. (I. Abt.)*, **38**, 307-429.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition du milieu de culture de Cunningham

	g/l	g/2l	g/4l	g/5l
Sels inorganiques				
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,15	0,3	0,6	0,75
KCl	2,98	5,96	11,92	14,9
MgCl ₂ .6H ₂ O	3,04	6,08	12,16	15,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7	7,4	14,8	18,5
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,53	1,06	2,12	2,65
Acides organiques				
Acide a-ketoglutaric	0,37	0,74	1,48	1,85
Acide fumarique	0,06	0,11	0,22	0,28
Acide malique	0,17	0,34	0,68	0,85
Acide succinique	0,6	1,2	2,4	3
Sucres				
D-glucose	0,7	1,4	2,8	3,5
Fructose	0,4	0,8	1,6	2
Sucrose	0,4	0,8	1,6	2
Divers composants				
Hepes	4,77	9,54	19,08	23,85
rouge phénol	0,02	0,04	0,08	0,1
Vitamine (BME*100)	2 ml	4 ml	8 ml	10 ml
Acides aminés				
Alanine	2	4	8	10
DL-Alanine	1,09	2,18	4,36	5,45
DL-Isoleucine	0,9	1,8	3,6	4,5
DL-Methionine	0,2	0,4	0,8	1
DL-Sérine	à 2	0,4	0,8	1
DL-Thréonine	0,1	0,2	0,4	0,5
DL-Valine	0,21	0,42	0,84	1,05
Glycine	0,12	0,24	0,48	0,6
L-Arginine (HCl)	0,44	0,88	1,76	2,2
L-Asparagine	0,24	0,48	0,96	1,2
L-aspartic acid	0,11	0,22	0,44	0,55
L-Cystéine	0,8	1,6	3,2	4
L-Cystine	0,3	0,6	1,2	1,5
L-glutamic acid	0,25	0,5	1	1,25
L-Glutamine	1,64	3,28	6,56	8,2
L-Histidine (HCl)	0,16	0,32	0,64	0,8
L-Leucine	0,9	1,8	3,6	4,5
L-Lysine (HCl)	0,15	0,3	0,6	0,75
L-Phénylalanine	0,2	0,4	0,8	1
L-Proline	6,9	13,8	27,6	34,5
L-Taurine	0,27	0,54	1,08	1,35
L-Tryptophane	0,1	0,2	0,4	0,5
L-Tyrosine	0,2	0,4	0,8	1

Les lots de produits sont dissous séparément dans de l'eau distillée puis le pH du mélange final est ajusté à 7,4.
Le milieu liquide est ensuite filtré à 0,22 µm puis conservé à -20°C.

Annexe 2 : Milieu de culture de Tobie

Ingrédients :

Eau distillée	1000 ml
Bacto-Tryptose (Difco)	15,0 g
NaCl	4,0 g
Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O	5,0 g
KCl	0,4 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g

Préparation :

1. Dissoudre les ingrédients sur une plaque chauffante en agitant avec un barreau aimante
2. Ajuster le pH à 7,6 avec du HCl ou du NaOH 1N
3. Distribuer la solution par volume de 80 ml dans des bouteilles à bouchon vissable
4. Autoclaver à 120° C pendant 20 minutes minimum et conserver à 4° C
5. Pour utilisation, relouer la solution en la chauffant à 56° C pendant environ 30 minutes
6. Ajouter sous une hotte 20 ml (20%) de sang de lapin aseptique prélevé sur anticoagulant (héparine ou citrate de sodium)
7. Mélanger le gel d'agar et le sang et distribuer 2 ml dans des tubes en verre de 10*100 mm.
8. Incuber à 37° C pendant 24 heures pour vérifier la stérilité

NB : Utiliser des bouteilles pour la culture de masse :

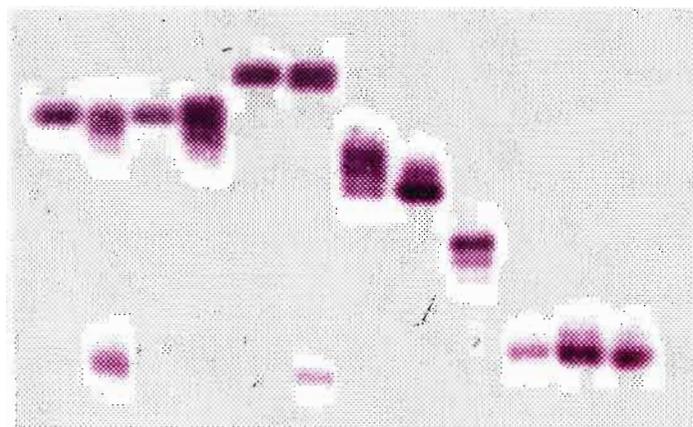
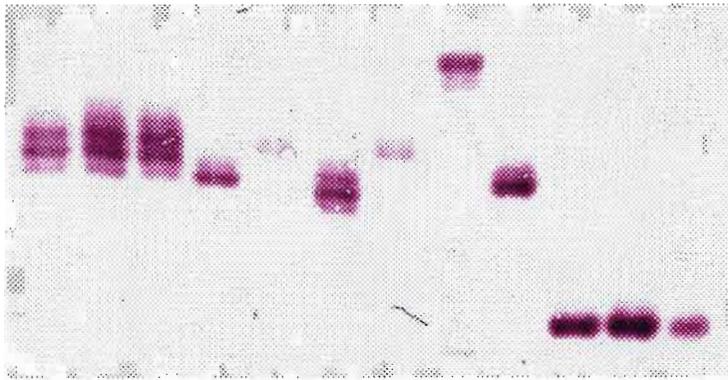
- bouteille de 100 ml : utiliser 5 ml de mélange sang (20%) + gel d'agar (80%)
- bouteille de 250 ml : utiliser 10 ml de mélange sang (20%) + gel d'agar (80%)

Annexe 3 : Milieu MEM modifié pour culture de procycliques de *T. congolense*

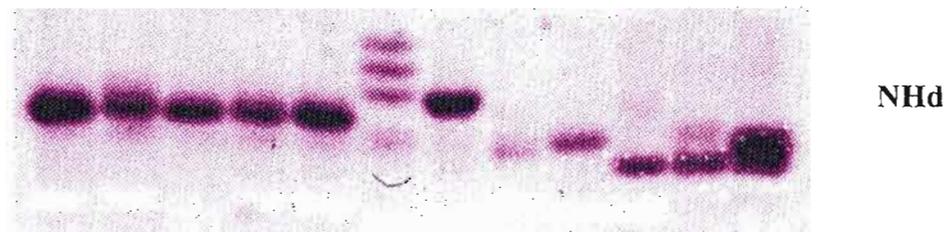
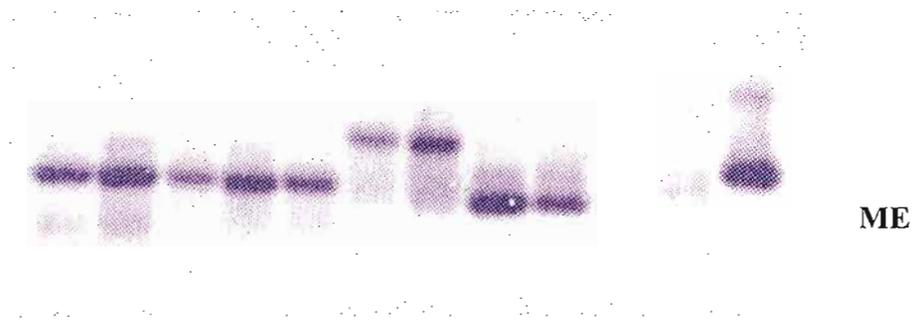
MEM de base Réf. 32360 (Life Technologies)
+ 20% sérum de veau foetal
+ 1% Acides aminés non-essentiels Réf. 11140-035 (Life Technologies)
+ 1% L-Glutamine à 100µM
+ 60 mM Proline
+ 3, 25 µg Hémine (qsp 500 ml final)

NB : le milieu est filtré à 0,22 µm puis la stérilité est contrôlée à 37° C. La solution finale prête à l'emploi est conservable un mois.

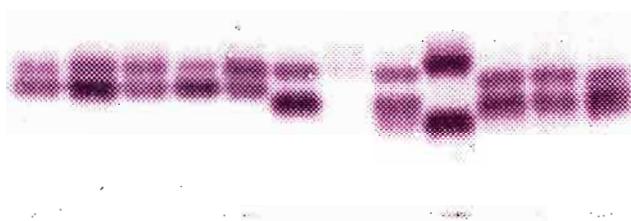
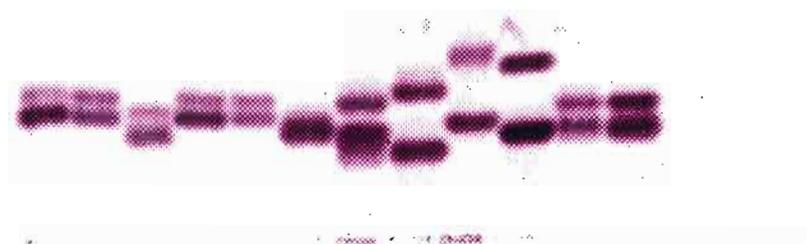
Annexe 4 : **zymogramme obtenu avec le Glucose-phosphate isomerase (GPI)**
(enzyme ayant montré le plus grand nombre d'hétérozygotes au sein de *T. congolense*)



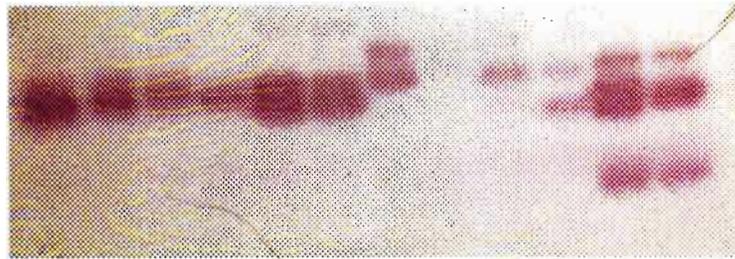
Annexe 5 : zymogrammes obtenus avec l'enzyme malique (ME) et la Nucleoside hydrolase deoxyinosine (NHd)



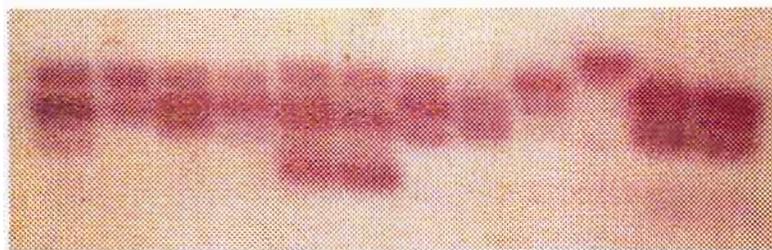
Annexe 6 : zymogramme obtenu avec la Malate deshydrogenase (MDH)



Annexe 7 : zymogrammes obtenus avec les peptidases



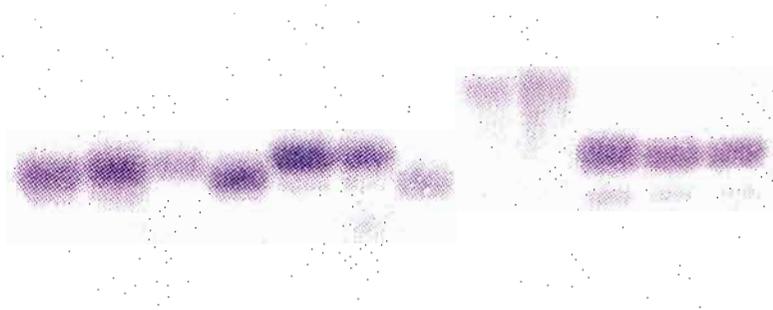
PEP 1



PEP 2

La PEP 1 est souvent révélée sur la plaque de la PEP 2 parce que le substrat de révélation de la PEP 2 est composé de leucine d'alanine (Leu-ala)

Annexe 8 : zymogrammes obtenus avec l'Uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase (UGPP) et le Glutathione reductase (GSR)



UGPP



GSR

**Annexe 9 : zymogrammes obtenus avec la Threonine
deshydrogénase (TDH) et la Phosphoglucomutase
(PGM)**

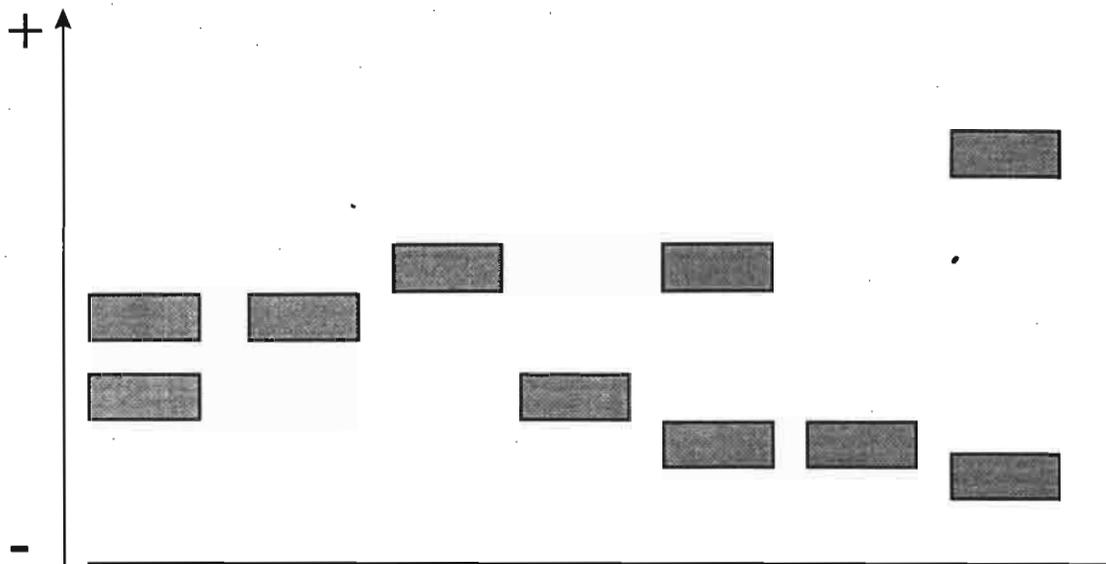


TDH

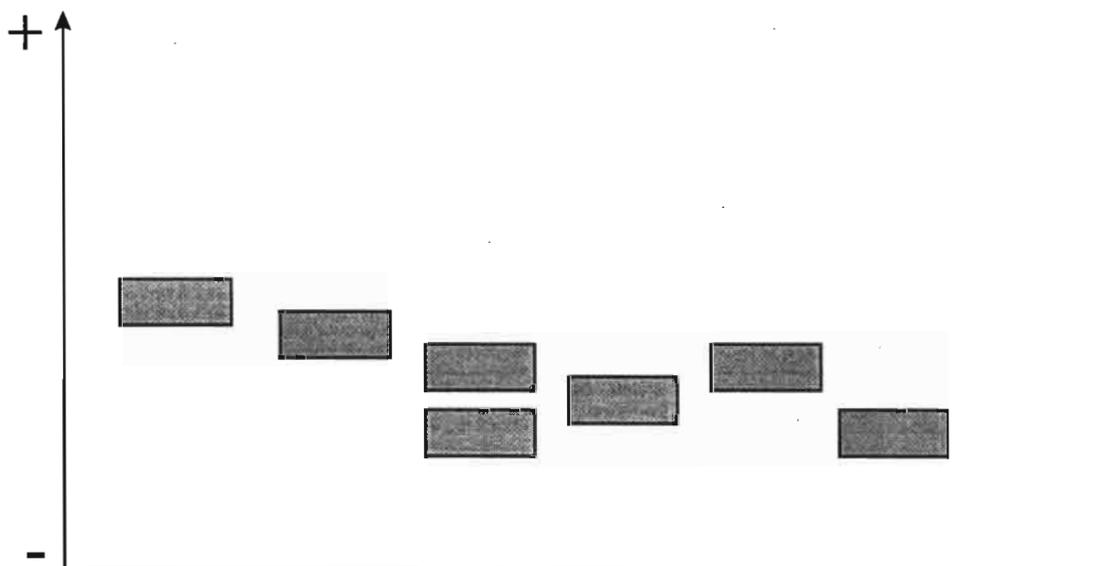


PGM

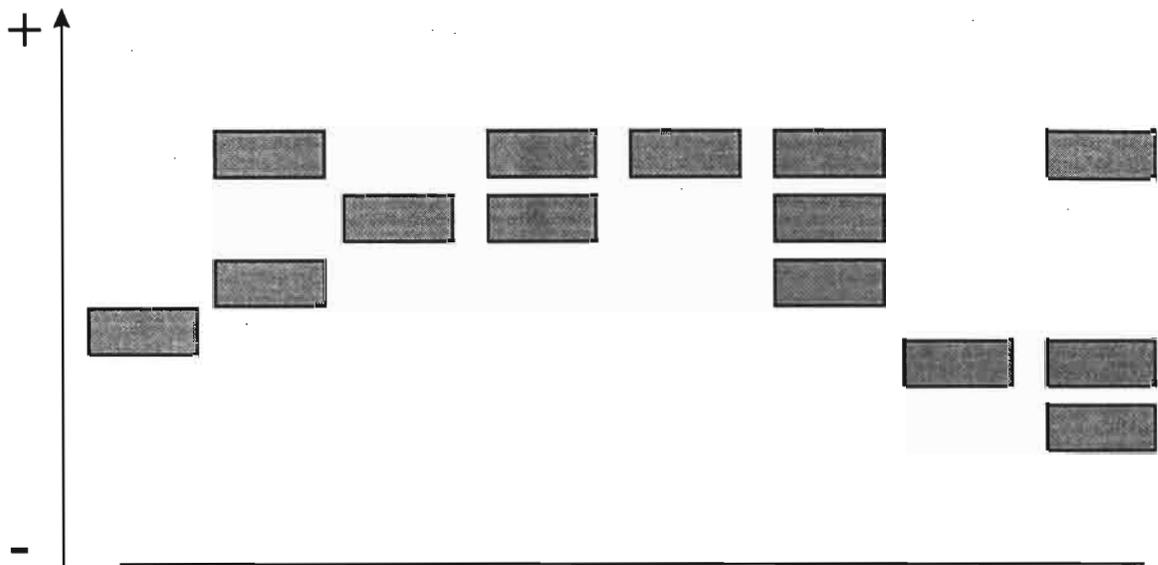
Annexe 10a : zymogramme obtenu pour la Nucleoside hydrolase inosine (NHi)



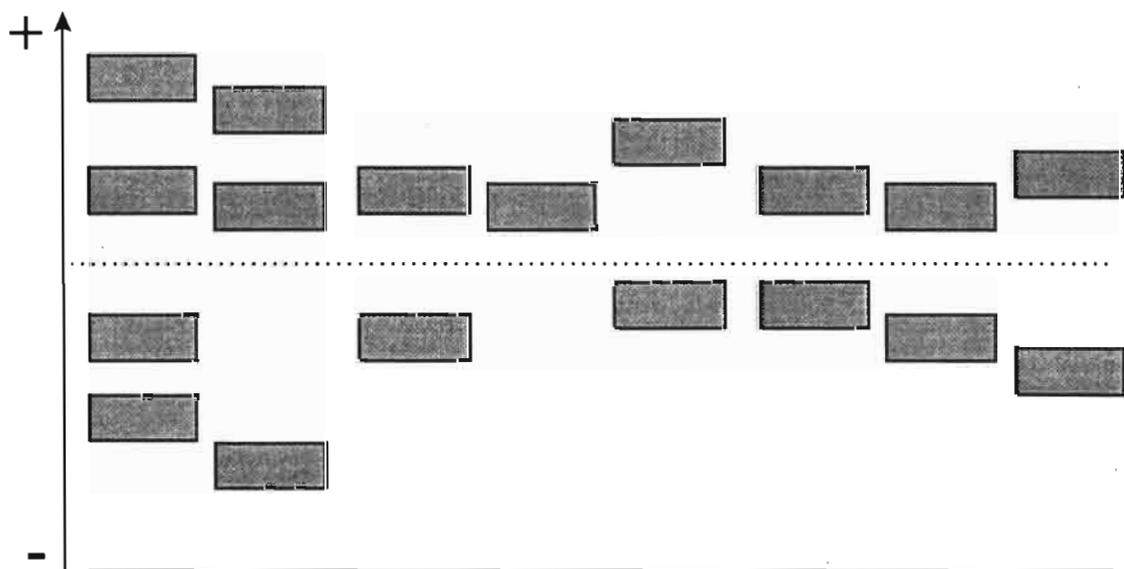
Annexe 10b : zymogramme obtenu pour l'Aspartate aminotransferase (GOT)



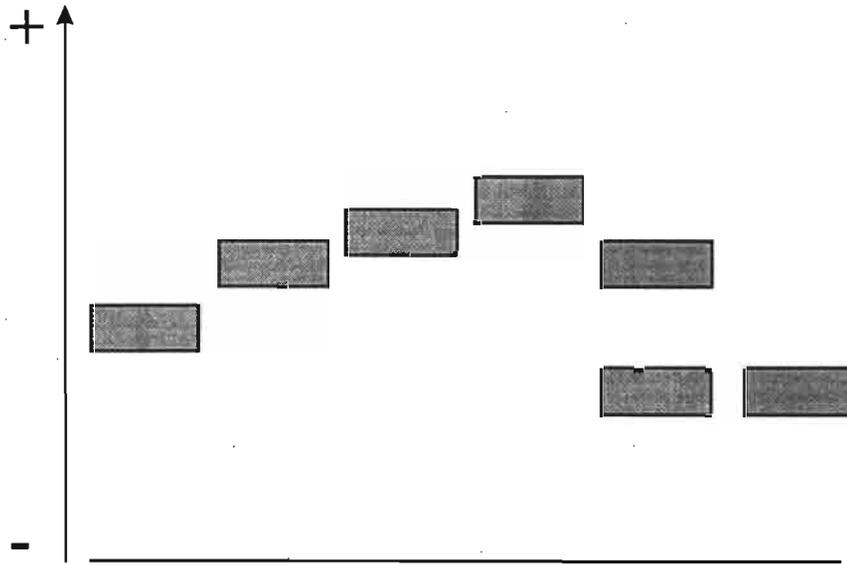
**Annexe 11a : zymogramme obtenu pour le
Glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase (GAPD)**



