



**UNIVERSITE MONTPELLIER II**  
**-SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC-**

**Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes**

**Mémoire d'initiation à la recherche**

**année 1998/1999**

**APPORTS DE LA TECHNIQUE PCR DANS LE  
DIAGNOSTIC ET L'IDENTIFICATION DES  
TRYPANOSOMES.**

**Par : Fabien DEL PINO**

**Réalisé sous la direction de Gérard CUNY**

**Institut de recherche  
pour le développement (Ex ORSTOM)**

**Centre de Montpellier**

**911, avenue Agropolis**

**B.P. 5045**

**34032 Montpellier Cdx 1**

**Tél : 04 67 41 61 00**

**Fax : 04 67 54 78 00**



**Fonds Documentaire ORSTOM**

**Cote : Ax 18321 Ex : unique**



010018321

**SOMMAIRE p 2**

**INDICATIONS SUR LE LIEU DU STAGE p 3**

**INTRODUCTION p 4**

**1. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC CHEZ L'HÔTE VERTEBRE : p 4**

**1.1 Les diagnostics de certitude p 4**

**1.2 Les diagnostics de présomption p 5**

**2. LA TECHNIQUE PCR DANS LE DIAGNOSTIC DES TRYPANOSOMES CHEZ  
L'HÔTE VERTEBRE : p 6**

**2.1 Objectifs p 6**

**2.2 Matériel et méthodes p 7**

**2.3 Résultats et discussion p 7**

**CONCLUSION p 8**

**BIBLIOGRAPHIE p 9**

**ANNEXES p 10**

**RESUME (dos)**

Fonds Documentaire ORSTOM

2

Cote : A \* 18321 Ex: *multiple*

## Présentation du laboratoire d'accueil :

Le laboratoire où j'ai eu le privilège de passer mon stage de formation dans le cadre de la Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes option Parasitologie fait parti du centre de recherche de l'Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D. anciennement appelé ORSTOM) implanté dans la zone Agropolis de Montpellier.

L'I.R.D. est un établissement public à caractère scientifique et technologique placé sous la tutelle du Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et du Ministère de la Coopération, travaillant en collaboration avec l'Afrique, l'Amérique latine, certains pays du Pacifique et, plus récemment, l'Asie tropicale, ainsi que les Dom-Tom.

Le laboratoire d'accueil est rattaché, dans le cadre de l'I.R.D. au programme de " transmission, expression, prévention et contrôle des maladies à vecteur " afin de développer les outils moléculaires à la demande des chercheurs de terrains et, sur leurs propres thématiques, d'assurer le transfert de technologies et la formation aux techniques de biologie moléculaire.

L'équipe du laboratoire est constituée de quatre personnes titulaires et de stagiaires. Cette équipe est dirigée par Gérard CUNY, Directeur de Recherche (DR2), biologiste moléculaire, est composée de deux Chargés de Recherche, Sophie RAVEL (CR2), biologiste moléculaire, de Philippe SOLANO (CR2), entomo-parasitologiste, et d'une Technicienne Classe Normale, Valérie DUMAS (TCN), biologiste moléculaire.

Les études réalisées au laboratoire traitent simultanément des recherches sur l'onchocercose, par des études de microsatellites d'*Onchocerca volvulus*, parasite responsable de la maladie et de son vecteur, les simulies. Des travaux sur les arboviroses (étude d'*Aedes aegypti*), afin d'établir avec précision la répartition des populations des différents vecteurs, et des recherches sur les trypanosomoses, au niveau des microsatellites de glossines, et au niveau des techniques de diagnostic des trypanosomes par PCR chez les glossines et chez les hôtes vertébrés, cette dernière partie étant le sujet du mémoire.

# APPORTS DE LA TECHNIQUE PCR DANS LE DIAGNOSTIC ET L'IDENTIFICATION DES TRYPANOSOMES.

## INTRODUCTION :

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés de l'ordre des Kinetoplastidea, du genre *Trypanosoma*, et sont responsables des différentes trypanosomoses qui sévissent dans les zones tropicales et subtropicales. En Amérique du Sud, les trypanosomes sont responsables de la maladie de Chagas, transmise par les réduves, vecteurs hématophages. En Afrique Centrale et Subsaharienne, les trypanosomes provoquent la maladie du sommeil chez l'homme (les THA : Trypanosomoses Humaines Africaines) et le " nagana " chez les animaux domestiques (TAA : Trypanosomoses Animales Africaines), toutes deux principalement transmises par des glossines, insectes diptères hématophages, hôtes invertébrés du cycle biologique du genre *Trypanosoma*.

