

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

UMR CNRS-ORSTOM 9926

Génétique Moléculaire
des Parasites et des Vecteurs
ORSTOM

911, Av. Agropolis - B.P. 5045
34032 Montpellier cedex 1

THESE

présentée à l'UNIVERSITE MONTPELLIER II - SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
pour obtenir le
DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : PHYSIOLOGIE, BIOLOGIE DES ORGANISMES ET DES POPULATIONS
Formation Doctorale : PARASITOLOGIE

**MODE DE REPRODUCTION DE *TRYPANOSOMA BRUCEI*
DANS SES POPULATIONS NATURELLES : IMPLICATIONS
TAXONOMIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES**

par

Françoise MATHIEU-DAUDE

soutenue le 19 Décembre 1991
devant le Jury composé de :

MM. BOUX Georges, Professeur, Université Montpellier II
DEDET Jean-Pierre, Professeur, Université Montpellier I
KJELLBERG Finn, Chargé de Recherche, CNRS, Montpellier
FREZIL Jean-Louis, Directeur de Recherche, ORSTOM, Montpellier
TIBAYRENC Michel, Directeur de Recherche, ORSTOM, Montpellier

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

REMERCIEMENTS

Je souhaite avant tout exprimer ma reconnaissance aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail :

- **Monsieur le Professeur G. Boulx**, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Il a encadré mes premières expériences de laboratoire et a suivi avec beaucoup d'intérêt le déroulement de mon travail depuis maintenant quelques années.

- **Monsieur le Professeur J.P. Dedet**, qui a accepté de juger ce travail. Sa compétence en Parasitologie et son expérience en maladie de "Chagas" me seront très profitables.

- **Finn Kjellberg**, que je suis heureuse de compter parmi les membres du jury. Il m'a aidé de ses conseils dans l'application des tests statistiques.

- **Jean-Louis Frézil**, dont la grande expérience dans le domaine de la trypanosomiase en fait un orateur que j'ai eu plaisir à écouter.

- **Michel Tibayrenc**, qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a accordé sa confiance dans la réalisation de ce travail. Il m'a guidée tout au long de mes recherches et m'a très souvent encouragée. Par son dynamisme, il a su créer au sein du laboratoire un esprit de recherche que j'ai beaucoup apprécié.

J'exprime toute ma gratitude à **Monsieur le Professeur L. Euzet** qui m'a enseigné les premiers mots de la Parasitologie et m'a donné goût à cette discipline.

Je tiens également à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé dans la réalisation de ce travail :

- **Philippe Truc**, compagnon de paillasse de mes débuts, qui m'a enseigné les éléments de base de la technique d'électrophorèse pratiquée au laboratoire et également la culture sur animaux. Ses connaissances en épidémiologie de la trypanosomiase et son expérience de terrain m'ont été très utiles. Notre collaboration s'est toujours poursuivie dans la bonne humeur. Je l'en remercie.

- **Alain Bicart-See**, avec qui nous avons réalisé toutes les expériences de biologie moléculaire. Une grande partie de ce travail n'aurait pu être réalisée sans sa présence. Son enthousiasme m'a beaucoup encouragée à poursuivre ces manipulations. Je lui en suis très reconnaissante.

- **Etienne Serres**, qui a guidé mes premiers pas en analyse numérique. Je le remercie pour sa disponibilité et son aide dans le traitement des données, qui m'ont été très précieuses.

- **Frédérique Brenière** qui a encadré mon travail de biologie moléculaire et a toujours fait preuve d'un grand intérêt pour mes résultats.

- Les chercheurs qui m'ont accueillie chaleureusement dans leur laboratoire et m'ont communiqué des stocks indispensables à la réalisation de ce travail : **David Godfrey**, **Peter Dukes** et **Ian Maudlin** du Tsetse Research Laboratory de Bristol, ainsi que **Andrew Tait** et **Geoff Hide** du Wellcome Unit of Molecular Parasitology de Glasgow.

Merci à **Jean-Pierre Dujardin** pour ses conseils et à **Marie-France Bosseno** pour son aide, ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire de **Génétique des Parasites et des Vecteurs** qui a contribué à maintenir une bonne ambiance dans le laboratoire.

Enfin, merci à mes parents, mes frères et soeurs, mes amis et à Philippe.

SOMMAIRE

	page
REMERCIEMENTS	
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : GENERALITES	2
1. TRYPANOSOMA BRUCEI S.L.	2
1. 1. Position taxonomique du parasite	2
1. 2. Sous-divisions de l'espèce <i>Trypanosoma brucei</i>	3
1. 3. Cycle évolutif	5
2. LA TRYPANOSOMIASE AFRICAINE	8
2. 1. Pathogénicité chez l'homme	8
2. 1. 1. Les principaux foyers de trypanosomiase	10
2. 1. 2. Aspects cliniques de la maladie	10
2. 1. 3. Diagnostic et traitement	11
2. 1. 4. Variation antigénique	11
2. 2. Trypanosomiase animale	11
3. ORGANISATION DU GENOME PARASITAIRE	12
3. 1. L'ADN nucléaire	12
3. 1. 1. Mise en évidence de la diploïdie	12
3. 1. 2. Structure	13
3. 2. L'ADN kinétoplastique	13
3. 2. 1. Le maxicercle	13
3. 2. 2. Le minicercle	14
4. MODE DE REPRODUCTION DU PARASITE	14
4. 1. Mise en évidence de la sexualité	14
4. 2. Mode de reproduction dans les populations naturelles	15
4. 3. Approche personnelle	17
5. TAXONOMIE SUBSPECIFIQUE ET DIVERSITE GENETIQUE CHEZ TRYPANOSOMA BRUCEI	18
5. 1. Validité génétique des sous-espèces de <i>T. brucei</i>	18
5. 1. 1. Méthodes isoenzymatiques	18
5. 1. 2. Les sondes d'ADN	19
5. 2. Approche personnelle	20

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODE	22
A. MATERIEL	22
1. STOCKS CARACTERISES AU LABORATOIRE	22
1. 1. Laboratoires donneurs	22
1. 2. Historique des stocks	22
2. DONNEES DE LA LITTERATURE	25
B. METHODES	26
1. CULTURE DES PARASITES	26
1. 1. Formes sanguines	26
1. 2. Formes procycliques	27
1. 1. 1. Transformation	27
1. 1. 2. Culture de masse	28
2. L'ELECTROPHORESE ISOENZYMATIQUE	29
2. 1. Généralités	29
2. 1. 1. Electrophorèse isoenzymatique et génétique	29
2. 1. 2. Principe de la visualisation des protéines	30
2. 2. Méthode utilisée	31
2. 2. 1. Préparation des extraits enzymatiques	31
2. 2. 2. Le support	31
2. 2. 3. La migration	31
2. 2. 4. La révélation	33
2. 2. 5. Les systèmes enzymatiques	33
2. 3. Interprétation des résultats	37
3. METHODES D'ANALYSE	38
3. 1. Variabilité génétique	38
3. 1. 1. Taux de polymorphisme	38
3. 1. 2. Diversité allélique	38
3. 1. 3. Hétérozygotie observée	38
3. 1. 4. Diversité génétique moyenne	38
3. 1. 5. Distance génétique standard de Nei	39
3. 1. 6. Distance de Jaccard	39
3. 2. Classification automatique	40
3. 2. 1. Méthode d'analyse phénétique : le dendrogramme	41
3. 2. 2. Méthode d'analyse multivariée : l'analyse factorielle des correspondances	41
3. 2. 3. Méthodes d'analyse cladistique	41
1- Méthode de parcimonie : Réseau de Wagner	42
2- Méthode de compatibilité	42

3. 3. Analyse du mode de reproduction du parasite	43
3. 3. 1. Tests de ségrégation	43
3. 3. 2. Tests de recombinaison	44
1- Génotypes multilocus surreprésentés et déficit en génotypes recombinants	44
2- Déséquilibre de liaison	45
4. MANIPULATIONS PORTANT SUR L'ADN KINETOPLASTIQUE	46
4. 1. Amplification de l'ADN	46
4. 1. 1. Principe de la technique de polymérisation en chaîne	46
4. 1. 2. Choix des amorces	47
4. 1. 3. Protocole d'amplification	49
4. 1. 4. Visualisation et transfert	49
4. 1. 5. Intérêt de la technique	50
4. 2. Hybridation	50
4. 2. 1. Principe	50
4. 2. 2. Préparation de la sonde	50
4. 2. 3. Marquage	51
4. 2. 4. Hybridation	51
4. 2. 5. Détection	51
CHAPITRE III : RESULTATS	52
1. ELECTROPHORESES ISOENZYMATIQUES	52
1. 1. Interprétation des zymogrammes	52
1. 1. 1. Loci interprétés en terme d'allèles	52
1. 1. 2. Loci interprétés en terme de génotypes	52
1. 1. 3. Comparaison des zymogrammes des formes sanguines et procycliques	52
1. 2. Individualisation des zymodèmes	53
1. 3. Appréciation de la variabilité génétique	58
1. 3. 1. Indices de variabilité génétique	58
1. 3. 2. Distances génétiques	62
1. 4. Tests sur le mode de reproduction du parasite	63
1. 4. 1. Tests de ségrégation	65
1- Absence de génotypes unilocus	65
2- Déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg	65
1. 4. 2. Tests de recombinaison	71
1- Génotypes multilocus surreprésentés et déficit en génotypes recombinants	71
2- Déséquilibre de liaison	75
3- Génotypes surreprésentés ubiquistes	75

1. 5. Etudes des relations phénétiques et phylétiques	77
1. 5. 1. Analyse phénétique : le dendrogramme	77
1. 5. 2. Analyse factorielle des correspondances	79
1. 5. 3. Analyse cladistique	81
1- Méthode de parcimonie : le réseau de Wagner	81
2- Méthode de compatibilité	83
1. 5. 4. Comparaison des diverses méthodes utilisées	83
2. ETUDE DE L'ADN KINETOPLASTIQUE	85
2. 1. Résultats des amplifications	85
2. 2. Résultats des hybridations	87
CHAPITRE IV : DISCUSSION ET CONCLUSIONS	92
1. LE PROBLEME DU MODE DE REPRODUCTION CHEZ <i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i>	92
2. COROLLAIRES TAXONOMIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	100
ANNEXES	

INTRODUCTION

La taxonomie subsppécifique du complexe *Trypanosoma brucei*, protozoaire parasite responsable de la trypanosomiase humaine africaine (THA), est à l'heure actuelle très confuse. On distingue classiquement trois sous-espèces : *Trypanosoma brucei gambiense*, agent de la THA en Afrique centrale et en Afrique de l'Ouest, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, agent de la THA en Afrique de l'Est, et *Trypanosoma brucei brucei* parasite purement animal. Ces dernières années, les travaux basés sur des caractères intrinsèques du parasite (marqueurs génétiques) ont remis en question cette classification : la valeur taxonomique de telles subdivisions, soupçonnées être de simples "pathotypes", est douteuse. Par ailleurs, le mode de reproduction de ce protozoaire dans les conditions naturelles est fortement controversé. Certains profils isoenzymatiques avaient pu suggérer la possibilité de processus sexués chez l'agent de la THA (Tait 1980 ; Gibson *et al.* 1980). Plus récemment, il a été prouvé que des recombinants génétiques pouvaient être obtenus expérimentalement (Jenni *et al.* 1986; Sternberg *et al.* 1988). Cependant, ces expériences de laboratoire montrent seulement la potentialité de processus sexués, mais n'apportent pas d'information quant à l'importance réelle de ces phénomènes dans les populations naturelles (Tibayrenc *et al.* 1990). Les deux problèmes, taxonomie subsppécifique et mode de reproduction dans les conditions naturelles, sont indissociables : en effet, l'importance des flux géniques entre populations conditionne l'individualité de ces populations, ainsi que leur stabilité dans l'espace et dans le temps en tant qu'entités distinctes les unes des autres, en un mot, leur valeur taxonomique.

Notre travail consiste en une étude de génétique des populations du taxon *Trypanosoma brucei sensu lato*, visant à confirmer ou infirmer l'existence de subdivisions discrètes au sein de ce taxon. Ce travail se focalise sur le mode de reproduction du parasite dans les cycles naturels, pour les raisons exposées ci-dessus. Le but de notre thèse est donc d'élaborer un modèle de taxonomie subsppécifique sur lequel pourront se baser les études appliquées (clinique, épidémiologie, immunologie et pharmacologie) : il est primordial d'identifier l'unité génétique et taxonomique à considérer pour de telles études.

Notre approche se base avant tout sur la technique isoenzymatique, qui reste irremplaçable dans les études de génétique des populations. Cette analyse de fond est complétée par une partie plus "appliquée" : l'élaboration de marqueurs moléculaires spécifiques (sondes d'ADN) des variants identifiés au préalable par l'analyse de génétique des populations.

CHAPITRE I :

GENERALITES

GENERALITES

1. *TRYPANOSOMA BRUCEI* S.L.

1. 1. Position taxonomique du parasite

Trypanosoma brucei, agent de la trypanosomiase africaine, a été identifié par Plimmer et Bradford en 1899. Ce Protozoaire du phylum des *Sarcomastigophora* Hönigberg et Balamuth 1963, et de la classe des *Zoomastigophorea* Calkins 1909, appartient à l'ordre des *Kinetoplastida* Hönigberg 1963, à la famille des *Trypanosomatidae* Döfllein 1911, et au genre *Trypanosoma* Gruby, 1843.

La systématique des trypanosomes parasites de mammifères est basée sur les conclusions d'Hoare (1972), prenant en compte les modalités de développement chez les insectes pour distinguer deux sections : les *Stercoraria* et les *Salivaria*, groupant elles-mêmes plusieurs sous-genres :

- La section des *Stercoraria* est caractérisée par un cycle de développement s'achevant dans l'intestin postérieur de l'insecte, les formes infectieuses se trouvant dans les fécès (mode de transmission postérograde). Cette section comprend les sous-genres : *Megatrypanum*, *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* (*Trypanosoma cruzi*).

- La section des *Salivaria* est caractérisée par un cycle de développement s'achevant dans la région buccale ou les glandes salivaires d'un insecte hématophage, les formes infectieuses étant transmises par piqûre (mode de transmission antérograde). Cette section comprend 5 sous-genres : *Duttonella*, *Nannomonas*, *Tejeraia*, *Pycnomonas* et *Trypanozoon*.

Le sous-genre *Trypanozoon* regroupe 3 espèces : *Trypanosoma equiperdum*, agent de la dourine des Equidés d'Europe, d'Afrique du nord et d'Asie, *Trypanosoma evansi*, responsable du surra des Equidés d'Amérique latine et d'Afrique du nord, ainsi que du débab des Camélidés d'Afrique du nord et d'Asie, et *Trypanosoma brucei* parasitant divers mammifères en Afrique.

Le statut taxonomique de *Trypanosoma evansi*, parasite d'Equidés et de Camelidés, a été longtemps controversé. Hoare (1972) le considèrait d'abord comme une sous-espèce de *Trypanosoma brucei* (au même titre que *Trypanosoma equiperdum*) mais, par les différences cliniques et épidémiologiques observées entre ce trypanosome et *Trypanosoma brucei*, l'espèce *Trypanosoma evansi* fut ensuite retenue. En effet, *Trypanosoma evansi* Balbiani 1888, ne possède pas d'hôte intermédiaire : il est transmis de façon mécanique par des mouches de la famille des Tabanidés.

La classification d'Hoare revue par Levine *et al.* (1980) est présentée figure 1.

1. 2. Sous-divisions de l'espèce *Trypanosoma brucei*

L'espèce *Trypanosoma brucei* est classiquement divisée en 3 sous-espèces : *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* et *Trypanosoma brucei brucei*, indistinguables morphologiquement (Hoare 1972). Leur identification est classiquement basée sur des caractères extrinsèques du parasite, c'est-à-dire des critères d'hôtes, de vecteurs, de répartition géographique et d'aspects cliniques de la maladie.

- *Trypanosoma brucei gambiense* Dutton 1902, est l'agent de la maladie du sommeil chez l'homme en Afrique centrale et occidentale. Ce parasite, transmis par les glossines du groupe *Glossina palpalis* (*G. palpalis*, *G. fuscipes* et *G. tachinoïdes*) dans les sous-bois, aux bords des eaux, provoque une maladie de type chronique.

- *Trypanosoma brucei rhodesiense* Stephens et Fantham 1910, est responsable de la forme aiguë de la maladie du sommeil chez l'homme en Afrique de l'est. Ce parasite est transmis par les glossines du groupe *Glossina morsitans* (*G. morsitans*, *G. pallidipes* et *G. swynnertoni*).

- *Trypanosoma brucei brucei* Plimmer et Bradford 1899, est responsable de la nagana des mammifères domestiques et sauvages, mais non pathogène pour l'homme. La nagana sévit sur toute l'aire de répartition du parasite.

D'autres caractères du même type ont été ajoutés pour distinguer l'une de l'autre les deux sous-espèces parasites de l'homme : *Trypanosoma brucei rhodesiense* serait plus virulent chez le rongeur hôte de laboratoire, et présenterait plus de formes

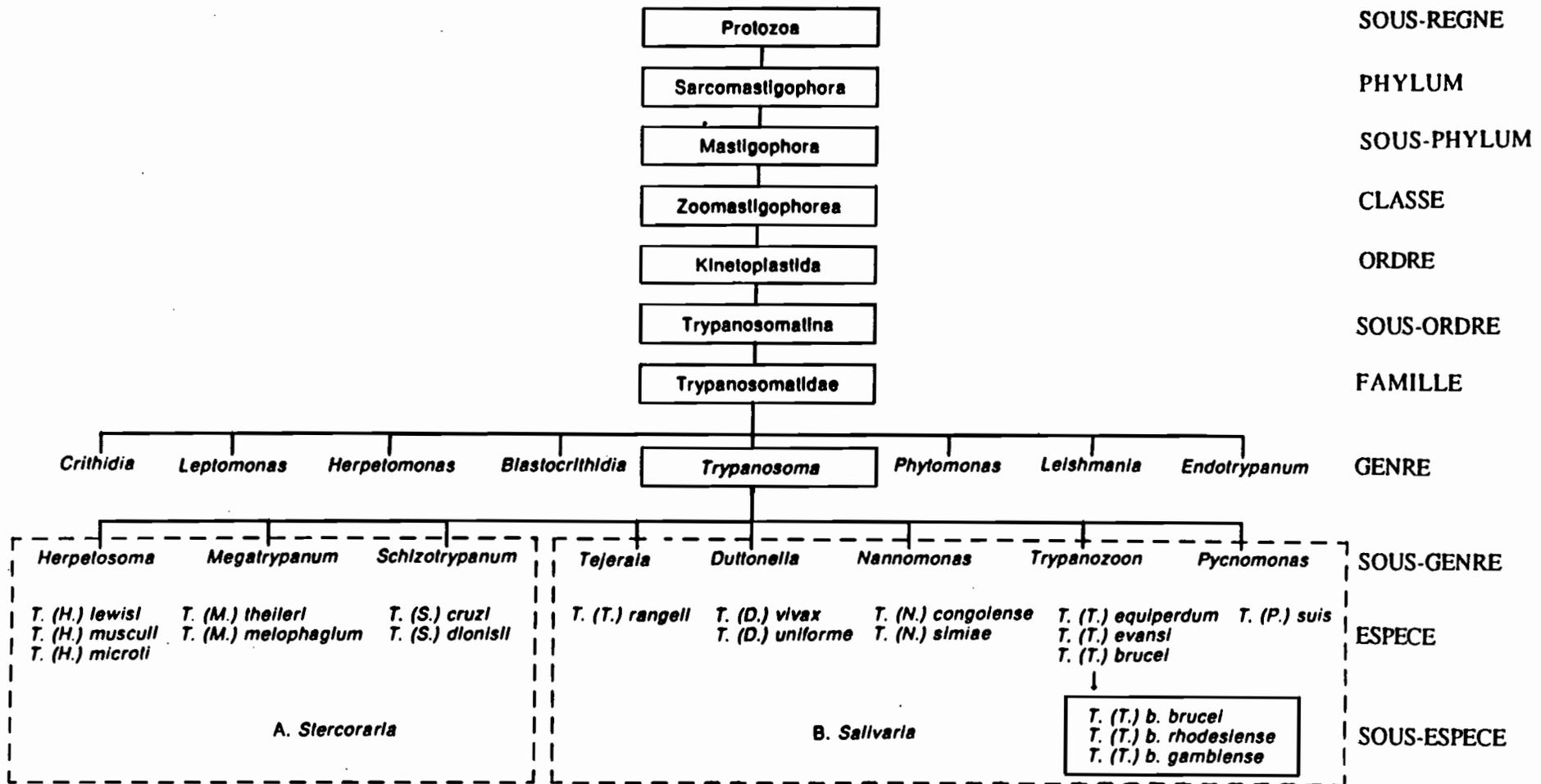


Figure 1 : Classification des trypanosomes de mammifères
 (d'après Hoare 1972, Levine *et al.* 1980, Anez, 1982). Document W.H.O. (1986).

nucléopostérieures (cf. paragraphe 1.3.) que *Trypanosoma brucei gambiense*. Toutefois ces deux critères ont été mis en doute (Wijers 1960 ; Lester 1933). De même, l'aspect clinique de la maladie a été controversé puisqu'il existerait des formes aiguës à *Trypanosoma brucei gambiense*, et chroniques à *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Gentilini *et al.* 1982). Certains auteurs considèrent les deux formes parasites de l'homme comme des variants génétiques de *T. brucei* parasite du bétail, et non comme des sous-espèces (De Puytorac *et al.* 1987).