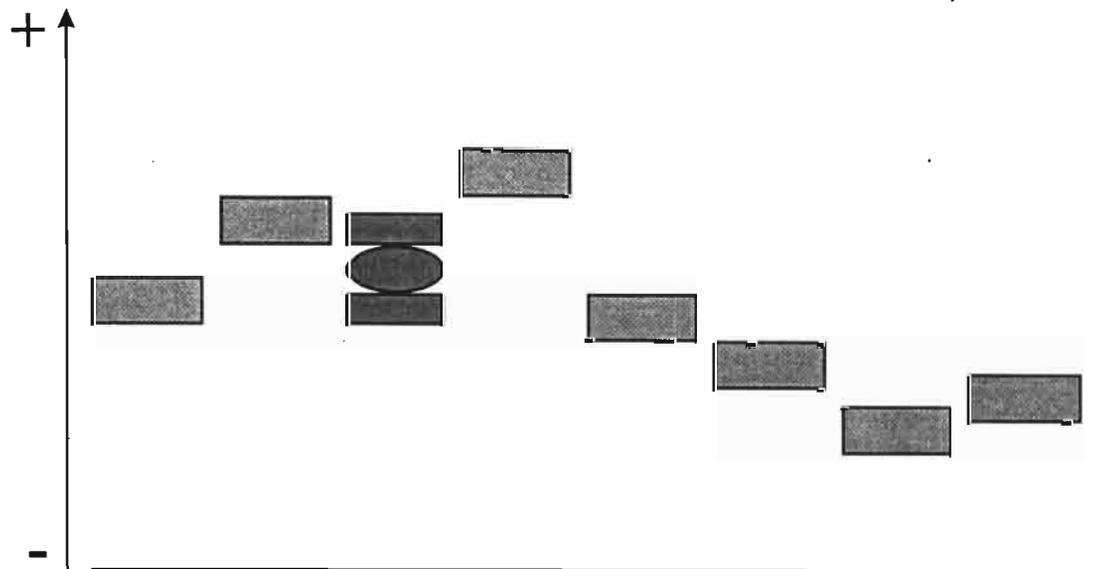
**Annexe 11b : zymogramme obtenu pour la Superoxyde
dismutase (SOD)**



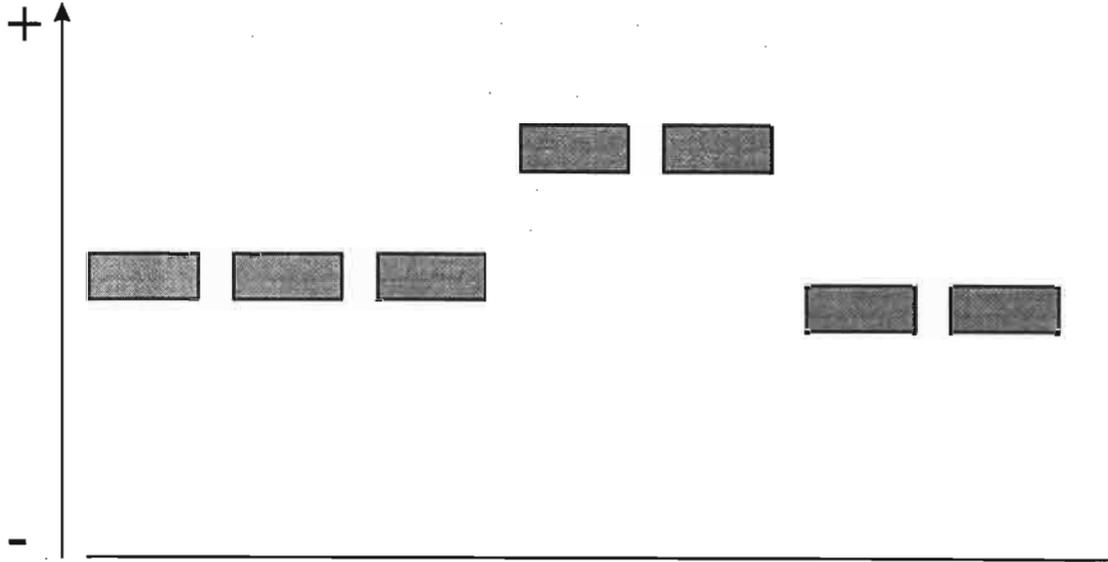
Annexe 12a : zymogramme obtenu pour le Glucose 6-phosphate deshydrogenase (G6PDH)



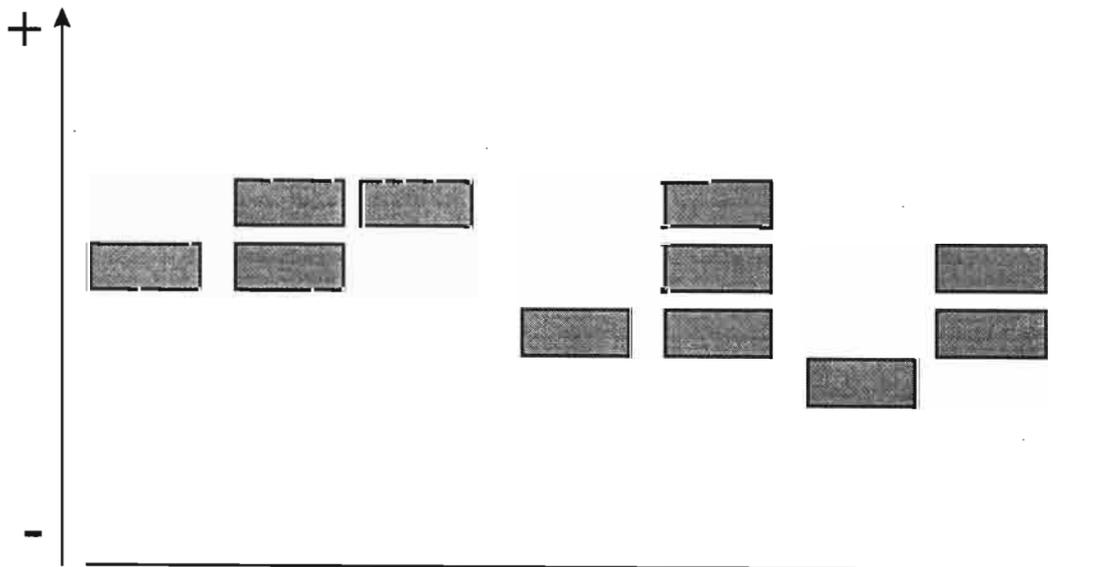
Annexe 12b : zymogramme obtenu pour la 6-Phosphogluconate deshydrogenase (6PGDH)



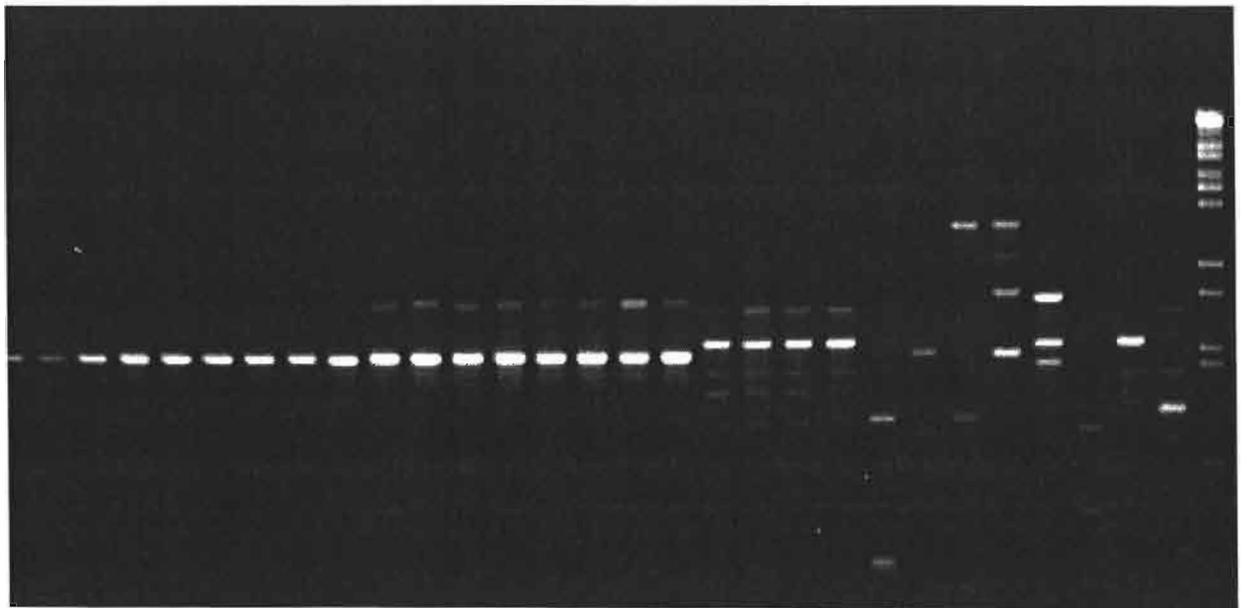
Annexe 13a : zymogramme obtenu pour l'Alanine aminotransferase (ALAT)



Annexe 13b : zymogramme obtenu pour l'Isocitrate dehydrogenase (IDH)



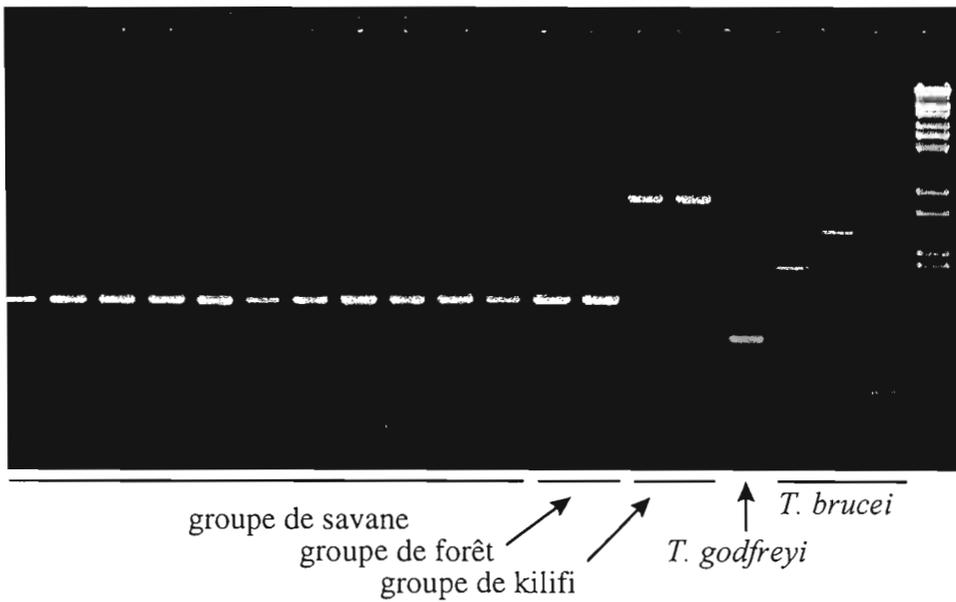
Annexe 14 : profils d'amplification obtenus avec l'amorce U 11. On observe une bande de forte intensité spécifique du groupe de savane au sein de *T. congolense*.



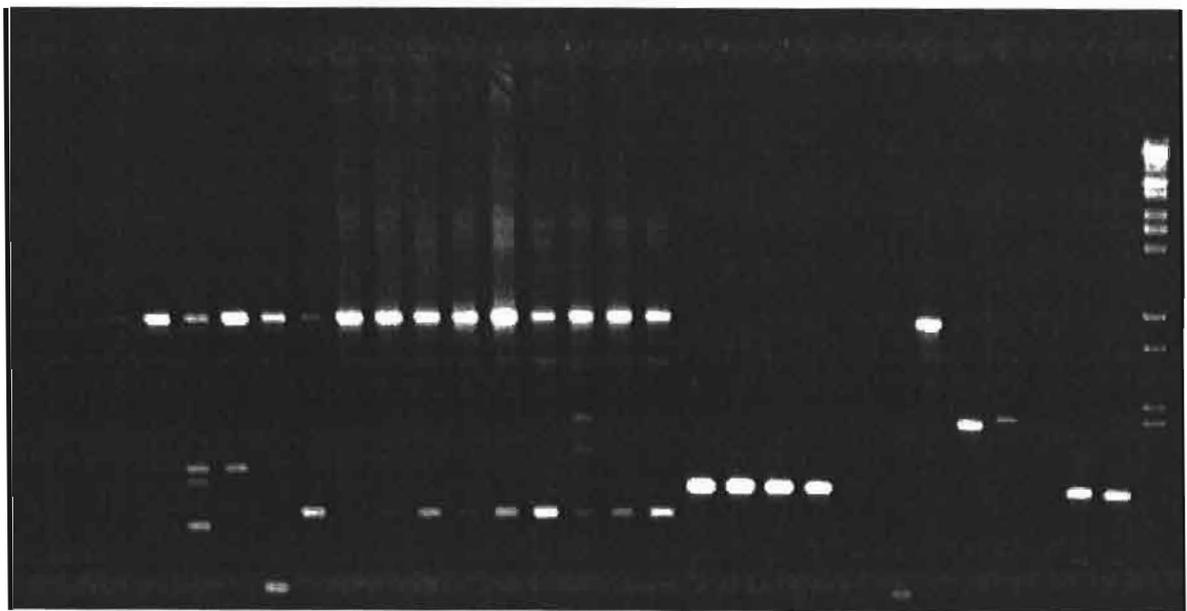
groupe de savane

T. brucei
groupe de forêt
groupe de kilifi
T. simiae
T. godfreyi
T. brucei

Annexe 15 : Profil d'amplification montrant une très forte bande conservée entre les groupes de savane et de forêt au sein de *T. congolense* (amorce N7)



Annexe 16 : Peu d'amorces de la série F ont montré des profils intéressants chez *T. congolense*; cependant les rares amorces qui ont été sélectionnées montrent des profils très spécifiques (cas de l'amorce F 16)



groupe de savane

T. brucei

groupe de forêt

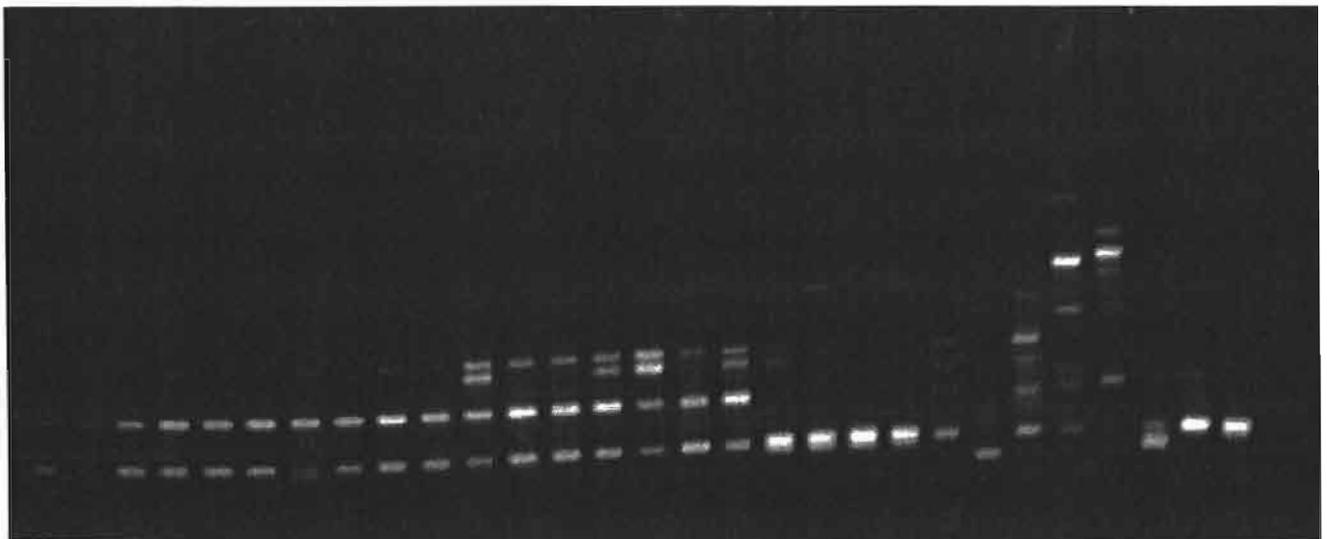
groupe de kilifi

T. simiae

T. godfreyi

T. brucei

Annexe 17 : Les profils RAPD obtenus avec l'amorce U 13 révèlent deux bandes majeures dans le groupe de savane de *T. congolense*. Le fragment de faible poids moléculaire est également conservé chez les 3 sous-espèces de *T. brucei*.



groupe de savane

T. brucei

groupe de forêt

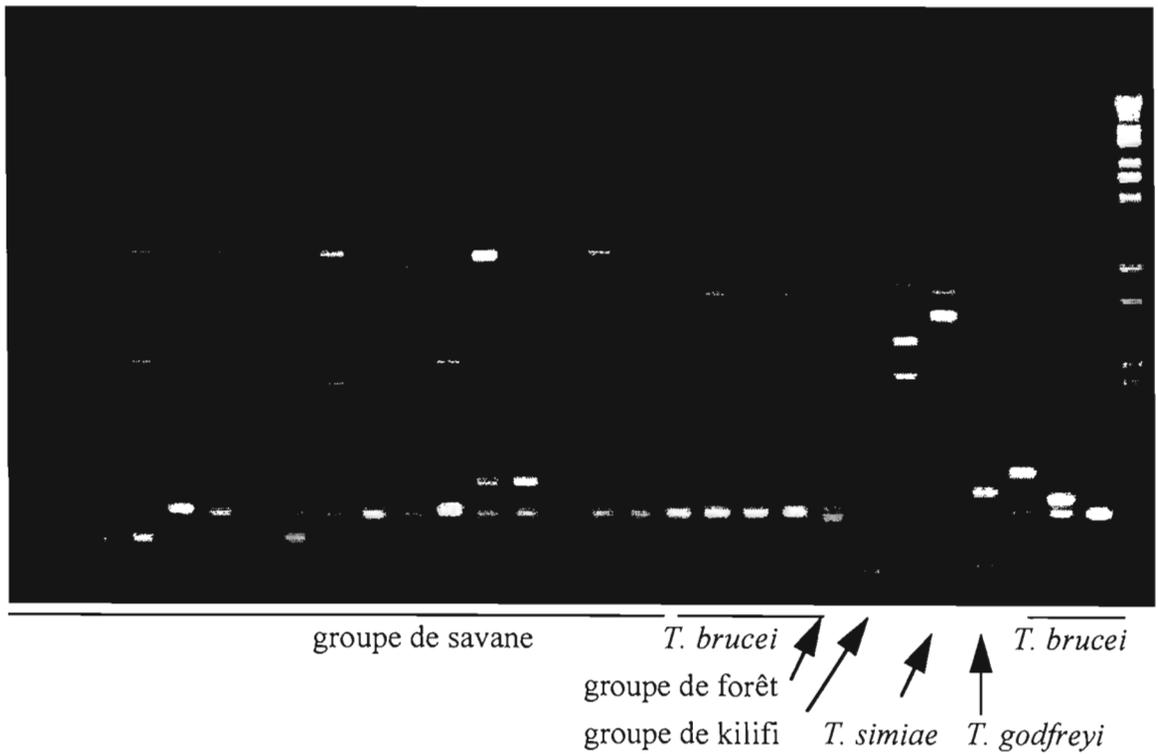
T. simiae

T. godfreyi

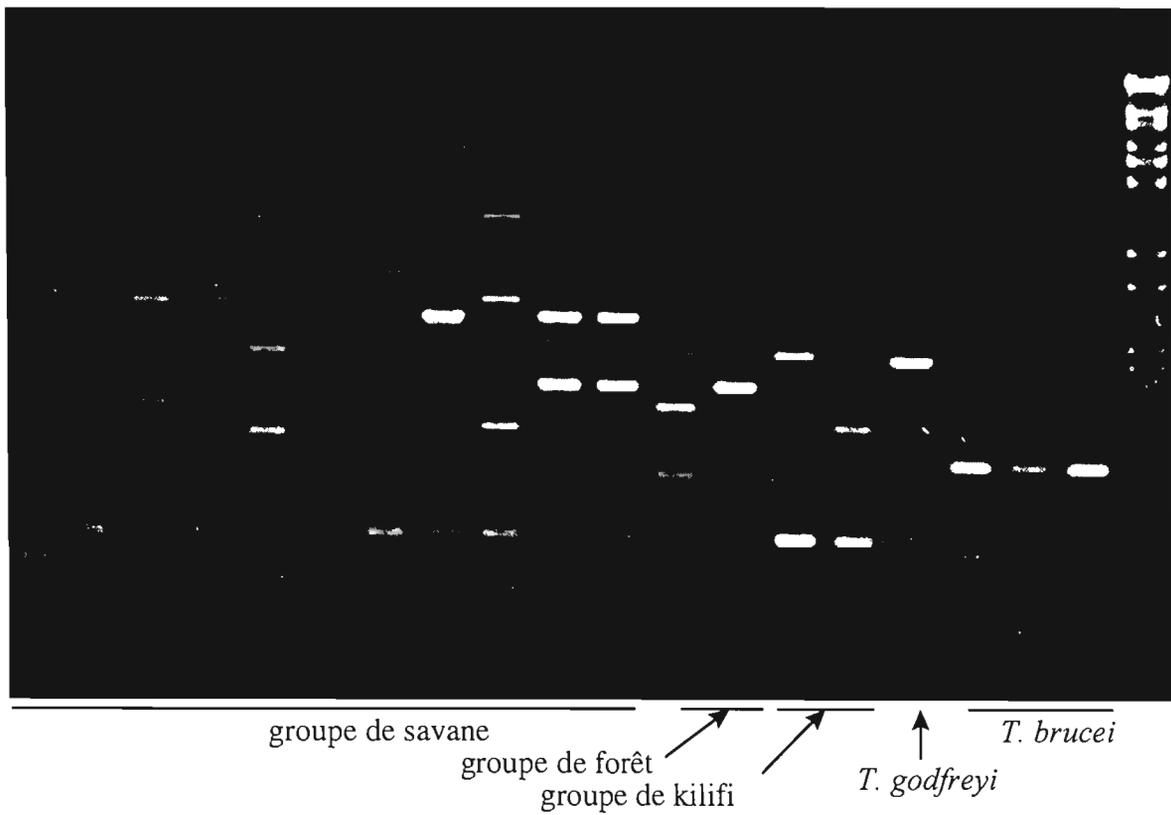
T. brucei

groupe de kilifi

Annexe 18 : les 3 sous-espèces de *T. brucei* conservent une bande commune avec les souches de *T. congolense* de savane (amorce A 16)