Les pertes économiques dans le secteur de l'élevage dues aux TAA sont estimées par certains économistes à 1 milliard de dollars par an à l'échelle du continent, ce qui fait de la lutte anti-trypanosomienne un souci majeur dans le développement économique des pays africains (de Haan & Bekure, 1991).

Les THA sévissent entre les 15ème parallèle Nord et 29ème parallèle Sud, on recense 300 000 à 500 000 cas par an de THA répartis dans 36 pays. Il est estimé que 55 millions de personnes sont exposées au risque de contracter la maladie du sommeil (Cattand, 1994 ; Frézil & Cuisance 1994).

Le cycle biologique des trypanosomes présents en Afrique est généralement dixène, c'est-à-dire que le développement du trypanosome est réparti sur deux hôtes qui sont les glossines ou hôte invertébré vecteur, et les hôtes vertébrés comme les reptiles et les mammifères (dont l'homme). Il faut noter qu'il n'a jamais été observé de reproduction sexuée chez les trypanosomes, seulement des reproductions asexuées. Certaines particularités sont à noter : la présence de cycle monoxène (hôte vertébré seulement) chez *Trypanosoma equiperdum*, et la présence d'insectes hématophages vecteurs mécaniques comme les tabanides, où aucune reproduction a lieu, mais pouvant infecter des hôtes vertébrés (Cuisance, 1998).

Les progrès des dix dernières années en biologie moléculaire avec notamment l'apparition de la PCR (Polymerase Chain Reaction voir annexe 1), semblent apporter des perspectives intéressantes par rapport aux techniques de diagnostic habituellement utilisées pour détecter et identifier les trypanosomes (Solano *et al.*, 1997 ; Lefrançois *et al.*, 1999).

Nous rappellerons d'abord les techniques les plus courantes de diagnostic des trypanosomes, puis le protocole expérimental du diagnostic PCR chez l'hôte vertébré sera décrit et les résultats de l'apport de cette technique PCR seront discutés.

## 1. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC CHEZ L'HOTE VERTEBRE :

Cette revue n'est pas exhaustive, et se limite aux techniques les plus couramment utilisées (Reifenberg, 1997 ; Cuisance, 1998 ; Morlais, 1998).

### 1.1 Les diagnostics de certitude : (le parasite est " visible ")

-Frottis sanguin : cette méthode consiste en une observation microscopique de coloration de sang frais au Giemsa dilué après fixation dans de l'alcool méthylique. Cette méthode a l'avantage d'être simple, rapide et peu coûteuse, mais s'avère être peu sensible dans les cas de faible parasitémie dans le sang.

-Concentration en Tube Capillaire (CTC) : on centrifuge 75µl de sang frais dans un tube capillaire hépariné, puis on pratique l'observation directe du "buffy-coat"(interface plasma globules) afin de détecter la présence éventuelle de trypanosomes dont on pourra définir le sous genre en fonction de leur forme et de leur motilité. La méthode QBC (Quantitative Buffy-Coat) est une variante du CTC, utilisée en THA, suivant le même principe, en complétant la technique par une coloration à l'acridine-orange des éléments du buffy-coat. Ces deux dernières méthodes sont aussi des méthodes faciles à mettre en place, rapides et peu coûteuses, mais sont applicables aux cas de parasitémies élevées, et ne permettent pas de remonter au-delà du sous genre du trypanosome infectant.

-Technique mAEC "miniature Anion-Exchange Centrifugation".

-Ponction lombaire : on fait une recherche des trypanosomes dans le liquide céphalo-rachidien. Cette technique s'applique aux sujets humains suspects sérologiquement, en vue d'une confirmation parasitologique, mais aussi dans tous les cas avant d'entamer une thérapeutique.

## 1.2 Les diagnostics de présomption : (le parasite n'est pas " visible ")

-Inoculation de sang parasité à des animaux de laboratoire (Rat Whistar) : on fait produire des trypomastigotes par un animal que l'on sacrifie au seuil de 0,5 à 1.10Ex9 trypanosomes/ml de sang. Les parasites sont recueillis par élution sur colonne DEAE cellulose. Cette technique longue, mais rend la distinction possible entre les *Trypanosoma brucei rhodesiense* (évolution rapide des THA), et les *Trypanosoma brucei gambiense* (évolution lente des THA).