1. 3. Cycle évolutif

Le cycle de vie de ce parasite digène s'effectue en partie dans le sang de l'hôte mammifère, et en partie dans le tube digestif de l'insecte vecteur : le diptère hématophage du genre *Glossina* (mouche tsé-tsé). *Trypanosoma brucei* possède la propriété de se multiplier par division binaire longitudinale (mitose). Ce parasite, cellule fusiforme de 10 à 40 μm , est mobile, grâce à un flagelle dirigé vers l'avant, relié à la masse cytoplasmique par une membrane ondulante (photo 1). Le développement plus ou moins important de ce flagelle, et la position relative du kinétoplaste, permettent de distinguer plusieurs stades morphologiques du parasite chez l'insecte et chez l'hôte vertébré. Ces stades correspondent à différentes phases successives du cycle évolutif du trypanosome. La figure 2 présente le cycle évolutif du parasite, d'après Vickerman *et al.* (1969).

Chez le mammifère, après inoculation par la glossine, le parasite se multiplie d'abord localement dans le collagène dermique (chancre d'inoculation ou "trypanome"), puis dans la circulation sanguine générale et dans le système lymphatique. On les trouve sous trois formes trypomastigotes (Hoare 1972) : forme longue, forme intermédiaire et forme courte. La forme longue ou forme grêle (type "slender") présente un flagelle libre et une membrane ondulante, et se multiplie très activement dans le sang. La forme intermédiaire possède un flagelle plus court. Elle constitue une étape de transformation vers la forme courte. Cette forme courte, trapue (type "stumpy") sans flagelle libre, ne se divise plus dans le sang de l'hôte. Elle constitue la forme infestante pour l'insecte vecteur qui se contamine lors d'un repas sanguin pris sur le mammifère. La forme nucléopostérieure, forme trapue particulière dont le noyau est déplacé à l'extrémité postérieure de la cellule, est produite par une division cellulaire spéciale, lorsque les deux noyaux sont arrangés dans un plan longitudinal.

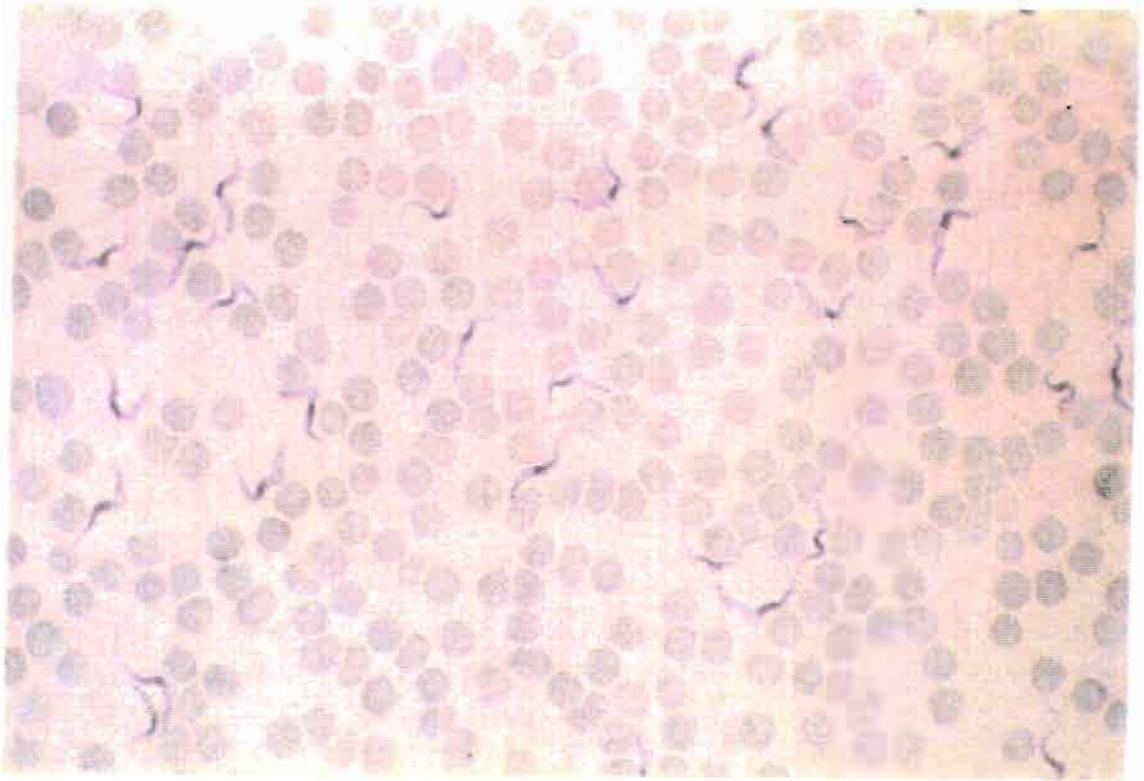


Photo 1 : *Trypanosoma brucei*

Trypomastigotes formes grêles dans le sang du mammifère hôte (photo J.L.Frézil, ORSTOM). Sur chaque cellule parasitaire, on distingue la membrane ondulante, le noyau et le kinétoplaste.

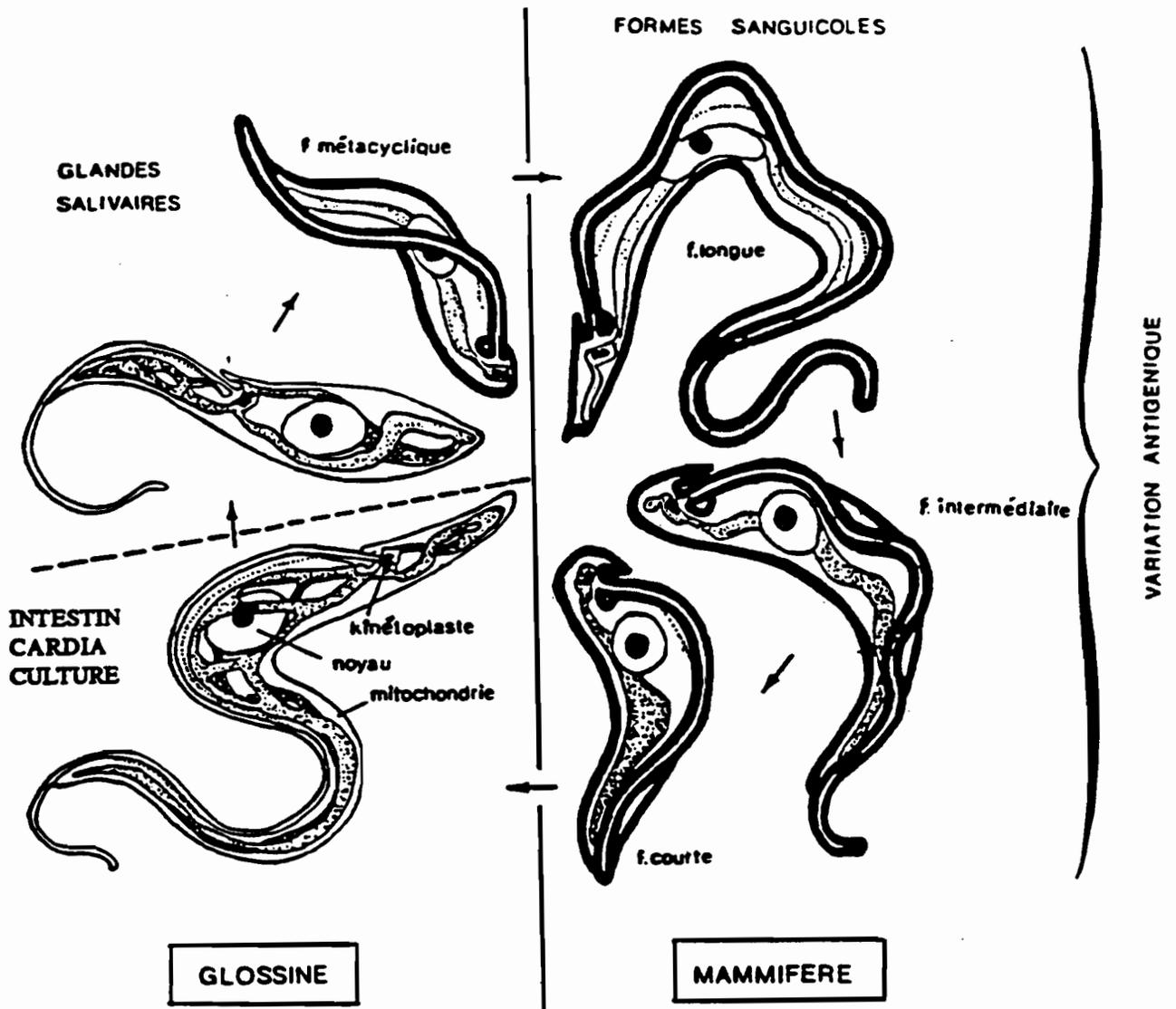


Figure 2 : Cycle évolutif de *Trypanosoma brucei* (Vickerman *et al.* 1969). La membrane cellulaire en trait épais représente l'enveloppe de glycoprotéines de surface variables, acquise dès le stade métacyclique, permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte vertébré.

Chez le vecteur, les premières formes de multiplication sont appelées formes procycliques. Après avoir traversé l'œsophage et le proventricule, les trypomastigotes se multiplient activement dans l'intestin moyen de la glossine sous formes grêles, puis contournent la membrane péritrophique à son extrémité postérieure pour passer dans l'espace ectopéritrophique. Dans cet espace, apparaissent des formes épimastigotes (migration du corps basal du flagelle en avant du noyau). Les parasites remontent vers la région antérieure de l'intestin, retraversent la membrane péritrophique au niveau du proventricule, gagnent alors l'hypopharynx et, enfin, les glandes salivaires. Fixé à la paroi, le parasite se multiplie sous forme épimastigote, puis donne des formes trypomastigotes métacycliques. Celles-ci constituent les formes infectieuses pour l'hôte vertébré, entraînées par la salive de l'insecte lors de la piqûre.

A côté du réservoir humain, il existe un réservoir animal pour les trypanosomes parasites de l'homme. Pour l'Afrique de l'est, le rôle réservoir des mammifères sauvages (antilopes) et domestiques (bétail) a été établi depuis de nombreuses années (Heisch *et al.* 1958 , Onyango *et al.* 1966 , cités par Kuzoe 1991). Le réservoir sauvage constituerait le réservoir principal de la maladie. En Afrique centrale et occidentale, l'homme est le principal réservoir de la maladie. Toutefois, il semble que les mammifères domestiques (porc, chèvre et mouton) puissent jouer un rôle accessoire (Mehlitz *et al.* 1982 ; Scott *et al.* 1983 ; Truc 1991), ce qui expliquerait le maintien de l'endémie dans des régions où des cas humains isolés se produisent sporadiquement.

2. LA TRYPANOSOMIASE AFRICAINE

L'aire de répartition du parasite *Trypanosoma brucei* est conditionnée par celle de son insecte vecteur : la glossine ou mouche tsé-tsé. Celle-ci se rencontre sur le continent africain, entre 15° de latitude Nord et 25° de latitude Sud (figure 3).

2. 1. Pathogénicité chez l'homme

Sur l'aire de répartition du parasite, la distribution de la maladie du sommeil se fait de façon discontinue. La trypanosomiase est toujours endémique dans 36 pays d'Afrique sub-saharienne où l'on estime que 50 millions de personnes, vivant dans 200 foyers d'endémie, sont exposées au risque de contracter cette maladie. Bien qu'il ne soit pas possible de connaître avec précision l'incidence de l'infection chez l'homme, on évalue à 25000 le nombre annuel de nouveaux cas (W.H.O. 1986).

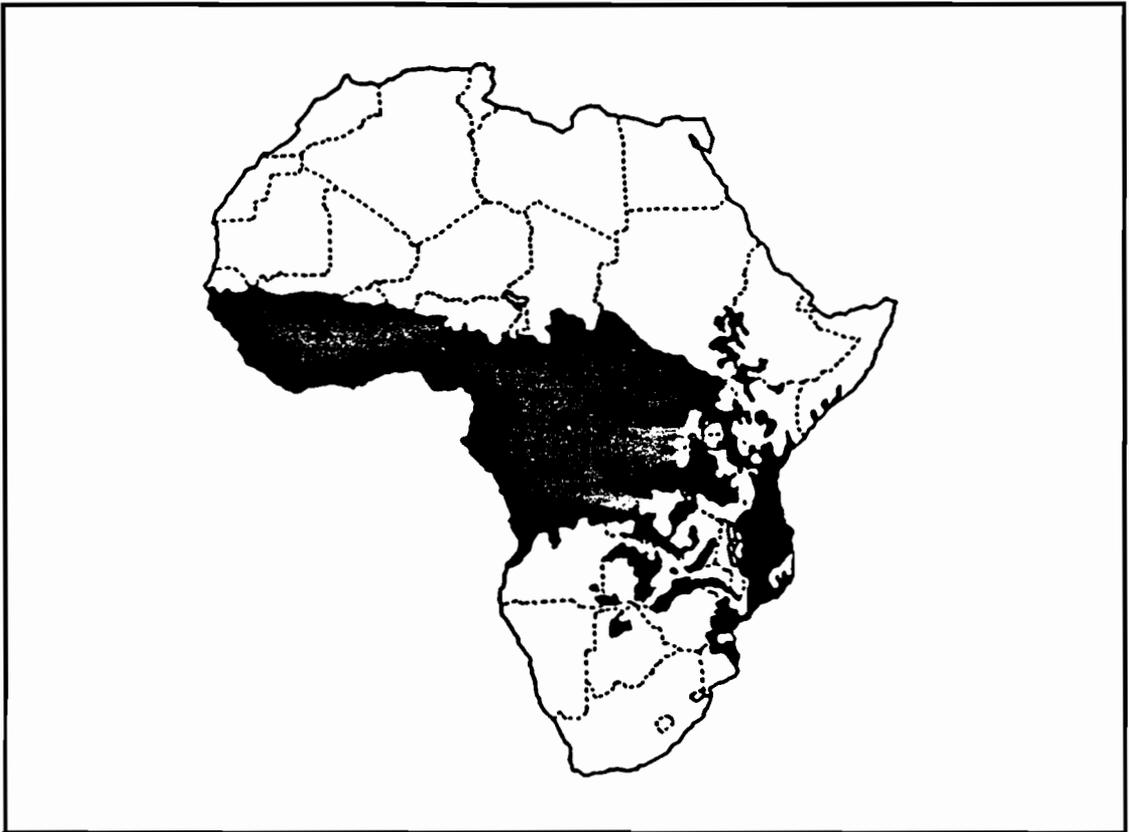


Figure 3 : Aire de répartition des glossines.
Document W.H.O. (1986).

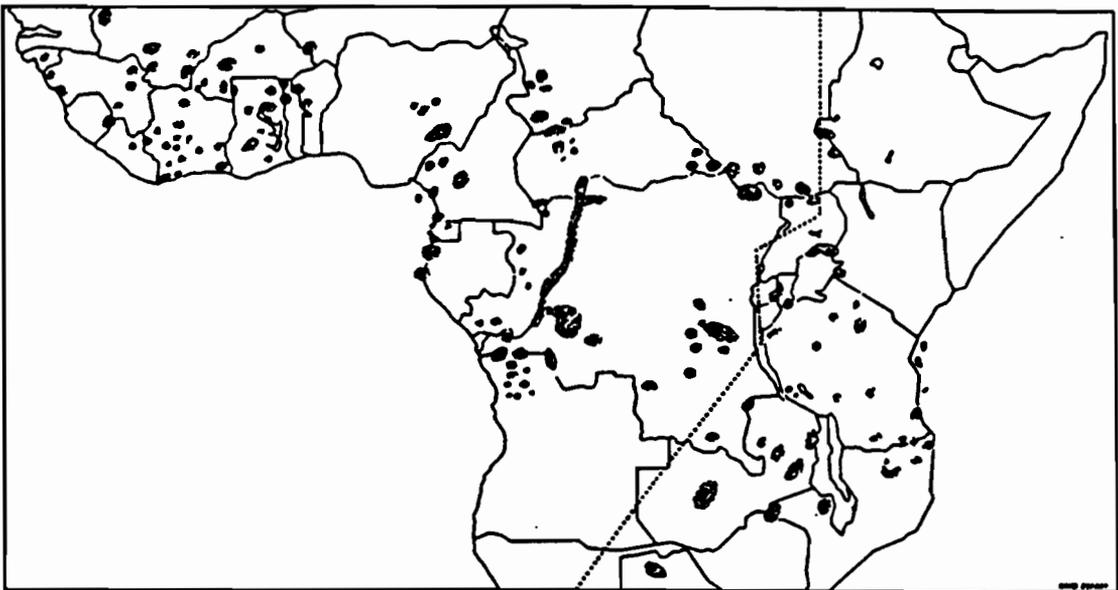


Figure 4 : Répartition géographique des principaux foyers de la Trypanosomiase Humaine Africaine.
Document W.H.O. (1986).

2. 1. 1. Les principaux foyers de trypanosomiase

La trypanosomiase humaine africaine (ou THA) montre une recrudescence inquiétante, surtout en Afrique centrale et orientale. A l'heure actuelle les principaux foyers sont localisés dans les pays suivants : Angola, Burkina Faso, Cameroun, Congo, Côte-d'Ivoire, Gabon, Guinée Konacry, Guinée Equatoriale, Ghana, Libéria, Mali, Mozambique, Nigéria, Ouganda, République Centrafricaine, Ruanda, Soudan, Tchad, Tanzanie, Zaïre et Zambie (figure 4).

2. 1. 2. Aspects cliniques de la maladie

Après inoculation du parasite par la piqûre de l'insecte vecteur, la maladie évolue chez l'homme en 2 phases :

- La 1^{ère} période (lymphatico-sanguine) correspond à une multiplication active du parasite dans le sang et le système lymphatique, et est caractérisée par des accès de fièvre, des céphalées, une tachycardie et une hypertrophie de la rate.

- La 2^{ème} période (méningo-encéphalitique) correspond au passage du parasite dans le liquide céphalo-rachidien. A ce stade, on observe souvent une hypertrophie des ganglions rachidiens, et se manifestent des troubles généraux du système nerveux : troubles psychiques, sensitifs et neuro-endocriniens, inversions nyctémérales. Les somnolences de plus en plus longues aboutissent à la cachexie sommeilleuse terminale.

Dans la forme chronique de la maladie, la 2^{ème} période peut débuter quelques mois, aussi bien que plusieurs années après la piqûre infestante. La parasitémie décroît au cours de l'évolution de la maladie. Au contraire, dans la forme aiguë de la maladie, la parasitémie reste élevée, les symptômes de la phase lymphatico-sanguine sont souvent plus marqués (fièvre forte, amaigrissement prononcé) et la mort peut survenir en moins d'un an.

2. 1. 3. Diagnostic et traitement

Le diagnostic de la maladie est réalisé par recherche du parasite sur sang frais ou dans le liquide céphalo-rachidien, ou par la recherche d'anticorps dirigés contre les

antigènes de surface du parasite, principalement par le test d'agglutination directe Testryp CATT (Magnus *et al.* 1978). En ce qui concerne la thérapeutique, le traitement reste basé sur trois drogues : deux trypanocides qui ne sont actifs qu'au stade initial de la maladie (la pentamidine et la suramine) et un trypanocide majeur qui est actif sur tous les stades de l'affection : le mélarsoprol (Duteurtre *et al.* 1986). Un nouveau médicament, l'eflornithine, plus connu sous le nom de DFMO (pour difluorométhylornithine), suscite actuellement les plus grands espoirs (Kuzoe 1991).

2. 1. 4. Variation antigénique

Trypanosoma brucei possède la propriété de changer très facilement sa couverture antigénique, ce qui lui permet de se maintenir malgré la réponse immunitaire de l'hôte vertébré. Le parasite est recouvert d'une enveloppe de glycoprotéines de surface variables (VSG) dès le stade métacyclique (figure 2). Cette variation antigénique est directement liée au polymorphisme accusé du parasite : lorsque la parasitémie augmente, les formes grêles prolifèrent, puis les anticorps détruisent la grande majorité de ces formes et provoquent l'apparition des formes trapues qui changent leur couverture antigénique et se multiplient à nouveau sous formes grêles. Ainsi, une succession de types antigéniques variables (variable antigene types : VATs) apparaît dans le sang du mammifère hôte, au cours de l'infection, alors que la parasitémie fluctue (Vickerman 1985). Cette variation antigénique constitue un lourd obstacle à la conception d'un éventuel vaccin.