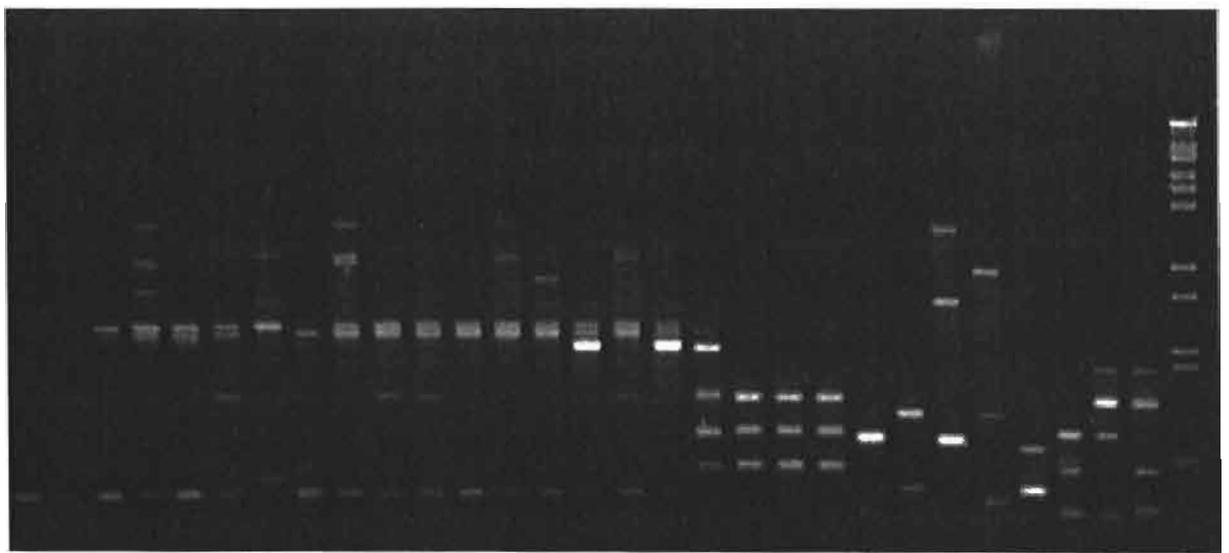


Annexe 19 : Cette amorce N 15 révèle la variabilité génétique au sein de *T. congolense* et une bande commune entre les sous-espèces de *T. brucei*.



le groupe de savane possède également une bande commune avec le groupe de kilifi

Annexe 20 : Profils RAPD obtenus avec l'amorce N 20



groupe de savane

T. brucei
groupe de forêt

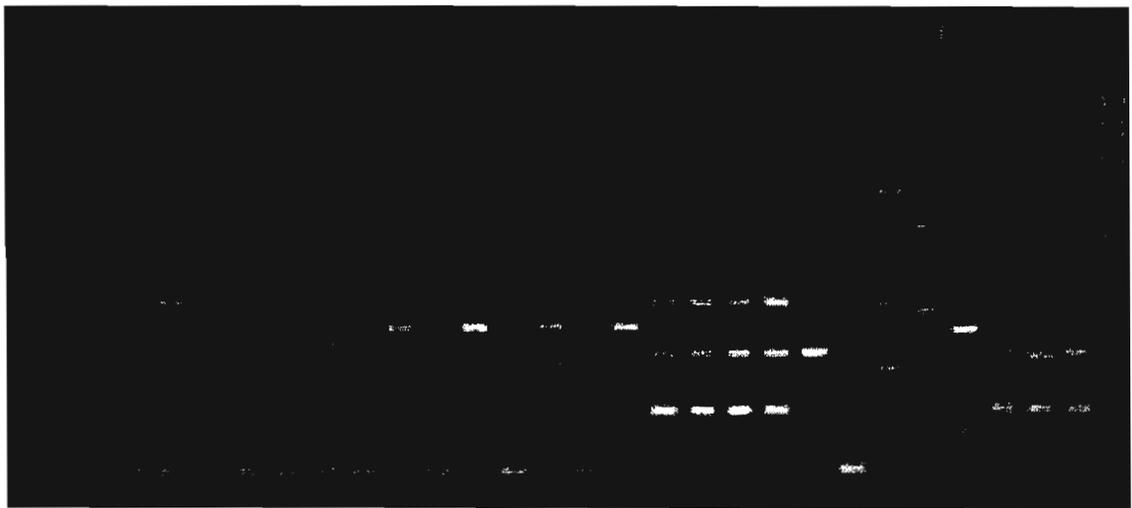
groupe de kilifi

T. simiae

T. godfreyi

T. brucei

Annexe 21 : Profils obtenus avec l'amorce N 15. C'est une des rares amorces qui semble amplifier une bande commune à toute l'espèce *T. congolense*.



groupe de savane

T. brucei

groupe de forêt

groupe de kilifi

T. simiae

T. godfreyi

T. brucei

Annexe 22 : Matrice de distances de Jaccard entre les 38 souches de *T. congolense* caractérisées par 18 systèmes enzymatiques polymorphes

Souches	KAR57	KAR69	SAT193	SAMO253	SAMO53	SAMO51	SAMO23	SAM31.C1	SAM31	SAM33.1	SAM34.2	SAM49	SAM51	SAM52.1	SAM55.2	SAM82.2	SAM83.1	BAN67
KAR69	0,65																	
SAT193	0,46	0,38																
SAMO253	0,52	0,30	0,16															
SAMO53	0,46	0,42	0,25	0,32														
SAMO51	0,54	0,36	0,34	0,29	0,48													
SAMO23	0,63	0,33	0,32	0,26	0,41	0,25												
SAM31.C1	0,54	0,32	0,36	0,30	0,24	0,40	0,38											
SAM31	0,62	0,30	0,40	0,29	0,48	0,33	0,25	0,34										
SAM33.1	0,69	0,41	0,44	0,33	0,56	0,38	0,35	0,44	0,32									
SAM34.2	0,62	0,45	0,30	0,23	0,44	0,22	0,19	0,41	0,34	0,33								
SAM49	0,71	0,46	0,53	0,44	0,58	0,47	0,41	0,45	0,33	0,27	0,49							
SAM51	0,59	0,45	0,24	0,24	0,46	0,23	0,27	0,43	0,36	0,30	0,24	0,31						
SAM52.1	0,65	0,43	0,33	0,33	0,52	0,32	0,24	0,39	0,27	0,31	0,28	0,42	0,29					
SAM55.2	0,67	0,38	0,36	0,23	0,44	0,34	0,19	0,41	0,22	0,39	0,30	0,39	0,31	0,21				
SAM82.2	0,67	0,38	0,41	0,36	0,50	0,34	0,19	0,41	0,29	0,39	0,30	0,44	0,37	0,15	0,16			
SAM83.1	0,74	0,36	0,50	0,45	0,58	0,44	0,38	0,41	0,39	0,47	0,35	0,51	0,52	0,38	0,45	0,41		
BAN67	0,63	0,33	0,37	0,37	0,45	0,35	0,28	0,31	0,18	0,39	0,37	0,40	0,38	0,29	0,31	0,31	0,36	
DIN3	0,77	0,85	0,78	0,81	0,82	0,82	0,79	0,78	0,82	0,88	0,84	0,86	0,83	0,74	0,75	0,75	0,80	0,77
TSW152	0,74	0,79	0,76	0,76	0,83	0,77	0,76	0,76	0,80	0,80	0,79	0,84	0,78	0,75	0,79	0,79	0,78	0,77
TSW243	0,77	0,81	0,78	0,78	0,82	0,79	0,76	0,75	0,79	0,85	0,81	0,84	0,80	0,71	0,72	0,72	0,78	0,77
WG5	0,89	0,97	0,88	0,88	0,93	0,83	0,88	0,88	0,89	0,87	0,85	0,88	0,85	0,84	0,91	0,85	0,87	0,86
WG84	0,91	0,97	0,88	0,88	0,92	0,83	0,88	0,88	0,88	0,86	0,85	0,87	0,84	0,83	0,90	0,85	0,86	0,86
JG30	0,53	0,56	0,50	0,41	0,53	0,53	0,56	0,41	0,53	0,55	0,45	0,62	0,56	0,51	0,50	0,54	0,53	0,54
GAM2	0,54	0,32	0,29	0,29	0,48	0,39	0,42	0,34	0,44	0,42	0,40	0,55	0,36	0,38	0,45	0,45	0,49	0,41
TRPZ105	0,52	0,39	0,33	0,26	0,46	0,41	0,44	0,29	0,44	0,48	0,36	0,58	0,42	0,43	0,46	0,48	0,47	0,43
EATRO2026	0,44	0,58	0,45	0,45	0,48	0,53	0,52	0,55	0,48	0,56	0,55	0,63	0,56	0,56	0,50	0,59	0,68	0,54
WG74	0,42	0,46	0,45	0,45	0,43	0,53	0,52	0,45	0,48	0,59	0,59	0,63	0,61	0,59	0,50	0,59	0,61	0,50
WG45	0,62	0,41	0,32	0,32	0,41	0,25	0,15	0,43	0,31	0,41	0,26	0,41	0,27	0,30	0,26	0,26	0,42	0,28
WG46	0,44	0,52	0,45	0,39	0,48	0,53	0,52	0,50	0,48	0,60	0,55	0,63	0,57	0,56	0,50	0,59	0,61	0,55
GAM17	0,50	0,50	0,13	0,28	0,30	0,45	0,43	0,36	0,46	0,50	0,41	0,59	0,36	0,39	0,46	0,46	0,56	0,43
GAM20A	0,57	0,35	0,23	0,08	0,38	0,34	0,32	0,36	0,34	0,39	0,30	0,49	0,31	0,39	0,30	0,41	0,50	0,42
I/148Fly	0,69	0,66	0,68	0,61	0,64	0,72	0,65	0,57	0,63	0,70	0,71	0,67	0,73	0,67	0,64	0,68	0,71	0,67
JG1	0,46	0,48	0,57	0,48	0,56	0,56	0,54	0,44	0,47	0,62	0,53	0,61	0,63	0,58	0,53	0,57	0,51	0,53
JG7	0,50	0,54	0,60	0,56	0,59	0,62	0,61	0,52	0,54	0,64	0,60	0,67	0,69	0,64	0,60	0,64	0,58	0,51
JG8	0,44	0,58	0,43	0,32	0,46	0,52	0,50	0,39	0,48	0,52	0,48	0,56	0,50	0,52	0,48	0,53	0,61	0,55
IL3000	0,57	0,69	0,53	0,57	0,56	0,59	0,62	0,48	0,63	0,65	0,53	0,70	0,59	0,58	0,65	0,65	0,55	0,53
SAM32.1	0,64	0,12	0,35	0,27	0,45	0,40	0,30	0,19	0,26	0,29	0,42	0,35	0,42	0,32	0,35	0,35	0,25	0,22

Annexe 22 : Matrice de distances de Jaccard entre les 38 souches de *T. congolense* caractérisées par 18 systèmes enzymatiques polymorphes

DIN3	TSW152	TSW243	WG5	WG84	JG30	GAM2	TRPZ105	EATRO2026	WG74	WG45	WG46	GAM17	GAM20A	148Fly	JG1	JG7	JG8	IL3000
0,23																		
0,20	0,23																	
0,96	0,96	0,96																
0,96	0,96	0,96	0,16															
0,80	0,78	0,78	0,87	0,89														
0,76	0,68	0,73	0,91	0,91	0,39													
0,78	0,72	0,75	0,86	0,86	0,20	0,17												
0,82	0,77	0,82	0,91	0,91	0,53	0,53	0,55											
0,79	0,77	0,79	0,91	0,93	0,44	0,48	0,44	0,39										
0,76	0,79	0,79	0,86	0,85	0,59	0,47	0,50	0,52	0,52									
0,74	0,75	0,78	0,90	0,90	0,57	0,53	0,56	0,38	0,38	0,47								
0,76	0,74	0,76	0,87	0,86	0,55	0,33	0,35	0,55	0,45	0,43	0,44							
0,81	0,76	0,78	0,88	0,88	0,45	0,34	0,29	0,50	0,50	0,38	0,45	0,28						
0,76	0,74	0,73	0,88	0,92	0,55	0,63	0,58	0,69	0,55	0,68	0,63	0,65	0,64					
0,77	0,75	0,74	0,89	0,91	0,28	0,42	0,31	0,51	0,27	0,58	0,42	0,53	0,53	0,50				
0,80	0,77	0,80	0,89	0,91	0,36	0,45	0,41	0,50	0,24	0,61	0,45	0,56	0,60	0,56	0,11			
0,76	0,70	0,73	0,91	0,90	0,42	0,37	0,36	0,47	0,42	0,55	0,30	0,41	0,38	0,46	0,35	0,44		
0,71	0,69	0,71	0,84	0,86	0,38	0,42	0,37	0,63	0,51	0,62	0,56	0,48	0,61	0,58	0,36	0,34	0,45	
0,80	0,74	0,76	0,95	0,94	0,52	0,26	0,35	0,54	0,48	0,38	0,48	0,43	0,32	0,61	0,48	0,54	0,46	0,63

Annexe 23 : Matrice des distances de Jaccard entre l'ensemble des 28 souches caractérisées par 18 systèmes enzymatiques polymorphes

Souches	JG8	IL3000	GAM17	148Fly	WG84	WG46	EATRO2026	EATRO1125	DAL967	058clA3	GAM2	JG30	WG74	TSW152	TSW243	WGS	KEN7	KEN2	JG1	JG7	TRPZ105	KAR57	GAM20	SAT193		
IL3000	0,45																									
GAM17	0,41	0,48																								
148Fly	0,44	0,60	0,64																							
WG84	0,90	0,86	0,86	0,91																						
WG46	0,30	0,56	0,44	0,62	0,90																					
EATRO2026	0,47	0,59	0,55	0,68	0,91	0,38																				
EATRO1125	0,82	0,83	0,85	0,89	0,90	0,86	0,87																			
DAL967	0,77	0,79	0,81	0,87	0,84	0,84	0,88	0,55																		
058clA3	0,77	0,81	0,84	0,87	0,87	0,82	0,88	0,27	0,46																	
GAM2	0,37	0,42	0,33	0,62	0,91	0,53	0,53	0,82	0,80	0,85																
JG30	0,41	0,36	0,53	0,56	0,89	0,56	0,51	0,83	0,84	0,81	0,38															
WG74	0,40	0,50	0,43	0,57	0,93	0,36	0,37	0,86	0,92	0,90	0,47	0,45														
TSW152	0,73	0,71	0,76	0,76	0,96	0,78	0,76	0,87	0,86	0,88	0,70	0,80	0,79													
TSW243	0,72	0,71	0,76	0,72	0,96	0,77	0,81	0,87	0,83	0,86	0,73	0,77	0,78	0,23												
WGS	0,91	0,86	0,87	0,89	0,13	0,90	0,91	0,88	0,82	0,85	0,91	0,89	0,93	0,96	0,96											
KEN7	0,82	0,80	0,86	0,81	0,87	0,84	0,85	0,85	0,84	0,82	0,85	0,80	0,90	0,93	0,96	0,88										
KEN2	0,93	0,91	0,89	0,91	0,95	0,95	0,93	0,90	0,89	0,91	0,95	0,96	0,93	0,91	0,88	0,93	0,93									
JG1	0,33	0,34	0,52	0,51	0,91	0,40	0,50	0,87	0,88	0,86	0,41	0,29	0,28	0,77	0,73	0,91	0,86	0,93								
JG7	0,42	0,32	0,55	0,58	0,91	0,43	0,48	0,87	0,88	0,85	0,44	0,38	0,25	0,79	0,79	0,91	0,85	0,95	0,11							
TRPZ105	0,29	0,37	0,27	0,56	0,86	0,50	0,55	0,86	0,80	0,83	0,09	0,17	0,42	0,75	0,74	0,86	0,86	0,95	0,28	0,38						
KAR57	0,42	0,55	0,48	0,71	0,91	0,42	0,42	0,83	0,85	0,85	0,52	0,55	0,44	0,76	0,76	0,91	0,88	0,88	0,48	0,52	0,50					
GAM20	0,38	0,61	0,28	0,63	0,88	0,45	0,50	0,88	0,82	0,82	0,34	0,44	0,48	0,78	0,78	0,88	0,82	0,95	0,52	0,59	0,22	0,56				
SAT193	0,43	0,53	0,13	0,67	0,88	0,45	0,45	0,84	0,80	0,85	0,29	0,48	0,43	0,78	0,78	0,88	0,85	0,90	0,56	0,59	0,26	0,44	0,23			
SAMO253	0,32	0,57	0,28	0,59	0,88	0,39	0,45	0,86	0,82	0,82	0,29	0,39	0,43	0,78	0,78	0,88	0,82	0,95	0,47	0,55	0,18	0,50	0,08	0,16		
SAM31.C1	0,39	0,47	0,36	0,54	0,90	0,48	0,53	0,88	0,87	0,87	0,32	0,37	0,41	0,78	0,74	0,90	0,82	0,93	0,40	0,48	0,18	0,52	0,33	0,33		
SAMOS3	0,46	0,56	0,30	0,63	0,92	0,48	0,48	0,89	0,88	0,89	0,48	0,52	0,41	0,85	0,82	0,92	0,87	0,89	0,55	0,58	0,39	0,43	0,38	0,25		
SAM37	0,82	0,83	0,83	0,90	0,86	0,86	0,92	0,37	0,51	0,39	0,85	0,85	0,94	0,88	0,85	0,84	0,86	0,89	0,90	0,92	0,85	0,84	0,87	0,84		
GAOUA231	0,80	0,84	0,84	0,89	0,87	0,87	0,92	0,33	0,55	0,39	0,83	0,84	0,94	0,86	0,84	0,85	0,87	0,89	0,88	0,92	0,83	0,85	0,85	0,85		
GAOUA282	0,80	0,84	0,84	0,89	0,87	0,87	0,92	0,36	0,57	0,42	0,83	0,84	0,94	0,86	0,83	0,85	0,87	0,89	0,88	0,92	0,83	0,84	0,85	0,85		
GAOUA283	0,79	0,83	0,83	0,88	0,89	0,86	0,92	0,37	0,59	0,43	0,82	0,83	0,94	0,85	0,83	0,87	0,86	0,89	0,88	0,92	0,82	0,83	0,84	0,84		
SAM49	0,54	0,69	0,58	0,64	0,89	0,61	0,61	0,85	0,86	0,86	0,53	0,59	0,59	0,85	0,83	0,89	0,83	0,93	0,58	0,64	0,50	0,70	0,45	0,50		
SAM51	0,50	0,59	0,36	0,72	0,84	0,57	0,56	0,83	0,81	0,87	0,36	0,55	0,59	0,80	0,79	0,84	0,84	0,92	0,62	0,69	0,35	0,58	0,31	0,24		
SAM38.2	0,71	0,79	0,82	0,83	0,93	0,79	0,81	0,66	0,66	0,63	0,75	0,73	0,83	0,87	0,84	0,91	0,88	0,93	0,76	0,81	0,74	0,82	0,80	0,80		
BAN67	0,55	0,51	0,43	0,65	0,88	0,53	0,53	0,89	0,80	0,85	0,39	0,51	0,47	0,79	0,76	0,88	0,83	0,93	0,50	0,48	0,35	0,62	0,40	0,34		
SAM31	0,48	0,62	0,46	0,61	0,90	0,47	0,47	0,91	0,85	0,88	0,42	0,50	0,45	0,81	0,78	0,91	0,82	0,93	0,44	0,52	0,36	0,61	0,32	0,38		
SAMOS1	0,52	0,59	0,45	0,71	0,83	0,53	0,53	0,84	0,83	0,85	0,39	0,51	0,52	0,79	0,79	0,83	0,85	0,93	0,54	0,61	0,35	0,52	0,34	0,34		
SAMO23	0,50	0,62	0,43	0,64	0,88	0,52	0,52	0,88	0,83	0,85	0,42	0,54	0,50	0,79	0,75	0,88	0,88	0,93	0,53	0,60	0,38	0,62	0,32	0,32		
SAM83.1	0,61	0,54	0,56	0,70	0,89	0,60	0,67	0,87	0,86	0,86	0,47	0,50	0,58	0,80	0,77	0,89	0,86	0,93	0,49	0,56	0,39	0,73	0,48	0,48		
SAM34.2	0,48	0,53	0,41	0,70	0,85	0,55	0,55	0,88	0,82	0,85	0,40	0,44	0,58	0,81	0,80	0,85	0,85	0,95	0,52	0,59	0,29	0,61	0,30	0,30		
WG45	0,55	0,62	0,43	0,68	0,85	0,47	0,52	0,88	0,85	0,88	0,47	0,58	0,50	0,81	0,78	0,85	0,88	0,93	0,57	0,60	0,44	0,61	0,38	0,32		
SAM55.2	0,48	0,65	0,46	0,63	0,90	0,50	0,50	0,88	0,85	0,85	0,45	0,48	0,48	0,81	0,71	0,90	0,88	0,93	0,52	0,59	0,40	0,66	0,30	0,36		
SAM33.1	0,52	0,64	0,50	0,69	0,88	0,59	0,54	0,87	0,86	0,86	0,41	0,53	0,57	0,82	0,84	0,89	0,83	0,98	0,59	0,62	0,41	0,68	0,37	0,42		
SAM52.1	0,52	0,57	0,39	0,66	0,86	0,55	0,54	0,87	0,81	0,86	0,35	0,49	0,57	0,77	0,70	0,86	0,86	0,91	0,56	0,62	0,35	0,63	0,37	0,31		
SAM82.2	0,53	0,65	0,46	0,67	0,85	0,59	0,59	0,90	0,85	0,87	0,45	0,53	0,58	0,81	0,71	0,85	0,90	0,93	0,56	0,63	0,42	0,66	0,41	0,41		
DIN3	0,76	0,71	0,76	0,76	0,96	0,74	0,82	0,87	0,84	0,86	0,76	0,80	0,79	0,26	0,17	0,96	0,96	0,88	0,77	0,79	0,78	0,76	0,81	0,78		
SAM32.1	0,46	0,62	0,43	0,59	0,97	0,46	0,52	0,86	0,84	0,87	0,23	0,48	0,44	0,76	0,75	0,97	0,84	0,97	0,44	0,50	0,22	0,62	0,29	0,32		
KAR69	0,58	0,69	0,50	0,64	0,97	0,52	0,58	0,90	0,89	0,92	0,32	0,54	0,43	0,82	0,81	0,97	0,90	0,97	0,46	0,52	0,29	0,64	0,35	0,38		

Annexe 23 : Matrice des distances de Jaccard entre l'ensemble des 28 souches caractérisées par 18 systèmes enzymatiques polymorphes