-Kit pour Isolement In Vitro des trypanosomes (KIVI) : on prélève du sang sur un anticoagulant, puis on ensemence un flacon KIVI par individu. Après avoir conservé ceux-ci à 27°C dans une étuve, on repique le mélange de sang dans un milieu de culture. A la suite de plusieurs repiquages successifs, on obtient une concentration suffisante de parasites, dont on peut faire une identification taxonomique (Truc *et al.* 1997). Bien que cette méthode soit très sensible et permette une identification précise des trypanosomes, elle a l'inconvénient d'être très longue et lourde à appliquer.

-Xénodiagnostic : il s'agit ici de gorger une glossine sur un individu suspect et de faire une observation microscopique des différents organes quelques jours après le repas sanguin (Frézil, 1971). Le problème dans ce cas est l'élevage difficile des mouches, et la faible infectivité des glossines.

Les techniques suivantes utilisent les réponses immunologiques des individus infectés :

-Recherche d'anticorps : on recherche la présence d'IgM spécifiques aux trypanosomes dans le sérum, mais la présence de ceux-ci peut être due à une infection passée.

-Immunofluorescence Indirecte (IFI, Wéry *et al.* 1970) : Cette technique utilise la formation en cas d'infection du complexe anticorps antigène. On fixe sur lamelle des antigènes lyophilisés de rat auxquels on met en contact le produit sanguin ou sérique associé à un conjugué fluorescent. S'il y a fixation, la fluorescence sera positive et le test sera positif. L'utilisation de sang séché sur papier filtre peut être faite (technique des confettis), mais le test IFI nécessite deux sorties sur le terrain ou le retour du suspect. De plus le protocole étant long, ce test devient peu pratique.

-Test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay, Voller 1975, Nantulya et Lindquist 1989) : il s'agit d'un test de détection d'antigènes (ou anticorps) circulants, en utilisant des anticorps monoclonaux (ou antigènes) spécifiques (*T.brucei*, *T.congolense* et *T.vivax*). Le sang ou le sérum des sujets à tester est mis en présence d'antigènes ou monoclonaux fixés sur microplaque. Un conjugué couplé à une enzyme permet de révéler la réaction, la lecture se

faisant visuellement ou par mesure de la densité optique au spectrophotomètre. Cette technique est surtout utilisée en médecine vétérinaire.

-Hémagglutination Indirecte (HAI, Boué & Charlier 1975) : on met des hématies saines sensibilisées et stabilisées avec des antigènes solubles purifiés, en présence de sérums dilués à tester. La réaction positive se fait par agglutination des hématies sur un kit "Cellognost" (Boehringer Mannheim), mais cette méthode manque de fiabilité.

-Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT, Magnus *et al.*, 1978) : la détection d'anticorps antitrypanosomiens dans le sang, sérum ou plasma, par agglutination directe se fait par une suspension lyophilisée de trypomastigotes fixés, colorés et stabilisés. Le test se fait sur une carte plastifiée, la réaction positive correspondant à une apparition d'agrégats bleus. Les problèmes de cette méthode sont que la variabilité antigénique des trypanosomes peut donner des réponses négatives chez des animaux infectés et que cette variabilité induit une sélection des sérotypes utilisés en fonction des foyers étudiés (Komoin-Oka *et al.*, 1998). Actuellement des essais sont faits sur des billes de latex (Jamonneau 1996).

-Dipstick Colloidal Dye Immuno Assay (DIA, Snowden *et al.*, Howwel 1991, Kashiwazaki *et al.*, 1994) : cette méthode est en cours de mise au point. La détection d'antigènes trypanosomiens multiples se fait sur des bandelettes d'acétate sur lesquelles des anticorps trypanosomiens connus ont été absorbés à différents endroits, plongés dans les solutions sanguines à tester. La réaction est mise en évidence par des particules colorées.