2. 2. Trypanosomiase animale

Les infections à *Trypanosoma brucei* chez les animaux domestiques et sauvages sont généralement paucisymptomatiques, du fait de la grande trypanotolérance que présentent ces animaux. Dans la pathologie des bovins, *T. brucei* n'a donc qu'une faible importance en comparaison des deux autres espèces de trypanosomes : *T. congolense* et *T. vivax*, qui provoquent d'importants dégâts dans les troupeaux. Chez le cheval, le chien et les Camélidés, *Trypanosoma evansi* est particulièrement pathogène, provoquant anémies, œdèmes et amaigrissements. L'issue est en général fatale pour ces animaux.

3. ORGANISATION DU GENOME PARASITAIRE

L'ADN de *Trypanosoma brucei* est localisé dans deux parties différentes de la cellule : le noyau (ADN nucléaire) et le kinétoplaste (ADN kinétoplastique). Le kinétoplaste, caractéristique de la famille des Kinétoplastidés, est un organite cytoplasmique, localisé près des corps basaux flagellaires ; il s'agit en fait d'une partie de la volumineuse mitochondrie du parasite.

3. 1. L'ADN nucléaire

Du fait de l'impossibilité d'observer des chromosomes ou des unités d'ADN assimilables à des chromosomes, et en l'absence de preuves cytologiques classiques de méiose, gamétogenèse et syngamie, *Trypanosoma brucei s.l.* a longtemps été considéré comme un organisme asexué de ploïdie inconnue. A présent, les nombreuses études menées dans cette voie ont apporté beaucoup d'informations relatives à la structure du génome du parasite.

3. 1. 1. Mise en évidence de la diploïdie

Depuis les premières observations de profils isoenzymatiques à plusieurs bandes caractéristiques des hétérozygotes pour des enzymes monomériques et dimériques (Godfrey & Kilgour 1976 ; Gibson *et al.* 1980 ; Tait 1980), l'hypothèse de travail qui prévaut est que le génome de *Trypanosoma brucei* est diploïde (chaque chromosome existe en deux exemplaires). Cette hypothèse a été corroborée, en ce qui concerne les formes trypomastigotes (sanguicoles et procycliques), par des mesures portant sur la quantité d'ADN et la complexité du génome (Borst *et al.* 1982), ainsi que par une analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction d'un certain nombre de gènes d'enzymes glycolytiques (Gibson *et al.* 1985). A l'aide du même type de marqueurs, on a pu postuler que les formes métacycliques du parasite étaient également diploïdes (Kooy *et al.* 1989 ; Tait *et al.* 1989). Cependant, d'autres hypothèses, quoique moins parcimonieuses, restent compatibles avec de telles observations (anéuploïdie, duplication dans un génome haploïde). Nous tiendrons compte de cette restriction dans notre analyse du polymorphisme enzymatique.

3. 1. 2. Structure

Les études de caryotypes basés sur des électrophorèses en champ pulsé (Gibson & Borst 1986 ; Van der Ploeg *et al.* 1984) ont montré que le génome de *Trypanosoma brucei* est constitué de plus de 100 molécules chromosomiques, la majeure partie étant de petite taille. On distingue en fait trois groupes de "chromosomes" : les minichromosomes (50-150 kb), les chromosomes Intermédiaires (150-700 kb), et les grands chromosomes (>700 kb). Le nombre et la taille des chromosomes intermédiaires varie beaucoup d'un stock à l'autre (Gibson & Borst 1986). Il existerait au moins 7 paires de chromosomes homologues parmi les grands chromosomes (Gottesdiener *et al.* 1990). Contrairement aux chromosomes Intermédiaires, la ségrégation de ces grands chromosomes se ferait de façon mendélienne (Gibson 1989).

L'ADN nucléaire de *Trypanosoma brucei* possède de nombreuses séquences d'ADN répétées de localisation variée. Elles peuvent se situer au niveau des gènes codant pour les ARN ribosomiaux (Hide 1988), ou, comme la séquence *ingi*, dispersées dans tout le génome. Cette séquence de 5,2 kilobases, représentée par 150 à 250 copies, est un rétrotransposon, capables d'auto-réplication à partir de l'ARN (Kimmel *et al.* 1987).

3. 2. L'ADN kinétoplastique

L'ADN kinétoplastique de *Trypanosoma brucei* représente 4% de l'ADN total (Borst *et al.* 1982). Il est formé d'un réseau de molécules circulaires existant à des milliers d'exemplaires : les minicercles (1000 paires de bases). Ces minicercles sont enchevêtrés avec des maxicercles (23 kb).

3. 2. 1. Le maxicercle

Au nombre de 50 par cellule, les maxicercles sont homogènes quant à leur séquence nucléotidique. Considéré comme l'équivalent de l'ADN mitochondrial des eucaryotes supérieurs (Fairlamb *et al.* 1978), le maxicercle contient une région transcrite codant pour des ARN ribosomiaux et des protéines kinétoplastiques. Par l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction de son ADN, il est proposé comme outil taxonomique (Borst *et al.* 1981 ; Gibson *et al.* 1985 ; Truc 1991).

3. 2. 2. Le minicercle

Les minicercles sont hautement variables, puisque l'on estime qu'il existe 100 à 300 séquences différentes dans une même cellule (Simpson 1987). De fonction longtemps inconnue, le minicercle a récemment été trouvé impliqué dans le mécanisme d'édition de l'ARN. Il serait donc en partie transcrit (Simpson 1990), et fournirait, grâce à sa multiplicité et son hétérogénéité, une information génétique suffisante pour le mécanisme d'édition (Borst 1991).

Par séquençage, Chen et Donelson (1980) montre la présence d'une séquence conservée de 122 paires de bases (cf chapitre II § 4.). Celle-ci présenterait de grandes homologies avec une séquence de 130 paires de bases du minicercle de *T. equiperdum* (Barrois *et al.* 1981) et une de 145 paires de bases chez *T. evansi* (Bajyana Songa *et al.* 1990). L'origine des changements dans la région variable est considérée comme le résultat de la combinaison d'un taux élevé de substitutions de nucléotides et de réarrangements de segments, impliquant la recombinaison entre minicercles. En effet, d'après Gibson et Garside (1990), les minicercles hérités lors des expériences de recombinaison génétique, seraient un mélange des types parentaux. Quoiqu'il en soit, ce minicercle a toujours été considéré comme trop hétérogène et d'une évolution trop rapide pour constituer un marqueur phylogénique (Borst *et al.* 1981).

4. MODE DE REPRODUCTION DU PARASITE

4. 1. Mise en évidence de la sexualité

Par l'analyse de la variabilité isoenzymatique de populations de *Trypanosoma brucei*, Tait (1980 ; 1983) propose l'hypothèse que ce parasite possède une structure diploïde, et que ses populations répondent à un modèle potentiellement panmictique (c'est-à-dire une situation analogue à celle qui prévaut chez la plupart des eucaryotes supérieurs, dont l'Homme). La preuve de la possibilité d'une recombinaison génétique entre stocks de trypanosomes a été apportée ultérieurement par des expériences de croisement au laboratoire (Jenni *et al.* 1986 ; Wells *et al.* 1987 ; Sternberg *et al.* 1988, 1989 ; Gibson 1989 ; Gibson & Garside 1991). Après une infection mixte de la mouche par deux stocks génétiquement distincts, les formes métacycliques isolées et

cultivées sont analysées à l'aide de marqueurs isoenzymatiques (Schweizer *et al.* 1988; Sternberg *et al.* 1988), de marqueurs de polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN (Jenni *et al.* 1986 ; Wells *et al.* 1987 ; Sternberg *et al.* 1988 ; Gibson 1989) et de caryotypes moléculaires (Gibson 1989). Grâce à l'utilisation de marqueurs pour lesquels les deux stocks parentaux sont homozygotes pour des allèles différents, on peut observer l'apparition de nouveaux génotypes Improprement appelés "hybrides" (il s'agit, en fait, de génotypes ségrégeants : le terme d'hybride est réservé aux produits de croisements entre Individus d'espèces différentes). Si l'on considère les descendants obtenus locus par locus, on s'aperçoit que certains loci présentent des génotypes de ségrégation, alors que d'autres montrent un génotype parental. Il semble donc que l'héritage ne se fasse pas toujours de façon mendélienne, tous les chromosomes ne ségrégeraient pas de la même manière (Kooy 1991). De plus, pour les divers croisements étudiés, on obtient toujours un grand nombre de types parentaux dans la descendance. Cet échange génétique n'est donc pas un évènement obligatoire dans le cycle de vie du parasite, certains trypanosomes pouvant réaliser leur cycle complet chez la glossine sans subir de modification génétique (Schweizer *et al.* 1988 ; Sternberg *et al.* 1989). Certains auteurs n'ont d'ailleurs toujours obtenus que des types parentaux dans leurs diverses expériences de croisement. Toutefois, ces études montrent clairement qu'un échange génétique peut se produire entre deux stocks de *Trypanosoma brucei*, et que cette "sexualité" peut avoir lieu dans l'intestin postérieur de l'insecte vecteur (Schweizer & Jenni 1991). Divers modèles de recombinaison génétique sont alors proposés impliquant les phénomènes de méiose et de syngamie (Tait & Turner 1990 ; Turner *et al.* 1990). Kooy (1991) identifie un stade haploïde facultatif dans le cycle de vie du parasite. En fait, à l'heure actuelle, le mécanisme précis de ces échanges génétiques reste hypothétique.

4. 2. Mode de reproduction dans les populations naturelles

Si le processus d'échange génétique a été mis en évidence par des travaux de laboratoire, il reste à présent à déterminer quelle est l'importance de ce phénomène dans les populations naturelles.

Tait (1980, 1983), par l'observation d'une ségrégation allélique mendélienne et des fréquences génotypiques en accord avec l'équilibre d'Hardy-Weinberg, propose un modèle panmictique à l'intérieur de ces populations. Ces résultats sont contredits par Cibulskis (1988) qui, soulignant les limites de l'utilisation de l'équilibre

d'Hardy-Weinberg, montre que l'accord apparent avec un tel équilibre ne saurait constituer une preuve de l'existence d'échanges génétiques. Ceci est une loi générale en statistique : l'impossibilité de réfuter l'hypothèse nulle n'est pas une preuve que cette hypothèse nulle est valide. Le même auteur insiste par ailleurs sur la difficulté de cerner l'incidence réelle des phénomènes de recombinaison dans les populations naturelles, par deux observations contradictoires. D'un côté, il semble que la diversité observée ne puisse être le résultat de simples mutations sous une hypothèse de reproduction purement asexuée : il faudrait un trop grand nombre de mutations (et même des mutations récurrentes) pour générer une telle diversité. Par contre, il existe un déséquilibre de liaison entre loci et une déficience de certaines combinaisons génotypiques qui peuvent refléter l'importance relative d'une reproduction asexuée. Cibulskis suggère alors la possibilité d'une "évolution séparée de certaines lignées parasites", chacune ayant leurs caractéristiques propres. Ce type d'évolution correspond, en fait, à une structure clonale de la population, bien que l'auteur n'aille pas jusqu'à formuler explicitement cette hypothèse.

Grâce à l'étude comparée de diverses populations de *Trypanosoma brucei* isolées d'un même type d'hôte, Tait (communication personnelle) pense que l'importance de la sexualité pourrait varier selon l'hôte considéré. Ainsi une incidence plus élevée serait mise en évidence dans les populations isolées de glossines ou d'animaux sauvages, et une incidence très faible, voire une absence de sexualité, serait observée dans les populations isolées de l'homme ou d'animaux domestiques.

Dans le cadre d'une théorie clonale des Protozoaires parasites, Tibayrenc *et al.* (1990 ; 1991), considèrent des données de la littérature (Gibson *et al.* 1980 ; Mihok *et al.* 1990) en les soumettant à une analyse de génétique des populations à l'aide de tests statistiques spécifiques. Ils concluent que les échanges génétiques, dans les cycles naturels, ne sont pas suffisamment fréquents pour "brouiller le tableau" prédominant d'une structure clonale : les variants génétiques de *Trypanosoma brucei* peuvent être alors assimilés à des clones naturels (ou à des familles de clones étroitement apparentés) stables dans l'espace et dans le temps. Ces variants génétiques sont les "zymodèmes" quand la technique employée est celle des Isoenzymes, et les "schizodèmes" quand est utilisé le polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN kinétoplastique. L'hypothèse clonale permet donc de substituer à des concepts purement descriptifs (zymodèmes et schizodèmes) un concept de définition précise, ayant une grande valeur prédictive quant aux propriétés fondamentales du parasite : le clone naturel.

4. 3. Approche personnelle

L'approche théorique, que nous utiliserons dans le présent travail, est classiquement utilisée en génétique des populations : il s'agit d'observations attestant l'absence de ségrégation intralocus et de recombinaison entre loci. L'hypothèse de base de cette analyse est celle d'une reproduction sexuée libre, permettant des échanges génétiques aléatoires entre les individus au sein de la population, impliquant un réassortiment des allèles intralocus et une réassociation des différents génotypes entre les divers loci. Il est nécessaire de prendre l'hypothèse panmictique comme hypothèse nulle, car c'est la seule dont les résultats théoriques peuvent être prévus de façon fiable. L'hypothèse de structure clonale (hypothèse de travail) a été formulée sur diverses observations attestant, à l'opposé, l'absence de ségrégation intralocus et de recombinaison interloci (Tibayrenc *et al.* 1990 ; 1991). Ces différents critères de clonalité, réunis en deux groupes, sont les suivants :

1 - Critères relatifs à l'absence de ségrégation :

- Hétérozygotie fixée
- Absence ou déficit de génotypes ségrégeants
- Déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg

2 - Critères relatifs à l'absence de recombinaison :

- Génotypes multilocus surreprésentés et ubiquistes
- Absence ou déficit de génotypes recombinants
- Déséquilibre de liaison
- Corrélation entre deux séries indépendantes de marqueurs génétiques.

Ces différents critères permettent, par des mesures statistiques, de rejeter ou non l'hypothèse de départ. Les deux groupes de tests sont basés respectivement sur deux critères biologiques majeurs : l'équilibre de Hardy-Weinberg lorsque l'on considère la ségrégation des allèles à un locus donné, et le déséquilibre de liaison lorsque l'on étudie le caractère aléatoire ou non de la réassociation de génotypes d'un locus à l'autre. Mais les différents tests ne sauraient être considérés comme redondants. Selon les circonstances et la structure des données, l'un ou l'autre pourra

être davantage informatif. Par exemple, les tests de recombinaison présentent l'avantage de pouvoir être utilisés indépendamment de toute hypothèse sur la ploïdie. Cela les rend précieux dans le cas de nombreux protozoaires, dont *Trypanosoma brucei*, pour lesquels la diploïdie reste une simple hypothèse de travail.

Les considérations sur le mode de reproduction du parasite dans ses populations naturelles ont des implications épidémiologiques considérables. En effet, la valeur épidémiologique d'un variant individuel (cas d'une population panmictique) est tout à fait différente de celle d'un clone naturel (modèle de reproduction asexuée). Dans le premier cas, le génotype du variant individuel est éphémère, et ne perdure que le temps de vie de l'individu : l'unité taxonomique utile, dans ce cas, n'est pas tel ou tel génotype, mais l'espèce entière. Au contraire, dans le modèle clonal, chaque génotype est isolé génétiquement des autres, évolue pour son propre compte, et constitue donc un véritable taxon. Ceci ne signifie pas qu'il sera nécessaire d'étudier séparément tous les génotypes dans les études d'intérêt médical : on peut s'attendre à ce que de nombreux clones présentent des propriétés médicales comparables. Mais, dans le cadre de l'hypothèse clonale, ceci doit faire l'objet de vérifications soigneuses.

5. TAXONOMIE SUBSPECIFIQUE ET DIVERSITE GENETIQUE CHEZ *TRYPANOSOMA BRUCEI*

Les isoenzymes et les sondes spécifiques d'ADN constituent deux "outils" qui ont été largement utilisés dans l'étude de *Trypanosoma brucei*. Toutefois, s'ils ont été utiles pour préciser la diversité génétique du parasite, ils ont été principalement employés dans un but utilitaire diagnostic.

5. 1. Validité génétique des sous-espèces de *T. brucei*

5. 1. 1. Méthodes isoenzymatiques

Elles ont d'abord été employées dans le but de trouver une concordance entre les profils isoenzymatiques observés et les divisions subsécifiques du complexe *Trypanosoma brucei* s.l. (Godfrey & Kilgour 1976 ; Gibson *et al.* 1980 ; Tait *et al.* 1984). Si aucun profil ne peut être considéré comme spécifique des différentes sous-

espèces, une combinaison de zymogrammes à divers loci (ALAT, ASAT, ICD, PGM) a tout de même été proposée pour identifier *Trypanosoma brucei gambiense* (Gibson *et al.* 1980 ; Godfrey *et al.* 1987). Pour certains auteurs, le fait d'observer une activité enzymatique nulle à un locus (PEPC) dans tous les stocks de *Trypanosoma brucei gambiense* observés, justifie bien le statut de sous-espèce ou d'espèce jumelle de *Trypanosoma brucei* pour ce groupe (Tait *et al.* 1984). Par contre, *Trypanosoma brucei rhodesiense* ne constituerait qu'un groupe de variants de *Trypanosoma brucei brucei* (Tait *et al.* 1985). Il est à noter qu'un certain nombre de stocks d'origine humaine, responsables de formes cliniques chroniques en Afrique occidentale, ne répondent pas au profil sensé définir *T. b. gambiense*. Gibson (1986) propose de retenir pour *T. b. gambiense* une définition très pragmatique et prudente : tout stock isolé de l'homme en Afrique de l'ouest. Parmi les parasites ainsi définis, apparaît un groupe présentant une certaine homogénéité isoenzymatique, et les profils caractéristiques énoncés ci-dessus. Ce groupe, baptisé "*T. b. gambiense* groupe 1", réunirait la grande majorité des stocks isolés de l'homme en Afrique de l'ouest. A côté de ce "groupe 1", l'auteur distingue un groupe minoritaire, dit "groupe 2", dont la définition est négative : appartiennent à ce groupe tous les stocks isolés de l'homme en Afrique occidentale ne pouvant être rangés dans le groupe 1.

Les récentes analyses phylétiques et cladistiques (Godfrey *et al.* 1990 ; Stevens *et al.* 1991), basés sur 9 et 10 loci, montrent la présence de neuf groupes, et mettent en évidence une dichotomie entre Afrique de l'est et Afrique de l'ouest. Ils considèrent que *T. b. gambiense* et *T. evansi* restent des entités séparées, bien que *T. evansi* soit inclus dans un groupe de stocks isolés de l'animal en Afrique de l'ouest. *Trypanosoma brucei rhodesiense* et *Trypanosoma brucei brucei* apparaissent comme très hétérogènes, et difficiles à individualiser.

5. 1. 2. Les sondes d'ADN

Par fragmentation de l'ADN à l'aide d'enzymes de restriction, et hybridation avec des sondes spécifiques d'antigènes de surface et des sondes d'ADN génomique indéfinies, Paindavoine *et al.* (1986) pensent identifier sans ambiguïté la sous-espèce *Trypanosoma brucei gambiense* alors que *Trypanosoma brucei rhodesiense* et *Trypanosoma brucei brucei* ne peuvent être discriminées et semblent être divisées en groupes hétérogènes. Par le même type d'approche, utilisant soit des sondes d'ADN nucléaire (Pays *et al.* 1984), soit des sondes d'ADN kinétoplastique du maxicercle

(Gibson *et al.* 1985), d'autres auteurs sont également à même d'individualiser la sous-espèce *Trypanosoma brucei gambiense*.

Les travaux de Hide *et al.* (1990), basés sur l'utilisation de sondes d'ADN répété (parties codantes et non-codantes des gènes de l'ARN ribosomal) sont interprétés par une analyse phylétique. Ils confirment l'existence d'un groupe homogène de *Trypanosoma brucei gambiense* en Afrique de l'ouest, et permettent d'individualiser deux autres entités : l'une regroupe des stocks de *T. b. gambiense* et *T. b. brucei* de l'ouest, l'autre des stocks de *T. b. rhodesiense* et *T. b. brucei* de l'est. L'auteur propose deux sortes de *T. b. gambiense* ; certains (ceux qui sont proches des stocks animaux) seraient indistinguables des *T. b. brucei* de l'ouest, tout comme *T. b. rhodesiense* et *T. b. brucei* à l'est de l'Afrique. Il distingue nettement *T. evansi* comme une entité distincte.

