

NOUVELLE TECHNIQUE DE PREPARATION DU SANG, APPLICABLE SUR LE TERRAIN, POUR LE DIAGNOSTIC DES TRYPANOSOMES HUMAINES ET ANIMALES PAR P.C.R.

PENCHENIER L¹, DUMAS V², GREBAUT P³, REIFENBERG JM³, CUNY G²

RESUME

La détection des trypanosomes dans le sang est difficile : comparée aux techniques classiques de la parasitologie, la PCR peut apporter la sensibilité et la spécificité requises. Cependant, l'amplification directe dans le sang est inhibée par des dérivés de l'hémoglobine. Nous avons donc développé une méthode simple et efficace pour détecter 1 trypanosome dans 1 ml de sang, sans purification préalable d'ADN. Cette méthode a été appliquée ensuite sur les intestins de glossines. Cette technique semble très prometteuse pour les problèmes de santé humaine et animale, car elle peut être utilisée dans les conditions de terrain et peut faciliter grandement les études épidémiologiques.

SUMMARY

Detection of Trypanosoma in blood is difficult: PCR technology can bring the required sensitivity and specificity compared to classical methods of the parasitology. However, direct amplification from blood is inhibited by haemoglobin derivatives. We have then developed a simple and efficient technique to detect 1 trypanosome in 1ml of blood and applied it for detection of parasites in midguts of tsetse flies, without DNA purification. This technique can be really useful for human and animal health because it can be easily performed in field conditions and can greatly facilitate epidemiological studies.

INTRODUCTION

Le diagnostic de certitude des trypanosomoses dans le sang est souvent très difficile, soit à cause d'une parasitémie indécélable, soit à cause des limites des techniques parasitologiques elles-mêmes. La centrifugation sur mini colonnes échangeuses d'anions (mAEC) (Lanham et Godfrey, 1988) nécessite du sang récemment prélevé : c'est une technique délicate peu utilisée dans les dépistages de masse. La

1. Laboratoire de Recherche sur les Trypanosomoses - OCEAC - BP 288 Yaoundé - Cameroun. e-mail: pencheni@oceac.orstom.cm
2. Laboratoire de Parasitologie et d'Entomologie Moléculaires - ORSTOM - 911 Avenue Agropolis - BP 5045 - 34032 Montpellier Cedex 1 - France.
3. Laboratoire de pathologie tropicale - CIRAD/EMVT - 911 Avenue Agropolis - BP 5045 - 34032 Montpellier Cedex 1 - France.
4. Laboratoire des Rétrovirus - ORSTOM - 911 Avenue Agropolis - BP 5045 - 34032 Montpellier Cedex 1 - France.

centrifugation sur tubes capillaires (CTC) (Woo, 1971) d'emploi facile, nécessite également du sang frais (75 µl) et manque de sensibilité (on peut, en théorie, mettre en évidence 1 trypanosome pour 75 µl de sang, mais en pratique il faut une parasitémie bien supérieure pour rendre un résultat positif). Or ce diagnostic parasitologique est indispensable, tant pour décider du traitement des malades que pour la compréhension de certains aspects épidémiologiques de la trypanosomiase humaine africaine (THA) ou des trypanosomoses animales (en particulier l'étude du réservoir animal de la THA, la circulation du parasite, la trypanotolérance...).

La Polymerase Chain Reaction (PCR) pourrait être un excellent outil pour le diagnostic des trypanosomoses, mais son application sur le sang n'est pas réalisable du fait des dérivés de l'hémoglobine qui inhibent la réaction. Pour des raisons analogues, l'emploi direct de cette technique sur le tube digestif des glossines est délicat. La PCR n'est en fait utilisée que pour la mise en évidence



d'une infection des pièces buccales (probocis) ou des glandes salivaires des mouches (Gibson *et al.*, 1988 ; Masiga *et al.*, 1992).

Pour pallier ces problèmes, nous avons mis au point une technique permettant de détecter, par PCR, 1 trypanosome dans 1 ml de sang, sans purification préalable de l'ADN. Cette technique de réalisation extrêmement simple permet de conserver les prélèvements dans les conditions de terrain et de les faire traiter ultérieurement au laboratoire. Nous l'avons également adaptée pour la détection des trypanosomes dans les tubes digestifs de glossines. Les perspectives offertes par cette technique sont très nombreuses, tant en médecine humaine ou vétérinaire qu'en entomologie.