## 2. LA TECHNIQUE PCR DANS LE DIAGNOSTIC DES TRYPANOSOMES CHEZ L'HÔTE VERTEBRE :

La technique PCR est considérée comme très prometteuse en terme de sensibilité et de spécificité. Elle fut mise en place dans le cas des trypanosomoses afin de pouvoir diagnostiquer et d'identifier de manière fiable les trypanosomes pathogènes du bétail et de l'homme, aussi bien sur les hôtes vertébrés, que sur les glossines (Reifenberg, 1996 ; Reifenberg *et al.*, 1997 ; Solano *et al.*, 1997 ; Morlais, 1998). Les amorces oligonucléotidiques permettent d'amplifier une région d'ADN satellite de groupes taxonomiques précis : sous genre *Nannomonas* : *Trypanosoma congolense* savane, *T.c.* forêt, *T.c.* Kilifi, *T.godfreyi*, et *T.simiae* ; sous genre *Duttonella* : *T.vivax* ; et sous genre *Trypanozoon* : *T.brucei* s.l. (voir Figure 1 et annexe 3).

L'ADN satellite est une courte séquence ADN génomique répétée en tandem un très grand nombre de fois, non codante, dont la variabilité chez les trypanosomes permet une détection au niveau interspécifique, mais cette séquence est suffisamment conservée au niveau intra spécifique.

### 2.1 Objectifs :

L'objectif de la première partie du stage a été d'estimer la sensibilité du diagnostic des trypanosomes par PCR. A cet effet, on disposait d'échantillons de gouttes de sang infecté expérimentalement par des *Trypanosoma congolense* type savane dont la concentration en trypanosomes par ml de sang était connue (0, 100 et 1000 trypanosomes/ml de sang).

La deuxième partie du stage a porté sur une étude de détection des trypanosomes sur la faune sauvage du Parc National de Zakouma (Tchad), à partir d'échantillons de sang séché sur papier Whatmann lors d'un prélèvement entre le 23.01 et le 21.02.1999 (P Chardonnet, CIRAD-EMVT). En utilisant le protocole décrit précédemment, le diagnostic PCR a été réalisé avec les amorces spécifiques de (voir annexe 3) : *Trypanosoma congolense* savane, *T.c.* forêt, *T.c.* Kilifi, *T. simiae*, *T.brucei* s.l., et *T.vivax*.

Parmi la faune sauvage se trouvaient huit espèces différentes d'animaux (voir annexe 2) : 8 buffles, espèce inféodée aux savanes arbustives ; 1 phacochère, espèce dépendante des points d'eau qu'elle fréquente aux heures chaudes pour s'abreuver et se rouler dans la boue ; 6 Cobes de Fassa, vivant dans les savanes arborées et les forêts en galerie, inféodés aux zones humides et ombragées, ainsi qu'aux abords des points d'eau ; 9 Cobes de Buffon, vivant dans les mêmes zones que les Cobes de Fassa ; 5 bubales, vivant en savane arbustive, fréquentant les points d'eau une fois par jour en saison sèche, et pouvant s'abstenir en saisons humides ; 1 damalisque, vivant dans les mêmes zones ; 1 hippotrague rouan, vivant en savane arbustive, très dépendant des points d'eau, les fréquentant aux heures chaudes pour s'abreuver ; et 1 gazelle rufifron, fréquente en savane plus sèche (Mattioli *et al*, 1990 ; Mattioli, 1991).

## 2.2 Matériel et méthodes :

Les échantillons se présentaient sous forme de gouttes de sang séchées sur papier Whatmann. Une partie du papier est découpé (environ 1/6 de la zone recouverte de sang) dans des conditions stériles et placées dans 100µl de solution à 1% de Chelex 100 (voir annexe 3) dans de l'eau pure. Après une incubation d'une heure à 56°C, suivie de 30 min à 95°C, les échantillons sont traités immédiatement ou conservés à -20°C.

La PCR est réalisée dans un volume réactionnel de 25µl composé des réactifs suivants : du Tris-HCl à pH 8,3 à une concentration finale de 10mM ; du KCl à une concentration finale de 50mM ; du MgCl<sub>2</sub> à 1,5mM de concentration finale ; du dNTPs à 200µM de concentration finale ; 20 pmoles de chaque amorce ; 0,5 unité de Taq Polymerase et 2µl de surnageant des échantillons traités au Chelex 100 après 2min de centrifugation (14000tr/min).

Le protocole standardisé suivant a été mis au point pour la détection de tous les groupes taxonomiques de trypanosomes recherchés (Reifenberg *et al*, 1997).