En conclusion, la taxonomie subs spécifique qui ressort de ces différentes études est encore passablement confuse. Les résultats fournis par les Isoenzymes d'une part, et par les sondes moléculaires d'autre part, convergent cependant pour suggérer l'existence d'un groupe distinct qui représenterait la majorité des stocks humains d'Afrique centrale et occidentale. Ce groupe serait la seule entité que les marqueurs génétiques puissent identifier de façon robuste au sein du taxon *T. brucei s.l.*. Tout le reste du taxon ne présente pas d'individualité génétique nette.

Du point de vue du mode de reproduction du parasite, on peut noter que la possibilité d'identifier des marqueurs spécifiques de tel ou tel sous-groupe (ici : le "*T. brucei gambiense* groupe 1") implique en elle-même que l'espèce *T. brucei s.l.*, dans son ensemble, ne constitue pas une seule unité potentiellement panmictique.

5. 1. Approche personnelle

Nous avons pris comme hypothèse nulle de départ que le taxon *T. brucei s.l.* constitue une seule unité potentiellement panmictique, au sein de laquelle il est impossible d'individualiser des sous-groupes. L'analyse de génétique des populations portant sur le mode de reproduction a précédé l'étude de taxonomie subs spécifique proprement dite. En effet, il serait profondément illogique d'essayer de classer des entités qui ne seraient en fin de compte que de simples variants individuels éphémères.

Grâce à une étude isoenzymatique sur un grand nombre de loci (18 loci polymorphes), nous avons étudié les ressemblances et les liens de parenté entre les différents zymodèmes observés, par des méthodes de classification numérique automatique. Ces méthodes présentent toutes des contraintes et reposent sur des hypothèses de travail spécifiques qui ne sont pas toujours satisfaites. Pour cette raison, nous avons multiplié et diversifié les méthodes d'analyse afin de traduire au mieux la diversité observée. Nous avons donc utilisé des méthodes d'analyse phénétique, cladistique (parcimonie et compatibilité) et multivariée (analyse factorielle des correspondances). C'est sur cette base solide et sur l'analyse préalable de génétique des populations, que nous avons interprété à posteriori les résultats de la reconnaissance des zymodèmes par notre sonde d'ADN kinétoplastique. Ce travail diffère donc, par son approche, de celui de Paindavoine *et al.* (1986) qui ont établi une classification à priori à partir des résultats obtenus avec leurs sondes d'ADN. En effet, une telle utilisation "à l'aveugle" d'une sonde monogénique n'est pas satisfaisante : un marqueur monogénique employé isolément ne peut fournir d'indication utile sur la structure des populations.

CHAPITRE II :
MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

A. MATERIEL

1. STOCKS CARACTERISES AU LABORATOIRE

1. 1. Laboratoires donneurs

Les stocks de trypanosomes proviennent de divers centres donneurs européens : Tsetse Research Laboratory (Bristol, Royaume-Uni), Wellcome Unit of Molecular Parasitology (Glasgow, Royaume-Uni), Institut de Médecine Tropicale "Prince Léopold" (Anvers, Belgique), et de centres outre-mer : Institut Pierre Richet (Bouaké, Côte-d'Ivoire), Centre ORSTOM de Brazzaville (Congo). La majeure partie des stocks fournis concerne des formes parasitaires sanguicoles. Les quelques stocks reçus sous forme procyclique proviennent d'une transformation par passage cyclique chez la glossine effectuée au Tsetse Research Laboratory de Bristol.

1. 2. Historique des stocks

L'origine des stocks (pays, hôte et année d'isolement), les diverses références bibliographiques relatives à ces stocks et leur identification subsppécifique ("appartenance à l'une des 3 sous-espèces") sont réunies dans le tableau 1.

Au total 81 stocks ont été étudiés : 78 stocks de *Trypanosoma brucei* et 3 stocks de *Trypanosoma evansi*. L'échantillon de *Trypanosoma brucei* regroupe des stocks de 16 pays différents : Burkina Faso, Cameroun, Congo, Côte-d'Ivoire, Ethiopie, Gambie, Kenya, Libéria, Nigéria, Ouganda, Ruanda, Sénégal, Soudan, Tanzanie, Zaïre et Zambie. Il couvre une aire géographique très large puisque ces pays sont répartis sur toute l'aire d'endémie de la trypanosomiase : de la côte ouest (Sénégal) à la côte est (Ethiopie, Kenya) et au sud jusqu'à la Zambie. La carte (figure 5) situe les différents pays d'isolement. Ces stocks ont été isolés de divers hôtes : l'homme, la glossine (*Glossina palpalis*, *Glossina morsitans*, *Glossina pallidipes*) et de nombreux

Tableau 1 : Historique des souches étudiées : Sont indiqués successivement : - le code OMS avec, entre (), le code ITMAP (Institut de Médecine Tropicale d'Anvers) et l'indication de clone. - l'espèce : br. = *T.brucei* ; ev. = *T.evansi*. - l'hôte : M. dom. = mammifère domestique ; M. sauv. = mammifère sauvage ; (les noms des divers hôtes sont donnés annexe 14). - le pays d'origine. - l'année d'isolement. - les références bibliographiques relatives à l'étude de la variabilité et à l'identification de ces souches (I = par isoenzymes ; S = par sondes d'ADN nucléaire) : 1: Gibson *et al.* 1980 (I). 2: Godfrey *et al.* 1987 (I). 3: Painsavoine *et al.* 1986 (S). 4: Tait *et al.* 1984 (I). 5: Mehlitz *et al.* 1982 (I). 6: Gibson & Gashumba 1983 (I). 7: Richner & Jenni 1986 (I). 8: Stevens *et al.* 1989 (I). 9: Kaukas *et al.* 1990 (I). 10: Hide *et al.* 1990 (S). 11: Stevens *et al.* 1991 (I). 12: Gibson *et al.* 1983 (I). 13: Boid *et al.* 1989 (I). 14: Truc *et al.* 1991 (I). 15: Truc 1991 (I). 16: Penchenier *et al.*, en préparation (I). - la sous-espèce : Identification de la souche et références bibliographiques s'y rapportant : T.b.b. = *Trypanosoma brucei brucei*, T.b.g. = *Trypanosoma brucei gambiense*, T.b.r. = *Trypanosoma brucei rhodesiense*, non-g. = "non gambiense".

Code OMS	sp.	Hôte	Pays	Année	Réf.bibl.	"sous-espèce"
MHOM/BF/80/MURAZ 15	br.	Homme	BURKINA FASO	1980	2. 9.	T.b.g. (2. 9)
MHOM/BF/77/SJ	br.	Homme	BURKINA FASO	1977	2. 11	T.b.g. (2. 11)
MBOI/BF/80/TC 125	br.	M.dom.	BURKINA FASO	1980	3. 5	non-g. (3)
MBOI/BF/80/TC 126	br.	M.dom.	BURKINA FASO	1980	5	
MKOK/BF/80/KK 39	br.	M.sauv.	BURKINA FASO	1980	5. 11	
MALC/BF/80/AB 14	br.	M.sauv.	BURKINA FASO	1980	5. 11	
MKOK/BF/80/KK 14	br.	M.sauv.	BURKINA FASO	1980	5	
MHOM/CM/88/M 001	br.	Homme	CAMEROUN	1988	11	T.b.g. (11)
MHOM/CM/88/A 004	br.	Homme	CAMEROUN	1988	11	T.b.g. (11)
MHOM/CM/88/A 005	br.	Homme	CAMEROUN	1988	11	T.b.g. (11)
MHOM/CM/88/A 009	br.	Homme	CAMEROUN	1988	11	T.b.g. (11)
MHOM/CM/88/B 014	br.	Homme	CAMEROUN	1988	11	T.b.g. (11)
MHOM/CM/88/B 016	br.	Homme	CAMEROUN	1988	11	T.b.g. (11)
MHOM/CM/88/B 018	br.	Homme	CAMEROUN	1988	11	T.b.g. (11)
MHOM/CM/75/BIM (1789) (Clone)	br.	Homme	CAMEROUN	1975	3. 4. 10. 15	T.b.g. (3. 4. 10)
MHOM/CM/74/MOS (1787) (Clone)	br.	Homme	CAMEROUN	1974	3. 4.10.11.15	T.b.g. (3. 4. 10. 11)
MHOM/CM/79/JUA (1790)	br.	Homme	CAMEROUN	1979	3. 4. 11. 15	T.b.g. (3. 4. 11)
MHOM/CG/80/PEYA (1847)	br.	Homme	CONGO	1980	11. 15	T.b.g. (11)
MHOM/CG/89/DIM	br.	Homme	CONGO	1989	15	
MHOM/CG/89/MABAYA	br.	Homme	CONGO	1989	15	
MHOM/CG/89/MBOUL	br.	Homme	CONGO	1989	15	
MHOM/CG/89/SIMJ	br.	Homme	CONGO	1989	15	
MHOM/CG/74/OK (1841)	br.	Homme	CONGO	1974	3.4.11.14.15	T.b.g. (3. 4. 11)
GPAP/CI/82/KP2 (Cl.38)	br.	Glossine	COTE D'IVOIRE	1982	3. 9	non-g. (3). T.b.b. (9)
MHOM/CI/78/TH1 - 037	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	3. 5. 11	non-g. (3)
MHOM/CI/78/TH 112	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	11	
MHOM/CI/78/TH 149	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	5. 9. 11	T.b.g. (9. 11)
MHOM/CI/79/MURAZ 1	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1979	2	T.b.g. (2)
MHOM/CI/79/MURAZ 3	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1979	2	non-g. (2)
MHOM/CI/78/DAL 069	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	3. 5. 9. 11	T.b.g. (3. 9. 11)
MHOM/CI/86/DAL 967	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1986	11	T.b.g. (11)
MHOM/CI/86/DAL 972	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1986	11	T.b.g. (11)
MHOM/CI/52/ELIANE (2188) (Cl.)	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1952	3. 4. 10	T.b.g. (3. 4. 10)
MHOM/CI/78/TH 2 (Clone)	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	5. 9	

Tableau 1 : Suite.

Code OMS	sp.	Hôte	Pays	Année	Réf.bibl.	"sous-espèce"
MHOM/CI/78/TH 113	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1978		
MHOM/CI/??/NANA	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1977	2. 11	T.b.g. (2. 11)
MHOM/CI/??/DAL 1072	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1977	16	
MSUS/CI/82/TSW 53	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1982	11	
MSUS/CI/79/ TBD	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1979	3. 11	non-g. (3)
MSUS/CI/82/TSW 65-KP1 (Cl.A)	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1982	11	
MSUS/CI/82/TSW 65-KP1 (ex BIIT)	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1982	11	
MSUS/CI/82/TSW 125-KP1 (Cl.B)	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1982	3. 11	T.b.g. (3)
MSUS/CI/84/IPR 1113	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1984	16	
MSUS/CI/85/IPR 01122	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1985	16	
MSUS/CI/86/IPR 10158(3)	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1986	16	
MHOM/ET/67/GAMBELA I	br.	Homme	ETHIOPIE	1967	1	
MHOM/ET/69/GAMBELA III	br.	Homme	ETHIOPIE	1969		
MBOT/GM/77/GB 2	br.	M.dom.	GAMBIE	1977	1	T.b.b. (1)
MBOT/GM/77/GB 6	br.	M.dom.	GAMBIE	1977	1	T.b.b. (1)
MCAP/KE/81/M 253	br.	Chèvre	KENYA	1981	11	
GPAL/KE/69/EATRO 1535 (Clone)	br.	Glossine	KENYA	1969		
GPAL/KE/69/K 21 (Clone)	br.	Glossine	KENYA	1969		
GPAL/KE/70/K 26 (Clone)	br.	Glossine	KENYA	1970		
GPAL/KE/69/S 05 (Clone)	br.	Glossine	KENYA	1969	3	non-g. (3)
GPAL/KE/69/S 29 (Clone)	br.	Glossine	KENYA	1969		
MHOM/KE/61/EATRO 112 (Clone)	br.	Homme	KENYA	1961		
MHOM/KE/82/LVH 143	br.	Homme	KENYA	1982	11	
GPAL/LR/80/TGP 2	br.	Glossine	LIBERIA	1980		
GMOS/NG/70/NITR 40.12	br.	Glossine	NIGERIA	1970	3. 4. 10	non-g. (3. 4). T.b.b. (10)
GMOS/NG/70/YGR 3	br.	Glossine	NIGERIA	1970		
MBOT/NG/77/IBADAN 22 (Cl.A)	br.	M.dom.	NIGERIA	1977	1. 11	T.b.b. (1)
MBOT/NG/77/IBADAN 42 (Cl.B)	br.	M.dom.	NIGERIA	1977	1	T.b.b. (1)
MBO?/NG/77/IBADAN 74 (Cl.A)	br.	M.dom.	NIGERIA	1977	1	T.b.b. (1)
MOVS/NG/68/SH 1	br.	Mouton	NIGERIA	1968	4	non-g. (4)
GPAL/UG/69/EATRO 1242 (Clone)	br.	Glossine	OUGANDA	1969		
MHOM/UG/79/UTRO 2528	br.	Homme	OUGANDA	1979	6. 7	
MTRG/UG/66/EATRO 1125	br.	M.sauv.	OUGANDA	1966	3. 10. 15	non-g. (3). T.b.b. (10)
MHOM/RW/70/ 0404	br.	Homme	RUANDA	1970		
MHOM/SN/54/TREU 99	br.	Homme	SENEGAL	1954		
MHOM/SD/82/BİYAMINA (Cl.B)	br.	Homme	SOUDAN	1982	2	T.b.g. (2)
MPAN/TZ/71/STIB 215	br.	M.sauv.	TANZANIE	1971	1	T.b.b. (1)
MHOM/ZR/71/C 126 (Clone)	br.	Homme	ZAIRE	1971	1. 11. 14. 15	T.b.g. (1. 11)
MHOM/ZR/90/TONU (2206)	br.	Homme	ZAIRE	1990		
MHOM/ZR/90/DIEYI (2228)	br.	Homme	ZAIRE	1990		
MOVS/ZR/87/SH 161	br.	Mouton	ZAIRE	1987	15	
MHOM/ZM/74/ 058 (Cl.A3)	br.	Homme	ZAMBIE	1974	1	T.b.r. (1)
MHOM/ZM/82/TRPZ 227	br.	Homme	ZAMBIE	1982	11	
MBOI/ZM/82/TRPZ 166	br.	M.dom.	ZAMBIE	1982		
MHYD/CO/73/ E 8	ev.	M.sauv.	COLOMBIE	1973	1. 8. 11	T. evansi
MCAM/KE/80/KETRI 2480	ev.	Chameau	KENYA	1980	8. 11. 12	T. evansi
MCAM/SD/77/KASSALA 4 (Clone)	ev.	Chameau	SOUDAN	1977	13	T. evansi

mammifères. Parmi ces derniers, on trouve des mammifères domestiques comme le porc, la chèvre, le mouton, le boeuf et le zébu (*Bos indicus*), et des mammifères sauvages : le kob (*Kobus kob*), le lion (*Panthera leo*), le bubale (*Alcelaphus*), le guib harnaché (*Tragelaphus*). L'isolement s'étend sur une période de 38 années : de 1952 à 1990. Les stocks de *Trypanosoma evansi* ont été isolés sur des chameaux africains (Kenya et Soudan) et sur un ragondin (*Hydrochaeris*) d'Amérique du Sud (Colombie).

2. DONNEES DE LA LITTERATURE

Godfrey *et al.* (1990) ont effectué une importante synthèse des données isoenzymatiques concernant les stocks caractérisés par le laboratoire de Bristol (Tsetse Resarch Laboratory). Cette étude concerne 945 stocks isolés entre 1955 et 1984. Les hôtes sont très variés puisque l'on retrouve : l'homme, plusieurs espèces de glossine (*Glossina palpalis palpalis*, *G. morsitans morsitans*, *G. fuscipes fuscipes*, *G. tachinoides*, *G. pallidipes*), et de très nombreux mammifères domestiques (dont le chien) et sauvages : la girafe (*Giraffa*), l'hippopotame (*Hippopotamus*), le phacochère (*Phacochoerus*) et de nombreux Cervidés. Les stocks humains sont au nombre de 448 ; les stocks de glossine, au nombre de 74 ; les stocks isolés d'animaux domestiques, au nombre de 364 ; et d'animaux sauvages, 59. En ce qui concerne les lieux de récolte, le Botswana et le Mozambique s'ajoutent à notre liste de pays.

L'importance de l'échantillon communiqué par Godfrey *et al.* a permis, après des divisions selon des critères d'hôtes et de géographie, de travailler sur des "sous-échantillons" sympatriques de taille suffisamment grande pour l'application de tests statistiques.

Deux autres séries de données apportent des informations qui complètent bien l'étude de Godfrey *et al.* :

Mihok, Otieno et Darji (1990) ont publié une étude très documentée sur une importante série de stocks provenant tous d'une même région du Kenya, la Lambwe valley, ce qui nous a permis d'appliquer nos tests de génétique des populations dans des conditions de sympatrie très satisfaisantes. Nous nous sommes plus spécialement attachés à analyser les stocks isolés d'hôtes animaux, dans le but d'élucider la structure des populations dans le réservoir non humain (voir aussi Tibayrenc *et al.* 1991). Cet échantillonnage porte sur 154 stocks.

Gibson & Welde (1985) ont également analysé des stocks en provenance de la même région. Nous avons étudié dans leurs données les stocks d'origine humaine, année par année, pour 3 années consécutives, dans le but d'analyser la structure des populations parasites de l'Homme dans d'excellentes conditions de sympatrie, et dans un laps de temps limité. Les échantillons comprennent 24 stocks pour 1980, 34 pour 1981 et 26 pour 1982, ce qui est amplement suffisant pour appliquer les tests de façon fiable.

B. METHODES

1. CULTURE DES PARASITES

1. 1. Formes sanguines

La production en masse est réalisée sur rat Whistar, à partir de stabilats de sang. L'animal subit un traitement immunodépresseur au Cyclophosphamide (Endoxan®) par une injection intrapéritonéale d'une dose de 80 mg / kg (Wéry *et al.* 1977); 0,5 ml de sang est inoculé par voie intrapéritonéale également. La parasitémie est alors contrôlée quotidiennement à partir du 3^{ème} jour suivant l'inoculation, par observation et comptage sous microscope d'une goutte de sang prélevée à la queue de l'animal.

Lorsque la parasitémie atteint une valeur de $5 \cdot 10^8$ - 10^9 parasites/ml, l'animal est sacrifié et, par section de la veine cave, une quantité maximale de sang est récupérée (15 à 20 ml pour un rat de 400 à 500 g). Les trypanosomes sont isolés du sang sur une colonne de cellulose DEAE 52 échangeuse d'anions (Lanham & Godfrey 1970), permettant la rétention des éléments figurés et l'élution des trypanosomes dans un tampon phosphate-salin (60 mM - i : 0,218 - pH 8,0) glucosé (1,5%). Les parasites sont concentrés à l'aide de 2 centrifugations successives de 10 minutes à 1500 g, suivie d'une centrifugation de 10 minutes à 5000 g dans des tubes Eppendorf. Après avoir éliminé le surnageant, le culot est pesé (poids généralement compris entre 150 et 200 mg), et stocké au congélateur à -70°C.



Figure 5 : Localisation des différents pays d'isolement des stocks de *Trypanosoma brucei* étudiés.