SAMO253	SAM31.C1	SAMO53	SAM37	GAOUA231	GAOUA282	GAOUA283	SAM49	SAM51	SAM38.2	BAN67	SAM31	SAMO51	SAMO23	SAM83.1	SAM34.2	WG45	SAM55.2	SAM33.1	SAM52.1	SAM82.2	DIN3	SAM32.1	
0,27																							
0,32	0,21																						
0,87	0,89	0,90																					
0,85	0,87	0,91	0,10																				
0,85	0,87	0,91	0,13	0,03																			
0,84	0,86	0,90	0,13	0,03	0,00																		
0,41	0,47	0,56	0,86	0,84	0,84	0,83																	
0,24	0,41	0,46	0,80	0,79	0,79	0,79	0,26																
0,77	0,76	0,81	0,64	0,63	0,63	0,64	0,77	0,76															
0,34	0,32	0,43	0,90	0,90	0,90	0,90	0,39	0,36	0,78														
0,26	0,36	0,46	0,92	0,90	0,90	0,89	0,32	0,33	0,78	0,19													
0,29	0,38	0,48	0,85	0,83	0,83	0,82	0,44	0,23	0,75	0,33	0,31												
0,26	0,36	0,41	0,87	0,85	0,88	0,87	0,38	0,27	0,74	0,25	0,22	0,25											
0,44	0,42	0,56	0,88	0,86	0,86	0,85	0,51	0,50	0,79	0,38	0,41	0,42	0,35										
0,23	0,39	0,44	0,87	0,85	0,85	0,84	0,45	0,24	0,74	0,34	0,32	0,22	0,19	0,33									
0,32	0,41	0,41	0,87	0,88	0,88	0,87	0,38	0,27	0,78	0,25	0,29	0,25	0,15	0,41	0,26								
0,23	0,39	0,44	0,89	0,88	0,87	0,87	0,35	0,31	0,74	0,29	0,19	0,34	0,19	0,44	0,30	0,26							
0,31	0,45	0,55	0,90	0,88	0,88	0,87	0,26	0,27	0,79	0,41	0,33	0,35	0,33	0,49	0,31	0,39	0,37						
0,31	0,40	0,50	0,85	0,84	0,83	0,83	0,41	0,26	0,76	0,30	0,28	0,30	0,21	0,39	0,25	0,28	0,19	0,32					
0,36	0,45	0,50	0,89	0,88	0,87	0,87	0,45	0,37	0,74	0,34	0,32	0,34	0,19	0,44	0,30	0,26	0,16	0,42	0,19				
0,81	0,78	0,82	0,85	0,86	0,86	0,85	0,85	0,83	0,87	0,76	0,81	0,82	0,79	0,80	0,84	0,76	0,75	0,87	0,74	0,75			
0,24	0,20	0,43	0,89	0,87	0,87	0,87	0,33	0,39	0,74	0,23	0,27	0,38	0,27	0,26	0,39	0,35	0,32	0,30	0,33	0,39	0,79		
0,30	0,32	0,42	0,95	0,92	0,92	0,92	0,43	0,45	0,80	0,33	0,30	0,36	0,33	0,36	0,45	0,41	0,38	0,41	0,43	0,38	0,85	0,12	

Annexe 24 : Matrice des distances de Jaccard entre les 38 souches de *T. congolense* caractérisées par 23 amorces RAPD

Souches	KAR57	KAR69	SAT193	SAMO253	SAMO53	SAMO51	SAMO23	SAM31.CI	SAM31	SAM33.1	SAM34.2	SAM49	SAM51	SAM52.1	SAM55.2	SAM82.2	SAM83.1	BAN67	DIN3	TSW152	TSW243	WG5	WG84	
KAR69	0,43																							
SAT193	0,42	0,38																						
SAMO253	0,35	0,36	0,17																					
SAMO53	0,46	0,46	0,17	0,25																				
SAMO51	0,51	0,42	0,41	0,39	0,42																			
SAMO23	0,51	0,47	0,46	0,47	0,45	0,34																		
SAM31.CI	0,41	0,42	0,41	0,39	0,38	0,44	0,41																	
SAM31	0,52	0,54	0,39	0,39	0,34	0,49	0,54	0,26																
SAM33.1	0,52	0,52	0,45	0,41	0,44	0,44	0,54	0,42	0,30															
SAM34.2	0,69	0,68	0,61	0,61	0,57	0,66	0,72	0,66	0,55	0,51														
SAM49	0,50	0,48	0,34	0,35	0,32	0,44	0,52	0,38	0,21	0,33	0,57													
SAM51	0,56	0,51	0,33	0,38	0,30	0,41	0,54	0,47	0,32	0,36	0,55	0,24												
SAM52.1	0,54	0,54	0,41	0,41	0,36	0,37	0,52	0,48	0,38	0,30	0,55	0,33	0,29											
SAM55.2	0,58	0,59	0,44	0,43	0,41	0,50	0,57	0,49	0,36	0,41	0,57	0,31	0,37	0,31										
SAM82.2	0,51	0,55	0,42	0,41	0,37	0,43	0,52	0,41	0,34	0,31	0,55	0,32	0,38	0,21	0,27									
SAM83.1	0,65	0,68	0,58	0,56	0,52	0,68	0,71	0,62	0,56	0,58	0,60	0,52	0,51	0,54	0,47	0,49								
BAN67	0,51	0,51	0,37	0,35	0,34	0,45	0,55	0,33	0,20	0,35	0,60	0,20	0,29	0,33	0,31	0,32	0,51							
DIN3	0,83	0,81	0,82	0,81	0,82	0,77	0,81	0,80	0,81	0,81	0,80	0,84	0,82	0,79	0,81	0,79	0,80	0,80						
TSW152	0,87	0,86	0,88	0,88	0,89	0,84	0,87	0,86	0,89	0,88	0,85	0,91	0,89	0,87	0,88	0,87	0,86	0,88	0,30					
TSW243	0,86	0,87	0,88	0,88	0,88	0,83	0,86	0,87	0,90	0,89	0,86	0,90	0,88	0,86	0,87	0,86	0,83	0,88	0,34	0,26				
WG5	0,85	0,86	0,84	0,86	0,85	0,84	0,85	0,86	0,84	0,85	0,91	0,84	0,85	0,84	0,86	0,85	0,92	0,86	0,90	0,94	0,93			
WG84	0,83	0,84	0,82	0,83	0,85	0,85	0,86	0,83	0,85	0,85	0,89	0,85	0,87	0,88	0,88	0,86	0,92	0,86	0,90	0,93	0,90	0,38		
JG30	0,46	0,57	0,56	0,51	0,58	0,62	0,61	0,57	0,59	0,61	0,74	0,57	0,68	0,64	0,64	0,62	0,73	0,60	0,84	0,88	0,88	0,83	0,81	
GAM2	0,63	0,71	0,70	0,67	0,71	0,74	0,73	0,69	0,71	0,70	0,83	0,71	0,77	0,74	0,74	0,71	0,81	0,73	0,86	0,88	0,88	0,85	0,79	
TRPZ105	0,41	0,57	0,58	0,55	0,58	0,60	0,63	0,57	0,62	0,63	0,70	0,61	0,68	0,66	0,66	0,64	0,71	0,62	0,83	0,88	0,87	0,83	0,81	
EATRO2026	0,41	0,46	0,49	0,43	0,48	0,44	0,51	0,48	0,52	0,50	0,65	0,50	0,57	0,48	0,55	0,53	0,71	0,49	0,80	0,87	0,86	0,83	0,83	
WG74	0,42	0,53	0,54	0,49	0,54	0,55	0,55	0,53	0,56	0,53	0,69	0,53	0,63	0,58	0,56	0,56	0,71	0,53	0,84	0,89	0,88	0,86	0,85	
WG45	0,55	0,61	0,60	0,57	0,60	0,59	0,58	0,56	0,60	0,60	0,73	0,58	0,67	0,64	0,58	0,62	0,71	0,59	0,85	0,92	0,90	0,86	0,82	
WG46	0,36	0,42	0,41	0,34	0,42	0,45	0,47	0,42	0,47	0,49	0,68	0,42	0,52	0,49	0,50	0,46	0,65	0,45	0,80	0,88	0,87	0,84	0,83	
GAM17	0,40	0,38	0,40	0,36	0,42	0,42	0,45	0,41	0,48	0,50	0,67	0,44	0,51	0,50	0,54	0,45	0,64	0,49	0,79	0,88	0,87	0,84	0,82	
GAM20A	0,38	0,41	0,36	0,34	0,39	0,50	0,52	0,41	0,47	0,47	0,67	0,41	0,49	0,51	0,51	0,47	0,61	0,44	0,82	0,89	0,89	0,83	0,80	
148FLY	0,58	0,63	0,63	0,59	0,63	0,60	0,64	0,62	0,60	0,62	0,78	0,57	0,62	0,62	0,64	0,60	0,76	0,56	0,82	0,87	0,86	0,86	0,86	
JG1	0,48	0,57	0,60	0,53	0,58	0,59	0,62	0,58	0,55	0,58	0,73	0,49	0,60	0,57	0,60	0,62	0,68	0,53	0,86	0,91	0,90	0,84	0,84	
JG7	0,48	0,58	0,61	0,54	0,59	0,61	0,63	0,58	0,54	0,56	0,71	0,50	0,61	0,56	0,62	0,59	0,67	0,55	0,87	0,92	0,90	0,85	0,83	
JG8	0,44	0,55	0,54	0,49	0,55	0,51	0,59	0,53	0,55	0,57	0,66	0,51	0,60	0,57	0,60	0,54	0,69	0,51	0,82	0,89	0,88	0,85	0,82	
IL3000	0,50	0,56	0,57	0,52	0,57	0,53	0,58	0,56	0,57	0,58	0,73	0,56	0,64	0,61	0,61	0,57	0,73	0,56	0,82	0,87	0,89	0,85	0,82	
SAM32.1	1	0,57	0,52	0,49	0,47	0,49	0,57	0,49	0,45	0,40	0,62	0,47	0,52	0,47	0,48	0,41	0,53	0,49	0,79	0,84	0,85	0,88	0,87	

Annexe 26 : Matrice de distances de Jaccard entre les 38 souches de *T. congolense* caractérisées par 18 systèmes enzymatiques polymorphes et 23 amorces RAPD

Souches	KAR57	KAR69	SAT193	SAMO253	SAMO53	SAMO51	SAMO23	SAM31.C1	SAM31	SAM33.1	SAM34.2	SAM49	SAM51	SAM52.1	SAM55.2	SAM82.2	SAM83.1	BAN67
KAR69	0,48																	
SAT193	0,43	0,38																
SAMO253	0,40	0,35	0,16															
SAMO53	0,45	0,45	0,19	0,27														
SAMO51	0,51	0,40	0,39	0,36	0,44													
SAMO23	0,54	0,44	0,42	0,41	0,44	0,32												
SAM31.C1	0,44	0,40	0,39	0,36	0,34	0,43	0,40											
SAM31	0,54	0,49	0,39	0,36	0,37	0,44	0,46	0,29										
SAM33.1	0,57	0,49	0,44	0,38	0,47	0,42	0,49	0,43	0,31									
SAM34.2	0,67	0,63	0,52	0,51	0,54	0,54	0,60	0,59	0,49	0,46								
SAM49	0,56	0,47	0,39	0,37	0,39	0,44	0,48	0,41	0,24	0,31	0,54							
SAM51	0,56	0,50	0,30	0,34	0,34	0,36	0,47	0,46	0,32	0,34	0,47	0,25						
SAM52.1	0,57	0,52	0,38	0,38	0,40	0,35	0,45	0,46	0,35	0,31	0,47	0,36	0,28					
SAM55.2	0,60	0,55	0,42	0,37	0,42	0,45	0,48	0,47	0,32	0,39	0,49	0,33	0,35	0,27				
SAM82.2	0,56	0,52	0,42	0,39	0,41	0,41	0,44	0,42	0,34	0,35	0,48	0,36	0,38	0,20	0,24			
SAM83.1	0,67	0,61	0,55	0,52	0,53	0,61	0,62	0,56	0,51	0,55	0,52	0,52	0,51	0,50	0,46	0,48		
BAN67	0,54	0,47	0,36	0,35	0,36	0,41	0,47	0,33	0,20	0,37	0,53	0,27	0,31	0,32	0,30	0,33	0,47	
DIN3	0,81	0,82	0,81	0,81	0,82	0,78	0,80	0,79	0,81	0,83	0,82	0,84	0,82	0,78	0,79	0,78	0,80	0,79
TSW152	0,84	0,85	0,85	0,85	0,88	0,82	0,85	0,84	0,87	0,86	0,84	0,89	0,87	0,84	0,86	0,85	0,84	0,85
TSW243	0,83	0,85	0,85	0,85	0,86	0,81	0,83	0,83	0,87	0,87	0,84	0,88	0,86	0,81	0,82	0,82	0,81	0,84
WG5	0,87	0,89	0,85	0,87	0,87	0,84	0,86	0,87	0,86	0,86	0,89	0,86	0,85	0,85	0,87	0,85	0,91	0,87
WG84	0,86	0,88	0,84	0,84	0,87	0,84	0,87	0,85	0,87	0,86	0,88	0,87	0,86	0,87	0,89	0,86	0,91	0,87
JG30	0,49	0,56	0,54	0,47	0,56	0,58	0,59	0,51	0,56	0,58	0,65	0,58	0,64	0,59	0,59	0,59	0,65	0,57
GAM2	0,60	0,61	0,58	0,55	0,64	0,63	0,64	0,59	0,63	0,61	0,71	0,65	0,65	0,62	0,65	0,63	0,70	0,62
TRPZ105	0,43	0,52	0,51	0,46	0,54	0,53	0,57	0,48	0,56	0,57	0,60	0,58	0,60	0,58	0,60	0,58	0,62	0,55
EATRO2026	0,41	0,49	0,48	0,44	0,48	0,47	0,51	0,50	0,50	0,51	0,62	0,54	0,57	0,50	0,54	0,55	0,69	0,50
WG74	0,42	0,51	0,51	0,47	0,51	0,54	0,54	0,50	0,53	0,54	0,65	0,55	0,62	0,58	0,54	0,56	0,67	0,51
WG45	0,57	0,56	0,52	0,49	0,55	0,49	0,48	0,52	0,51	0,54	0,61	0,52	0,57	0,54	0,49	0,52	0,62	0,49
WG46	0,38	0,44	0,42	0,36	0,44	0,47	0,49	0,44	0,47	0,52	0,64	0,49	0,53	0,50	0,50	0,50	0,63	0,48
GAM17	0,43	0,41	0,33	0,34	0,39	0,43	0,44	0,40	0,48	0,50	0,60	0,48	0,47	0,47	0,52	0,45	0,62	0,47
GAM20A	0,43	0,40	0,32	0,27	0,39	0,46	0,47	0,39	0,43	0,44	0,58	0,43	0,44	0,47	0,45	0,45	0,57	0,43
148Fly	0,62	0,63	0,64	0,59	0,63	0,64	0,64	0,60	0,60	0,65	0,76	0,59	0,65	0,63	0,64	0,62	0,74	0,59
JG1	0,48	0,54	0,59	0,51	0,57	0,58	0,59	0,53	0,51	0,59	0,66	0,52	0,60	0,56	0,57	0,60	0,62	0,52
JG7	0,49	0,57	0,61	0,54	0,59	0,61	0,62	0,55	0,53	0,58	0,67	0,55	0,64	0,58	0,61	0,61	0,63	0,53
JG8	0,43	0,56	0,51	0,44	0,52	0,51	0,56	0,49	0,53	0,55	0,61	0,52	0,57	0,55	0,57	0,54	0,66	0,52
IL3000	0,52	0,59	0,56	0,54	0,57	0,55	0,59	0,53	0,59	0,60	0,67	0,60	0,62	0,60	0,62	0,59	0,68	0,55
SAM32.1	0,55	0,48	0,47	0,43	0,46	0,46	0,50	0,43	0,41	0,38	0,57	0,43	0,49	0,43	0,44	0,41	0,46	0,43

Annexe 26 : Matrice de distances de Jaccard entre les 38 souches de *T. congolense* caractérisées par 18 systèmes enzymatiques polymorphes et 23 amorces RAPD

DIN3	TSW152	TSW243	WG5	WG84	JG30	GAM2	TRPZ105	EATRO2026	WG74	WG45	WG46	GAM17	GAM20A	148Fly	JG1	JG7	JG8	IL3000
0,28																		
0,28	0,25																	
0,92	0,95	0,94																
0,92	0,94	0,92	0,30															
0,83	0,85	0,84	0,85	0,84														
0,82	0,82	0,83	0,88	0,84	0,41													
0,81	0,84	0,83	0,84	0,83	0,30	0,46												
0,81	0,83	0,84	0,86	0,86	0,43	0,58	0,42											
0,82	0,86	0,85	0,89	0,87	0,43	0,59	0,35	0,28										
0,82	0,88	0,86	0,86	0,83	0,51	0,61	0,45	0,47	0,44									
0,78	0,85	0,84	0,86	0,85	0,45	0,59	0,44	0,34	0,34	0,41								
0,78	0,84	0,83	0,85	0,84	0,47	0,54	0,41	0,44	0,40	0,43	0,27							
0,82	0,86	0,86	0,84	0,82	0,47	0,56	0,41	0,45	0,44	0,47	0,36	0,28						
0,80	0,83	0,82	0,87	0,88	0,55	0,68	0,53	0,55	0,51	0,61	0,51	0,57	0,58					
0,83	0,87	0,85	0,87	0,86	0,41	0,59	0,40	0,43	0,38	0,56	0,43	0,49	0,50	0,50				
0,84	0,88	0,86	0,87	0,86	0,43	0,60	0,42	0,43	0,37	0,54	0,44	0,50	0,52	0,55	0,14			
0,80	0,84	0,83	0,87	0,85	0,41	0,57	0,32	0,35	0,37	0,51	0,31	0,43	0,43	0,45	0,36	0,38		
0,79	0,82	0,83	0,86	0,83	0,41	0,57	0,42	0,43	0,43	0,54	0,44	0,45	0,52	0,56	0,43	0,41	0,38	
0,79	0,82	0,82	0,90	0,90	0,55	0,58	0,52	0,52	0,54	0,50	0,47	0,47	0,45	0,64	0,53	0,52	0,50	0,55

Annexe 27 : Matrice de distances de Jaccard entre l'ensemble des 48 souches caractérisées, en même temps, par 18 systèmes enzymatiques et 23 amorces RAPD

Souches	KAR57	KAR69	SAT193	SAMO253	SAMO53	SAMO51	SAMO23	SAM31.C1	SAM31	SAM33.1	SAM34.2	SAM38.2	SAM49	SAM51	SAM52.1	SAM55.2	SAM82.2	SAM83.1	BAN67	DIN3	TSW152	TSW243	WG5	WG84		
KAR69	0,48																									
SAT193	0,43	0,38																								
SAMO253	0,40	0,35	0,16																							
SAMO53	0,45	0,45	0,19	0,27																						
SAMO51	0,51	0,40	0,39	0,36	0,44																					
SAMO23	0,54	0,44	0,42	0,41	0,44	0,32																				
SAM31.C1	0,44	0,40	0,39	0,36	0,34	0,43	0,40																			
SAM31	0,54	0,49	0,39	0,36	0,37	0,44	0,46	0,29																		
SAM33.1	0,57	0,49	0,44	0,38	0,47	0,42	0,49	0,43	0,31																	
SAM34.2	0,67	0,63	0,52	0,51	0,54	0,54	0,60	0,59	0,49	0,46																
SAM38.2	0,84	0,88	0,81	0,80	0,78	0,80	0,83	0,81	0,77	0,80	0,77															
SAM49	0,56	0,47	0,39	0,37	0,39	0,44	0,48	0,41	0,47	0,31	0,54	0,76														
SAM51	0,56	0,50	0,30	0,34	0,34	0,36	0,47	0,46	0,32	0,34	0,47	0,74	0,25													
SAM52.1	0,57	0,52	0,38	0,38	0,40	0,35	0,45	0,46	0,35	0,31	0,47	0,76	0,36	0,28												
SAM55.2	0,60	0,55	0,42	0,37	0,42	0,45	0,48	0,47	0,32	0,39	0,49	0,75	0,33	0,35	0,27											
SAM82.2	0,56	0,52	0,42	0,39	0,41	0,41	0,44	0,42	0,34	0,35	0,48	0,75	0,36	0,38	0,20	0,24										
SAM83.1	0,67	0,61	0,55	0,52	0,53	0,61	0,62	0,56	0,51	0,55	0,52	0,79	0,52	0,51	0,50	0,46	0,48									
BAN67	0,54	0,47	0,36	0,35	0,36	0,41	0,47	0,33	0,20	0,37	0,53	0,77	0,27	0,31	0,32	0,30	0,33	0,47								
DIN3	0,81	0,82	0,81	0,81	0,82	0,78	0,80	0,79	0,81	0,83	0,82	0,91	0,84	0,82	0,78	0,79	0,78	0,80	0,79	0,79						
TSW152	0,84	0,85	0,85	0,85	0,88	0,82	0,85	0,84	0,87	0,86	0,84	0,91	0,89	0,87	0,84	0,86	0,85	0,84	0,85	0,85	0,28					
TSW243	0,83	0,85	0,85	0,85	0,86	0,81	0,83	0,83	0,87	0,87	0,84	0,91	0,88	0,86	0,81	0,82	0,82	0,81	0,84	0,28	0,25					
WG5	0,87	0,89	0,85	0,87	0,87	0,84	0,86	0,87	0,86	0,86	0,89	0,91	0,86	0,85	0,85	0,87	0,85	0,91	0,87	0,92	0,95	0,94				
WG84	0,86	0,88	0,84	0,84	0,87	0,84	0,87	0,85	0,87	0,86	0,88	0,92	0,87	0,86	0,87	0,89	0,86	0,91	0,87	0,92	0,94	0,92	0,30			
KEN2	0,88	0,90	0,87	0,89	0,88	0,90	0,88	0,88	0,89	0,90	0,90	0,91	0,89	0,89	0,89	0,91	0,89	0,94	0,90	0,94	0,95	0,93	0,93	0,91		
KEN7	0,93	0,94	0,92	0,92	0,93	0,93	0,93	0,91	0,92	0,92	0,93	0,93	0,92	0,93	0,92	0,93	0,93	0,94	0,92	0,93	0,96	0,95	0,92	0,91		
DAL967	0,93	0,94	0,91	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,90	0,79	0,93	0,93	0,90	0,93	0,91	0,92	0,92	0,92	0,90	0,90	0,94	0,94		
058c1A3	0,93	0,95	0,92	0,92	0,93	0,92	0,92	0,94	0,93	0,94	0,91	0,77	0,93	0,94	0,93	0,92	0,92	0,94	0,94	0,90	0,90	0,89	0,93	0,93		
EATRO1125	0,92	0,95	0,93	0,93	0,94	0,92	0,94	0,93	0,94	0,94	0,93	0,75	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,91	0,90	0,90	0,94	0,93		
SAM37	0,91	0,95	0,91	0,92	0,92	0,92	0,94	0,92	0,92	0,93	0,91	0,69	0,90	0,90	0,91	0,92	0,92	0,93	0,93	0,92	0,92	0,91	0,93	0,93		
GAOUA231	0,93	0,94	0,92	0,92	0,92	0,91	0,92	0,92	0,92	0,94	0,90	0,71	0,91	0,90	0,91	0,92	0,92	0,93	0,93	0,91	0,91	0,90	0,93	0,93		
GAOUA282	0,93	0,94	0,91	0,92	0,92	0,91	0,92	0,92	0,92	0,94	0,90	0,70	0,91	0,90	0,91	0,92	0,92	0,93	0,93	0,91	0,91	0,90	0,93	0,93		
GAOUA283	0,93	0,94	0,92	0,92	0,93	0,91	0,92	0,92	0,93	0,93	0,90	0,72	0,91	0,91	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,91	0,90	0,90	0,94	0,93		
JG30	0,49	0,56	0,54	0,47	0,56	0,58	0,59	0,51	0,56	0,58	0,65	0,85	0,58	0,64	0,59	0,59	0,59	0,65	0,57	0,83	0,85	0,84	0,85	0,84		
GAM2	0,60	0,61	0,58	0,55	0,64	0,63	0,64	0,59	0,63	0,61	0,71	0,86	0,65	0,65	0,62	0,65	0,63	0,70	0,62	0,82	0,82	0,83	0,88	0,84		
TRPZ105	0,43	0,52	0,51	0,46	0,54	0,53	0,57	0,48	0,56	0,57	0,60	0,84	0,58	0,60	0,58	0,60	0,58	0,62	0,55	0,81	0,84	0,83	0,84	0,83		
EATRO2026	0,41	0,49	0,48	0,44	0,48	0,47	0,51	0,50	0,50	0,51	0,62	0,86	0,54	0,57	0,50	0,54	0,55	0,69	0,50	0,81	0,83	0,84	0,86	0,86		
WG74	0,42	0,51	0,51	0,47	0,51	0,54	0,54	0,50	0,53	0,54	0,65	0,86	0,55	0,62	0,58	0,54	0,56	0,67	0,51	0,82	0,86	0,85	0,89	0,87		
WG45	0,57	0,56	0,52	0,49	0,55	0,49	0,48	0,52	0,51	0,54	0,61	0,85	0,52	0,57	0,54	0,49	0,52	0,62	0,49	0,82	0,88	0,86	0,86	0,83		
WG46	0,38	0,44	0,42	0,36	0,44	0,47	0,49	0,44	0,47	0,52	0,64	0,85	0,49	0,53	0,50	0,50	0,63	0,48	0,78	0,85	0,84	0,86	0,85	0,85		
GAM17	0,43	0,41	0,33	0,34	0,39	0,43	0,44	0,40	0,48	0,50	0,60	0,85	0,48	0,47	0,47	0,52	0,45	0,62	0,47	0,78	0,84	0,83	0,85	0,84		
GAM20A	0,43	0,40	0,32	0,27	0,39	0,46	0,47	0,39	0,43	0,44	0,58	0,83	0,43	0,44	0,47	0,45	0,45	0,57	0,43	0,82	0,86	0,86	0,84	0,82		
1/148Fly	0,62	0,63	0,64	0,59	0,63	0,64	0,64	0,60	0,60	0,65	0,76	0,85	0,59	0,65	0,63	0,64	0,62	0,74	0,59	0,80	0,83	0,82	0,87	0,88		
JG1	0,48	0,54	0,59	0,51	0,57	0,58	0,59	0,53	0,51	0,59	0,66	0,83	0,52	0,60	0,56	0,57	0,60	0,62	0,52	0,83	0,87	0,85	0,87	0,86		
JG7	0,49	0,57	0,61	0,54	0,59	0,61	0,62	0,55	0,53	0,58	0,67	0,84	0,55	0,64	0,58	0,61	0,61	0,63	0,53	0,84	0,88	0,86	0,87	0,86		
JG8	0,43	0,56	0,51	0,44	0,52	0,51	0,56	0,49	0,53	0,55	0,61	0,82	0,52	0,57	0,55	0,57	0,54	0,66	0,52	0,80	0,84	0,83	0,87	0,85		
IL3000	0,52	0,59	0,56	0,54	0,57	0,55	0,59	0,53	0,59	0,60	0,67	0,86	0,60	0,62	0,60	0,62	0,59	0,68	0,55	0,79	0,82	0,83	0,86	0,83		
SAM32.1	0,55	0,48	0,47	0,43	0,46	0,46	0,50	0,43	0,41	0,38	0,57	0,79	0,43	0,49	0,43	0,44	0,41	0,46	0,43	0,79	0,82	0,82	0,90	0,90		