La réaction PCR commence par une étape de dénaturation à 94°C d'une durée de 1min suivie de 35 cycles composés d'une étape de dénaturation de 1min à 94°C, d'une étape d'hybridation des amorces sur l'ADN de 1min à 55°C et d'une étape d'élongation de 1min à 72°C, ces cycles sont suivis d'une élongation finale de 10min à 72°C et d'un refroidissement à 4°C.(voir annexe 1)

Les produits d'amplification sont ensuite révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% contenant à 0,5 µg de bromure d'éthidium par ml TBE (voir annexe 3) : on fait migrer à 100V, 10µl de produit réactionnel mélangé à 2µl de bleu de charge, les bandes sont visualisées sous lumière UV. Pour contrôler la fiabilité de chaque PCR on utilise un témoin positif où les 2µl d'échantillons sont remplacés par une solution d'ADN purifié de *Trypanosoma congolense* savane dans le cadre de l'expérience de sensibilité, et des ADN témoins des témoins des différents groupes taxonomiques (voir photo annexe 4), et un témoin négatif composé du produit réactionnel avec 2µl d'eau pure.

## 2.3 Résultats et discussion :

L'étude sur la capacité de détection de la méthode PCR nous a permis de mettre en valeur les limites de sensibilité de celle-ci avec ce mode de préparation. En effet, toutes les réactions pratiquées sur des échantillons issus d'une goutte de sang infecté par 1000 trypanosomes/ml de sang se sont révélées positives, alors que sur les échantillons de 100 trypanosomes/ml de sang, un seul a été positif (voir tableau 1).

ECHANTILLONS	CONCENTRATIONS (tryp/ml)	RESULTATS
G1	0	-
G2	0	-
G3	100	-
G4	100	-
G5	1000	+
G6	1000	+
B19	1000	+
B20	1000	+
B21	100	-
B22	100	+
B23	0	-

**Tableau 1 : Résultats PCR en fonction des concentrations de trypanosomes/ml de sang.**

Les expériences montrent que lorsqu'un trypanosome est présent, il est détecté (1000 tryp/ml de sang équivaut à 1 trypanosome dans 2 µl) et la limite de sensibilité est d'environ 1 pg d'ADN.

Pour 100 tryp/ml de sang, les résultats négatifs peuvent s'expliquer par une dilution plus importante, donc une difficulté plus grande à trouver les bonnes séquences. Il faudrait alors augmenter le volume de l'échantillon mais il peut se présenter un problème d'inhibition.

Pour augmenter encore la sensibilité, c'est-à-dire détecter un trypanosome pour 100 µl ou 1 ml, il faudrait envisager des techniques de concentration comme le Buffy-Coat.

La technique de diagnostic PCR dans les travaux en cours, nous a permis d'établir des résultats préliminaires sur la présence de certains trypanosomes dans la faune sauvage du Tchad. Ainsi, les résultats préliminaires ont montré : une réaction positive aux amorces de *Trypanosoma congolense* forêt chez l'hippotrague rouan, chez le phacochère et chez un buffle, deux réactions positives aux amorces *T.c.* savane chez deux buffles, et une réaction positive à *T.vivax* chez le phacochère et chez un buffle (en cours de confirmation).

Au vu des résultats, le diagnostic PCR met en avant certains avantages par rapport aux autres techniques de diagnostic des trypanosomes : spécificité, sensibilité, détection des infections mixtes et non nécessité de matériel frais.

Cette technique présente encore l'inconvénient d'être relativement longue et nécessite un laboratoire bien équipé.

#### CONCLUSION :

L'estimation de la sensibilité du diagnostic des trypanosomes par PCR est évaluée à 1 pg d'ADN, c'est-à-dire à un seul trypanosome, cette sensibilité est meilleure que celle des autres techniques. De plus, les premiers résultats de la deuxième partie du stage portant sur une étude de détection des trypanosomes sur la faune sauvage du Tchad, se montrent encourageants. Des *Trypanosoma congolense* savane et forêt, et des *T.vivax* ont déjà été détectés. Ceci semble confirmer le rôle de la faune sauvage comme réservoir des trypanosomes.

Le diagnostic des trypanosomes par PCR est donc une des seules techniques à réunir autant d'avantages en comparaison des autres techniques de diagnostic.

Alors que les diagnostics de certitude manquent de sensibilité, que les diagnostics immunologiques se retrouvent confrontés aux problèmes de variabilité antigénique des trypanosomes et de détection d'infections passées, la technique PCR permet un diagnostic de présomption des trypanosomes fiable, spécifique et très sensible.

## BIBLIOGRAPHIE :

-CUISANCE, D.