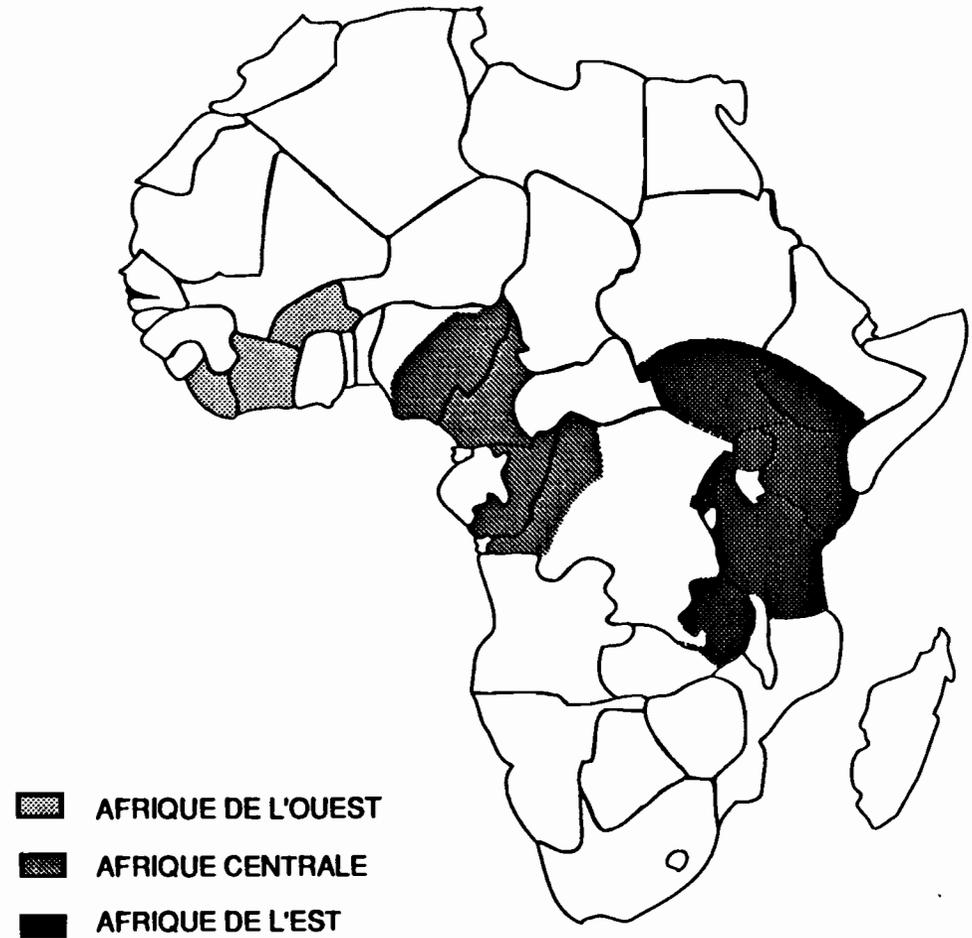


Figure 6 : Représentation des trois "zones" géographiques correspondant aux divisions de l'échantillon. "Afrique de l'ouest" = Burkina faso, Côte d'Ivoire, Libéria. "Afrique centrale" = Cameroun, Congo, Nigéria, Zaïre. "Afrique de l'est" = Ethiopie, Kenya, Ouganda, Ruanda, Soudan, Tanzanie, Zambie.

Pour garder les parasites vivants, le sang parasité est conservé sous forme de stabilat dans la solution phosphate-saline glucosée additionnée de glycérol à 20% (cryoprotecteur) dans les proportions suivantes : 1/3 de solution pour 2/3 de sang hépariné. Ces stabilats sont congelés progressivement (3 heures à -20°C, une nuit à -70°C), et stockés dans l'azote liquide (-196°C) dans une cryobanque.

1. 2. Formes procycliques

Afin de limiter la manipulation des animaux, et dans un souci de standardisation des méthodes, nous avons fait l'apprentissage de la technique de culture *in vitro* des formes procycliques du parasite. Ainsi, une grande partie des stocks a pu être transformée et cultivée selon cette méthode. Certains stocks préalablement transformés au laboratoire de Bristol, envoyés sous forme procycliques, ont pu également être cultivés de cette manière.

1. 2. 1. Transformation

Pour les stocks les plus virulents, la culture se fait directement à partir du stabilat de sang (Dukes communication personnelle). Après une centrifugation servant à éliminer le glycérol (cf § 1.1.), une goutte de sang est diluée dans 2 ml de milieu de culture des formes procycliques de *T.brucei* : milieu de Cunningham (Cunningham 1977) additionné de 20% de sérum de veau foetal et de 20 µg/ml de gentamicine. 500 µl de ce mélange sont déposés dans le premier des puits d'une plaque de culture comportant 750 µl de milieu dans chacun de ses puits. On procède ensuite par dilution successive : chaque puits est infecté à l'aide de 500 µl du puits précédent. Après 5 jours à l'étuve à 27°C, on renouvelle le milieu ; on peut avoir en 10 jours une transformation complète des formes sanguines en formes procycliques. Le contenu de 2 puits est alors transféré dans 2 petits flacons de culture et dilué dans 2 ml de milieu.

Pour les souches moins virulentes, il est nécessaire de réaliser un passage par une jeune souris avant la mise en culture. Cette mise en culture des parasites sanguins peut se faire de la même manière qu'avec les stabilats, ou selon le protocole de Truc (1991) par ensemencement direct de 2 ml de milieu dans un flacon de culture avec 0,1 ml de sang parasité, prélevé chez l'animal par une ponction intracardiaque stérile. Cette méthode est particulièrement intéressante car on obtient une transformation des

parasites, même pour des parasitémiés faibles chez le rongeur, et le risque de contamination bactérienne des cultures est limité. Il suffit de laisser sédimenter les hématies, et de transvaser le surnageant dans un nouveau flacon après quelques jours à 27°C.

Pour les stabilats de formes procycliques fournis par le laboratoire de Bristol, le contenu du stabilat (1 ml) est dilué dans 2 ml de milieu, centrifugé à basse vitesse (500 g), et le surnageant est éliminé. Le culot resuspendu dans 2 ml de milieu est transvasé dans un petit flacon qui est placé à l'étuve.

1. 2. 2. Culture de masse

Elle est réalisée par addition progressive de milieu (milieu de Cunningham + 20% de sérum de veau foetal + 20 µg/ml de gentamicine) et transvasement dans des flacons de taille supérieure, jusqu'à l'obtention de 300 ml de culture très riche (10^8 - 10^9 parasites/ml). Le temps requis est de 15 à 30 jours pour les cultures nécessitant une transformation des formes sanguines en formes procycliques, et de 10 à 25 jours pour les autres.

Pour la récolte, la culture est centrifugée 2 fois à 1900 g à 4°C (30 mn, puis 15 mn). Le culot est resuspendu et recentrifugé dans un tube Eppendorf à 5000 g durant 15 mn. Après élimination du surnageant, le culot est pesé (environ 150 mg) et stocké à -70°C.

Pour la cryoconservation, sous forme de stabilat, on réalise un comptage à l'aide d'une cellule de Thoma et on effectue une dilution de la culture pour n'avoir que 2.10^6 parasites/ml. On prélève 2 ml de cette dilution que l'on centrifuge à basse vitesse (500 g-4°C-10 mn). Le culot est resuspendu dans 2 ml de milieu de congélation : milieu de Cunningham + 25% de sérum de veau foetal + 8% de Glycérol + 20 µg/ml de gentamicine, et aliquoté en 2 stabilats de 1 ml. La congélation est progressive : 2 heures à -20°C et une nuit à -80°C, avant de plonger dans l'azote liquide pour la conservation.

2. L'ELECTROPHORESE ISOENZYMATIQUE

2. 1. Généralités

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, reflet de la variation de 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 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 loci (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 même gène sont appelés "allozymes" (Prakash *et al.* 1969, cité dans Richardson *et al.* 1986). Mais ces isoenzymes peuvent aussi correspondre à l'expression de gènes distincts donc à l'expression de deux ou plusieurs loci, 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, et 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 peut directement se combiner à un "azodye" (Fast Blue BB ou Fast Black K salt) pour donner un précipité coloré. D'autres, comme 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 : - le substrat spécifique de l'enzyme ; - des cofacteurs : coenzymes, ions et autres composés nécessaires à l'activité de l'enzyme ("activateurs") ; - 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 coloration. Celle-ci est nécessaire quand la réaction se fait en deux étapes.

2. 2. Méthode utilisée

2. 2 .1. Préparation des extraits enzymatiques

Les trypanosomes des culots parasites (cf § 1.1. et 1.2.) sont lysés à 4°C par addition d'un volume identique de stabilisateur d'enzymes hypotonique composé de : Dithiothreitol 2 mM, acide amino-n-caproïque 2 mM et EDTA 2 mM (Godfrey & Kilgour 1976). Après 15 minutes, le culot est centrifugé à 5000 g. Le surnageant récupéré est aliquoté en volumes de 10 µl et conservé à -70°C. Il constitue l'extrait enzymatique qui sera déposé sur les gels.

2. 2. 2. Le support

Les électrophorèses sont réalisées sur gels d'acétate de cellulose. Sur ce support, la migration des protéines 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 migration sont très courts (40 mn maximum) et la quantité d'extrait déposée est très faible (environ 1 µl par système enzymatique). Le matériel d'électrophorèse (gels, cuves et peigne applicateur) provient des laboratoires HELENA (Beaumont, Texas, USA) et les produits chimiques des laboratoires SIGMA (USA).

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 est donnée dans le tableau 4. Le gel d'acétate de cellulose est imbibé dans le tampon de migration (pur ou dilué, selon le système enzymatique à l'étude) pendant 15 à 20 minutes. Ensuite, à l'aide du peigne, les échantillons sont déposés sur le gel (12 échantillons) : 1, 2 ou 3 applications par plaque sont nécessaires selon les systèmes enzymatiques. Le gel est alors placé dans la cuve sur des bandelettes de papier filtre autorisant le passage du courant. Les compartiments centraux de la cuve contiennent soit de l'eau soit des éponges réfrigérées spéciales, en fonction du tampon de migration et de l'enzyme. En effet, un refroidissement est nécessaire dans certains systèmes pour éviter la distorsion et permettre une bonne reproductibilité des résultats. Une plaque de verre

SYST. ENZ.	TAMPON	DIL. IMB.	DIL. MIG.	VOLT.	TPS.	REF.
GAPD	A	25/100	pur	200 V	30 '	
GOT	A	50/100	pur	160 V	35 '	
G6PD	B	pur	pur	200 V	30 '	**
GPI	A	25/100	pur	200 V	40 '	
GSR	C	15/100	50/100	160 V	35 '	**
IDH	A	50/100	pur	160 V	30 '	*
LAP	A	25/100	pur	200 V	30 '	
MDH	B	90/100	pur	160 V	40 '	
ME	A	20/100	80/100	160 V	40 '	*
NHI1	B	75/100	pur	120 V	30 '	*
NHI2	A	75/100	pur	200 V	30 '	*
NHd	A	75/100	pur	160 V	30 '	*
PEP	A	pur	pur	200 V	30 '	
PGM	A	25/100	pur	160 V	35 '	
TDH	D	50/100	80/100	160 V	35 '	**
UGPP	B	75/100	80/100	200 V	30 '	*
6 PGD	E	25/100	25/100	200 V	30 '	**

Tableau 2 :
Conditions électrophorétiques utilisées

SYST.ENZ.= système enzymatique ; TAMPON = tampon électrophorétique (cf.code dans le tableau 4) ; DIL.IMB.= dilution du tampon pour l'imbibition des plaques ; DIL.MIG.= dilution du tampon dans la cuve de migration ; VOLT.= voltage en Volts ; TPS.= durée de la migration en minutes ; REF.= refroidissement pendant la migration: glace sur la cuve (*) + éponges réfrigérées dans la cuve (**).

NB : - pour la ME sont ajoutés 5 ml de MgCl₂ molaire qsp 100 ml de tampon A avant la dilution, pour l'imbibition et la migration.
- des conditions différentes sont utilisées pour les 2 loci de la NH

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 2.

2. 2. 4. La révélation

Elle s'effectue en milieu solide. A la solution de coloration spécifique (tableau 3) 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 circulaire en plastique de 12 cm de diamètre, et est placé à l'obscurité. A la fin de la migration, la plaque d'acétate est appliquée sur ce "gel" d'agarose (côté acétate) et l'ensemble est placé dans une étuve à 37°C. Quand la coloration est suffisamment intense, la révélation enzymatique est stoppée en plongeant la plaque d'acétate dans une solution d'acide acétique à 5% pendant 10 mn. Après rinçage, cette plaque est mise à sécher sur du papier absorbant.

2. 2. 5. Les systèmes enzymatiques

Les systèmes enzymatiques utilisés sont des enzymes classiques du métabolisme (glycolyse, cycle de Krebs,...) : elles ont été recherchées de manière empirique en adaptant au trypanosome africain les protocoles des électrophorèses isoenzymatiques appliquées à des organismes variés (homme, moustique, autres kinetoplastidés,...) provenant de divers auteurs : Shaw & Prasad 1969 ; Harris & Hopkinson 1976 ; Gibson *et al.* 1978 ; Kreutzer & Christensen 1980 ; Kreutzer & 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 sélectionnés sont proches de ceux utilisés par Truc *et al.* (1991)

Les 16 systèmes enzymatiques étudiés sont : GAPD, GOT, G6PD, GPI, GSR, IDH, LAP, MDH, ME, NHi, NHd, PEP, PGM, TDH, UGPP et 6PGD. Les noms et les codes officiels de ces enzymes sont donnés dans le tableau 7. Les deux nucléosides hydrolases catalysent des réactions transformant deux substrats différents : l'inosine pour la NHi et la déoxyinosine pour la NHd. Certains de ces systèmes enzymatiques permettent la visualisation de 2 loci : la NHi (notés NHi1 et NHi2), la ME (ME1 et ME2) et l' UGPP (UGPP1 et UGPP2). Le locus qui présente la migration la plus rapide est noté 1. Ce sondage génétique concerne donc un total de 19 loci.

SYST.ENZ.	T.REACTION	SOLUTION DE COLORATION
GAPD	1 (1/4)	D-fructose 1,6-diphosphate 20 mg, aldolase 0.7 UI, Na ₂ arsenate 10 mg, acide pyruvique 15 mg, NAD 4 mg, MTT 1.2 mg, PMS 3 mg
GOT	2 (1/10)	L-acide aspartique 30 mg, acide alpha-kétoglutarique 25 mg, pyridoxal 5-phosphate 3 mg, fast blue BB salt 20 mg.
G6PD	1 (1/2)	D-glucose 6-phosphate 8 mg, MgCl ₂ 50 mg, NADP 5 mg, MTT 1.2 mg, PMS 3 mg.
GPI	1 (1/4)	fructose 6-phosphate 10 mg, glucose 6-phosphate déhydrogénase 4 UI, MgCl ₂ 50 mg, NADP 5 mg, MTT 1.2 mg, PMS 3 mg.
GSR	2 (1/4)	glutathione forme oxydée 20 mg, NADPH Na ₄ : 3 mg, MTT 2.4 mg.
IDH	2 (1/10)	DL-acide isocitrique 10 mg, MgCl ₂ 50 mg, NADP 5 mg, MTT 1.2 mg, PMS 3 mg.
LAP	43	L-leucine beta-naphthylamide 10 mg, fast black K salt 10 mg.
MDH	2 (1/4)	acide malique 1M pH7 0.9 ml, NAD 4 mg, MTT 1.2 mg, PMS 3 mg.
ME	1 (1/4)	acide malique 1M pH7 0.6 ml, MgCl ₂ 50 mg, NADP 5 mg, MTT 1.2 mg, PMS 3 mg.
NH a/b	2 (1/10)	inosine 20 mg, xanthine oxydase 1.5 UI, MTT 1.2 mg, PMS 3 mg.
NH c	2 (1/10)	2'-déoxyinosine 20 mg, xanthine oxydase 1.5 UI, MTT 1.2 mg, PMS 3 mg.
PEP	2 (1/10)	L-leucyl-L-alanine 5 mg, L-aminoacide oxydase 1mg, peroxydase 1mg, MgCl ₂ 30 mg, MnCl ₂ 3 mg, 3-amino 9-éthylcarbazole 10 mg
PGM	2 (1/4)	D-glucose 1-phosphate 20 mg, glucose 6-phosphate déhydrogénase 8 UI, MgCl ₂ 50 mg, NADP 5 mg, MTT 1.2 mg, PMS 3 mg.
TDH	2 (1/10)	L-thréonine 100 mg, KCl 75 mg, NAD 4 mg, MTT 1.2 mg, PMS 3 mg
UGPP	2 (1/2)	uridine 5'-diphosphoglucose 40 mg, D-glucose 1,6-diphosphate 1 mg, tetrasodium pyrophosphate 70 mg, glucose 6-phosphate déhydrogénase 10 UI, phosphoglucomutase 60 UI, MgCl ₂ 50 mg, EDTA 60 mg, NADP 5 mg, MTT 2.4 mg, PMS 6 mg.
6 PGD	2 (1/4)	acide 6-phosphogluconique 10 mg, MgCl ₂ 50 mg, NADP 5 mg, MTT 1.2 mg, PMS 3 mg.

Tableau 3 : Recettes des colorations spécifiques

SYST.ENZ. = système enzymatique ; T.REACTION = tampon de réaction (cf. code tableau 5) et sa dilution indiquée entre parenthèses ; pour les colorations, voir les abréviations des coenzymes et des colorants dans le tableau 6.

N.B. : - pour la GAPD mettre à incuber à 37° pendant 1 heure le mélange substrat, tampon et enzyme de liaison, avant d'ajouter le reste. - pour la GOT réajuster à pH 8 le mélange substrat et tampon avec NaOH 1N. - pour la PEP diluer préalablement le colorant dans 0.5 ml d'éthanol absolu.

TAMPON	COMPOSITION
A	Tris-Versene-Borate 0.5 M pH = 8.0
B	Tris-Barbital-Sodium Barbital (HR Helena) i=0.075 pH = 9.0
C	Na H ₂ PO ₄ 0.2 M dans Na ₂ H PO ₄ 0.2 M pH = 7.0
D	Tris 0.02 M -Tricine 0.025 M -KCl 0.01 M pH = 8.0
E	Tris 0.1 M-Ac. Maleique 0.004 M-EDTA 0.01 M-MgCl ₂ 0.01 M pH = 8.6

Tableau 4 : Tampons de migration

TAMPON	COMPOSITION
1	Tris - HCl 1M pH = 7.0
2	Tris - HCl 1M pH = 8.0
3	Tris 0.2 M - Ac. Maleique 0.2 M pH = 6.0

Tableau 5 : Tampons de Réaction

CODE	NOM	FONCTION
MTT	4,5-Dimethylthiazolyl Blue	Colorant
FMS	Phenazine Methosulfate	Colorant
EDTA	Ethylene-Diamine-Tetra-Acétique acide	Coenzyme
NAD	B-Nicotinamide Adenine Dinucleotide	Coenzyme
NADP	B-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate	Coenzyme
NADPH	B-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate forme réduite	Coenzyme

Tableau 6 : Noms des coenzymes et de certains colorants utilisés dans les colorations spécifiques

NOM	SIGLE	CODE
Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase	GAPD	E.C. 1.2.1.12
Glutamate oxaloacétate transaminase	GOT	E.C. 2.6.1.1
Glucose 6-phosphate déshydrogénase	G6PD	E.C. 1.1.1.49
Glucose phosphate isomérase	GPI	E.C. 5.3.1.9
Glutathione réductase	GSR	E.C. 1.6.4.2
Isocitrate déshydrogénase	IDH	E.C. 1.1.1.42
Leucine aminopeptidase	LAP	E.C. 3.4.11 ou13.-
Malate déshydrogénase	MDH	E.C. 1.1.1.37
Enzyme malique	ME	E.C. 1.1.1.40
Nucléoside hydrolase (Inosine)	NHi	E.C. 3.2.2.-
Nucléoside hydrolase (Deoxyinosine)	NHd	E.C. 3.2.2.-
Peptidase (L-Leucyl-L-Alanine)	PEP	E.C. 3.4.11 ou13.-
6-Phosphogluconate déshydrogénase	6PGD	E.C. 1.1.1.44
Phosphoglucomutase	FGM	E.C. 2.7.5.1
Thréonine déshydrogénase	TDH	E.C. 1.1.1.103
Uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase	UGPP	E.C. 2.7.7.9

**Tableau 7 : Noms, sigles et codes d'identification
des 16 systèmes enzymatiques étudiés**

E.C. = Enzyme Commission

N.B. : les systèmes présentant 2 loci sont : la ME, la NHi et l'UGPP.

2. 3. Interprétation des résultats

Les zymogrammes sont lus locus par locus. Sous l'hypothèse de diploïdie du génome de *Trypanosoma brucei* (Tait 1980), il est logique de tenter d'associer tout phénotype observé à un génotype putatif et à une combinaison allélique. Toutefois certains loci ne permettent pas une interprétation en terme d'allèles : les zymogrammes trop complexes ne permettent qu'une lecture génotypique globale, c'est-à-dire que chaque profil isoenzymatique distinct et reproductible est assimilé à un génotype distinct, dont la composition allélique reste inconnue.

- Pour les loci 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, 1/1 représente le génotype unilocus homozygote pour l'allèle le plus rapide, 2/2 le génotype unilocus homozygote pour l'allèle le plus lent et 1/2 l'hétérozygote pour ces deux allèles.

- Pour les autres loci (GOT, G6PD, MDH et PEP), chacun des différents phénotypes observés est assimilé à un génotype distinct caractérisé par un chiffre romain.

Pour certains stocks, une absence complète d'activité enzymatique a été observée à 3 loci (ME2 : 1 stock, 6PGD : 2 stocks et UGPP2 : 1 stock). Elle a été interprétée comme la présence d'un allèle nul à l'état homozygote (noté 0). On qualifie de nul un allèle dont le produit n'est pas révélable à l'électrophorèse, ce qui sous-entend une délétion ou une mutation au niveau du gène, annulant l'activité de l'enzyme, au moins dans les conditions techniques utilisées.