MATERIELS ET METHODES

1. Le sang

Le sang d'un volontaire exempt de trypanosomiase a été prélevé sur des tubes secs et sur des tubes contenant de l'anticoagulant (EDTA). Les prélèvements ont été aliquotés dans des tubes de 1 ml et des trypanosomes (*Trypanosoma brucei gambiense*, souche ITMAP 1841) vivants ont été ajoutés ; leur nombre a été déterminé par dilutions limites ou par clonages avec un micromanipulateur.

Chaque échantillon a été traité soit immédiatement, soit après conservation pendant une semaine à 4°C, avec un kit commercial, Ready AMP™ Genomic Purification System (Promega®, Madison, WI, USA), selon le protocole suivant : à chaque échantillon de 1 ml de sang trypanosomé on ajoute 1 ml d'eau stérilisée. Ce mélange est incubé à température ambiante et agité avec un vortex 5 à 10 secondes toutes les 2 mn pendant 10 mn puis centrifugé à 15.000 rpm pendant 2 mn. Le surnageant est retiré délicatement et 100 µl de résine, préalablement resuspendue par agitation magnétique sont ajoutés. L'ensemble est agité énergiquement afin de resuspendre la totalité du culot.

L'échantillon ainsi préparé est incubé à 56°C pendant 20 mn puis agité au vortex 5 à 10 secondes et placé 8 mn à 100°C.

Après ébullition, l'échantillon est à nouveau agité au vortex 5 à 10 secondes puis centrifugé à 15 000 rpm pendant 2 mn. Le surnageant contenant l'ADN peut être directement traité par PCR ou conservé à 4°C ou

- 20°C.

L'ensemble de la préparation dure environ 45 minutes.

2. Les tubes digestifs de glossines

Nous avons utilisé des glossines (*Glossina morsitans morsitans*) de l'insectarium commun CIRAD/ORSTOM. Ces glossines ont été nourries sur une souris parasitée par *Trypanosoma congolense* (type Savannah, stabilat Satiri/87/CRTA/235) ou sur un lapin exempt de trypanosomes pour les mouches témoins. Sept jours après les glossines ont été disséquées. Pour chaque mouche nourrie sur souris, le tube digestif a été examiné au microscope. Entre chaque dissection de mouche, les instruments ont été soigneusement nettoyés afin d'éviter toute contamination par de l'ADN de trypanosome d'une glossine à l'autre. Tous les intestins ont été placés séparément dans des tubes contenant 50 µl de sérum physiologique. Dans chaque tube 100 µl de résine ont été ajoutés et le protocole de préparation décrit plus haut a été appliqué.

3. La PCR

La PCR a été réalisée dans un volume final de 50 µl contenant du tampon Cetus 1x, 20 pmoles de chaque amorce, 200 µM de dNTPs, 10 ml de l'échantillon à amplifier et 1 unité de Taq DNA polymérase (Perkin-Elmer®, Norwalk, CT, USA). L'amplification s'est faite sur Techne PHC-3 (Techne®, Cambridge, UK) ; 40 cycles ont été effectués avec, par cycle : une phase de dénaturation à 94°C de 30 s, une phase d'appariement des amorces à 60°C (*T. brucei sl.*) ou 67°C (*T. congolense savannah*) de 30 s et une phase de polymérisation à 72°C de 1 mn. Après élongation finale à 72°C pendant 5 mn, 10 ml des produits d'amplification ont été déposés et mis à migrer dans un mini gel d'agarose à 1% contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. Le résultat de l'électrophorèse est photographié sous lumière UV.

Les amorces de *T. brucei sl.* et *T. congolense savannah* sont celles décrites par Masiga *et al.*, 1992.

RESULTATS

1. Dans le sang

Dans un premier temps nous avons utilisé du sang auquel on avait ajouté, par dilutions limites, de 5 à 100 trypanosomes. Ce sang a été immédiatement traité selon notre technique. Après PCR et migration,

les fragments de 164 paires de bases (pb), spécifiques de l'amplification de l'ADN satellite de *T. brucei* sl., ont été observées pour toutes les dilutions (résultats non montrés). Nous avons alors cloné des trypanosomes par micromanipulation (de 1 à 3) et les avons placés dans le sang qui a été également traité immédiatement. Les résultats sont montrés figure 1. On voit clairement la sensibilité et la reproductibilité de la technique puisque :

- a. la présence d'un seul trypanosome est détectable ;
- b. le sang non parasité ne donne pas de bandes artéfactuelles .