Glossine et trypanosomes. Cours d'entomologie médicale de l'Institut Pasteur. Session 1998., CIRAD-EMVT.

-KOMOIN-OKA, C., TRUC, P., BENGALY, Z., FORMENTY, P., DUVALLET, G., LAUGINIE, F., RAATH, J-P., N'DEPO, A-E., LEFORBAN, Y.

Etude de la trypanosomose chez les différentes espèces d'animaux sauvages du Parc National de la COMOIE en Côte d'Ivoire : résultats préliminaires sur la comparaison de trois méthodes de diagnostic.

-LEFRANCOIS, T., SOLANO, P., BAUER, B., KABORE, I., TOURE, S-M., CUNY, G., DUVALLET, G., 1999.

Polymerase Chain Reaction caractérisation of trypanosomes in *Glossina morsitans submorsitans* and *Glossina tachinoïdes* collected on the game ranch of Naziga, Burkina Faso. *Acta Tropica.*, 72 : 65-77.

-MATTIOLI, R-C., JEAN, O., A-M-G, BELEM., 1990.

Incidence de la trypanosomose sur la faune sauvage d'un ranch de gibier au Burkina Faso. *Revue Elev. Méd-Vét-Pays Trop.*, 43(4) : 459-456.

-MATTIOLI, R-C., 1991.

Fréquence des trypanosomes dans les populations de glossines du ranch de gibier de Nazinga (Burkina Faso). *Revue Elev. Méd-Vét-Pays Trop.*, 44(2) : 165-168.

-MORLAIS, I., 1998.

Identification des trypanosomes chez les glossines en zone endémiques de trypanosomose humaine au Cameroun. *Thèse doctorale UMII.*

-REIFENBERG, J-M., 1996.

Etude des relations parasites-hôtes dans l'épidémiologie moléculaire des trypanosomoses bovines au Burkina Faso. *Thèse doctorale UMII.*

-REIFENBERG, J-M., SOLANO, P., BAUER, B., KABORE, I., CUNY, G., DUVALLET, G., CUISANCE, D., 1997.

Apport de la technique PCR pour une meilleure compréhension de l'épizootologie des trypanosomoses bovines : exemple de la zone d'aménagement pastoral de Yalé au Burkina Faso. *Revue Elev. Méd-Vét-Pays Trop.*, 50(1) : 14-22.

-SOLANO, P., CUNY, G., DUVALLET, G., CUISANCE, D., RAVEL, S., SIBIDE, I., TOURE, S-M., 1997. Les techniques de génétique moléculaire au service de l'épidémiologie des trypanosomoses. Intérêt de l'étude du polymorphisme des microsatellites des glossines. *Revue Elev. Méd-Vét-Pays Trop.*, 50(4) : 297-301.

-SOLANO, P., DESQUESNE, M., SIBIDE, I., 1997.

Le diagnostic de *Trypanosoma vivax* : un problème non résolu dans l'épidémiologie des trypanosomoses. *Revue Elev. Méd-Vét-Pays Trop.*, 50 : 209-213.

-SOLANO, P., 1998.

Implications épidémiologiques de la variabilité génétique des populations de glossines. Cas de *Glossina palpalis* en Afrique de l'Ouest. *Thèse doctorale UMII.*

-TRUC, P., FORMENTY, P., DUVALLET, G., KOMOIN-OKA, C., BOUBACAR DIALLO, P., LAUGINIE, F., 1997.

Identification of trypanosomes isolated by KIVI from wild mammals in Côte d'Ivoire : diagnostic, taxonomic and epidemiological considerations. *Acta Tropica.*, 67 : 187-196.

## **ANNEXE 1**

### **Principe de la PCR : (Roche biotechnologie)**

Trois étapes sont nécessaires afin de pouvoir amplifier une séquence d'acides nucléiques par méthode PCR :

- une étape de dénaturation des acides nucléiques,
- une étape d'hybridation des amorces sur les séquences cibles,
- une étape d'extension des amorces par Taq (*Thermophilus aquaticus*) Polymérase (Appligene).

Ces trois étapes constituent un cycle d'amplification.

Etape de dénaturation :

L'ADN extrait à partir d'un échantillon est dénaturé par une exposition thermique à 94°C pendant 1 min dans le cadre du stage : les deux brins d'acides nucléiques sont alors séparés.