Chaque stock est caractérisé par un ensemble de génotypes unilocus, constitué des différents zymogrammes observés aux différents loci, formant un profil enzymatique. Les stocks présentant le même profil enzymatique sont regroupés sous le terme de zymodème (Godfrey 1979). Le zymodème est donc assimilable à un génotype multiocus, dont le statut biologique doit être élucidé par l'analyse de génétique des populations.

3. METHODES D'ANALYSE

3. 1. Variabilité génétique

La variabilité génétique au sein de l'échantillon est mesurée à l'aide de divers paramètres :

3. 1. 1. Taux de polymorphisme

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

3. 1. 2. Diversité allélique

Elle correspond au nombre moyen d'allèles par locus : $A = \sum a_r / r$
 r étant le nombre de locus et a le nombre d'allèles à chaque locus.
 Ce paramètre est sensible à l'effectif de l'échantillon, puisque le fait d'échantillonner un grand nombre d'individus augmente les chances d'observer des allèles rares.

3. 1. 3. Hétérozygotie observée

Il s'agit de la fréquence des génotypes à l'état hétérozygote observés dans l'échantillon :

$$H_o = \sum h_{or} / r$$

r étant le nombre de loci et h_o la fréquence des hétérozygotes à chaque locus.

3. 1. 4. Diversité génétique moyenne

Il s'agit de l'hétérozygotie théorique moyenne, c'est à dire de la fréquence théorique moyenne des génotypes à l'état hétérozygote dans l'échantillon :

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

r étant le nombre de loci, q_i la fréquence du $i^{\text{ème}}$ allèle au locus considéré, et h la diversité génétique à chaque locus.

3. 1. 5. Distance génétique standard de Nei

Largement utilisée dans les études de génétique des populations, cette distance élaborée par Nei (1972) est une mesure directe de la différence génique : il s'agit du nombre moyen de codons différents par gène entre deux populations.

Si x_i est la fréquence du $i^{\text{ème}}$ allèle dans la population X et y_i la fréquence du $i^{\text{ème}}$ allèle au même locus dans la population Y, la probabilité pour que 2 allèles choisis au hasard, un dans chaque population, soient identiques est : $J_{XY} = \sum x_i y_i$

La probabilité d'identité de 2 allèles choisis au hasard à ce locus dans la population X est :

$$j_X = \sum x_i^2$$

et dans la population Y est :

$$j_Y = \sum y_i^2$$

L'identité I entre les 2 populations est :

$$I = J_{XY} / (J_X J_Y)^{1/2}$$

avec J_{XY} , J_X et J_Y les valeurs moyennes des probabilités j_{XY} , j_X et j_Y sur tous les loci étudiés. I varie de 1 (les 2 populations ont des fréquences alléliques identiques à tous les locus considérés) à 0 (les 2 populations n'ont aucun allèle en commun).

La distance génétique standard D entre les 2 populations est alors :

$$D = - \log_e I \quad (D \text{ varie de } 0 \text{ à } \infty)$$

Nei a généralisé l'utilisation de cette distance en l'étendant aux organismes asexués (Tibayrenc 1980 ; Rioux *et al.* 1986).

3. 1. 6. Distance de Jaccard

Elle quantifie la dissemblance phénétique entre deux zymodèmes, par le calcul du pourcentage de bandes communes sur le total des bandes (Jaccard 1908):

$$D_J = 1 - (C / 2N - C)$$

avec C le nombre de bandes communes aux deux zymodèmes, et N le nombre total de bandes révélées pour les deux zymodèmes.

Pour le calcul de cette distance, les divers allèles d'un génotype unilocus sont assimilés à des bandes (1/2 devient 1-2), et pour les loci dont la lecture allélique n'est pas possible, chacun des chiffres romains est remplacé par un groupe de bandes, celles-ci étant numérotées de 1, pour la bande présentant la migration la plus rapide, à n (par exemple 1-3-4 remplace II).

Pour le calcul des distances D_N et D_J nous avons utilisé le programme informatique TAXONOMIE communiqué par Serres et Roux (1986).

3. 2. Classification automatique

Le but de la classification est de discerner, au sein d'un ensemble d'objets, les groupes dont les éléments se ressemblent entre eux plus qu'ils ne ressemblent à ceux des autres groupes. C'est l'avènement de l'informatique qui a permis de développer la classification automatique par l'utilisation d'algorithmes appropriés (Serres & Roux 1986). Elle nécessite un grand nombre de caractères et un grand nombre d'éléments (ou unités). Les caractères sont les divers loci isoenzymatiques, et les unités, appelés UTOs (pour Unités Taxonomiques Opérationnelles), sont représentées par les différents zymodèmes (Rioux *et al.* 1990).

3. 2. 1. Méthode d'analyse phénétique : le dendrogramme

Le dendrogramme est construit à partir de la matrice de distances par classification hiérarchique ascendante. 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 diverses distances génétiques : la matrice de distances de Jaccard a été choisie pour notre analyse. Nous avons également choisi la méthode d'agglomération par liens moyens qui prend en compte l'ensemble des objets agglomérés préalablement pour le calcul des distances à chaque nouvelle agglomération et semble être la plus apte à rendre compte des relations entre les groupes (Serres & Roux 1986). Le dendrogramme permet de visualiser les relations taxonomiques entre

les différents zymodèmes, car il met en évidence les ressemblances, ou dissemblances, entre deux UTOs. Il ne saurait être considéré comme un arbre phylogénique qu'avec prudence.

La construction du dendrogramme a été réalisée à l'aide du programme informatique TAXONOMIE communiqué par Serres et Roux (1986).

3. 2. 2. Méthode d'analyse multivariée : l'analyse factorielle des correspondances

Il s'agit d'une méthode d'analyse multidimensionnelle adaptée au traitement des données qualitatives. Elle utilise comme matrice un tableau binaire de présence-absence. Les objets sont les divers zymodèmes et les variables sont les différents loci. Cette méthode prend en compte toutes les variables simultanément et précise leur importance relative (Benzécri 1984). Un graphique à deux dimensions sur lequel sont situés tous les zymodèmes fait émerger l'essentiel de l'information contenue dans les données. Les deux axes factoriels généralement retenus sont ceux dont les pourcentages d'inertie sont les plus élevés. La méthode d'aggrégation utilisée est celle du "moment d'ordre 2 d'une partition", qui minimise à chaque aggrégation l'augmentation de la variance des distances (Serres & Roux 1986). Cette méthode peut être appliquée pour contrôler la validité des groupes dégagés par les autres algorithmes.

Le traitement des données a été réalisé à l'aide du programme TAXONOMIE (Serres & Roux, 1986).

3. 2. 3. Méthodes d'analyse cladistique

Ces méthodes permettent de visualiser les relations phylogéniques entre les différents zymodèmes. Les UTOs sont toujours les zymodèmes, mais les caractères sont les "génézymes" (Rioux *et al.* 1990), c'est à dire les allozymes réduits à de simples états de caractère. Ces méthodes sont particulièrement adaptées au traitement des données qualitatives du type présence-absence d'un caractère.

1- Méthode de parcimonie : Réseau de Wagner

La construction de ce cladogramme, ou arbre évolutif, repose sur la prise en compte simultanée des caractères et des distances entre UTOs. Ainsi, il considère non seulement le nombre, mais aussi la valeur intrinsèque des états de caractère communs. Le calcul de l'éloignement entre UTOs est basé sur la distance de Manhattan qui a pour formule:

$$d(A, B) = \sum^n |A_i - B_i|$$

et représente, en valeur absolue, la somme des différences entre A et B après comparaison de la totalité n de leurs caractères i.

La structure dichotome est édiflée par inclusion successive de toutes les unités. Un ancêtre putatif, ou UTH (pour Unité Taxonomique Hypothétique), 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 minimal 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 UTOs et aux UTHs, il est possible d'apprécier la contribution de chaque "génézyne" à l'autonomie et à la liaison des groupes. On peut alors distinguer les caractères ancestraux (plésiomorphes) des caractères nouveaux ou dérivés (apomorphes) (Lanotte *et al.* 1986).

Nos données ont été traitées par le programme TAXONOMIE (Serres & Roux 1986), puis par l'algorithme MIX extrait du programme PHYLIP distribué par J. Felsenstein (1978).

2- Méthode de compatibilité

Elle permet également de construire un arbre phylogénétique non enraciné. Le principe consiste à relier les différentes UTOs en ne prenant en compte que le plus grand ensemble (clique) de caractères compatibles, c'est à dire n'engendrant pas d'information contradictoire les uns par rapport aux autres. Les caractères homoplasiques, dus à des phénomènes de convergence ou de réversion, sont donc rejetés. Cette méthode est particulièrement intéressante si l'homoplasie affecte plus

spécifiquement certains caractères que d'autres. Là aussi, il est possible d'apprécier la contribution de chaque caractère à l'autonomie et à la liaison des groupes.

Nos données ont été traitées par le programme TAXONOMIE (Serres & Roux 1986), puis par l'algorithme CLIQUE extrait du programme PHYLIP distribué par J. Felsenstein (1978).

3. 3. Analyse du mode de reproduction du parasite

Cette analyse est basée sur les deux conséquences fondamentales de la reproduction sexuée : ségrégation et recombinaison. Parmi les différents critères de clonalité proposés par Tibayrenc *et al.* (1990 ; 1991) (cf chapitre I § 4.3.), certains sont relatifs à l'absence de ségrégation, d'autres à l'absence de recombinaison. Parmi le premier groupe, relatifs à l'absence de ségrégation, l'hétérozygotie fixée et l'absence de certains génotypes ségrégeants sont des critères qualitatifs qui peuvent être jugés par simple observation. Les autres critères nécessitent des tests statistiques.

Les tests statistiques sont donc de deux types : les tests de ségrégation qui étudient le réassortiment des allèles à un locus donné, et les tests de recombinaison qui considèrent les associations des génotypes entre les différents loci. Les premiers supposent une interprétation allélique et une structure diploïde du génome étudié, alors que les autres sont utilisables indépendamment de toute hypothèse sur la ploïdie. Dans tous les cas, l'hypothèse nulle de travail est une structure panmictique, et tout résultat statistiquement significatif permet de rejeter cette hypothèse. Ces tests sont effectués par des algorithmes, sur programme TURBO-PASCAL, conçus par Tibayrenc, Kjellberg et Ayala (1990).

3. 3. 1. Tests de ségrégation

La loi d'Hardy-Weinberg permet de calculer sous l'hypothèse d'échanges génétiques randomisés, les diverses fréquences génotypiques à chaque locus, si l'on connaît les fréquences alléliques au locus considéré. Les tests effectués pour vérifier s'il y a ou s'il n'y a pas d'écart significatif par rapport à la situation d'équilibre sont

des tests de conformité aux proportions théoriques que cette loi prévoit. Le paramètre statistique auquel on a recours est le χ^2 qui indique si les différences entre la distribution observée et la distribution théorique sont suffisamment fortes pour que l'on ait le droit de rejeter l'hypothèse nulle de recombinaison libre. Ce test ne s'applique que pour des effectifs théoriques égaux ou supérieurs à 5. Dans le cas contraire, on effectue un regroupement de classes en ajoutant les effectifs de 2 génotypes de manière à atteindre la valeur 5. Ce procédé, s'il est acceptable sur le plan statistique, présente l'inconvénient de faire perdre beaucoup d'information.

Lorsqu'un tel regroupement n'est pas possible, c'est le cas lorsque l'on a un génotype à effectif très élevé et d'autres génotypes d'effectifs très faibles pour lesquels la somme n'atteint pas 5, on effectue un autre test adapté à de faibles effectifs. Ce test, appelé FACTO et développé par Tibayrenc *et al.* (1990), repose sur une analyse combinatoire dont la formule est:

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

n est le nombre total d'individus, m est l'effectif observé du génotype unilocus considéré, et x est la fréquence théorique du génotype unilocus calculée à partir des fréquences alléliques observées. Le principe de ce test est expliqué de manière plus détaillée dans le paragraphe suivant.

3.3.2. Tests de recombinaison

1- Génotypes multilocus surreprésentés et déficit en génotypes recombinants

Pour ces critères deux tests sont utilisés.

Le test FACTO (employé aussi pour tester la ségrégation) calcule la probabilité d'échantillonner, par simple hasard, un génotype multilocus donné avec un effectif tel que l'on observe dans l'échantillon, toujours sous l'hypothèse nulle d'échanges randomisés. Ce test concerne un génotype multilocus donné : il prend donc en compte sa fréquence théoriquement attendue. Celle-ci est calculée en faisant le produit des fréquences observées des génotypes unilocus qui le composent. Il repose sur l'analyse combinatoire exposée au § 3.3.1.

Le test HAPLO permet de calculer, à partir d'un tableau comportant les différentes fréquences des génotypes unilocus de tous les loci, deux probabilités :

- La probabilité d'obtenir un génotype quelconque avec un effectif égal ou supérieur à celui du génotype le plus représenté dans l'échantillon.
- La probabilité d'obtenir un nombre de génotypes différents inférieur ou égal au nombre effectivement observé (ce dernier paramètre a été exploré par le même procédé par Cibulskis (1988) dans une étude portant sur des stocks kenyans de *T. brucei*).

Ce test repose sur des simulations de Monte-Carlo mimant une recombinaison aléatoire entre les différents génotypes unilocus. Il réalise 1000 ou 10000 tirages aléatoires sur les fréquences observées des génotypes unilocus et obtient un certain nombre de génotypes multilocus différents, dans certaines proportions. La fréquence d'un génotype multilocus est toujours le produit des fréquences observées des génotypes unilocus qui le composent. En ce qui concerne la représentation excessive de certains zymodèmes, ce test est très intéressant car il teste la probabilité d'échantillonner n'importe quel zymodème avec l'effectif réellement observé, et non pas un zymodème particulier. Il est donc plus "sévère" et plus robuste que le test précédent (FACTO).

2 - Déséquilibre de liaison

Ce terme désigne une association non aléatoire entre les génotypes à des loci différents. Dans une population sexuée en équilibre, la présence d'un certain génotype à un locus n'a aucun pouvoir prédictif sur le génotype qui sera observé à un autre locus, sauf dans le cas rare où ces deux loci sont très intimement liés sur le même chromosome. Par contre, en cas de déséquilibre, la présence d'un génotype donné à un locus rend plus probable la présence de certains génotypes à d'autres locus. Cette association non aléatoire des génotypes unilocus, déjà reflétée dans les tests FACTO et HAPLO, est évaluée plus spécifiquement à l'aide du test DE. Celui-ci apprécie le déséquilibre multilocus grâce à une série de comparaisons des loci deux à deux. Après 1000 ou 10000 tirages aléatoires, il donne la probabilité d'obtenir par le seul fruit du hasard un déséquilibre de liaison supérieur ou égal à celui effectivement constaté dans l'échantillon. Le codage utilisé est 1 pour le génotype unilocus le plus représenté et 0 pour tous les autres génotypes.

4. MANIPULATIONS PORTANT SUR L'ADN KINETOPLASTIQUE

Le travail sur le minicercle de l'ADN kinétoplastique de *Trypanosoma brucei* comprend deux étapes. Il s'agit en premier lieu d'amplifier la région variable du minicercle par la technique de polymérisation en chaîne (PCR). La deuxième étape consiste à voir si les régions variables des différents stocks se reconnaissent entre-elles. On a alors recours à la technique d'électrophorèse et d'hybridation des acides nucléiques, en utilisant comme sonde la région variable amplifiée d'un stock choisi.

4. 1. Amplification de l'ADN

4. 1. 1. Principe de la technique de polymérisation en chaîne

La "PCR" ou "Polymerase Chain Reaction" consiste en une amplification sélective de séquences d'ADN : il s'agit d'une synthèse enzymatique *in vitro*, par une polymérase thermostable, d'une séquence d'ADN spécifique, grâce à deux oligonucléotides s'hybridant sur les deux brins complémentaires, de part et d'autre de la séquence d'ADN cible.

Les deux oligonucléotides complémentaires d'une courte séquence située aux extrémités 5'-phosphate des brins du fragment à amplifier, sont mis à hybrider avec ce fragment. Les extrémités 3'-OH des oligonucléotides servent d'amorce à une ADN polymérase, et chaque brin du fragment sert de matrice à l'enzyme. Les produits issus de cette synthèse sont dénaturés, et les oligonucléotides (amorces ou "primers") sont remis à hybrider avec l'ADN du premier cycle. Ainsi, une série de cycles répétés comprenant : la dénaturation de l'ADN, l'hybridation des oligonucléotides sur chacun des brins et l'élongation de ces amorces par une DNA polymérase, résulte en une accumulation exponentielle du fragment d'ADN spécifique se terminant par les extrémités 5' des primers. La réaction se réalise en appliquant une série de cycles alternant 3 températures différentes sur le mélange : ADN à amplifier, oligonucléotides, déoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), et DNA polymérase thermorésistante (*Taq* polymérase) isolée de *Thermus aquaticus*. Cette technique se réalise actuellement à l'aide de cycleurs automatiques.

4. 1. 2. Choix des amorces

La stratégie générale est celle sélectionnée par Veas *et al.* (1991) et Brenière *et al.* (sous presse) pour élaborer des sondes spécifiques de clones naturels de *Trypanosoma cruzi*. Dans le cas de notre étude, portant sur *T. brucei*, le choix des amorces s'est basé sur les travaux de Chen & Donelson (1980) qui, par isolement de 2 minicercles du réseau d'ADN kinétoplastique d'un stock de *T. brucei* après digestion par des enzymes de restriction et séquençage, ont montré la présence d'une séquence conservée de 122 paires de bases. Les 2 amorces de 20 nucléotides ont été choisies aux 2 extrémités de cette région conservée, de façon à encadrer la région variable. Près de l'extrémité 3' de chacun des primers, une modification d'une base a été introduite afin d'incorporer un site de restriction. Ces oligonucléotides ont été synthétisés sur commande par le CRBGC (Laboratoire du Pr. Zalta, Toulouse, France).

Séquence nucléotidique de 122 paires de bases conservée (ADN k 201 après digestion par *Pst* I) (Chen & Donelson 1980) :

5'-⁴⁵³ AAAAAACC GAAAATCTTA TGGGCGTGCA GATTTCACCA
 TACACAAATC CCGTGCTATT TTGGGGGGTT TTTGAGGTCC
 GAGGTACTTC GAAAGGGGTT GGTGTAATAC TCACACGGTT TTTTC⁵⁷⁴-3'

Oligonucléotide n°1: 5'-CGCCCATAAGATTTCCGGTT-3'

Oligonucléotide n°2: 5'-GGTGTAATACTCACCCGGTT-3'

L'oligonucléotide n°1, complémentaire de la 1^{ère} région soulignée de la séquence conservée, s'hybridera à celle-ci, tandis que l'oligonucléotide n°2, correspondant à la 2^{ème} région soulignée, s'hybridera avec le brin complémentaire, à cet endroit même. Les bases en caractères gras indiquent le site de restriction de l'enzyme *Msp* I : C/CGG (orienté 5'-3'). Il a été introduit artificiellement par modification d'une base (CCGG remplace TCGG pour l'oligonucléotide 1, et ACGG pour l'oligonucléotide 2). Ce site permet, par digestion enzymatique, d'éliminer les amorces après amplification de la région variable. La figure 7 illustre le processus d'amplification de la région variable.

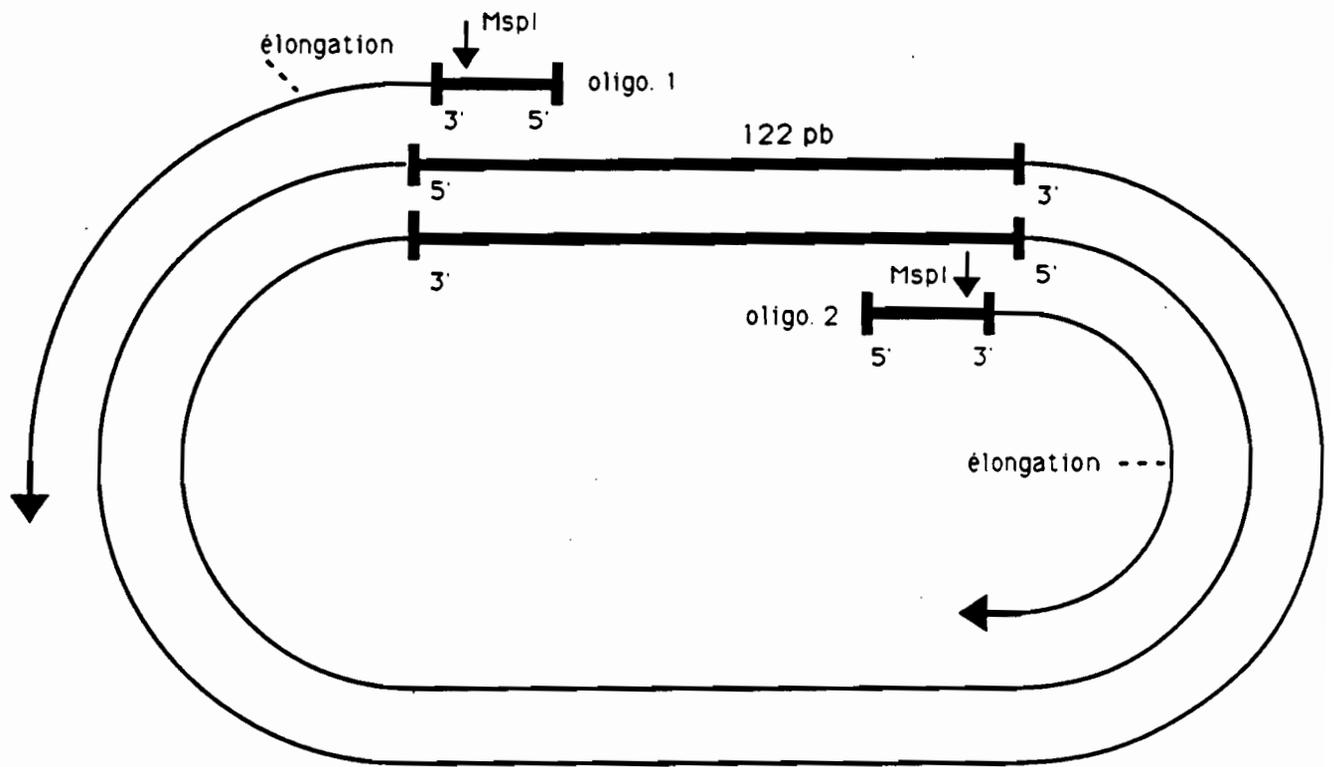


Figure 7 : Schéma du principe d'amplification de la région variable du minicercle de l'ADN kinétoplastique.