Annexe 27 : Matrice de distances de Jaccard entre l'ensemble des 48 souches caractérisées, en même temps, par 18 systèmes enzymatiques et 23 amorces RAPD

KEN2	KEN7	DAL967	058&IA3	EATRO1125	SAM37	GAOUA231	GAOUA282	GAOUA283	JG30	GAM2	TRPZ105	EATRO2026	WG74	WG45	WG46	GAM17	GAM20A	148Fly	JG1	JG7	JG8	IL3000	
0,95																							
0,94	0,93																						
0,94	0,91	0,57																					
0,94	0,92	0,57	0,35																				
0,93	0,93	0,58	0,54	0,52																			
0,93	0,93	0,59	0,49	0,45	0,19																		
0,93	0,93	0,60	0,49	0,46	0,22	0,04																	
0,93	0,93	0,61	0,50	0,45	0,22	0,04	0,02																
0,89	0,89	0,91	0,91	0,91	0,92	0,92	0,92	0,92															
0,92	0,90	0,90	0,92	0,91	0,93	0,93	0,92	0,92	0,41														
0,90	0,90	0,92	0,92	0,93	0,92	0,91	0,91	0,91	0,30	0,46													
0,89	0,91	0,93	0,93	0,93	0,94	0,93	0,93	0,93	0,43	0,58	0,42												
0,89	0,92	0,94	0,93	0,92	0,94	0,93	0,93	0,93	0,43	0,59	0,35	0,28											
0,90	0,92	0,94	0,93	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,51	0,61	0,45	0,47	0,44										
0,88	0,91	0,92	0,91	0,92	0,92	0,91	0,91	0,91	0,45	0,59	0,44	0,34	0,34	0,41									
0,87	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,90	0,90	0,90	0,47	0,54	0,41	0,44	0,40	0,43	0,27								
0,89	0,90	0,92	0,92	0,93	0,91	0,91	0,91	0,91	0,47	0,56	0,41	0,45	0,44	0,47	0,36	0,28							
0,88	0,91	0,92	0,93	0,94	0,92	0,92	0,92	0,92	0,55	0,68	0,53	0,55	0,51	0,61	0,51	0,57	0,58						
0,90	0,91	0,93	0,92	0,93	0,92	0,91	0,91	0,91	0,41	0,59	0,40	0,43	0,38	0,56	0,43	0,49	0,50	0,50					
0,91	0,91	0,92	0,91	0,92	0,94	0,93	0,93	0,93	0,43	0,60	0,42	0,43	0,37	0,54	0,44	0,50	0,52	0,55	0,14				
0,89	0,91	0,90	0,91	0,92	0,91	0,90	0,90	0,90	0,41	0,57	0,32	0,35	0,37	0,51	0,31	0,43	0,43	0,45	0,36	0,38			
0,87	0,89	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,41	0,57	0,42	0,43	0,43	0,54	0,44	0,45	0,52	0,56	0,43	0,41	0,38		
0,91	0,93	0,93	0,93	0,94	0,92	0,93	0,93	0,93	0,55	0,58	0,52	0,52	0,54	0,50	0,47	0,47	0,45	0,64	0,53	0,52	0,50	0,55	

**PUBLICATIONS ET RESUMES
DE COMMUNICATIONS ET POSTERS**

Tropical Medicine and Parasitology

**Official Organ of
Deutsche Tropenmedizinische
Gesellschaft**

Editors

R. Garms, Hamburg
R. Korte, Frankfurt-Eschborn
R. D. Walter, Hamburg

Editorial Board

H. J. Bremer, Heidelberg
U. Brinkmann, Boston
D. W. Büttner, Hamburg
H. J. Diesfeld, Heidelberg
B. O. L. Duke, Lancaster
R. D. Horstmann, Tübingen
S. H. E. Kaufmann, Ulm
A. A. Kielmann, Nairobi
D. Mehlitz, Berlin
K. Mott, Geneva
F. P. Schelp, Berlin

Georg Thieme Verlag
Rüdigerstraße 14
D-70469 Stuttgart
Postfach 30 11 20
D-70451 Stuttgart

Thieme Medical Publishers, Inc.
381 Park Avenue South
New York, NY 10016

Reprint

© Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York
Reprint with the permission of the publishers only

Pathogenesis and pathology of African trypanosomosis in Baoulé, N'Dama/Baoulé cross bred and Zebu cattle in Burkina Faso

1. Clinical performance under high natural tsetse challenge

P.-H. Clausen, I. Sidibé, A. Bassinga, X. Richard*, B. Bauer, H. Pohlit

Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

Abstract

The pathogenesis and pathology of African animal trypanosomosis (AAT) in Baoulé, N'Dama/Baoulé-cross-bred and Zebu cattle was studied from 1987 to 1991 in a series of experiments conducted under natural and artificial conditions of challenge at the Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales (CRTA) in Burkina Faso. This first paper reports on the clinical performance of 64 Baoulé, 10 N'Dama/Baoulé-cross-bred and 20 Zebu cattle, which were transferred to the pastoral zone of Satiri, 50 km north-east of Bobo-Dioulasso, a zone infested with *Glossina palpalis gambiensis*, *G. morsitans submorsitans* and *G. tachinoides*. Prior to the experiment, the cattle had been raised in a fly proof stable and at the CRTA breeding station, an area of extremely low incidence of trypanosomosis or had been exposed at least once to natural trypanosome challenge in an area of high *Glossina* density. The cattle were monitored daily for clinical performance. Blood samples were collected twice weekly and examined on the spot for packed red cell volume (PCV) and parasitaemia. In the blood of 98% of the cattle trypanosomes (*Trypanosoma vivax*, *T. congolense*) were detected. Significant inter- and intra-breed differences with respect to the clinical performance were recorded. Regarding general health, the humpless Baoulé and N'Dama/Baoulé cross-bred cattle (*Bos taurus*) proved to be superior to the humped Zebu cattle (*B. indicus*) under this high challenge. Previous exposure to natural challenge had a positive effect on survival for both Baoulé and Zebu cattle. The phenotypic variation in response to trypanosomosis was small in Baoulé previously exposed and large in Baoulé previously not exposed. The repeatability of the former classification was fairly high, indicating the possibility of a genetic basis for this trait. Mechanisms of innate and acquired resistance as well as environmental and management factors should be considered as affecting phenotypic variation in response to trypanosomosis.

Introduction

Africa is currently confronted with a deficit in both meat and dairy products. In tropical Africa the self-sufficiency ratio for meat has declined during the last ten years. The situation according to all projections is likely to worsen (Jahnke et al., 1988). In the humid and sub-humid zones of Africa, trypanosomosis is still a major constraint to livestock production. At present, it effectively precludes the use of temperate zone exotic breeds which might otherwise be introduced on a larger scale than the existing tentative trials (Ferguson, 1988).

It has been recognized that certain taurine breeds of West African cattle, as well as some species of wildlife, possess the ability to survive and be productive in tsetse-infested areas. However, other breeds rapidly succumb to the disease. Because of this, increasing consideration is being given to the use of "trypanotolerant" cattle. Progress has been made towards understanding the nature of trypanotolerance. The superior innate resistance within the N'Dama and West African shorthorn breeds has been well established (Roberts and Gray, 1973; Murray et al., 1982; Roelants et al., 1987). The ability to resist the development of anaemia in the face of infection, as assessed by packed red cell volume percent (PCV), is considered to be related to a better control of parasitaemia. There are indications that both processes are genetically controlled but are not directly linked to each other (Paling et al., 1987). Recent field studies on trypanotolerant N'Dama cattle in Zaire have shown that the ability of an infected animal to maintain PCV is correlated with reproductive performance and productivity (Trail et al., 1991). However, the underlying mechanisms of parasitaemia and anaemia control in trypanotolerant cattle are still poorly understood.

Whereas trypanosomosis constrains livestock production in humid and sub-humid zones, shortage of forage and water is the main constraint for livestock in arid and semi-arid zones of Africa. Due to the dramatic effects of successive droughts in the years 1968–1973, 1979–1980 and 1984–1985, the livestock owners in the sahelian countries, like Burkina Faso, had to migrate southwards in search of forage and water (Diallo, 1987). It was then, that their cattle, predominantly humped Zebu (*Bos indicus*), a so-called "trypanosusceptible" cattle breed, came in contact with tsetse. Recent

*In Memoriam

Accepted 30 April 1993

Table 1 Experimental group A: Zebu raised in a fly proof stable and/or at the CRTA breeding station (no *Glossina*).

Ear-tag number	hemotype ¹		sex ²	age ³ (yrs)	origin ⁴	nutritional state ^{3,5}	PCV ³ (%)	natural ^{4,8} pre-challenge	antibodies ^{3,7}	
	Hb	Alb							IgM	IgG
0687	nd	nd	F	2	BAN	4	34	a)	1/60	1/80
0688	AB	FS	M	2	FPS	4	34	b)	1/160	1/320
0691	AB	SS	F	2	BAN	4	41	no	1/160	1/40
0693	BB	FS	M	2	FPS-TC5	5	32	a)	1/40	1/40
0694	AB	FS	F	2	BAN	4	39	no	1/160	1/40
0698	BB	SS	M	2	FPS-TC5	5	29	a)	1/80	1/320
0701	BB	SS	F	2	BAN	4	32	d)	1/20	1/20
0703	BB	nd	M	2	FPS-TC5	5	32	no	1/80	1/20
0704	AB	FS	M	2	BAN	4	32	no	1/40	1/80
0705	BB	SS	F	2	BAN	4	50	no	1/80	1/80
0709	AB	FS	F	2	FPS-TC5	4	36	no	1/20	1/20
X						4,3	35,6		1/66	1/58
SD						0,45	5,63			
N = 11										

Keynotes (for Table 1–6)

¹ both biallelic systems of hemoglobin (Hb) and albumin (Alb) are monomorphic at 100 % for the AA and FF phenotypes in the taurines of pure breed, as in N'Dama cradle of origin in Guinea, as in Baoulé isolats in the south of Burkina Faso (Maillard et al., submitted). Each AB or BB phenotype is an irrefutable sign of crossbreeding, nd = not done

² F = female, M = male

³ data recorded prior to the experiment

⁴ BAN = breeding station in Banankeledaga; FPS = calves raised from 24 h after birth in a fly proof stable. They were transferred 3–5 months prior to the experiment to the CRTA breeding station; FPS-TC5 = as above, but experimentally infected at the age of 1 year with a local stock of *T. congolense* (Duvallat et al., 1988); BANF = agro-pastoral zone of Banfora (*Glossina*), 80 km south of Bobo-Dioulasso; SAM = agro-pastoral zone of Samandeni (*Glossina*), 50 km north-east of Bobo-Dioulasso; KOR = Korogho, Cote d'Ivoire.

⁵ 1 = very poor; 2 = poor; 3 = medium; 4 = good; 5 = excellent (fat)

⁶ former classification under natural conditions of challenge; R = resistant, S = susceptible

⁷ Antibodies to crude trypanosomal antigens in serum dilutions (ELISA)

⁸ Detection of *T. vivax*-infections at the CRTA breeding station (no *Glossina*); a) = Jan. 1987, b) = Dec. 1986, c) = Nov. 1986, d) = Oct. 1986.

Table 2 Experimental group B: Zebu from the pastoral zone of Satiri, a *Glossina* infested zone.

Ear-tag number	hemotype ¹		sex ²	age ³ (yrs)	origin ⁴	nutritional state ^{3,5}	PCV ³ (%)	natural ^{4,8} pre-challenge	antibodies ^{3,7}	
	Hb	Alb							IgM	IgG
0751	AA	FS	M	2	SATIRI	4	36	YES	1/160	1/380
0752	BB	FS	F	2	SATIRI	3	32	YES	1/1280	1/640
0754	AA	SS	F	2	SATIRI	3	34	YES	1/640	1/320
0755	AB	FS	M	2	SATIRI	3	28	YES	1/1280	1/160
0756	AB	SS	F	2	SATIRI	3	31	YES	1/160	1/40
0758	AB	FS	M	2	SATIRI	3	26	YES	1/640	1/320
0759	BB	FS	M	2	SATIRI	4	30	YES	1/2560	1/1280
0760	BB	SS	M	2	SATIRI	4	29	YES	1/320	1/40
0761	AA	SS	M	2	SATIRI	3	32	YES	1/160	1/80
X						3,3	30,9		1/506	1/201
SD						0,47	2,88			
N = 9										

evidence (Njogu et al., 1985) indicates that *B. indicus* breeds have a partial resistance to trypanosomosis akin to the N'Dama and West African Shorthorn cattle. Depending on the local conditions, particularly the level of tsetse-challenge, herd management and chemoprophylaxis, Zebu cattle can be productive in tsetse infested areas. The nature and relevance of this "partial resistance to trypanosomosis" is not known.

The objective of our experiments, conducted between 1987 and 1991, was, therefore, to study the inter- and intra-breed differences in susceptibility of Baoulé, N'Dama/Baoulé-cross-bred and Zebu cattle, the contribution of innate and acquired resistance to trypanotolerance, and the constitutional factors affecting trypanotolerance under natural and artificial conditions of chal-

lenge. Results from this study should be of aid in defining selection criteria, maximizing the genetic progress on breeding stations and improving the management of livestock production in tsetse-infested zones. This first paper analyses the inter- and intra-breed differences with respect to the clinical performance under high natural tsetse challenge.

Materials and methods

Experimental area. The experimental area was located in the pastoral zone of Satiri, 50 km north-east of Bobo-Dioulasso. The experiment took place between April 1st and October 15th, 1987, covering the end of the dry season and all of the rainy season. The ambient temperature and atmospheric humidity varied according to the season between 20 °C/90 % (6

Table 3 Experimental group C: Baoulé raised in a fly proof stable and at the CRTA breeding station (no *Glossina*).

Ear-tag number	hemotype ¹		ancestor ⁶		sex ²	age ³ (y<rs)	origin ⁴	nutritional ^{3,5} state	PCV ³ (%)	natural ^{4,8} pre-challenge	antibodies ^{3,7}	
	Hb	Alb	M	F							IgM	IgG
0815	AA	FS	370(S)	184	F	2	FPS-TC5	4	34	no	1/40	0
0820	AA	FF	370(S)	528	M	2	FPS	3	30	no	0	1/20
0824	AA	FF	370(S)	007(R)	F	2	FPS-TC5	4	31	no	0	1/40
0827	AA	FF	370(S)	048(R)	M	2	FPS-TC5	4	32	a)	1/40	1/160
0840	AA	FF	370(S)	448(R)	M	2	FPS-TC5	3	30	no	1/20	1/160
0842	AA	FS	460(R)	149(S)	F	2	FPS-TC5	4	34	no	1/20	1/20
0847	AA	FF	370(S)	434(R)	M	2	FPS	4	33	no	1/40	1/80
0848	AA	FF	460(R)	507(R)	M	2	FPS-TC5	4	25	no	1/80	1/320
0849	AA	FF	370(S)	428	M	2	FPS-TC5	5	32	no	1/40	1/20
0850	AA	FF	370(S)	447(R)	F	2	FPS-TC5	4	30	no	1/20	1/80
0854	AA	SS	370(S)	444	M	2	FPS	4	30	no	1/20	1/80
0856	AA	FS	460(R)	550	F	2	FPS	4	31	no	1/80	1/40
0859	AA	FS	370(S)	003(S)	M	2	FPS-TC5	4	30	no	0	1/20
0865	AA	FF	460(R)	421(R)	F	2	FPS	3	30	no	0	1/80
0866	AA	FF	370(S)	148(R)	F	2	FPS-TC5	4	29	no	1/80	1/80
0867	AA	FF	460(R)	543	F	2	FPS	4	31	a)	1/40	1/20
0868	AA	FF	460(R)	496(R)	M	2	FPS	3	30	no	1/20	1/20
X								3,82	30,71		1/17	1/41
SD								0,51	2,02			
N = 17												

a.m.); 42 °C/20% (4 p.m.) and 20 °C/90% (6 a.m.); 32 °C/60% (4 p.m.), respectively.

Tsetse challenge. Tsetse fly prospecting was done at monthly intervals. Each time, ten traps Challier Laveissière, 1973) were set up for two hours after sunrise in riverine vegetation along water ways, areas with highly variable relative densities. Catches varied in the dry season between 24 to 58 flies (mainly *Glossina palpalis gambiensis*, a few *G. morsitans submorsitans* and *G. tachinoides*) and in the rainy season between 0 to 147 tsetse (again mainly *G. palpalis gambiensis*). The trypanosome infection rates in tsetse flies varied between 0 and 40 percent.

Experimental animals. The experimental animals consisted of 20 Zebu, 64 Baoulé, and 10 N'Dama/Baoulé-cross-bred cattle: Of the 20 Zebu cattle, 11 had been reared in a fly-proof stable and/or at the CRTA breeding station in Banankéléda, an area of extremely low incidence of trypanosomosis (Table 1). Nine Zebu cattle were bought 2 to 3 months prior to the experiment in the pastoral zone of Satiri, a tsetse infested area (Table 2). Of the Baoulé, 17 animals of known parentage had been reared in a fly-proof stable (Table 3) and 10 of them had been cyclically infected once at an age of one year with a local stock of *Trypanosoma congolense*, isolated from a Zebu at Karankasso, 60 km west of Bobo-Dioulasso (Duvall et al., 1988). 33 Baoulé cattle (Table 4) were purchased 2 to 3 months prior to the experiment in the area of Banfora (100 km south of Bobo-Dioulasso). Banfora, like Satiri, is situated in an area affected by trypanosomosis. With few exceptions, the Baoulé and N'Dama/Baoulé-cross-bred cattle, combined to make up experimental groups E and F (Table 5 and 6) had been exposed at least once to natural trypanosome challenge in an area of high *Glossina* density for various time periods (Roelants et al., 1987).

Herd management. Before the animals were transferred to the experimental area, all of them were kept for at least two months in quarantine at the CRTA breeding station. They were vaccinated against the major tropical diseases, treated against endo- and ecto-parasites, and received diminazene aceturate (Berenil®, Hoechst AG, F.R.G.; 7 mg/kg body weight) 40 to 60 days prior to exposure. Pre-experimental bleedings were

done in order to check for haemoparasites and to obtain pre-infection data, plasma and sera for later analyses. Transferred to the experimental area, the animals were divided according to age and sex into 4 herds which grazed throughout the day under herdsmen's supervision. With the exception of the time of acclimatization, no supplementary feed was given. In general, the animals had to walk 5 to 10 km daily for food and water. The herdsmen were told not to avoid the apparently highly *Glossina* infested zones. At night the cattle were corralled in paddocks. Apart from one acaricidal treatment with Flumethrin Pour-on (Bayticol® Pour-on, Bayer AG, F.R.G.; 1 mg active ingredient/kg b.w.) at the beginning of the experiment, no further treatments were applied in order to avoid any negative impact on the *Glossina* situation (Bauer et al., 1988). Instead ticks (*Amblyomma*, *Hyalomma* and *Boophilus*) were removed daily by two additionally employed herdsmen.