Etape d'hybridation :

Afin de pouvoir amplifier la séquence d'acides nucléiques visée, il faut synthétiser des amorces oligonucléotidiques (20 à 25 nucléotides) complémentaires de chaque brin d'ADN, qui encadrent la région à dédoubler.

Dans les conditions d'hybridation optimales, à 55°C, les amorces mélangées avec de l'ADN génomique, préalablement dénaturé, vont ainsi venir se positionner en face de leurs séquences complémentaires respectives.

Etape d'extension des amorces par ADN polymérase :

Une fois les amorces nucléotidiques fixées à chaque extrémité des 2 brins d'ADN à amplifier, l'ADN polymérase et le réchauffement à 72°C de la préparation permettent l'extension des amorces spécifiques par une séquence exactement complémentaire des brins où elles se sont fixées. Il en résulte un doublement de la séquence considérée puisque chaque brin d'ADN est recopié.

Les cycles d'amplification :

Chaque cycle d'amplification est constitué de 3 étapes successives, correspondant à 3 étapes thermiques. Chaque brin synthétisé va à son tour pouvoir fixer une amorce. On assiste donc à une amplification de type exponentiel des fréquences cibles. Après 20 cycles d'amplification la séquence initiale est amplifiée un million de fois, dans le cadre du stage 35 cycles d'amplification sont effectués.

## ANNEXE 2

Prélèvements effectués au Parc de Zakouma (Tchad) entre le 23.01 et le 21.02.1999 (P Chardonnet, CIRAD-EMVT) :

N° animal	Espèce	Noms scientifiques	Sexe	Age en années
Z4	Cobe de Fassa	<i>Kobus ellypsiprimnus</i>	F	5
Z6	Buffle	<i>Syncerus caffer</i>	M	3,5
Z9	Bubale	<i>Alcelaphus buselaphus</i>	F	8
Z14	Cobe de Buffon	<i>Kobus kob</i>	F	2,5
Z16	Cobe de Buffon	<i>Kobus kob</i>	M	10
Z17	Cobe de Fassa	<i>Kobus ellypsiprimnus</i>	F	3,5
Z19	Cobe de Buffon	<i>Kobus kob</i>	F	8
Z24	Gazelle rufifrons	<i>Gazella rufifrons</i>	F	5
Z25	Cobe de Buffon	<i>Kobus kob</i>	M	7
Z26	Cobe de Buffon	<i>Kobus kob</i>	M	1,5
Z27	Cobe de Buffon	<i>Kobus kob</i>	M	5
Z29	Hippotrague rouan	<i>Hippotragus equinus</i>	M	3,5
Z30	Cobe de Buffon	<i>Kobus kob</i>	F	5
Z32	Buffle	<i>Syncerus caffer</i>	M	5
Z33	Cobe de Fassa	<i>Kobus ellypsiprimnus</i>	M	8
Z34	Bubale	<i>Alcelaphus buselaphus</i>	M	8
Z35	Cobe de Buffon	<i>Kobus kob</i>	F	4
Z36	Cobe de Fassa	<i>Kobus ellypsiprimnus</i>	F	6
Z37	Phacochère	<i>Phacochoerus aethiopicus</i>	F	4
Z39	Buffle	<i>Syncerus caffer</i>	M	8
Z40	Bubale	<i>Alcelaphus buselaphus</i>	M	6
Z43	Buffle	<i>Syncerus caffer</i>	M	16
Z44	Buffle	<i>Syncerus caffer</i>	M	15
Z46	Cobe de Fassa	<i>Kobus ellypsiprimnus</i>	F	3
Z48	Bubale	<i>Alcelaphus buselaphus</i>	M	8
Z50	Bubale	<i>Alcelaphus buselaphus</i>	F	4
Z51	Damalisque	<i>Damaliscus korrigum</i>	F	8
Z52	Cobe de Fassa	<i>Kobus ellypsiprimnus</i>	M	10
Z53	Buffle	<i>Syncerus caffer</i>	M	5
Z55	Buffle	<i>Syncerus caffer</i>	M	5
Z56	Cobe de Buffon	<i>Kobus kob</i>	M	4
Z57	Buffle	<i>Syncerus caffer</i>	M	5

## ANNEXE 3

### Chelex 100 :

Le Chelex 100 est une résine qui chélate les ions métalliques. Cette résine est composée de copolymères de divinylbenzène styrène contenant une paire de imino diacétate formant le groupe actif chélateur.