———— : région conservée. ———— : région variable.

Sur chacun des oligonucléotides est indiqué le site de restriction de l'enzyme *Msp* I.

4. 1. 3. Protocole d'amplification

Le mélange d'amplification a été élaboré à partir des travaux préalables de PCR sur le minicercle de *Trypanosoma cruzi* (Veas *et al.* 1991 ; Brenière *et al.* sous presse). La concentration des oligonucléotides est calculée d'après l'absorption à 260 nm et le coefficient d'extinction molaire de chacun d'entre eux. Diverses concentrations en MgCl₂ ont été testées, l'activité de la *Taq* polymérase étant sensible à la concentration en ions Mg. La composition de ces mélanges est donnée dans l'annexe 1.

L'échantillon est constitué de parasites entiers provenant de culture : 10⁴ parasites sont placés dans 100 µl d'H₂O, mis à bouillir 5 mn, et 10 µl de ce mélange sont alors ajoutés aux aliquots de 39 µl contenant le mélange d'amplification. Un tube témoin est additionné de 10 µl d'H₂O. La *Taq* DNA polymérase (Genofit, France) est ajoutée dans chaque tube. L'amplification, réalisée sur un appareil PHC-2 (Techne, USA), comporte 2 phases :

- 1- une phase d'initialisation de la dénaturation de l'ADN (5 mn à 95°C), de l'hybridation des amorces (2 mn à 48°C), et de l'élongation (2 mn à 72°C).
- 2- 30 cycles d'amplification : 5 secondes à 95°C - 30 secondes à 48°C - 1 mn à 72°C.

4. 1. 4. Visualisation et transfert

L'ADN amplifié est visualisé par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8%, par dépôt de 10 µl d'échantillon amplifié. Un marqueur de poids moléculaire (Pbr/A/u l) est déposé dans les 2 puits extrêmes. Après migration à 100 Volts durant 30 mn, le gel, placé sous UV, révèle les bandes d'ADN colorées au bromure d'ethidium, qui correspondent à la région variable amplifiée. L'ADN du gel est transféré sous vide sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond-N⁺, Amersham, Royaume-Uni). Celle-ci, une fois sèche, est conservée sous plastique. La composition du gel et le protocole de transfert (Cuny *et al.* 1991) sont présentés dans l'annexe 1.

4. 1. 5. Intérêt de la technique

Cette technique présente un certains nombre d'intérêts :

- Elle permet d'utiliser des parasites vivants entiers, donc de supprimer l'étape d'extraction de l'ADN, minimisant ainsi les manipulations.
- La région variable est obtenue en un grand nombre de copies alors que l'on ignore entièrement sa séquence et ses extrémités 5'.
- La visualisation de l'ADN amplifié est simple et rapide, du fait du grand nombre de copies de ce fragment.

4. 2. **Hybridation**

4. 2. 1. Principe

L'utilisation de sondes est fondée sur le principe d'hybridation complémentaire de l'ADN. La sonde est une séquence d'acides nucléiques d'au moins 15 nucléotides, homologues à une séquence d'ADN avec laquelle elle s'hybride de façon stable et spécifique par réassociation entre bases complémentaires. La sonde est au préalable marquée afin de pouvoir visualiser le fragment d'ADN avec lequel elle s'hybride.

4. 2. 2. Préparation de la sonde

L'ADN amplifié utilisé comme sonde est extrait du produit d'amplification grâce à une migration sur un gel préparatif d'agarose à 1% (Low melting point ultra pure, BRL, Royaume-Uni). Après découpage sous UV de la bande correspondant à l'ADN de la région variable amplifiée, l'agarose est digéré à l'aide d'une préparation enzymatique : la GELase™ (Epicentre Technologies Corporation, Madison, USA). Le protocole de digestion par la GELase est donné dans l'annexe 2.

Afin de débarrasser la région variable des 2 amorces, l'ADN est digéré par l'enzyme de restriction *Msp* I (BRL, Royaume-Uni), et précipité selon le protocole donné dans l'annexe 2. La concentration de l'échantillon est mesurée au spectrophotomètre par mesure de la DO à 260 nm, et une dilution est réalisée de manière à obtenir une concentration de 80 ng/μl.

4. 2. 3. Marquage

Le marquage est réalisé de façon non radioactive, à l'aide d'un kit commercial (ECL gene detection system, Amersham®, Royaume-Uni). Ce sont des complexes de peroxydase chargés positivement qui forment, grâce à la glutaraldéhyde, des liaisons covalentes avec l'ADN de la sonde. Après dénaturation de l'ADN, le réactif marqueur à la peroxydase et la glutaraldéhyde sont ajoutés, et l'ensemble est placé à 37°C. Le protocole suivi est donné dans l'annexe 3.

4. 2. 4. Hybridation

La sonde marquée, diluée dans le tampon d'hybridation, est mise en contact avec les membranes porteuses de l'ADN des différents stocks amplifiés. L'hybridation se passe dans un four rotatif à 42°C où les tubes contenant une ou deux membranes, le tampon et la sonde, sont agités durant toute une nuit. Les détails de la manipulation sont donnés dans l'annexe 3.

4. 2. 5. Détection

La détection se fait par chimiluminescence. Le système ECL est basé sur une réaction d'oxydoréduction impliquant la peroxydase et un réactif au luminol dont l'oxydation provoque une émission de lumière. A la sortie du four à hybridation, la membrane hybridée est lavée, traitée par le réactif au luminol (dans l'obscurité), puis placée au contact d'un film d'autoradiographie (Hyperfilm™-MP, Amersham, Royaume-Uni) pour une courte exposition. Les fragments d'ADN qui se sont hybridés avec la sonde se présentent sous la forme d'une bande noire sur le film, les autres ne donnent aucune image. Les lavages précédant la détection sont importants car ils permettent d'éliminer l'hybridation non spécifique en jouant sur la concentration de la solution de lavage (SSC). Les conditions utilisées et le protocole de révélation sont présentés dans l'annexe 4.

CHAPITRE III :

RESULTATS

RESULTATS

1. ELECTROPHORESES ISOENZYMATIQUES

1. 1. Interprétation des zymogrammes

Parmi les 19 loci utilisés dans cette étude, nous avons distingué ceux qui se prêtent à une interprétation allélique de ceux qui ne s'y prêtent pas (cf chapitre II § 2.3).

1. 1. 1. Loci interprétés en termes d'allèles

Au nombre de 15, ces loci se sont avérés presque tous polymorphes, la GPI seule étant monorphe. Les 14 loci polymorphes sont : GAPD, GSR, IDH, LAP, ME1, ME2, NHI1, NHI2, NHd, PGM, TDH, UGPP1, UGPP2 et 6PGD. Selon les loci, on compte la présence de 2 à 5 allèles. Les zymogrammes observés pour ces loci sont présentés dans les annexes 5 à 9.

1. 1. 2. Loci interprétés en termes de génotypes

Ces loci polymorphes sont au nombre de 4 : GOT, G6PD, MDH et PEP. Le système enzymatique GOT présente 11 génotypes différents, et les trois autres systèmes en montrent 6. Les différents zymogrammes observés sont présentés dans les annexes 10 et 11.

1. 1. 3. Comparaison des zymogrammes des formes sanguines et procycliques

Les études isoenzymatiques étant réalisées avec des extraits de culots parasitaires provenant soit de sang de rongeur, soit de milieu de culture (cf chapitre II B § 1), il est nécessaire de vérifier avant tout si les deux formes peuvent être utilisées indifféremment. Les éventuelles différences dans l'expression des loci considérés, ont été recherchées grâce à deux stocks (MHOM/SD/78/BIYAMINA et MTRG/UG/66/EATRO1125) étudiés systématiquement sous les deux formes. Il s'avère

que pour aucun système on n'obtient de différence quantitative notable, contrairement à certains auteurs (Kilgour 1980 ; Kaukas *et al.* 1990) qui observent des bandes supplémentaires dans une des deux formes. Par contre, on observe des différences qualitatives pour certains systèmes enzymatiques : il s'agit d'une différence d'intensité pour tout le locus ou pour une bande particulière. Ces différences d'activité enzymatique traduisent un changement dans le métabolisme du trypanosome entre la forme sanguine et la forme procyclique. Le métabolisme basé sur les hydrocarbonates dans le sang du mammifère devient un métabolisme basé sur les acides aminés en milieu de culture, comme chez le vecteur (Kaukas *et al.* 1990).

Ainsi la TDH a une activité beaucoup plus forte chez les formes procycliques. Pour la GOT, la bande supérieure est beaucoup plus intense chez ces mêmes formes, alors que la bande inférieure est plus intense chez les formes sanguines. Il en est de même pour la PEP. La MDH présente une bande inférieure plus intense et plus épaisse chez les formes procycliques. Ces différences sont schématisées annexes 10 et 11.

Ces comparaisons montrent que le fait d'employer soit les formes sanguicoles, soit les formes procycliques, ne modifie pas l'interprétation génétique des zymogrammes, pour laquelle seuls le nombre et la position des bandes sont pris en compte, mais pas leur intensité. Les formes de culture peuvent donc se substituer aux formes sanguines dans les études isoenzymatiques, ce qui confirme les résultats de Kaukas *et al.* (1990). Il est même tolérable d'utiliser des stocks sous les deux formes différentes, en tenant compte des observations préalables, pour tous les systèmes étudiés dans ce travail. Cependant, il est préférable de s'en tenir à l'une des deux formes (sanguine ou procyclique) dans le cadre d'une étude donnée.

1. 2. Individualisation des zymodèmes

Les 18 loci polymorphes ont permis d'individualiser 59 zymodèmes, présentés dans le tableau 8. Parmi ces zymodèmes, 45 n'ont qu'un seul représentant, 11 sont représentés deux fois, et l'on trouve un zymodème à 3 représentants, un à 5 représentants et un à 6 représentants. La constitution des 59 zymodèmes, avec l'origine des différents stocks, est donnée dans le tableau 9. Le nombre de zymodèmes observés, par rapport au nombre de stocks (81), est élevé, témoignant d'une diversité importante.

ZYM.	GAPD	GSR	IDH	LAP	ME 1	ME 2	NHi 1	NHi 2	NHd	PGM	TDH	UGP1	UGP2	6PGD	GOT	G6PD	MDH	PEP	EFF.
1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	2
2	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	II	I	I	1
3	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	2
4	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	V	I	I	1
5	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	2
6	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	III	I	I	I	2
7	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	2
8	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	II	I	I	1
9	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	II	I	I	I	1
10	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	VII	V	I	I	1
11	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/3	1/1	I	I	I	I	1
12	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	0	I	II	I	I	1
13	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/2	II	VI	I	I	1
14	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	1/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	II	I	I	II	5
15	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	1/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	II	I	I	VI	1
16	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	1/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	V	I	I	II	1
17	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	1/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	II	I	I	III	1
18	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	IV	I	I	III	1
19	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	II	I	I	I	2
20	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	II	I	I	III	1
21	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	II	I	I	VI	1
22	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	IV	1
23	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	1
24	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	3
25	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	III	I	I	I	1
26	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	2
27	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	3/3	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	IV	1
28	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	3/3	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	V	I	I	2
29	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	3/3	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	1
30	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	3/3	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	VIII	I	I	IV	1
31	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/3	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	1
32	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	3/3	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	VIII	II	I	V	1
33	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	1
34	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	I	II	I	I	1
35	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	2/3	1/1	2/2	2/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	1
36	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	V	1
37	1/1	2/2	1/2	1/2	1/1	2/5	1/1	2/2	2/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	1
38	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/3	5/5	2/2	2/3	1/1	I	I	I	I	2
39	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/3	1/1	I	I	I	I	1
40	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	3/3	1/1	2/2	2/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	VI	IV	1
41	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	3/3	1/2	2/2	1/1	V	I	I	II	1
42	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	3/3	1/1	2/2	1/1	II	I	I	II	2
43	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/1	2/2	1/1	VI	I	I	III	1
44	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/1	2/2	1/1	II	I	I	II	6
45	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/2	2/2	1/1	II	I	I	II	1
46	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/2	2/2	1/1	II	I	I	I	2
47	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	2/2	2/2	1/1	IV	I	I	III	1
48	2/2	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	1
49	1/1	2/2	2/2	1/1	1/2	2/2	1/1	2/2	1/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	III	I	I	I	1
50	1/1	2/2	2/2	1/1	1/2	2/2	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	I	IV	III	I	1
51	1/1	2/2	2/2	1/2	1/2	2/2	1/1	2/2	1/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	1
52	1/1	2/2	2/2	1/1	1/1	3/3	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I	1
53	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	3/3	0	0	IX	IV	I	I	1
54	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	0	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	3/3	1/1	1/1	X	III	V	V	1
55	2/2	2/2	1/1	3/3	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	3/3	1/1	1/1	XI	I	I	I	1
56	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	2/3	2/2	2/2	2/2	1/1	1/4	2/2	1/1	1/1	I	I	II	I	1
57	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	2/3	2/2	2/2	2/2	1/1	2/5	2/2	1/1	1/1	I	III	II	I	1
58	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/4	2/2	2/2	1/1	I	I	IV	I	1
59	1/1	2/2	2/2	1/1	2/2	2/3	2/2	2/2	2/2	1/1	1/4	2/2	2/2	1/2	III	I	II	I	1

Tableau 8 : Zymodèmes caractérisés sur la base de 18 loci polymorphes. Le locus monomorphe GPI n'est pas présenté. Les 4 dernières colonnes contiennent les loci qui ne sont pas interprétés de façon allélique. ZYM = Zymodème ; EFF = effectif, ou nombre de stocks de chaque zymodème.

Tableau 9 : Constitution des 59 zymodèmes caractérisés par l'étude sur 18 loci polymorphes. Pour chacun des 81 stocks est indiqué : l'espèce (sp.), l'hôte (pour les espèces hôtes voir tableau 1 et annexe 14), le pays et l'année d'isolement, ainsi que le zymodème auquel il appartient (Zym.).

Stock	sp.	Hôte	Pays	Année	Zym.
BIYAMINA	br.	Homme	SOUDAN	1982	1
IBADAN 74	br.	M.dom.	NIGERIA	1977	1
IBADAN 22	br.	M.dom.	NIGERIA	1977	2
TH 112	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	3
AB 14	br.	M.sauv.	BURKINA FASO	1980	3
TH 2	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	4
TSW 65 (BIIT)	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1982	5
IPR 1113	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1984	5
KP2 (Cl.38)	br.	Glossine	COTE D'IVOIRE	1982	6
TGP 2	br.	Glossine	LIBERIA	1980	6
TH 113	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	7
TSW 53	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1982	7
KK 39	br.	M.sauv.	BURKINA FASO	1980	8
IPR 01122	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1985	9
TBD	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1979	10
TC 125	br.	M.dom.	BURKINA FASO	1980	11
GAMBELA I	br.	Homme	ETHIOPIE	1967	12
IPR 10158(3)	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1986	13
MURAZ 15	br.	Homme	BURKINA FASO	1980	14
DAL 069	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	14
DAL 967	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1986	14
DAL 972	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1986	14
NANA	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	19??	14
DAL 1072	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	19??	15
TH 149	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	16
ELIANE	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1952	17
OK	br.	Homme	CONGO	1974	18
DIM	br.	Homme	CONGO	1989	19
SIMJ	br.	Homme	CONGO	1989	19
DIEYI	br.	Homme	ZAIRE	1990	20
TONJ	br.	Homme	ZAIRE	1990	21
NITR 40,12	br.	Glossine	NIGERIA	1970	22
YGR 3	br.	Glossine	NIGERIA	1970	23
EATRO 1242	br.	Glossine	UGANDA	1969	24
MURAZ 3	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1979	24
SH 161	br.	Mouton	ZAIRE	1987	24

Tableau 9 : Suite

Stock	sp.	Hôte	Pays	Année	Zym.
KK 14	br.	M.sauv.	BURKINA FASO	1980	25
TSW 65 (Cl.A)	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1982	26
TSW 125	br.	Porc	COTE D'IVOIRE	1982	26
KASSALA 4	ev.	Chameau	SOUDAN	1977	27
GB 2	br.	M.dom.	GAMBIE	1977	28
GB 6	br.	M.dom.	GAMBIE	1977	28
TC 126	br.	M.dom.	BURKINA FASO	1980	29
E 8	ev.	M.sauv.	COLOMBIE	1973	30
MURAZ 1	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1979	31
KETRI 2480	ev.	Chameau	KENYA	1980	32
EATRO 1125	br.	M.sauv.	OUGANDA	1966	33
LVH 143	br.	Homme	KENYA	1982	34
TH1 - 037	br.	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	35
UTRO 2528	br.	Homme	OUGANDA	1979	36
GAMBELA III	br.	Homme	ETHIOPIE	1969	37
SJ	br.	Homme	BURKINA FASO	1977	38
SH 1	br.	Mouton	NIGERIA	1968	38
IBADAN 42	br.	M.dom.	NIGERIA	1977	39
TREU 99	br.	Homme	SENEGAL	1954	40
MDS	br.	Homme	CAMEROUN	1974	41
A 005	br.	Homme	CAMEROUN	1988	42
B 018	br.	Homme	CAMEROUN	1988	42
C 126	br.	Homme	ZAIRE	1971	43
M 001	br.	Homme	CAMEROUN	1988	44
A 004	br.	Homme	CAMEROUN	1988	44
A 009	br.	Homme	CAMEROUN	1988	44
B 014	br.	Homme	CAMEROUN	1988	44
B 016	br.	Homme	CAMEROUN	1988	44
JUA	br.	Homme	CAMEROUN	1979	44
PEYA	br.	Homme	CONGO	1980	45
MABAYA	br.	Homme	CONGO	1989	46
MBOUL	br.	Homme	CONGO	1989	46
BIM	br.	Homme	CAMEROUN	1975	47
EATRO 112	br.	Homme	KENYA	1961	48
058 (Cl.A3)	br.	Homme	ZAMBIE	1974	49
TRPZ 227	br.	Homme	ZAMBIE	1982	50
TRPZ 166	br.	M.dom.	ZAMBIE	1982	51
*0404	br.	Homme	RUANDA	1970	52
M 253	br.	Chèvre	KENYA	1981	53
S 29	br.	Glossine	KENYA	1969	54
S 05	br.	Glossine	KENYA	1969	55
K 21	br.	Glossine	KENYA	1969	56
EATRO 1535	br.	Glossine	KENYA	1969	57
STIB 215	br.	M.sauv.	TANZANIE	1971	58
K 26	br.	Glossine	KENYA	1970	59

ZYMODEMES	GAPD	GSR	IDH	LAP	ME 1	ME 2	NHI 1	NHI 2	NHd	PGM	TDH	UGP1	UGP2	6PGD	EFF.
1-2	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/2	1/1	3
3-4	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	3
5	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/2	1/1	2
6-7-8-9-10	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	7
11	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/3	1/1	1
12	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	0	1
13	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/2	1
14-15-16-17	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	1/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	8
18	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	1
19-20-21	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	4
22-23	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	2
24-25	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	4
26	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	2
27-28-29-30	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	3/3	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	5
31	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/3	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	1
32	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	3/3	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	1
33	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	1
34	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	1
35	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	2/3	1/1	2/2	2/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	1
36	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/2	1/1	1
37	1/1	2/2	1/2	1/2	1/1	2/5	1/1	2/2	2/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	1
38	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/3	5/5	2/2	2/3	1/1	2
39	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/3	1/1	1
40	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	3/3	1/1	2/2	2/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	1
41	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	3/3	1/2	2/2	1/1	1
42	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	3/3	1/1	2/2	1/1	2
43-44	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/1	2/2	1/1	7
45-46	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/2	2/2	1/1	3
47	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	2/2	2/2	1/1	1
48	2/2	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	1
49	1/1	2/2	2/2	1/1	1/2	2/2	1/1	2/2	1/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	1
50	1/1	2/2	2/2	1/1	1/2	2/2	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	1
51	1/1	2/2	2/2	1/2	1/2	2/2	1/1	2/2	1/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	1
52	1/1	2/2	2/2	1/1	1/1	3/3	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	1
53	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	3/3	0	0	1
54	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	0	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	3/3	1/1	1/1	1
55	2/2	2/2	1/1	3/3	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	3/3	1/1	1/1	1
56	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	2/3	2/2	2/2	2/2	1/1	1/4	2/2	1/1	1/1	1
57	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	2/3	2/2	2/2	2/2	1/1	2/5	2/2	1/1	1/1	1
58	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/4	2/2	2/2	1/1	1
59	1/1	2/2	2/2	1/1	2/2	2/3	2/2	2/2	2/2	1/1	1/4	2/2	2/2	1/2	1

Tableau 10 : Zymodèmes caractérisés sur la base de 14 loci polymorphes interprétés de façon allélique. Le locus monomorphe GPI n'est pas présenté. La numérotation des zymodèmes est celle utilisée pour la caractérisation sur 18 loci polymorphes (cf tableau 8) ; EFF = effectif, ou nombre de stocks de chaque zymodème.