Monitoring procedures. The cattle were monitored daily for clinical performance. Their nutritional status was recorded weekly according to Rosenberger (1977), body weights were taken twice monthly. Body temperatures were taken twice weekly. Blood samples were collected twice weekly and examined on the spot for packed red cell volume (PCV) and parasitaemia, using the microcentrifugation and the phase contrast buffy coat method (Murray et al., 1977), for total and differential white blood cell count, hemoglobin concentration and haemoparasites other than trypanosomes. Faecal samples were examined monthly for worm-eggs. Infected animals unable to follow the herd for feeding and watering due to their poor health state were treated with Berenil (7 mg kg⁻¹). Treatment was repeated when a susceptible animal became parasitologically positive a second time, regardless of its clinical condition. When animals died, a full post-mortem examination was carried out. The serum and plasma samples were evaluated for changes in hemolytic complement activity and C3 levels (Authié and Pobel, 1990), anti-trypanosome specific immune responses (Clausen et al., in preparation), circulating trypanosomal antigens (Nantulya et al., in preparation) progesterone (Chicoteau et al., 1990), trace elements, polyamine oxidase (PAO) and interferon (Ahmed et al., 1992). A hemotype study and the typing of bovine class I lymphocyte antigens (BoLA) was done on all cattle (Maillard et al., submitted). The experiment was stopped after 198 days of exposure,

Table 6 Experimental group F: N'Dama/Baoulé-cross-bred cattle with former classification⁶.

Ear-tag number	hemotype ¹		sex ²	age ³ (yrs)	origin ⁴	nutritional ^{3,5} state	PCV ³ (%)	natural ^{4,8} pre-challenge	antibodies ^{3,7}	
	Hb	Alb							IgM	IgG
0174	AB	FS	M	6	SAM	5	35	SAM 82(R) KAR 83(R) SAM 84(R) SAM 85(R)	1/160	1/40
0179	AB	FS	M	9	SAM	4	39		1/80	1/20
0192	AA	FS	M	7	SAM	4	33		1/40	1/20
0193	AA	FF	M	7	SAM	4	45		1/80	1/40
0194	AA	FF	M	7	SAM	5	35		1/320	1/160
0568	AA	FF	M	4	SAM	4	32		1/40	1/80
0572	AA	FS	N	4	SAM	4	29		1/40	1/80
0573	AA	FF	M	4	SAM	4	30		1/80	1/20
0574	AA	FF	F	4	SAM	4	45		1/160	1/40
0577	AA	FF	M	4	SAM	3	29		1/160	1/40
X						4,1	35,2		1/92	1/43
SD						0,54	5,71			
N = 10										

all animals were treated and transported to experimental installations for continued observations.

Statistical analysis. The inter- and intra-breed comparisons were performed using student's test and Wilcoxon's ranking test. The relationship between the different parameters were analysed by means of linear correlations, using a personal computer (CASIO PB-1000).

Results

Clinical manifestation and classification.

In the blood of 98% of the experimental animals, trypanosomes were detected which were mainly of *T. vivax* and *T. congolense* species (Fig. 1).

Significant inter- and intra-breed differences in the clinical performance were recorded. The Zebus (experimental groups A and B) but also the majority of the Baoulé cattle raised in the fly-proof stable and at the CRTA breeding station (experimental group C) performed very poorly from the clinical point of view. In animals exhibiting a rise of body-temperature (exceeding 40 °C), accompanied often by accelerated breathing and pulse rates, trypanosomes were usually detected, either the same day or one of the following days. Food intake was markedly reduced, lachrymation was observed, swelling of the subcutaneous glands was noted, and in many cases the hair coat got a rough, spiked appearance. The herdsmen reported the affected cattle as being feverish (*afari gouanna*) and sick (*a man kènè*). With the progress of the disease, the mucous membranes became pale, the cattle became weak and lagged behind the herd and showed the typical "fly struck" appearance (Fiennes, 1970). The cattle became thin, emaciated, muscular wasting was evident. Weight loss was marked (Fig. 2).

In contrast, the majority of the Baoulé and N'Dama/Baoulé-cross-bred cattle which had been previously exposed to natural conditions of challenge (experimental group D, E, and F) adapted quickly to the new environment, gained body weight and showed no severe clinical symptoms such as described above for cattle susceptible to trypanosomosis.

Differences in the total survival time (duration of challenge before treatment, death or termination of experiment) were highly significant between each experimental group (Fig. 3 and Table 7):

Of the 11 Zebu cattle previously not exposed to natural challenge (experimental group A), one died due to trypanosomosis and 10 required trypanocidal treatment after a mean survival time of 59 days. The mean total survival time for experimental group B (indigenous Zebu from the experimental area) was 86 days. Eight were treated in extremis. Zebu 0759, still alive at the end of the experiment, but exhausted and with a PCV of 18%, was treated with Berenil at day 197 in order to assure its survival during transport to the CRTA breeding station. However, it died during transport.

Of the 17 Baoulé reared in the fly-proof stable and at the CRTA breeding station (experimental group C) 88% (15/17) required Berenil treatment during the challenge (Fig. 3). At day 60 (the mean total survival time for the Zebu cattle raised under the same conditions) none of them had been treated. One month later, at the approximate mean total survival time for the Zebu cattle previously exposed to natural challenge, one had died and 5 had received trypanocidal treatment.

To make a comparative intra-breed analysis between the level of susceptibility and the genetic characteristics (hemotype, parentage) and the constitutional (nutritional state, PCV) pre-challenge data, the cattle of experimental group C were, in respect to their individual total survival time, subdivided into high susceptibility (total survival time up to 3 months), partial susceptibility (survival time 4 to 6 months) and low susceptibility Baoulé (total survival time > 6 months). However, no significant statistical correlations were found either with the average PCV, or with the nutritional status before challenge, or any other data from Table 3. For example, Baoulé 0859, a descendant of trypano-susceptible classified ancestors, with a hemotype AA, FS, which was in a good nutritional state before challenge, had a total survival time exceeding 6 months, whereas Baoulé 0848, a descendant of a resistant bull, hemotype AA, FF,

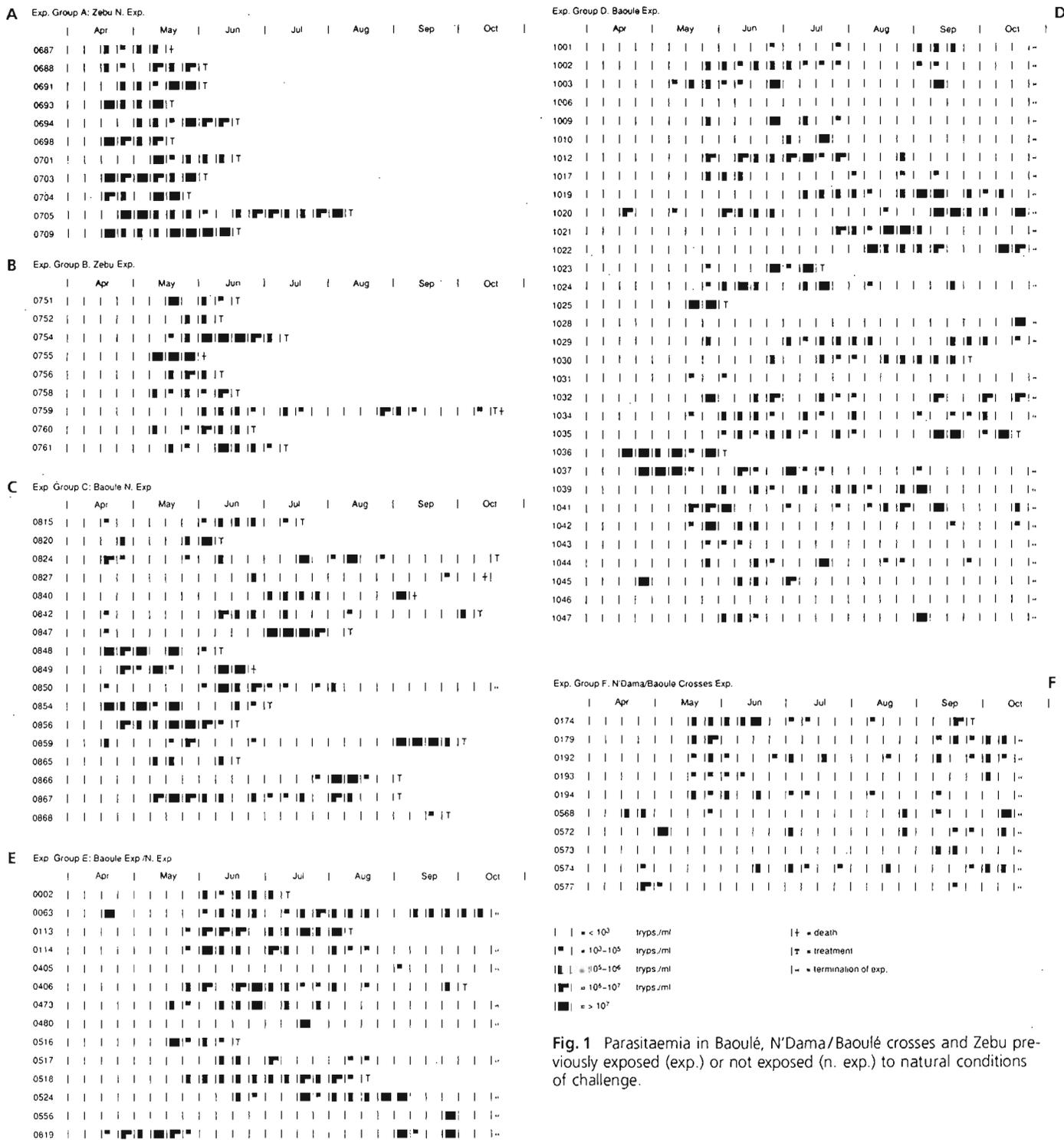


Fig. 1 Parasitaemia in Baoulé, N'Dama/Baoulé crosses and Zebu previously exposed (exp.) or not exposed (n. exp.) to natural conditions of challenge.

which was also in a good nutritional state before challenge, required trypanocidal treatment after 71 days.

Of the Baoulé, originating from a zone infested with *Glossina* (experimental group D), only 5 out of a total of 33 cattle (15%) showed severe clinical symptoms and required trypanocidal treatment. Baoulé 1016 became lame at the end of April. In cattle 1023, 1025 and 1036 the disease was very acute. 1023 and 1025 collapsed only one week after the onset of clinical signs in the field. In spite of careful examination, no indications

were found of haemoparasites other than trypanosomes. Baoulé 1036, developed a small hump one year after it had recovered from this experiment, and can therefore no longer be regarded as a pure-bred Baoulé. At the end of August, Baoulé 1030 suffered from interdigital necrosis. Because of its weakened condition and a PCV of 19%, it received trypanocidal drug treatment on September 7th. Taking into consideration, that Baoulé 1016 and 1030 were obviously handicapped due to lameness and Baoulé 1036 did not conform phenotypically with the characteristics of a pure-bred Baoulé, only 2 of the 5 treated

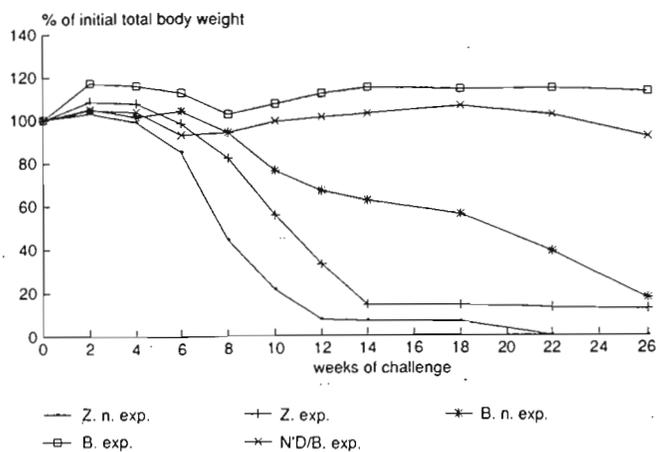


Fig. 2 Changes of total body weight during the challenge for Baoulé (B), N'Dama/Baoulé (N'D/B) cross bred and Zebu (Z) cattle previously exposed (exp.) or not exposed (n. exp.) to natural conditions of challenge.

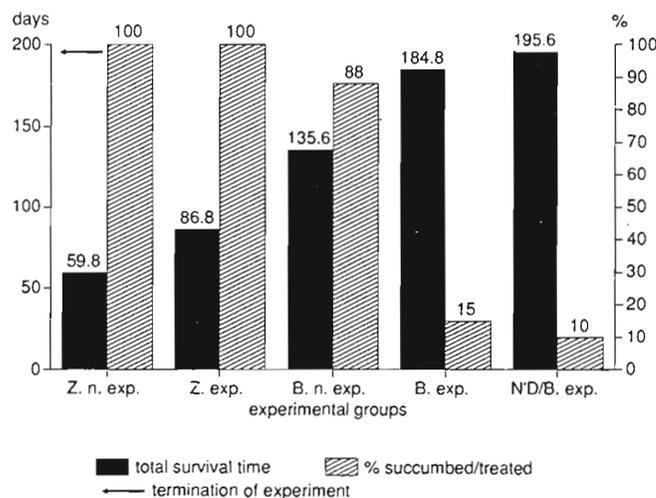


Fig. 3 Comparison of the means of total survival time (duration of challenge to treatment or death or termination of experiment) for Baoulé (B), N'Dama/Baoulé (N'D/B) cross-bred and Zebu (Z) cattle previously exposed (exp.) or not exposed (n. exp.) to natural conditions of challenge. Means differ significantly ($p < 0.001$).

Table 7 Total survival time.

Experimental group	No. of animals	Mean (days)	SD (days)
Z. n. exp. (A)	11	59.8	20.76
Z. exp. (B)	9	86.8	40.68
B. n. exp. (C)	17	135.6	53.46
B. exp. (D)	33	184.8	36.56
N'D/B. exp. (F)	10	195.6	7.20

Baoulé from the total of 33 cattle (6%) remain which can be considered as susceptible under these conditions of challenge.

Baoulé 1006 and 1046 were the only cattle in this experiment which never showed up with any parasite (Fig. 1). Their initial body weight increased during the challenge by 26.5% and 14.9% respectively.

The reproducibility of the former classification under natural conditions of challenge was fairly good (83.5%). From those Baoulé or N'Dama/Baoulé-cross-bred cattle which had been in previous selection experiments and had been classified as resistant to trypanosomosis, 86.7 percent (13/15) retained their status of resistance. Only two, 0406 (experimental group E) and 0174 (experimental group F) required trypanocidal treatment, and only on day 181 and 174 during challenge. From the Baoulé (0002, 0063, 0516), classified as susceptible due to their poor performance in 1982, 1983 and 1984 in Samandeni, two (0002 and 0516) required treatment with Berenil again on day 71 and 92 respectively. In spite of having a cardiac disorder (irregular palpitation, increased diastolic cardiac murmur, retrograd jugular pulse) from April 18th onwards, Baoulé 0063 showed no severe clinical symptoms due to trypanosomosis, apart from a light fatigue. Except for 0002, 0406 and 0516, three other Baoulé (0113, 0114 and 0518) from experimental group E required treatment at day 125, 195 and 135 respectively. According to their common history no natural tsetse challenge prior to this experiment had taken place.

Discussion

This paper reports on the clinical performance of Baoulé, N'Dama/Baoulé cross-bred and Zebu cattle submitted to natural tsetse challenge. Significant inter- and intra-breed differences in susceptibility to trypanosomosis were recorded. In accordance with earlier findings (Roelants et al., 1987) all Zebu proved to be sensitive to trypanosomosis, i.e., they died or were treated in extremis, whereas the majority, but not all, of the Baoulé and N'Dama/Baoulé crosses showed no severe clinical symptoms and survived in a good nutritional state.

The differences in susceptibility within the breeds were important, especially when related to early challenge. Previous exposure to natural challenge had a positive effect on survival for both Baoulé and Zebu (Fig. 3). The parasitological data which will be analysed in more detail elsewhere (Clausen et al., in preparation), emphasize the importance of acquired immunity in susceptibility to trypanosomosis for both Baoulé and Zebu cattle, i.e. the prevalence of trypanosomes was significantly lower in cattle previously exposed to natural challenge. This is in agreement with reports summarized by Murray et al. (1982), indicating that cattle which survive trypanosomosis with or without chemotherapy, are subsequently more resistant to rechallenge. This has been confirmed many times in N'Dama in West Africa by Chandler (1958), Desowitz (1959) and Touré et al. (1978). Similarly, evidence has been obtained that *B. indicus* breeds in East Africa, usually maintained by a chemother-

apeutic strategy, acquire a degree of resistance (Wilson et al., 1976). Stephen (1966) demonstrated that lengthened "refractory periods to reinfection" occurred after treatment of N'Dama and Zebu calves which could not be attributed to the residual effect of the drug and must have been in part due to the development of acquired immunity.

According to Nantulya et al. (1984) acquired immunity should be viewed in the context of a local situation. Cattle infected with cloned bloodstream *T. brucei* or *T. congolense* displayed complete immunity against tsetse-transmitted homologous challenge after a spontaneous elimination of trypanosomes from peripheral blood circulation. The animals were also immune to challenge by tsetse infected with clones belonging to the same serodeme but remained susceptible to similarly transmitted heterologous serodemes.

Another factor that may contribute to acquired resistance in the field is antigenetic cross-reactivity of VATs from different serodemes (Murray et al., 1982). Some VATs derived from widely differing field isolates of *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense*, *T. evansi* and *T. equiperdum* show strong cross reactions in immune fluorescence and immune lysis tests with infection antisera (Van Meirvenne et al., 1977). These cross-reactive VATs have been termed iso-VATs.

In Burkina Faso we have observed that previously exposed cattle, from both trypanosusceptible and trypanotolerant breeds, subjected to a clone of irradiated trypanosomes of an unrelated stock of *T. vivax* from Nigeria (Leefflang et al., 1976) showed lytic antibody responses one to two days earlier in comparison to previously non-exposed cattle (Clausen et al., 1989). The relevance and the basis of this apparently antigen independent "priming" effect of the immune system is not known.

Lymphokines, like interferon (IFN) and interleukin-2, play a central role in the immune response to microorganisms. Beside its regulatory role, interferon-gamma induces the activation of macrophages facilitating by this way the phagocytosis of the parasites. In mice, trypanotolerance was found to be positively correlated with the production of IFN-gamma. However, in this experiment, no correlation was found between the production of IFN and the parasitological data recorded (Ahmed et al., 1992).

The finding, that Baoulé and N'Dama/Baoulé cross-bred cattle previously exposed in geographically widely different areas, maintained in this experiment their state of resistance, underlines the importance of other than serodeme specific mechanisms in resistance. A high correlation between successive measurements (high repeatability of the trait) indicates that phenotypic variation is based on some "permanent" properties of the individuals evaluated (Soller and Beckmann, 1987). This is suggestive of a biological, possibly genetic, basis for the trait.

The Baoulé, which were raised in a fly proof stable and at the CRTA breeding station (experimental group C) performed very poorly and showed a large degree of phenotypic variation in trypanotolerance. This is in contrast to the little differences in susceptibility observed within experimental groups D and F. Differences in the acquisition of immunity during rearing, within experimental group C, can be neglected, even though some of the calves have been cyclically infected once at an age of one year with a local stock of *T. congolense*, but the differences in the survival time were statistically not related to prior circumstances.

Soller and Beckmann (1987) argued, that the reports of a large degree of phenotypic variation in trypanotolerance of N'Dama are based primarily on field observations, where the level of environmental stress and trypanosome challenge may differ markedly between animals. Minor variations in the intensity of challenge could not be held responsible for this large degree of phenotypic variation, since the repeatability of former classification in this experiment has been fairly good. However, it is known, that a large number of environmental and management factors do affect susceptibility to trypanosomosis. Certainly, it is not good management to take cattle which were raised on a concrete floor in a fly-proof stable and for 3 to 5 months on a breeding station, where they were exposed only to limited viral and bacterial hazards, fed with concentrate and rice-straw and transferred at the end of the dry season to an area of high challenge.

In conclusion, the Baoulé and N'Dama/Baoulé crosses proved to be superior to the Zebu cattle under the recorded challenge. Previous exposure to trypanosomosis had a pronounced positive effect on survival for both, Baoulé and Zebu cattle. The phenotypic variation in response to this challenge was small in Baoulé and N'Dama/Baoulé crosses previously exposed and large in Baoulé previously not exposed. Mechanisms of innate and acquired resistance as well as environmental and management factors should be considered as affecting phenotypic variation. It is not known to what extent the observed phenotypic variation is genetic in origin, an essential prerequisite for any selection program (Dolan, 1987). More conclusive evidence is expected from the analysis of the parasitological, hematological and immunological findings of this experiment.

Acknowledgements

The authors wish to thank for the hemotype study, Dr. R. Queval; for the investigation on the worm burden Dr. J. Petrich-Bauer; and for reviewing the manuscript Drs. G. Uilenberg and V.M. Nantulya. We are grateful to Messrs. A. van Melick, I. Kaboré, L. Ouattara, Ch. Vogel, T. Pobel, T. Palé, B. Somda and L. Milogo for technical assistance; and Mrs. D. Bouthillier for typing the manuscript. We wish to thank the herdsmen for their attention and their excellent herd management. This work was supported by the German Agency for Technical Cooperation (G.T.Z.) PN 77.2227.5, the "Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire de Pays Tropicaux" (I.E.M.V.T.), Maisons-Alfort, France and the "Ministere de l'Agriculture et de l'Elevage (M.A.E.)", Burkina Faso.