Quand trois parasites sont présents, on observe une faible bande correspondant à l'amplification de dimères de l'unité de répétition, comme pour l'ADN témoin : l'amplification d'oligomères est due à une plus forte concentration d'ADN (Masiga *et al.*, 1992). Dans un deuxième temps, afin de nous mettre dans les conditions de terrain, nous avons différé le traitement des échantillons d'une semaine. Compte tenu des contraintes de prélèvement et de conservation dans des situations de terrain, nous avons utilisé du sang recueilli sur des tubes secs ou sur EDTA. Après introduction dans ce sang de 1 à 4 trypanosomes (clonage par micromanipulation), les échantillons ont été conservés à 4°C. Au bout d'une semaine nous avons traité les prélèvements sur EDTA conformément au protocole. Les caillots présents dans les échantillons prélevés sur tubes secs ont été préalablement dilacérés mécaniquement avec une pipette. Les résultats sont montrés figure 2. La bande de 164 pb est visible pour chaque échantillon. Les prélèvements sur tubes secs donnent des bandes moins intenses (puits 4 et 5), notamment au niveau des bandes oligomériques, parce que de l'ADN de trypanosome reste dans le caillot. Les 2 modes de prélèvements permettent donc la mise en évidence d'ADN de trypanosomes dans du sang conservé à 4°C; cependant d'un point de vue pratique et pour la qualité de l'amplification, il est préférable d'utiliser du sang prélevé sur anticoagulant.

2. Dans le tube digestif des glossines

Cinq mouches ténérales, nées le même jour, ont été nourries sur souris infectée et 6 autres sur lapin sain (mouches témoins). Une semaine après, la dissection a révélé que seules 2 des mouches nourries sur souris étaient parasitées, les 3 autres étant négatives à l'examen microscopique. Tous les tubes digestifs des

mouches nourries avec du sang parasité et des mouches témoins ont été conservés et traités comme décrit précédemment. Dans le tube digestif de l'une des mouches témoins on a ajouté une centaine de trypanosomes immatures (concentration obtenue par dilution limite) provenant du tube digestif d'une des 2 mouches positives. Les résultats sont montrés figure 3. Une bande de 316 pb (taille attendue pour l'amplification de l'unité de répétition du satellite de *T. congolense savannah*) est visible pour les 2 mouches positives (n° 1 et 2 correspondant aux puits 2 et 3) ainsi que pour la mouche et témoin à laquelle une centaine de trypanosomes ont été ajoutés (puits 4). Il est intéressant de constater que sur les 3 mouches nourries sur la souris parasitée et négatives à l'examen microscopique, l'une d'entre elles est positive à la PCR. Les 2 autres sont négatives comme d'ailleurs toutes les mouches témoins (résultat non montré). On peut donc détecter et identifier par PCR des trypanosomes immatures, non décelables à l'examen microscopique.

DISCUSSION

Si l'on dispose d'amorces spécifiques, la PCR permet une détection spécifique et sensible d'ADN des différentes espèces de trypanosomes. Jusqu'à présent, du fait des inhibitions liées à l'hémoglobine, la PCR sur le sang total ou sur le tube digestif des glossines était difficile et peu fiable sauf après extraction de l'ADN (technique longue et minutieuse) et pour des concentrations parasitaires facilement décelables par les techniques parasitologiques classiques.

La technique que nous proposons, de par sa simplicité (ne nécessitant pas d'extraction d'ADN), sa sensibilité (1 trypanosome par ml de sang) et sa spécificité (d'espèce), ouvre de grandes possibilités aux études sur les trypanosomoses.

Le dépistage de masse de la trypanosomiase humaine africaine (THA) se fait en 2 temps. D'abord un dépistage sérologique par Card Agglutination Test for trypanosomiasis (CATT) (Magnus *et al.*, 1978) puis une recherche du parasite par CTC ou mAEC. Si celui-ci est mis en évidence, on effectue une ponction lombaire pour définir le stade de la maladie et donc le traitement (Penchenier et Jannin, 1991). Il s'avère que dans de nombreux cas le parasite n'est pas mis en évidence alors que le sujet est suspect biologiquement (Penchenier *et al.*, 1991). Du fait de la toxicité du

Mélarsozol et conformément aux recommandations de l'O.M.S. le traitement ne sera commencé que lorsque le parasite sera mis en évidence ce qui peut aboutir au maintien d'un réservoir humain non négligeable dans les foyers prospectés. Grâce à la technique proposée on peut aisément prélever le suspect sur le terrain, conserver le prélèvement jusqu'à la fin de la mission et l'analyser au laboratoire. Si la PCR est positive le dispensaire local pourra être rapidement informé et le malade traité évitant ainsi qu'il soit source de contamination pour son entourage.