La solution Chelex 100 chélate les ions Mg<sup>2+</sup>, nécessaires à l'action des enzymes DNAses qui ont pour rôle de dégrader les ADN dans les cellules. Le Chelex 100 permet ainsi de préserver les brins d'ADN lors de leur dénaturation, et lors de la lyse des cellules.

### Tampon de migration : TBE 0,5X (Tris-Borate-EDTA pH=8,8) :

Dilué à partir de TBE 10X : tampon de stockage 10X.

Préparation TBE 10X :

109,0g Tris base

55,6g acide borique

40,0ml de 0,5M Na<sup>2</sup>EDTA, pH 8,0

qsp H<sub>2</sub>O pour 1,0L (ajuster le pH à 8,8), mélanger, conservation à température ambiante.

### Amorces utilisées au cours du stage :

Amorces	Auteurs	Spécificité	Taille du produit amplifié (pb)
IL 344-345	Majiwa et al (1993)	<i>T.congolense</i> type savane	320
TCF 1,2	Masiga et al (1992)	<i>T.congolense</i> type forêt	350
KOL 1,2	Majiwa et al (1985)	<i>T.congolense</i> type Kilifi	294
TSM 1,2	Masiga et al (1992)	<i>T. simiae</i>	437
VOL 1,2	Dickin & Gibson (1989)	<i>T.vivax</i>	180
TBR 1,2	Moser et al (1989)	<i>T.brucei</i> s.l.	177

Annexe 4

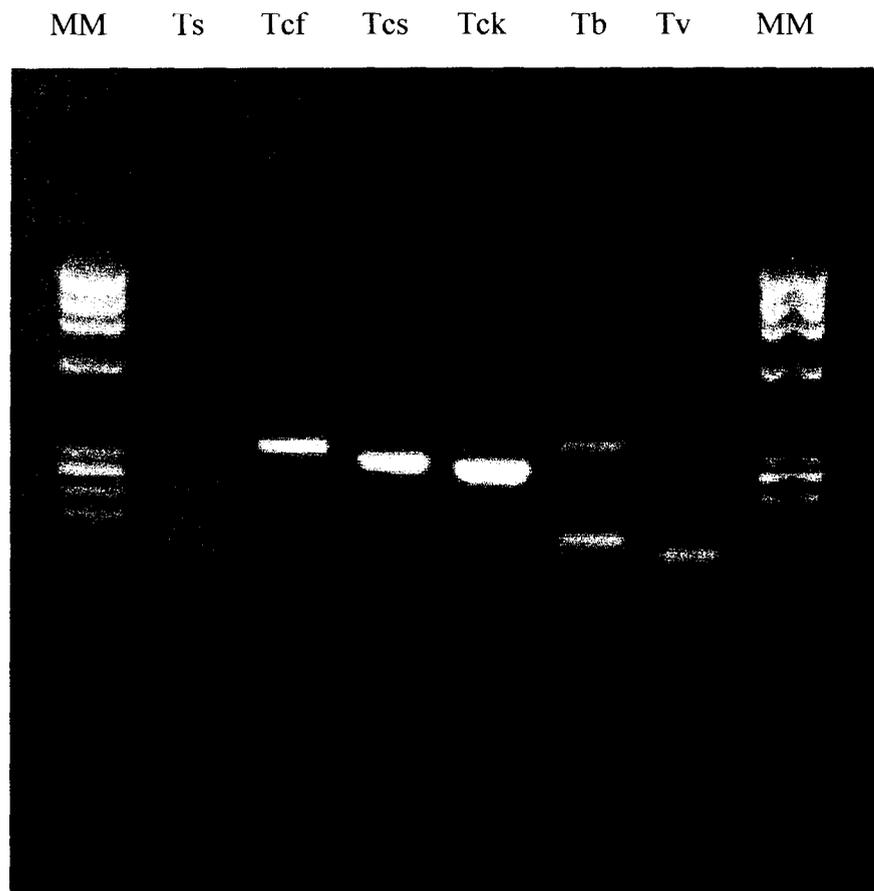


Photo 1 : Réaction PCR sur chaque couple d'amorces disponible avec son ADN spécifique.

De gauche à droite :

MM: Marqueur de poids Moléculaire (fX 174/Hae III)

Ts: Trypanosoma simiae; Tck: T. congolense type Kilifi

Tcs: T. congolense type savane; Tcf: T. congolense type forêt

Tv: T. vivax; T.b: T. brucei