References

- Ahmed, J. S., P.-H. Clausen, P. Voigt, H. Pohlit, I. Sidibe, F. Hörchner: The influence of the *Trypanosoma*-infection on the production of interferon and T cell growth factor by PBL from trypanotolerant and susceptible cattle. In: Publications of the Japanese-German Centre Berlin, 5 (1992) 149–153
- Authié, E., T. Pobel: Serum hemolytic complement activity and C3 levels in bovine trypanosomiasis under natural conditions of challenge-early indications of individual susceptibility to disease. Vet. Parasitol. 35 (1990) 43–59
- Bauer, B., J. Petrich-Bauer, H. Pohlit, I. Kaboré: Effects of Flumethrin pour-on against *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera, Glossinidae). Trop. Med. Parasit. 39 (1988) 151–152
- Bauer, B., I. Kaboré, A. Liebisch, F. Meyer, J. Petrich-Bauer: Simultaneous control of ticks and tsetse flies in Satiri, Burkina Faso, by the use of flumethrin pour-on for cattle. Trop. Med. Parasit. 43 (1992) 41–46
- Challier, A., C. Laveissière: Un nouveau piège pour la capture des glossines (*Glossina*, Diptera, Muscidae): description et essais sur le terrain. Cah. ORSTOM. Sér. Ent. Méd. Parasit. 1 (1973) 251–262
- Chandler, R. L.: Studies on the tolerance of N'Dama cattle to trypanosomiasis. J. Comp. Pathol. 68 (1958) 253–260
- Chicoteau, P., A. Bassinga, I. Sidibé, T. Pobel, X. Richard, P.-H. Clausen: Influence de l'exposition à un risque trypanosomien élevé sur la reproduction de vaches Baoulé au Burkina Faso. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 43 (1990) 473–477
- Clausen, P.-H., A. van Melick, I. Sidibé, H. Pohlit: Immune responses in cattle of differing susceptibility to African trypanosomiasis selected under natural fly challenge in Burkina Faso. In: Abstracts of the 13th Conference of the WAAVP. Berlin, G.D.R., (1989) 30
- Desowitz, R. S.: Studies on immunity and host parasite relationships. I. The immunological response to resistant and susceptible breeds of cattle to trypanosomal challenge. Ann. trop. Med. Parasitol. 53 (1959) 293–313
- Diallo, H.: Problématique de la sédentarisation de l'Élevage au Burkina Faso. Mémoire de Fin d'études. Institut Polytechnique Rurale de Katibougou, Mali (1987)
- Dolan, R. B.: Genetics and Typanotolerance. Parasitology Today 3 (1987) 137–143
- Duwallet, G., A. Ouedraogo, M. Pinder, A. Van Melick: Observations following the cyclical infection with *Trypanosoma congolense* of previously uninfected Baoulé and Zebu Cattle. In: Livestock production in tsetse-affected areas of Africa (ILCA/ILRAD). Proc. Meeting Nov. 23–27, 1987, Nairobi, Kenya, (1988) 318–325
- Ferguson, W.: Factors influencing the production potential of trypanotolerant livestock. In: Livestock production in tsetse-affected areas of Africa (ILCA/ILRAD). Proc. Meeting Nov. 23–27, 1987, Nairobi, Kenya, (1988) 187–209
- Fiennes, R. N. T.-W.: Pathogenesis and pathology of animal trypanosomiasis. In: Mulligan, H. W. (Ed.): The African Trypanosomiasis. George Allen and Unwin, London (1970) 729–750
- Jahnke, H. E., G. Tacher, P. Keil, D. Rojat: Livestock production in tropical Africa, with special reference to the tsetse-affected zone. In: Livestock production in tsetse-affected areas of Africa (ILCA/ILRAD). Proc. Meeting Nov. 23–27, 1987, Nairobi, Kenya, (1988) 3–21
- Leeftang, P., J. Buys, J. Blotkamp: Studies on *Trypanosoma vivax*: infectivity and serial maintenance of natural bovine isolates in mice. Int. J. Parasitol. 6 (1976) 413–417
- Maillard, J. C., H. Leveziel, R. Queval: Le complexe majeur d'histocompatibilité de bovins ouest africains: Typage d'antigènes lymphocytaires (BoLa) de taurins Baoulé (*Bos taurus*) et de Zebus soudaniens (*Bos indicus*) du Burkina Faso (Afrique occidentale) (Submitted)
- Murray, M., P. K. Murray, W. I. M. McIntyre: An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. Trans. r. Soc. trop. Med. Hyg. 71 (1977) 325–326
- Murray, M., W. I. Morrison, D. D. Whitelaw: Host susceptibility to African Trypanosomiasis: Trypanotolerance. Adv. Parasitol. 21 (1982) 1–68
- Nantulya, V. M., A. J. Musoke, F. R. Rurangirwa, S. K. Molloo: Resistance of cattle to tsetse-transmitted challenge with *Trypanosoma brucei* or *Trypanosoma congolense* after spontaneous recovery from syringe-passaged infections. Infect. Immun. 43 (1984) 735–738
- Njogu, A. R., R. B. Dolan, A. J. Wilson, P. D. Sayer: Trypanotolerance in east African Orma Boran cattle. Vet. Rec. 117 (1985) 632–636
- Paling, R. W., S. K. Molloo, J. R. Scott: The relationship between parasitaemia and anaemia in N'Dama and Zebu cattle following four subsequential challenges with *Glossina morsitans* infected with *Trypanosoma congolense*. International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control. 19th Meet., Lomé, Togo. OAU/STRC, Publication No 114, (1987) 256–264
- Roberts, C. J., A. R. Gray: Studies on trypanosome-resistant cattle. I. The breeding and growth performance of N'Dama, Muturu and Zebu cattle maintained under the same conditions of husbandry. Trop. Anim. Hlth. 5 (1973) 211–219
- Roelants, G. E., F. Fumoux, M. Pinder, R. Queval, A. Bassinga, E. Authié: Identification and selection of cattle naturally resistant to African Trypanosomiasis. Acta Trop. 44 (1987) 55–66
- Soller, M., J. S. Beckmann: Toward an understanding of the genetic basis for trypanotolerance in the N'Dama cattle of West Africa. Consultation report submitted to FAO, Rome, March (1987)
- Rosenberger, G.: Die klinische Untersuchung des Rindes. Verlag Paul Parey, Berlin/Hamburg (1977)
- Stephen, L. E.: Observations on the resistance of West African N'Dama and Zebu cattle to trypanosomiasis following challenge by wild *Glossina morsitans* from an early age. Ann. trop. Med. Parasit. 60 (1966) 230–246
- Touré, S. M., A. Gueyé, M. Séyé, M. A. Ba, A. Mané: A comparison between the pathology of a natural trypanosome infection in Zebu and N'Dama cattle. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 31 (1978) 293–313
- Trail, J. C. M., G. D. M. D'Ieteren, C. Colardelle, J. C. Maille, G. Ordner, B. Sauveroche, G. Yangari: Genetic aspects of control of anaemia development in trypanotolerant N'Dama cattle. Acta Trop. 48 (1991) 285–291
- Van Meirvenne, N., E. Magnus, T. Vervoort: Comparison of variable antigenic types produced by trypanosome strains of the subgenus *Trypanozoon*. Ann. Soc. belge Méd. trop. 57 (1977) 409–423
- Wilson, A. J., J. Paris, A. G. Lucking, F. K. Dar, A. R. Gray: Observations on a herd of beef cattle maintained in a tsetse area. II. Assessment of the development of immunity in association with trypanocidal drug treatment. Trop. Anim. Hlth. Prod. 8 (1976) 1–12

Dr. P.-H. Clausen

Institute for Veterinary Medicine (Robert von Ostertag-Institute) of the Federal Health Office
P.O. Box 480 447
D-12254 Berlin
Germany

ACTROP 00221

Development of multiple drug resistance of *Trypanosoma congolense* in Zebu cattle under high natural tsetse fly challenge in the pastoral zone of Samorogouan, Burkina Faso

P.-H. Clausen, I. Sidibe, I. Kaboré and B. Bauer

Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales (CRTA), B.P. 454, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

(Received 29 November 1991; accepted 7 April 1992)

Preliminary data from an ongoing epidemiological survey in the pastoral zone of Samorogouan (KénéDougou) indicate the occurrence of multiple-drug-resistant *Trypanosoma congolense*. Despite frequent trypanocidal drug treatments with diminazene aceturate (Berenil®, Hoechst) at 7 mg/kg body weight (bw) at intervals of 2 to 4 weeks, no significant drop in the prevalence of African animal trypanosomosis (AAT) was observed. To examine a suspected drug resistance, 20 Zebu cattle, naturally infected with *T. congolense* and/or *T. vivax*, were transferred in December 1989 from Samorogouan into a fly-proof stable. Diminazene aceturate at 7 mg/kg bw cured infections of *T. vivax*, but was ineffective against *T. congolense*. Likewise, treatments with homidium bromide (Ethidium®, FBC) at 1 mg/kg bw and isometamidium chloride (Trypamidium®, Rhône Mérieux) at 1 mg/kg bw, respectively, proved to be ineffective. Corresponding chemotherapeutic trials in previously unexposed Zebu bulls and Sahelian goats infected with one primary *T. congolense* isolate from Samorogouan demonstrated a high level of resistance to diminazene aceturate (7 mg/kg bw in cattle and 17.5 mg/kg bw in goats), isometamidium chloride (1 and 2 mg/kg bw i.v. in goats) and quinapyramine sulphate (Trypacide'S®; Rhône Mérieux) at 5 mg/kg bw in goats. The appearance of a multiple-drug-resistant strain of *T. congolense* emphasizes the urgent need for new chemical substances as trypanocidal drugs and the increasing importance of efficient vector control.

Key words: *Trypanosoma congolense*; Drug resistance, Diminazene aceturate; Isometamidium chloride; Quinapyramine sulphate; Homidium bromide

Introduction

The CEZIET* was created in 1978 and financed by the World Bank until 1984. The ultimate objective was to intensify cattle production in the pastoral zone of Samorogouan, an area of some 1400 km² of southern guinea savannah, approximately 100 km northwest of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. A high tsetse fly challenge, due to the presence of *Glossina morsitans submorsitans*, *G. palpalis gambiensis* and *G. tachinoides* and, consequently, a high prevalence of African animal trypanosomosis (AAT) was recognized as a serious constraint to profitable cattle production.

Correspondence to: P.-H. Clausen, Institute for Veterinary Medicine (Robert von Ostertag-Institute) of the Federal Health Office, Diederdsdorfer Weg 1, D-1000 Berlin 48, Germany. [Fax: +49 30 8308 2741.]

*Centre d'Encadrement des Zones d'Intensification de l'Élevage Traditionnel.

As a result, the initial cattle population, about 9000 head of Zebu, was treated four times a year with isometamidium chloride (0.5 mg/kg bw) and twice a year, in May and November, with diminazene aceturate (3.5 mg/kg bw). A suspected drug resistance led to an increase in the dosages to 1.0 mg/kg bw of isometamidium chloride and 7.0 mg/kg bw of diminazene aceturate, respectively.

Since April 1989, entomological and epidemiological surveys have been carried out in the pastoral zone of Samorogouan by the 'Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales (CRTA)'. Initially, 350 ear-tagged animals were monitored at monthly intervals. Cattle which tested positive for trypanosomes using the microcentrifugation and phase contrast buffy coat method (Murray et al., 1977), were treated with diminazene aceturate (7.0 mg/kg bw). A persistently high prevalence of AAT of up to 69% (with 44% *T. congolense*; 18% *T. vivax*; and 7% mixed infections) in July 1989, necessitated the reduction of the intervals between examinations/treatments to about 2 weeks. However, despite the frequent treatments of all positive animals with diminazene aceturate (7.0 mg/kg bw), no significant drop in the prevalence of AAT was observed. In addition, the cattle were in a very poor state of health. Calf mortality was high. This continuous high prevalence was due at least partly to the tsetse fly challenge. Nevertheless, relapsing infections could not be entirely excluded. Pinder and Authie (1984) and Authie (1984) had already described stocks of *T. congolense* which were isolated from cattle in Samorogouan in 1982 and were resistant to isometamidium. Moreover, when tested in mice, strains of *T. congolense* from Samorogouan proved to be resistant to diminazene aceturate (Authie, 1984). To evaluate the occurrence of drug-resistant populations in 1989, 20 naturally infected Zebu were transferred from Samorogouan to a fly-proof stable in Bobo-Dioulasso.

Material and Methods

Experimental groups and animals

*Experimental group 1: Drug sensitivity of *T. congolense* and/or *T. vivax* infections in cattle naturally infected in the pastoral zone of Samorogouan*

In order to carry out a preliminary study on the efficacy of various commercially available trypanocidal drugs to natural infections of *T. congolense* and/or *T. vivax*, 20 infected Zebu cattle were transferred in December 1989 from the pastoral zone of Samorogouan (Kéné Dougou) to a fly-proof stable in Bobo-Dioulasso. They were chosen from six different herds with an average prevalence of trypanosomosis of 79%. The selected cattle were of both sexes, between 3 and 6 years of age and generally in a poor state of health. Two animals collapsed and died during transport. The average packed red cell volume (PCV) of the remaining cattle varied before treatment between 19 and 22%.

*Experimental groups 2 and 3: Drug sensitivity of *T. congolense*, syringe passaged in previously unexposed, healthy Zebu bulls and Sahelian goats*

Corresponding chemotherapeutic trials were done on four 3–4-year-old Zebu bulls and 32 one-year-old male Sahelian goats, syringe infected with one primary *T. congolense* isolate from Samorogouan. The animals had been previously unex-

posed to trypanosomosis and were in good health with an average PCV of 34 and 33%, respectively. They were treated against helminth infections (Fenbendazole, 7.5 mg/kg bw) and ectoparasites (Flumethrin, 1 mg/kg bw), 14 days prior to the infection.

All experiments were carried out under fly-proof conditions.

Parasites

*Experimental group 1: Drug sensitivity of *T. congolense* and/or *T. vivax* infections in cattle naturally infected in the pastoral zone of Samorogouan*

In all Zebu, trypanosomes could be detected prior to treatment. On the day of treatment, 44.4% showed an infection of *T. congolense* and 11.1% an infection of *T. vivax*. 22.2% had a mixed infection. Haemoprotozoan parasites other than trypanosomes were not detected in thin blood films stained in Giemsa's stain.

*Experimental groups 2 and 3: Drug sensitivity of *T. congolense*, syringe passaged in previously unexposed, healthy Zebu bulls and Sahelian goats*

The *T. congolense* strain used in these experiments was derived from a primary isolate obtained from Zebu 778 from Samorogouan, after its arrival at the fly-proof stable. The primary isolate was used to infect irradiated inbred BALB/C mice, then subpassaged one time in mice, cryopreserved in liquid nitrogen and designated 'Samorogouan/89/CRTA/267.1'.

Infection

*Experimental groups 2 and 3: Drug sensitivity of *T. congolense*, syringe passaged in previously unexposed, healthy Zebu bulls and Sahelian goats*

The *T. congolense* stock (Samorogouan/89/CRTA/267.1) was expanded in irradiated inbred BALB/C mice. The experimental ruminants were infected by i.v. inoculation with blood from mice taken at the first parasitaemic peak. The number of trypanosomes administered for the Zebu bulls was $5 \cdot 10^3$ trypanosomes per kg bw and for the goats $1 \cdot 10^6$ trypanosomes per animal. All the animals developed a parasitaemia. The prepatent period varied between 6 and 18 days. One Zebu bull died on the 25th day of infection (17th day of parasitaemia) with a PCV of 19%.

Trypanocidal drugs

(1) Diminazene aceturate* was injected as a 7% (w/v) solution deep into the gluteal muscles in amounts not exceeding 20.0 ml per injection site. (2) Isometamidium chloride** was used as a 2% (w/v) solution and administered by deep intramuscular injection in the middle third of the side of the neck. Care was taken that the injection was completed before withdrawing the needle to avoid leakage into subcutaneous tissues. For the intravenous injections, a 1% (w/v) solution was prepared and injected slowly into the jugular vein within a time span of at least 10 min. (3) Homidium

*Berenil[®], Hoechst.

**Trypamidium[®], Rhône Merieux.

bromide*** was administered as a 2.5% (w/v) solution by deep intramuscular injection. (4) Quinapyramine sulphate[†] was used as a 10% (w/v) solution and injected subcutaneously.

Treatment regime

When a parasitaemia was well established or re-established, the experimental animals were treated as follows.

Experimental group 1: Drug sensitivity of T. congolense and/or T. vivax infections in cattle naturally-infected in the pastoral zone of Samorogouan

1 week after arrival at the fly-proof stable, all the cattle were treated with diminazene aceturate at 7 mg/kg bw. Relapsing animals were re-treated with homidium bromide at 1 mg/kg bw. Those which relapsed a second time received isometamidium chloride at 1 mg/kg bw (i.m.).

Experimental group 2: Drug sensitivity of T. congolense, syringe passaged in previously unexposed, healthy Zebu bulls

Three out of four Zebu bulls were treated with diminazene aceturate at 7 mg/kg bw, 3 weeks after infection.

Experimental group 3: Drug sensitivity test of T. congolense, syringe passaged in previously unexposed goats

(a) A first group of 12 goats received diminazene aceturate. Six goats were treated at 14 mg/kg bw; the remainder were treated at 17.5 mg/kg bw.

(b) In a second group, isometamidium chloride was injected intravenously. Six goats received 1.0 and 6 goats 2.0 mg/kg bw.

(c) A third group, consisting of 8 goats, was treated with quinapyramine sulphate at 5.0 mg/kg bw.

Monitoring

Blood samples were collected daily from the jugular vein and examined for packed red cell volume (PCV) and parasitaemia, using the microcentrifugation and the phase contrast buffy coat method (Murray et al., 1977). Cattle which became aparasitaemic after treatment were monitored for a 3 to 4 month period.

Results

Experimental group 1: Drug sensitivity of T. congolense and/or T. vivax infections in cattle naturally-infected in the pastoral zone of Samorogouan (Table 1)

Whereas diminazene aceturate at 7 mg/kg bw was still effective against *T. vivax*, it failed completely to cure *T. congolense* infections. When the relapsed *T. congolense* infections were treated with homidium bromide at the recommended dosage of 1 mg/kg bw, the animals remained parasitaemic or reappearance of a parasitaemia

***Ethidium[®], FBC.

[†]Trypacide 'S'[®], Rhône Mérieux.

TABLE 1

Drug-sensitivity of *T. congolense* infections in Zebu cattle naturally infected in the pastoral zone of Samorogouan

All *T. vivax* infections were cured with diminazene aceturate at 7 mg/kg bw.

	Number of cattle relapsed/treated	Mean relapse interval in days
Diminazene aceturate (7.0 mg/kg)	17/17	19.6 ± 12.8
Homidium bromide (1.0 mg/kg)	14/14	9.6 ± 8.1
Isometamidium chloride (1.0 mg/kg)	12/12	14.8 ± 15.6

occurred with a mean relapse interval of 9.6 days. Isometamidium chloride at 1 mg/kg bw also completely failed to cure the *T. congolense* infections.

Experimental group 2: Drug sensitivity of T. congolense (Samorogouan/89/CRTA/267.1) syringe passaged in previously unexposed Zebu bulls (Table 2)

When treated with diminazene aceturate at 7.0 mg/kg bw, the infections relapsed after 8.7 days.

Experimental group 3: Drug sensitivity of T. congolense (Samorogouan/89/CRTA/267.1) syringe passaged in previously unexposed goats (Table 3)

(a) In goats, diminazene aceturate failed completely to cure the infections at

TABLE 2

Drug-sensitivity of *T. congolense* (SAMO/89/CRTA/267.1) syringe passaged to previously unexposed Zebu bulls

	Number of cattle relapsed/treated	Mean relapse interval in days
Diminazene aceturate (7.0 mg/kg)	3/3	8.7 ± 1.8

TABLE 3

Drug-sensitivity of *T. congolense* (SAMO/89/CRTA/267.1) syringe passaged to previously unexposed goats

	Number of goats died/relapsed/treated	Mean relapse interval in days
Diminazene aceturate		
14.0 mg/kg i.m.	1/5/6	18.8 ± 7.4
17.5 mg/kg i.m.	0/6/6	17.0 ± 7.4
Isometamidium chloride		
1.0 mg/kg i.v.	1/5/6	13.4 ± 1.9
2.0 mg/kg i.v.	3/2/6	21.0 ± 4.0
Quinapyramine sulphate		
5.0 mg/kg s.c.	0/8/8	13.4 ± 8.3

14.0 and 17.5 mg/kg bw. One goat, in a very poor state of health when treated with 14.0 mg/kg bw, died on the 1st day after treatment.

(b) Isometamidium chloride, given intravenously at 1 mg/kg bw, had no curative effect. One goat collapsed and died shortly after treatment. At 2.0 mg/kg bw, three out of 6 goats died within 24 h after treatment. In 2 goats which survived the treatment, the trypanosomes reappeared at a mean relapse interval of 21 days. One goat was cured.

(c) Quinapyramine sulphate at 5.0 mg/kg bw failed completely to cure the infections.

Discussion

Pinder and Authie (1984) used mice to assess the resistance to isometamidium chloride of strains of *T. congolense* isolated from Samorogouan. Likewise, Authie (1984) used mice to evaluate the resistance of the same strains of *T. congolense* to isometamidium chloride and diminazene aceturate. Based on the mouse sensitivity test, *T. congolense* strains, isolated in Burkina Faso in 1982–1983, were found to be 4–8-times less sensitive to isometamidium chloride than those isolated in 1979–1980 (Pinder and Authie, 1984). Meaningful comparisons of tests using cattle and mice to assess the sensitivity of trypanosomes to trypanocides seem to be difficult to conduct. Although a mouse test may give a broad indication of the sensitivity of a strain, it cannot be used to predict curative doses for cattle (Sones et al., 1988). However, Moloo and Kutuza (1990) used the strains isolated by Authie in Burkina Faso in 1982–1983 to evaluate their resistance to trypanocides in Boran cattle. The *T. congolense* strain IL 2468, isolated in Samorogouan in 1982, was found to be resistant to the prophylactic treatment with isometamidium chloride (at 0.5 and 1.0 mg/kg bw when challenged 30 days after treatment), but sensitive to diminazene aceturate at 3.5 mg/kg bw. Our results, presented here, confirm the presence of resistance to isometamidium in trypanosome populations present in Samorogouan in 1989, 7 years after the study conducted by Pinder and Authie (1984) and, in addition show a development of resistance to diminazene aceturate.

Experimental data presented by Frommel (1988) suggest that drug efficacy is, to a certain extent, dependent on the immune status of the host. In his opinion, it is possible that immunosuppressed individuals, treated with a drug dosage that is curative in immunocompetent patients, could serve as the major source of drug-resistant trypanosomes. It is possible, therefore, that an immunosuppression due to chronic infection in the Samorogouan cattle could have influenced our results. But, our artificially infected, previously unexposed Zebu bulls and goats, all of them in a good state of health, showed response patterns to treatment which were very similar to those of the chronically infected animals.

Isometamidium chloride and diminazene aceturate are prescribed in general as a 'sanative pair' in the control of bovine trypanosomosis (Whiteside, 1960). However, there is recent evidence for the development of multiple-resistant strains of *T. congolense* isolated in the Bobo-Dioulasso region of Burkina Faso (Authie, 1984; Sones et al., 1988; Moloo and Kutuza, 1990). The present study confirms the work of the previous reports. Moreover, none of the other commercially available trypanocidal drugs had a curative effect at the manufacturers' recommended dose. These

results demonstrate, with respect to Samorogouan, the actual limitations of trying to control trypanosomosis by a chemotherapeutic or prophylactic approach. Even when treating the entire ear-tagged cattle herds in Samorogouan with isometamidium chloride (1 mg/kg bw), diminazene aceturate (14 mg/kg bw) and homidium bromide (1 mg/kg bw) at intervals of 2 weeks, no significant drop in the prevalence of AAT was observed (P.-H. Clausen et al., unpublished data).