Cette technique devrait également faciliter les études épidémiologiques, en particulier celles sur le réservoir animal (Mehlitz, 1986). Le porc, réservoir potentiel de la THA, vivant au contact de l'homme, est souvent polyparasité. Dans le cas d'une association *T. brucei sl.*, *T. congolense savannah*, ce dernier masque fréquemment *T. brucei sl.* Le seul moyen actuel pour mettre *T. brucei sl.* en évidence est la mise en culture du sang à l'aveugle sur milieu synthétique comme le KIVI (Kit for *in vitro* Isolation of trypanosomes, Aerts *et al.*, 1992) ou sur rongeur de laboratoire. C'est, sur le terrain, un travail astreignant, délicat et onéreux, qui se conclue souvent par un échec. La PCR permet de faire le diagnostic d'espèce des parasites rencontrés et, en cas d'études au niveau de la sous espèce (*T. b. brucei*; *T. b. gambiense*; *T. b. rhodesiense*), de cibler les échantillons sanguins à mettre en culture pour l'identification sub-spécifique (par électrophorèse isoenzymatique par exemple).

En entomologie, la possibilité d'identifier l'espèce des trypanosomes immatures trouvés dans le tube digestif des glossines va également permettre des études épidémiologiques plus fines, particulièrement en ce qui concerne les lieux de contamination des mouches ténérales.

Enfin, en médecine vétérinaire, le champ d'action de la PCR est très vaste. Elle peut être utilisée dans des études sur la trypanotolérance où les parasitémies sont souvent indécélables, dans des études sur les polyparasitismes, pour la comparaison d'un certain nombre de tests comme le test ELISA, dans la surveillance des troupeaux.

Remerciements

Nous remercions JL Frézil et D Cuisance pour l'aide et les conseils qu'ils nous ont apportés.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Aerst D, Truc P, Penchenier L, Claes Y, Le Ray D. A kit for *in vitro* isolation of trypanosomes in field : first trial with sleeping sickness patients in the Congo Republic. *Trans Roy Soc Trop Med and Hyg* 1992 ; 86 : 394-5.
- 2- Glibson WC, Dukes P, Gashumba JK. Species-specific DNA probes for identification of African trypanosomes in tsetse flies. *Parasitology* 1988 ; 97 : 63-73.
- 3- Lanham SM, Godfrey DG. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Expl Parasit* 1970 ; 28 : 521-34.
- 4- Magnus E, Vervoort T, Van Mervenne N. A card agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for serological diagnosis of *Trypanosoma b. gambiense* trypanosomiasis. *Ann Soc belge Méd trop* 1978 ; 58 : 169-76.
- 5- Masiga DK, Smith AJ, Hayes P, Bromidge TJ, Gibson WC. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Internat Journal for Parasitol* 1992 ; 22 : 909-18.
- 6- Mehlitz D. Le réservoir animal de la maladie du sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense*. Etudes et Synthèses de l'IEMVT 1986 ; 18 : 156 pp.
- 7- Moser DR, Cook GA, Ochs DE, Bailey CP, Mckane MR, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology* 1989 ; 99 : 57-66.
- 8- Penchenier L, Jannin J, Moulija-Pelat JP, Elfassi De La Baume F, Fadat G, Chanfreau B, Eozenou P. Le problème de l'interprétation du CATT dans le dépistage de la trypanosomiase humaine à *Trypanosoma brucei gambiense*. *Ann Soc belge Méd Trop* 1991 ; 71 : 221-8.
- 9- Penchenier L, Jannin J. Le traitement de la Trypanosomose Humaine Africaine à *Trypanosoma brucei gambiense*. (in : Some new prospects in epidemiology and fight against Human African Trypanosomiasis by E. Authie *et al.*). *Research and Reviews in Parasitol* 1991 ; 51 : 29-46.
- 10- Woo PTK. Evaluation of the hæmatocrite centrifuge and other techniques for the field diagnosis of human trypanosomiasis and filariasis. *Acta trop* 1971 ; 28 : 298-303.

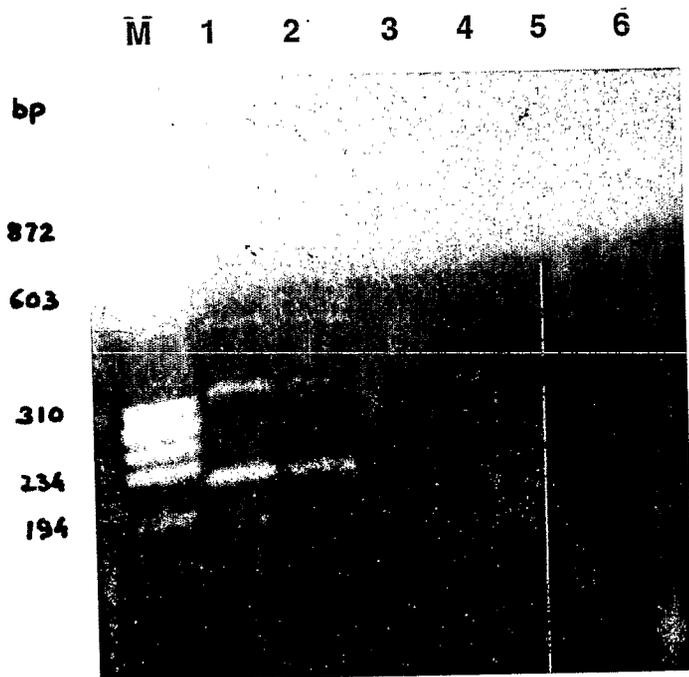


Figure 1 : amplification de *T. brucei* dans 1 ml de sang. Marqueur de taille (M), ϕ x 174/HaeIII ; 1:3 trypanosomes ; 2 : 2 trypanosomes ; 3 et 4 : 1 trypanosome ; 5 : sang non parasité ; 6 : contrôle négatif de la PCR ; 7 : 10 pg d'ADN de *T. brucei*.

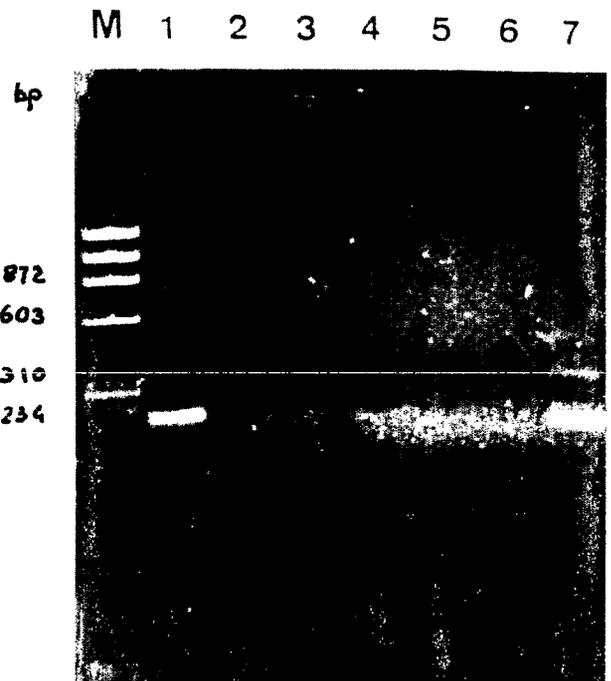


Figure 2 : amplification de *T. brucei* dans le sang conservé à 4°C. Marqueur de taille (M), ϕ x 174/HaeIII ; 1 : 4 trypanosomes ajoutés dans 1 ml de sang prélevé sur tube EDTA ; 2 : 1 trypanosome ajouté dans 1 ml de sang prélevé sur tube EDTA ; 3 : contrôle négatif de la PCR ; 4 : 4 trypanosomes ajoutés dans 1 ml de sang prélevé sur tube sec ; 5 : 1 trypanosome ajouté dans 1 ml de sang prélevé sur tube sec ; 6 : 10 pg d'ADN de *T. brucei*.