In order to avoid tissue reactions at the injection sites after intramuscular administration and to achieve rapid, high initial blood levels of isometamidium, attempts have been made to administer the drug intravenously (Touré, 1973; Schillinger et al., 1985; Dowler et al., 1989; Sutherland et al., 1991). Our results in goats concur with the reports from Sutherland et al. (1991). Even when they were treating the *T. congolense* infected Boran cattle intravenously with 1.0 mg/kg bw, the infections were not eliminated, nor was the time to relapse of parasitaemia significantly delayed. Sutherland et al. (1991) suggested that the trypanocidal efficacy of isometamidium chloride depended not only on the concentration of the drug to which the trypanosomes were exposed, but also on the length of exposure. This exposure is significantly longer following an intramuscular treatment.

Underdosage and uncontrolled use of trypanocides due to lack of a proper diagnosis are generally considered to be the major reasons for increasing drug resistance throughout Africa. However, the prolonged and frequent use of trypanocides in high challenge areas, even when well applied, is likely to select for resistance as well. With this in mind, the problems due to drug resistance will be of serious concern in the years to come.

Efficient vector control is, therefore, becoming increasingly important. Cost-effective and nonpolluting methods to reduce tsetse flies to a sustainable level are available (Cuisance et al., 1984). The effects of different formulations of pyrethroids against tsetse flies have been evaluated under laboratory conditions and in large-scale field trials (Bauer et al., 1989). A rapid decline of AAT was observed after three treatments with flumethrin pour on for cattle in Satiri, Burkina Faso (Bauer et al., in press). Efficient tsetse fly control will lead to a reduction of the use of trypanocidal drugs. This will leave their role as an efficient means to cure the disease in case of an outbreak.

In conclusion, integrated control strategies involving both vector control and chemotherapy combined with improved herd management should be developed to make livestock production of trypanosusceptible cattle breeds in tsetse fly affected areas feasible. Considerations should be given to the possible role of trypanotolerant livestock in reducing the need for trypanocidal drug usage.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Fulani livestock owners from Samorogouan for providing experimental animals and Mr. B. Somda, Mr. Y. Meme and Mr. L. Milogo for technical assistance. We are grateful to Dr. D. Schillinger for reviewing and Mrs. D. Bouthillier for typing the manuscript. Trypacide 'S' was a generous gift of Rhône Mérieux, France. This work was supported by the German Agency for Technical Cooperation (G.T.Z.) PN 77.2227.5 and the Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire de Pays Tropicaux (IEMVT), Maisons-Alfort, France.

References

- Authie, E. (1984) Mise en évidence d'une résistance aux trypanocides parmi des souches de *Trypanosoma congolense* récemment isolées au Burkina. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop. 37, (no. spécial), 219-235.
- Bauer, B., Meyer, F. and Kaboré, I. (1989) Effects of flumethrin pour on against *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera, Glossinidae) during releases in a fly proof stable. Trop. Med. Parasitol. 40, 478-479.
- Bauer, B., Kaboré, I., Liebisch, A. and Petrich-Bauer, J. (1992) Simultaneous control of ticks and tsetse flies in Satiri, Burkina Faso, by the use of flumethrin pour on for cattle. Trop. Med. Parasitol. (in press).
- Cuisance, D., Mérot, P., Politzar, H. and Tamboura, I. (1984) Cout de l'emploi d'écrans insecticides dans la lutte intégrée contre les glossines dans la zone pastorale de Sidéradougou. Burkina Faso. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop. 37 (no spécial), 84-98.
- Dowler, M.E., Schillinger, D. and Connor, R.J. (1989) Notes on the routine intravenous use of isometamidium in the control of bovine trypanosomiasis on the Kenya coast. Trop. Anim. Hlth. Prod. 21, 4-10.
- Frommel, T.O. (1988) *Trypanosoma brucei rhodesiense*; Effect of immunosuppression on the efficacy of Melarsoprol treatment of infected mice. Exp. Parasitol. 67, 364-366.
- Moloo, S.K. and Kuzuza, S.B. (1990) Expression of resistance to isometamidium and diminazene in *Trypanosoma congolense* in Boran cattle infected by *Glossina morsitans centralis*. Acta trop. (Basel) 47, 79-89.
- Murray, H., Murray P.K. and McIntyre W.I.M. (1977) An improved parasitological technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 71, 325-326.
- Pinder, M. and Authie, E. (1984) The appearance of isometamidium resistant *Trypanosoma congolense* in West Africa. Acta trop. (Basel) 41, 247-252.
- Schillinger, D., Maloo, S.H. and Röttcher, D. (1985) The toxic effect of intravenous application of the trypanocide isometamidium (Samorin®). Zbl. Vet. Med. A. 32, 234-239.
- Sones, K.R., Njogu, A.R. and Holmes, P.H. (1988) Assessment of sensitivity of *Trypanosoma congolense* to isometamidium chloride: a comparison of tests using cattle and mice. Acta trop. (Basel) 45, 153-164.
- Sutherland, I.A., Moloo, S.K., Holmes, P.H. and Peregrine, A.S. (1991) Therapeutic and prophylactic activity of isometamidium chloride against a tsetse-transmitted drug-resistant clone of *Trypanosoma congolense* in Boran cattle. Acta trop. (Basel) 49, 57-64.
- Touré, S.M. (1973) Notes on the trypanocidal activity of isometamidium administered intravenously. Bull. Epiz. Dis. Africa 21, 1-3.
- Whiteside, E.F. (1960) Recent work in Kenya on the control of drug resistant cattle trypanosomiasis. ISCTRC, 8th meeting, Jos, Nigeria, 1960. CCTA 62, 141-154.



International Workshop
on Molecular
Epidemiology and
Evolutionary Genetics
of Pathogenic Microorganisms

June 17 - 19, 1996

Centers for Disease Control and Prevention,
U.S. Dept of Health and Human Services,
Public Health Service, Atlanta, Georgia

ORSTOM/CNRS, Montpellier, France

in antibiotic-free environments, these compensatory mutations create a genetic background which confers a strong fitness disadvantage to antibiotic-sensitive revertants at the resistance-determining locus. Using P1-transduction to create wildtype revertants in streptomycin-resistant strains containing compensatory mutations, we demonstrate that the resulting streptomycin-sensitive strains have fitness disadvantages ranging from 4 to 30% per generation relative to the resistant, compensated strains from which they derived. We consider the implications of these results for public health.

37. Comparative Genetic Diversity of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma congolense*, *Leishmania* sp., *Candida albicans* and *Mycobacterium tuberculosis* Determined Using Multiprimer RAPD Fingerprinting.

Issa Sidibe, Anne-Laure Banuls, Sylvain Brisse and Michel Tibayrenc.

UMR CNRS/ORSTOM 9926 Genetique Moleculaire des Parasites et des Vecteurs Centre ORSTOM - 911 av. Agropolis BP5045 34032 MONTPELLIER Cedex1, France.

Until now, the genetic diversity of many species of microorganisms has been estimated by various molecular techniques. However, because they have almost always been studied separately, it is difficult to get a clear idea of the relative heterogeneities of different species. Here, we compared the within-species genetic diversity of various microorganisms with a standardized method, the random amplified polymorphic DNA (RAPD). One hundred primers were used to analyse in parallel the heterogeneity of three trypanosomatids (*Trypanosoma cruzi*, *T. congolense* and *Leishmania* sp.), of the yeast *Candida albicans* and of *Mycobacterium tuberculosis*. Within each species, stocks were selected according to previous studies to be representative of its whole genetic variability. The RAPD polymorphism revealed showed that the within-species genetic diversity is very different from one species to another. For example, *T. congolense* is much more heterogeneous than *T. cruzi*, which in turn contains genetic groups as distant as *Leishmania* species that are attributed to different species-complexes. Our samples of *C. albicans* and *M. tuberculosis* were less heterogeneous. Nevertheless, *M. tuberculosis* exhibited a notable genetic diversity, which is not in agreement with previous isoenzyme studies produced by others. The high number of primers tested allowed us to find, for each microorganism included in the study, primers of particular interest. For example, we could find many bands specifically amplified from all stocks within a species, or within certain subdivisions of it. It will be possible to use such bands to design specific molecular probes useful for epidemiological studies. Other primers allowed us to discriminate between very closely related genetic groups, and could be used as polymorphic markers in population genetics studies of such groups.

38. Molecular Characterization of the Cattle Pathogen *Trypanosoma congolense* by Multiprimer RAPD Fingerprinting.

I. Sidibe, S. Brisse, A-L Banuls and M. Tibayrenc

UMR CNRS/ORSTOM: "Genetique moleculaire des parasites et des vecteurs", ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France

T. (Nannomonas) congolense and *T. (N.) simiae* are regarded as separate species, largely because of their markedly different behaviour in vertebrates. *T. congolense* is a major pathogen of domestic ruminants but only produces a mild infection in pigs (Killick-Kendrick and Godfrey, 1963; Hoare, 1972) while *T. simiae* causes an acute pathogenicity to domestic pigs. The last new species, *T. godfreyi*, described by McNamara et al (1993) causes a subacute pathogenicity to pigs. In the present study 55 stocks of *T. (Nannomonas)* sp. isolated in East, South and West Africa were characterized by RAPD fingerprinting. Twenty-four out of 120 decamer primers were selected for the final analysis. The results show a perfect correlation between isoenzyme data and RAPDs but the RAPD results show a higher genetic diversity within the *T. congolense* group. The savannah group and the forest group are more closely related, while the Kilifi group is more distant from them. A new genotype, different from any of the species studied here, was discovered. Its species attribution will need further genetic characterization. The genetic diversity within the *T. congolense* stocks was considerable, higher than any of the other species

studied in parallel with the same technique in our group (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*). Many specific fingerprint patterns evidenced in the present study will allow sharp strain characterization for epidemiological studies, while several RAPD fragments specific of species or species subdivisions will be fully characterized in order to design specific probes and PCR diagnoses.

3. Multiple Primer RAPD Analysis for Studying Genetic Diversity and Molecular Taxonomy of *Leishmania* spp.

A-L. Banuls, I. Sidibe, S. Brisse, J. Arevalo *, D. Le Ray **and M. Tibayrenc

UMR CNRS-ORSTOM 9926: Genetique Moleculaire des Parasites et des Vecteurs, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France. * Universidad Peruana Cayetano Heredia, AP 4314, Lima 100, Peru. ** Institut de Medecine tropicale "Prince Leopold", B-2000 Antwerpen, Belgium.

In order to study the genetic diversity of the *Leishmania* genus., random amplification of polymorphic DNA (RAPD) was performed on a set of 18 *Leishmania* stocks representative of the main species of the genus. We tested on these samples one hundred decamer primers in parallel with samples of other microorganisms (*Trypanosoma cruzi*, *T. congolense*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*). Several lines of results have been reached: (i) Twenty-three primers gave easily scoreable multiband profiles. The combined use of a fair set of these primers will make it possible to perform both highly discriminative strain identification and population genetic analyses. (ii) Some of them showed a synapomorphic specificity, that is to say, they can specifically identify given phylogenetic subdivisions, either at a subspecific or at a specific level. For example, one primer showed a profile specific of *Leishmania peruviana*. Another primer revealed a different profile between *L. donovani* and *L. infantum*. (iii) Lastly, some primers appeared to be linked with specific virulence patterns. Some of them, for example, seemed to be able to distinguish the stocks isolated from mucocutaneous forms from the stocks isolated from cutaneous forms for *L. braziliensis*. The great interest of the RAPD method in comparison with isoenzyme analysis is to allow the purification and sequence characterisation of those fragments which are of a specific interest, for designing probes and PCR diagnoses. (iv) The comparison with other microorganisms studied in parallel with the same technique gave a clear and reliable idea of the actual phylogenetic divergence among *Leishmania* taxa.

along with PCR and DNA sequencing were used to examine F related plasmids among *S. enterica* isolates. The F plasmid genes examined were *finO*, *traD*, *repA* and *traY*. Comparative sequence analysis of the four genes showed them to be homologous to those found in *E. coli* natural isolates. Therefore it appears that *S. enterica* and *E. coli* share an overlapping plasmid pool which demonstrates the evolutionary significance of conjugation in the histories of these important bacterial species. Our survey found the occurrence of F-related plasmids in *Salmonella* to be slightly less frequent than in *E. coli* natural isolates.

8. Multiprimer Rapid Fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*, the Agent of Chagas' Disease.

Sylvain Brisse, Anne-Laure Banuls, Issa Sidibe, Christian Barnabe and Michel Tibayrenc
UMR CNRS/ORSTOM 9926 "Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs Centre ORSTOM - 911 av. Agropolis
BP5045 34032 MONTPELLIER Cedex1, France.

Natural populations of *Trypanosoma cruzi* have been shown to be genetically subdivided into natural clones which extend over vast geographic areas and coexist in sympatry without any apparent genetic exchange (Tibayrenc et al. 1986). We have analyzed 49 stocks of *T. cruzi* and 7 suitable *Schizotrypanum* outgroups with 20 highly resolutive RAPD primers. Phenetic and phylogenetic analysis of the results show the marked genetic structure of the parasite in a few distinct genetic groups equating to clonal lineages, confirming previous MLEE and RAPD data. A parallel analysis of *Leishmania* stocks showed that the genetic divergence between some groups of *T. cruzi* is greater than that between some species complexes within the *Leishmania* genus. Some stocks presented multiprimer RAPD patterns that were intermediate between that of two other stocks, suggestive of a hybridization event. For each main group of *T. cruzi*, certain primers amplified bands which were specific for the stocks within the group and which were not amplified outside the group. Molecular analysis of some of these bands should allow the design of specific probes and diagnostic PCR primers for epidemiological purposes.

genetic groups in each taxon using sub-specific probes.

► Genetic Structure and Evolution of *Trypanosoma cruzi*, the Agent of Chagas Disease, as Revealed by Multiprimer RAPD Analysis: Clonality vs. Sexuality.

Brisse Sylvain, Banuls Anne-laure, Sidibe Issa, Barnabe Christian and Tibayrenc Michel.

UMR CNRS/ORSTOM 9926 "Genetique Moleculaire des Parasites et des Vecteurs Centre ORSTOM - 911 av. Agropolis BP5045 34032 MONTPELLIER Cedex1, France.

Trypanosoma cruzi natural populations have been shown to be highly heterogeneous and subdivided into a number of genetically distant clonal lineages. We have selected 20 highly resolutive primers, out of 120 tested, to analyse 50 stocks representative of the major genetic subdivisions of the parasite. Stocks were isolated from diverse hosts and from different geographic areas. Other trypanosomatids, including *Leishmania spp.* and *Trypanosoma congolense*, were analysed in parallel in order to directly compare their genetic diversity with *T. cruzi*. The results show the marked genetic structuration of *T. cruzi* in a few distinct genetic groups, confirming previous MLEE and RAPD data. These groups are interpreted as clonal lineages. RAPD markers specific for each group are numerous and will be used to develop probes for specific diagnostic purposes. The huge genetic heterogeneity of *T. cruzi* is confirmed by the divergence between lineages of this parasite which is similar to that observed between species, and even species complexes, within the *Leishmania* genus. The phylogenetic relationships between the *T. cruzi* groups was investigated by multivariate and phylogenetic analysis. The monophyly of each group appears robust, but the hierarchical relationships between groups is problematic. Moreover, some groups display features that could be interpreted as the result of a hybridization event between strains of two other groups. These findings suggest the possibility of an evolutionary process involving both occasional recombination leading to new genotypes and clonal evolution of successful lineages.

British Society for Parasitology

Trypanosomiasis and Leishmaniasis Seminar

3rd - 6th September 1995

University of Glasgow



Abstracts

56 **MOLECULAR CHARACTERISATION OF *T. (NANNOMONAS) CONGOLENSE* BY MULTIPRIMER RAPD ANALYSIS**

I. Sidibé, A-L Banuls, S. Brisse & M. Tibayrenc. UMR CNRS-ORSTOM 9926 Laboratoire de Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs, ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier cédex 01, France.

16 *Trypanosoma congolense*, together with 2 *T. simiae* stocks and 2 *T. godfreyi* stocks were submitted to RAPD analysis with 100 different decamer primers. Outgroup species (*T. cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania spp.*) have been added. Many primers gave reproducible fingerprint patterns usable for strain identification, while other ones were able to specifically distinguish *T. congolense* from any other species. Moreover, other primers were specific of the whole *Nannomonas* group. Lastly, some primers made it possible to specifically label the different subdivisions (savannah, forest and kilifi) of *T. congolense*. Work is in hand to use on a wide scale multiprimer RAPD fingerprinting to study the population structure and epidemiology of *T. congolense* in West Africa.

12 MULTIPRIMER RAPD FINGERPRINTING FOR EVOLUTIONARY STUDIES IN *TRYPANOSOMA CRUZI*

▶ S Brisse, I. Sidibé, A.-L. Bañuls, C Barnabé and M. Tibayrenc. UMR CNRS-ORSTOM 9926: Laboratoire de Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs, ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier, France.

18 *Trypanosoma cruzi* stocks previously characterised by Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) and selected to be representative of the whole genetic variability of the parasite, were screened for 100 different decamer RAPD primers. Outgroup species (*T. cruzi marinkellei*, *T. rangeli*, *Leishmania spp.*) were added in the sample. In confirmation with previous results obtained from both MLEE and preliminary RAPD typing, two main phylogenetic clusters could be distinguished. One of them included the formerly-described zymodeme I, while the other one included the formerly-described zymodemes II and III (Miles *et al.*, 1979). The various primers tested made it possible to reach two main lines of results. (i) Many primers gave highly discriminative fingerprinting profiles usable for both strain identification and population genetic analyses. (ii) Other primers were less variable, and showed a synapomorphic specificity, in that they were able to identify specifically given phylogenetic subdivisions: some of these primers were monomorphic in the whole *T. cruzi* species and were able to distinguish it from outgroup species. As an example more than 30 fragments were shared by all *T. cruzi* stocks and were absent *T. cruzi marinkellei*. Other primers specifically labelled subdivisions within *T. cruzi*. As examples, 10 primers showed profiles specific of the first main cluster of strains, while 15 other primers were specific of the second cluster.

7 MULTIPLE PRIMER RAPD ANALYSIS FOR *LEISHMANIA* STRAIN IDENTIFICATION AND MOLECULAR TAXONOMY

A-I. Banuls, S. Brisse, I. Sidibe, C. Arevalo ¹, D. Le Ray ² & M. Tibayrenc. UMR CNRS-ORSTOM 9926: Laboratoire de Genetique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France. ¹Universidad Peruana Cayetano Heredia, AP 4314, Lima 100, Peru. ² Institut de Medecine tropicale "Prince Léopold", B-2000 Antwerpen, Belgium)

The RAPD method of DNA fingerprinting is usually used with a limited number of primers. In order to increase its discriminatory power, we have assayed one hundred decamer primers on a set of 18 *Leishmania* stocks representative of the main species of the genus. Several lines of results have been reached: (i) Many primers gave easily scoreable multiband profiles. The combine use of a fair set of those primers will make it possible to perform both highly discriminative strain identification and population genetic analyses. (ii) Other primers showed a synapomorphic specificity, that is to say: they can specifically identify given phylogenetic subdivisions, either at a subspecific or at a specific level. As examples, one primer showed a profile specific of *Leishmania peruviana*. Another primer revealed a different profile between *L. donovani* and *L. infantum*. (iii) Lastly, some primers appeared to be linked with specific virulence patterns. As an example, some of them seemed to be able to distinguish between mucocutaneous forms and cutaneous forms for *L. braziliensis*. The great interest of the RAPD method by comparison with isoenzyme analysis is to allow the purification and sequence characterisation of those fragments that have a specific interest, for designing probes and PCR diagnoses. Work is in hand to apply the multiple primer RAPD analysis on a broader range of *Leishmania* stocks, in order to confirm the above summarised results.

This work was supported by an EEC Avicenne grant n°AVI*CT92-0013 and an EEC STD3 grant n° TS3 *-CT92-0129.

RESUME

Trypanosoma congolense est une espèce de protozoaire parasite, qui est un des responsables majeurs de la trypanosomose animale sévissant en Afrique. Il fait partie du sous-genre *Nannonomas*, de la famille des *Trypanosomatidae*. Selon la taxonomie actuellement en vigueur il se subdivise en 3 groupes écogéographiques appelés: « Savannah », « Forest », et « Kilifi ».

Notre travail a eu pour objectif d'étudier la variabilité génétique de ce parasite par électrophorèse multilocus d'isoenzymes et par amplification de manière aléatoire de l'ADN ou Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), et surtout, d'appliquer à l'analyse de ces données les méthodes de la génétique de l'évolution. Nous avons analysé à cet effet 49 stocks d'origines géographiques diverses avec 18 systèmes isoenzymatiques polymorphes et 23 amorces RAPD. Nous avons d'abord commencé par mettre au point un milieu de culture qui permet de maintenir de façon pérenne *T. congolense in vitro*. Les résultats obtenus sur les analyses génétiques corroborent la subdivision actuelle de *T. congolense* en 3 groupes distincts. Dans l'analyse phylogénétique, *T. congolense* n'apparaît pas comme un groupe monophylétique distinct des autres espèces incluses dans notre analyse (*T. simiae*, *T. godfreyi*). Il est impossible de savoir si ce résultat est dû au fait que le niveau de résolution des isoenzymes et des RAPD est mal adapté pour étudier des niveaux de divergence phylogénétique aussi importants (horloge moléculaire trop rapide), ou si *T. congolense* est un groupe réellement polyphylétique.

Nous avons comparé la variabilité RAPD de *T. congolense* avec celles d'autres parasites voisins (*Trypanosoma brucei* sensu lato, agent de la trypanosomose africaine, *T. cruzi*, agent de la maladie de Chagas, et diverses espèces de *Leishmania*, agents des leishmanioses). La diversité phylogénétique intraspécifique de *T. congolense* est apparue très supérieure à celle de *T. brucei* s.l., supérieure à celle de *T. cruzi*, et comparable à celle qu'on observe pour des espèces de *Leishmania* radicalement différentes les unes des autres.

De nombreux caractères génétiques sont apparus comme spécifiques de subdivisions phylogénétiques données, soit au niveau de l'espèce, soit au niveau subsppécifique (caractères synapomorphes). Ceci a été observé pour les isoenzymes et pour les RAPD. Dans ce dernier cas, les fragments impliqués pourront être isolés et séquencés, dans le but d'élaborer des sondes et des diagnostics PCR spécifiques.