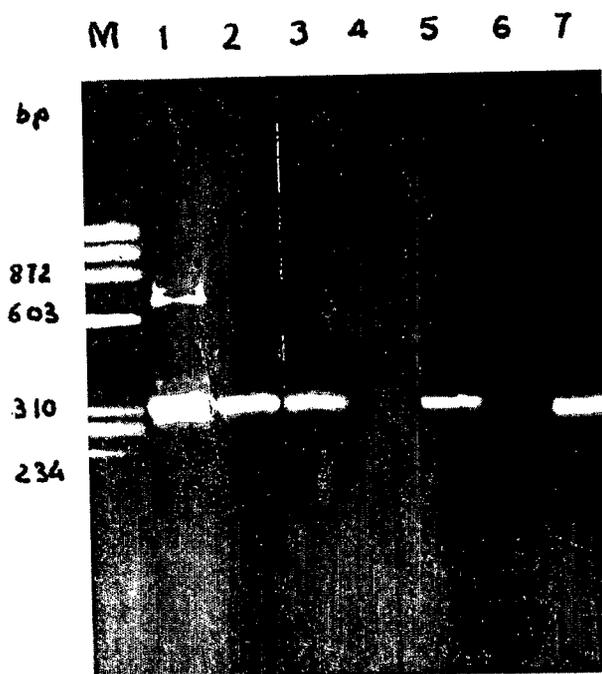
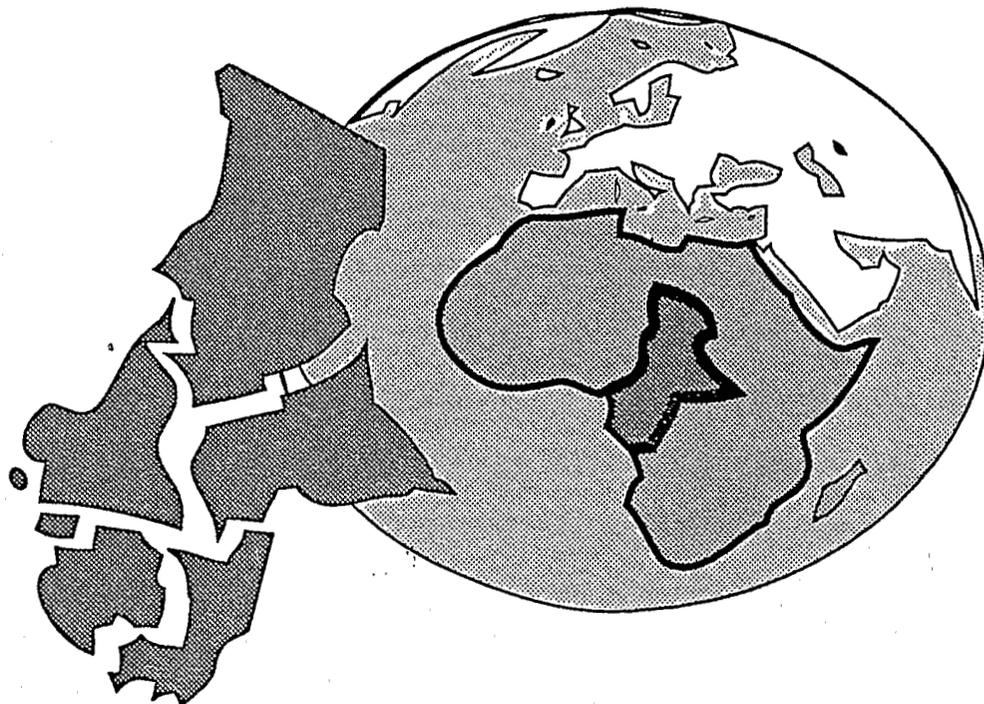


Figure 3 : amplification de *T. congolense* dans l'intestin de glossines. Marqueur de taille (M), ϕ X 174/HaeIII ; 1 et 2 : intestins de glossines parasitées ; 3 : intestin de glossines non infectées avec environ 100 trypanosomes ajoutés ; 4, 5 et 6 : intestin de glossines négatives à l'observation microscopique ; 6 : contrôle négatif de la PCR ; 7 : 10 pg d'ADN de *T. congolense*.



Le BULLETIN

de liaison et de documentation

de l'OCEAC

MODAE = D_D FRA

COTE =
PM 253



Volume 29(4) : 4^{ème} trimestre 1996

4 DEC. 1996



ORGANISATION DE COORDINATION POUR LA LUTTE
CONTRE LES ENDEMIES EN AFRIQUE CENTRALE

SECRETARIAT GENERAL B.P. 288 YAOUNDE REPUBLIQUE DU CAMEROUN
TEL : 237 23 22 32 FAX : 237 23 00 61 TELEX : 8411 KN