Les 14 loci polymorphes interprétés alléliquement ne permettent d'individualiser plus que 41 zymodèmes. En diminuant le nombre de loci, la discrimination est moins importante, si bien que des stocks qui paraissaient différents avec l'étude sur 18 loci sont regroupés sous le même zymodème. Ainsi, 2, 3, voire 5 zymodèmes individualisés précédemment peuvent se trouver regroupés dans le même zymodème. En utilisant la même numérotation qu'avec 18 loci on obtient les équivalences suivantes : Z01 = Z02, Z03 = Z04, Z06 = Z07 = Z08 = Z09 = Z10, Z14 = Z15 = Z16 = Z17, Z19 = Z20 = Z21, Z22 = Z23, Z24 = Z25, Z27 = Z28 = Z29 = Z30, Z43 = Z44, Z45 = Z46. Ces 41 zymodèmes sont présentés dans le tableau 10.

L'ajout de 4 loci supplémentaires semble donc important dans notre étude, quant à l'identification des zymodèmes. L'analyse restreinte aux 14 loci interprétés de façon allélique ne sera par conséquent utilisée que pour le calcul des différents indices de diversité et de la distance génétique standard de Nei. L'évaluation de cette distance permettra d'effectuer des comparaisons directes entre notre échantillon et des données relatives à un parasite voisin, *Trypanosoma cruzi*, qui avait fait l'objet d'une étude similaire (Tibayrenc *et al.* 1986), avec une interprétation allélique de 15 loci isoenzymatique et calcul de la distance génétique standard de Nei.

1. 3. Appréciation de la variabilité génétique

1. 3. 1. Indices de variabilité génétique

Au sein de l'échantillon, plusieurs indices de variabilité génétique ont été calculés : le taux de polymorphisme, la diversité allélique, l'hétérozygotie observée et la diversité génétique moyenne (les définitions sont données chapitre II B § 3.1.).

Afin d'établir des comparaisons inter-populations, nous avons divisé notre échantillon en trois populations correspondant à trois "zones" géographiques différentes (figure 6) :

- l'Afrique de l'ouest regroupe les stocks isolés au Burkina Faso, en Côte d'Ivoire et au Libéria.
- l'Afrique centrale regroupe les stocks isolés dans les pays suivants : Cameroun, Congo, Nigéria et Zaïre.

- l'Afrique de l'est regroupe les stocks isolés dans les pays suivants : Ethiopie, Kenya, Ouganda, Ruanda, Soudan, Tanzanie, et Zambie.

Cette division a été effectuée en se basant sur les positions relatives des différents foyers, de manière à délimiter des aires géographiques, dans lesquelles la distribution des foyers se fait de façon "continue". Ainsi nous avons éliminé du sous-groupe d'Afrique de l'ouest les stocks du Sénégal et de Gambie, et n'avons gardé que les stocks des trois pays limitrophes : Burkina Faso, Côte-d'Ivoire et Libéria. De même, notre sous-groupe "Afrique centrale" ne correspond pas à l'appellation classique puisque ce terme est normalement réservé aux trois seuls pays Cameroun, Congo, et Zaïre. C'est la position géographique des foyers dont ont été isolés les stocks nigériens, qui nous a permis d'inclure le Nigéria dans ce groupe. En effet, ces foyers sont plus proches des foyers camerounais que des foyers ivoiriens. Nous entendrons donc, tout au long de ce travail, par le terme "Afrique centrale" les 4 pays suivants : Cameroun, Congo, Nigéria et Zaïre. Les tableaux 11, 12 et 13 présentent les génotypes multilocus des stocks de chacune des zones géographiques étudiées.

Nous avons distingué un groupe supplémentaire constitué de tous les stocks qui ne sont pas d'Afrique de l'est : c'est le groupe "Afrique de l'ouest + Afrique centrale". Le stock de *Trypanosoma evansi* isolé en Colombie a, bien entendu, été exclu de ces découpages géographiques, ne pouvant appartenir à aucun des groupes.

Le calcul des 4 différents indices a donc été appliqué à la population dans son ensemble, et aux 4 groupes définis ci-dessus (en comptant le groupe "Afrique de l'ouest + Afrique centrale"). Les résultats de ces calculs sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 14 : Indices de variabilité des différentes zones étudiées. P = taux de polymorphisme ; A = diversité allélique ; Ho = hétérozygotie observée ; H = diversité génétique moyenne.

ZONE	P	A	Ho	H
Afrique	0.95	2.6	0.19	0.45
Est	0.84	2.2	0.11	0.35
Ouest/Centre	0.74	2.3	0.14	0.21
Ouest	0.63	2.2	0.15	0.17
Centre	0.47	2.3	0.24	0.36

STOCK	GAPD	GPI	GSR	IDH	LAP	ME 1	ME 2	NHi 1	NHi 2	NHd	PGM	TDH	UGP1	UGP2	6PGD	GOT	MDH	G6PD	PEP
KP 2	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	III	I	I	I
TSW 53	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I
KK 39	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	II	I
MURAZ 3	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I
TH 112	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I
TH 2	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	V	I
TH 113	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I
SJ	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/3	5/5	2/2	2/3	1/1	I	I	I	I
TGP 2	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	III	I	I	I
TSW 65 BIT	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I
TSW 65 A	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I
TC 125	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/3	1/1	I	I	I	I
TSW 125	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I
AB 14	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I
KK 14	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	III	I	I	I
TBD	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	VII	I	V	I
IPR 01122	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	II	I	I	I
IPR 10158	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/2	II	I	VI	I
IPR 1113	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I
TH 1	1/1	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	2/3	1/1	2/2	2/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I
MURAZ 1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/3	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I
TC 126	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	3/3	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	I	I	I	I
DAL 069	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	1/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	II	I	I	II
DAL 967	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	1/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	II	I	I	II
TH 149	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	1/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	V	I	I	II
DAL 972	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	1/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	II	I	I	II
NANA	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	1/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	II	I	I	II
MURAZ 15	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	1/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	II	I	I	II
ELIANE	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	1/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	II	I	I	III
DAL 1072	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	1/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1	II	I	I	VI

Tableau 11 : Génotypes multilocus des stocks du groupe "Afrique de l'ouest"

STOCK	GAPD	GPI	GSR	IDH	LAP	ME 1	ME 2	NH1	NH2	NHd	PGM	TDH	UGP1	UGP2	6PGD	GOT	MDH	G6PD	PEP
IBADAN 22	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/2	1/1				
IBADAN 42	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/3	1/1				
SH 1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/3	5/5	2/2	2/3	1/1				
IBADAN 74	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/2	1/1				
SH 161	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1				
MABAYA	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/2	2/2	1/1				
DIM	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1				
SIMJ	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1				
MBOUL	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/2	2/2	1/1				
YGR 3	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1				
M 001	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/1	2/2	1/1				
B 016	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/1	2/2	1/1				
B 016	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	3/3	1/1	2/2	1/1				
A 004	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/1	2/2	1/1				
A 009	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/1	2/2	1/1				
A 005	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	3/3	1/1	2/2	1/1				
B 014	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/1	2/2	1/1				
JUA	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/1	2/2	1/1				
PEYA	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/2	2/2	1/1				
MOS	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	3/3	1/2	2/2	1/1	V			
C 126	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	1/1	2/2	1/1	VI			
DIEYI	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1				
BIM	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	4/4	2/2	2/2	1/1	IV			
OK	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	IV			
NITR 4012	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1				IV
TONU	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/4	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	1/2	2/2	1/1				VI

Tableau 12 : Génotypes multilocus des stocks du groupe "Afrique centrale"

STOCK	GAPD	GPI	GSR	IDH	LAP	ME 1	ME 2	NH1	NH2	NHd	PGM	TDH	UGP1	UGP2	6PGD	GOT	MDH	G6PD	PEP
S 29	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	0	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	3/3	1/1	1/1	X	V		V
M 253	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	3/3	0	0	IX		IV	
S 05	2/2	1/1	2/2	1/1	3/3	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	3/3	1/1	1/1	XI			
EATRO 112	2/2	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1				
LVH 143	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1				
BIYAMINA	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/2	1/1				
GAMBELA I	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	0				
EATRO 1242	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1				
KASSALA 4	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	3/3	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1				IV
KETRI 2480	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	3/3	1/1	2/2	2/2	2/2	5/5	2/2	2/2	1/1	VIII			V
EATRO 1125	1/1	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1				
UTRO 2528	1/1	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	1/2	5/5	2/2	2/2	1/1				V
GAMBELA III	1/1	1/1	2/2	1/2	1/2	1/1	2/5	1/1	2/2	2/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1				
TRPZ 227	1/1	1/1	2/2	2/2	1/1	1/2	2/2	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1			IV	
0404	1/1	1/1	2/2	2/2	1/1	1/1	3/3	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1				
058	1/1	1/1	2/2	2/2	1/1	1/2	2/2	1/1	2/2	1/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1				
TRPZ 166	1/1	1/1	2/2	2/2	1/2	1/2	2/2	1/1	2/2	1/2	1/1	5/5	2/2	2/2	1/1				
STIB 215	1/1	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/4	2/2	2/2	1/1		IV		
EATRO 1535	1/1	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	2/3	2/2	2/2	2/2	1/1	2/5	2/2	1/1	1/1				
K 21	1/1	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	2/3	2/2	2/2	2/2	1/1	1/4	2/2	1/1	1/1				
K 26	1/1	1/1	2/2	2/2	1/1	2/2	2/3	2/2	2/2	2/2	1/1	1/4	2/2	2/2	1/2				

Tableau 13 : Génotypes multilocus des stocks du groupe "Afrique de l'est"

Le taux de polymorphisme est plus élevé en Afrique de l'est que dans les autres groupes, traduisant une variabilité plus importante dans cette zone. C'est en Afrique centrale qu'il est le plus faible. Inversement l'hétérozygotie observée est plus importante en Afrique centrale et moindre en Afrique de l'est. La diversité allélique est pratiquement identique pour tous les groupes. Dans tous les cas, l'hétérozygotie observée est inférieure à la diversité génétique moyenne (ou hétérozygotie théorique), ce qui reflète un déficit global en hétérozygotes pour tous les échantillons. Dans le cas d'une population panmictique, ces deux valeurs sont comparables. Le déficit observé ici montre qu'il y a soit une structuration géographique (différences de fréquence allélique entre deux points de la zone étudiée), soit un obstacle biologique à la recombinaison, soit les deux.

1. 3. 2. Distances génétiques

A ces indices, s'ajoute la distance génétique standard de Nei calculée entre paires de zymodèmes (cf définition chapitre II B § 3.1.). La matrice de ces distances, calculées pour les 41 zymodèmes, est donnée dans l'annexe 12. Les valeurs à relever sont : valeur minimale = 0,02 ; valeur maximale = 1,15 ; moyenne = 0,27 ; variance = 0,02 ; déviation standard = 0,14.

Ces résultats reflètent une variabilité génétique non négligeable, mais qui reste nettement plus faible que celle observée chez *Trypanosoma cruzi*. Le tableau 15 présente les valeurs obtenues dans notre échantillon et celles obtenues dans un échantillon comparable de *Trypanosoma cruzi*. Il s'agit de 121 stocks représentatifs de la variabilité génétique de ce taxon : ils ont été isolés sur des hôtes variés dans divers pays d'Amérique du Sud (Tibayrenc *et al.* 1986). Par l'utilisation de techniques électrophorétiques comparables et avec le même nombre de loci, les distances de Nei relevées entre les 43 zymodèmes de *T. cruzi* sont nettement plus élevées que dans le cas de *T. brucei*. Le tableau ci-dessous permet de comparer les valeurs relevées chez ces deux espèces de trypanosomes.

Tableau 15 : Valeurs des distances de Nei chez *Trypanosoma brucei* et *Trypanosoma cruzi*.

Taxon	v.minimale	v.maximale	moyenne	dév.standard
<i>T. brucei</i>	0.02	1.15	0.27	0.14
<i>T. cruzi</i>	0.02	2.02	0.76	0.48

Ces résultats montrent que le taxon *Trypanosoma brucei* est nettement plus homogène d'un point de vue génétique que le taxon *Trypanosoma cruzi*.

La distance de Jaccard, (cf définition chapitre II B § 3.1.), permet de quantifier la dissemblance entre paires de zymodèmes. La matrice de ces distances, calculées pour les 59 zymodèmes, est donnée dans l'annexe 13. Les valeurs à relever sont: valeur minimale = 0,03 ; valeur maximale = 0,79 ; moyenne = 0,37 ; déviation standard = 0,16.

1. 4. Tests sur le mode de reproduction du parasite

Ces tests s'appliquent classiquement dans des conditions proches de la sympatrie. Ces conditions ne sont pas satisfaites lorsque l'on considère des zones géographiques étendues, comme celles concernées par notre étude. Cependant, un contre-exemple pris sur une espèce sexuée comme l'Homme montre, qu'à un niveau de résolution génétique tel que celui de l'électrophorèse d'isoenzymes, et avec des effectifs de populations comparables à ceux de notre étude, les déviations par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg ne sont pas très importantes, et l'on n'observe pas de déséquilibre de liaison net. Les différents tests de ségrégation et de recombinaison, que nous allons appliquer ici chez *T. brucei*, sont en général totalement négatifs chez l'Homme, même dans des conditions extrêmes d'allopatrie (Tibayrenc *et al.* 1991). Ceci suggère que ces tests sont "robustes", en ce sens qu'ils ne deviennent statistiquement significatifs qu'en cas d'écarts très importants à la panmixie. Il est donc acceptable de conduire ces tests dans notre échantillonnage, sans pour autant négliger les biaisages qui peuvent être introduits par une structuration géographique,

c'est à dire des différences de fréquences alléliques entre deux zones géographiques, regroupées en une seule. Par ailleurs, il est souvent possible de dépister de tels biaisages en analysant soigneusement la structure des données au delà des résultats statistiques bruts. On peut ainsi départager ce qui est du à une structuration géographique de ce qui est imputable au mode de reproduction de l'organisme. Comme nous l'avons précédemment relevé, les différents tests utilisés dans cette étude ne sont pas redondants mais complémentaires, ainsi que nous allons le voir.

Afin de limiter le biaisage du à une structuration géographique, nous avons divisé notre échantillon en groupes correspondant à des zones géographiques différentes. Ces 4 groupes sont ceux utilisés pour le calcul des indices de diversité génétique (cf § 1.3.1 et figure 6), c'est-à-dire :

- Afrique de l'est : 21 stocks.
- Afrique de l'ouest et Afrique centrale : 59 stocks
- Afrique de l'ouest : 30 stocks
- Afrique centrale : 26 stocks

L'étude statistique de nos propres résultats expérimentaux a été complétée par une analyse portant sur le large échantillon étudié par Godfrey *et al.* (1990). Pour cet échantillon, nous avons réalisé, non seulement des divisions géographiques, mais également des divisions concernant l'hôte. Cette division nous a permis de distinguer 6 groupes :

- Hommes d'Afrique centrale et de l'ouest : 30 stocks
- Animaux domestiques d'Afrique centrale et de l'ouest : 179 stocks
- Hommes d'Afrique de l'est : 409 stocks
- Animaux domestiques d'Afrique de l'est : 120 stocks
- Animaux sauvages d'Afrique de l'est : 44 stocks
- Glossines d'Afrique de l'est : 70 stocks

Enfin, nous avons analysé deux autres séries de données (Mihok *et al.* 1990 ; Gibson & Welde 1985) concernant des stocks d'une même région du Kenya : la Lambwe Valley. Nous avons réalisé des divisions en fonction de l'hôte (tous les hôtes à l'exception de l'Homme dans la première série de données, uniquement les stocks humains dans la deuxième série), et également dans le temps (cf chapitre II A § 2.). Ainsi, nous avons distingué 4 groupes supplémentaires :

- Animaux de la Lambwe Valley : 154 stocks
- Homme de la Lambwe Valley - année 1980 : 24 stocks
- Homme de la Lambwe Valley - année 1981 : 34 stocks
- Homme de la Lambwe Valley - année 1982 : 26 stocks

1. 4. 1. Tests de ségrégation

1- Absence de génotypes unilocus

Parmi les critères relatifs à une absence de ségrégation, nous avons vu (chapitre II B § 3.3.) que l'absence de certains génotypes ségrégeants peut être jugée par simple observation. Ainsi dans notre échantillon, le tableau 8, présentant les différents zymodèmes, indique l'absence totale de certains génotypes, ce qui est incompatible avec l'hypothèse d'échanges génétiques randomisés. En effet, la loi de ségrégation des allèles à la méiose implique l'apparition de tous les génotypes recombinants dans la descendance, en accord avec les fréquences alléliques observées. Nous constatons donc l'absence de nombreux génotypes comme : ME2 3/4 et 4/4 , NHi1 1/2, UGPP1 2/3 et UGPP2 1/2, alors que leurs effectifs théoriques respectifs sont compris entre 2 et 6. Notons que nous éliminons de tout test de ségrégation le locus TDH. L'absence de plusieurs génotypes hétérozygotes à ce locus pourrait être en partie expliquée par des conditions techniques. En effet, ce locus possède des allèles dont les niveaux de migration sont si proches que certains profils d'hétérozygotes pourraient passer inaperçus.

2- Déviations par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg

Les déviations par rapport à l'équilibre d'Hardy-Weinberg permettent de tester statistiquement l'importance de ce déficit en génotypes ségrégeants. Elles ont été testées sur les divers groupes de notre échantillon et sur les groupes définis dans l'échantillon de Godfrey *et al.* (1990). Dans ce dernier, le nombre de loci interprétés en terme d'allèles est plus réduit. Les déviations ont été évaluées à l'aide du test de χ^2 pour des effectifs théoriques égaux ou supérieurs à 5. Pour des effectifs théoriques inférieurs à 5, nous avons appliqué un test de χ^2 avec regroupement de classes, ou le test FACTO (cf chapitre II B § 3.3.1.). Dans certains cas, nous avons ajouté le test

Tableaux 16 à 19 : Résultats des tests de ségrégation pour chacun des groupes étudiés. Gén. = génotype unilocus ; Eff. Obs. = effectif observé ; Eff.Thé. = effectif théorique ; FACTO = test FACTO sur le génotype unilocus ; X2 = test de χ^2 ; X2* = test de χ^2 avec regroupement de classes ; p = probabilité ; Sign. = test significatif (S) ou non significatif (NS) au seuil de 5%.

Tableau 16 :

Groupe "Afrique Centrale"

Locus	Gén.	Eff.Obs.	Eff.Thé.	Test	Probabilité	Sign.
LAP	1/1	19	16,146			
	1/2	3	8,684	X2*	0.2 < p < 0.3	NS
	2/2	4	1,17	Facto	p = 0.99	NS
ME2	2/2	5	9,23			
	2/4	21	12,532	X2*	p < 0.001	S
	4/4	0	4,238	Facto	p < 0.001	S
PGM	1/1	0	0,156	/		
	1/2	3	3,814	Facto	p = 0.72	NS
	1/3	1	0,078	/		
	2/2	22	21,242	Facto	p = 0.47	NS
	2/3	0	0,884	/		
UGP1	3/3	0	0,0104	/		
	1/L	9	6,5	Facto		NS
	1/2	8	13	X2	p = 0.05	NS
UGP2	2/2	9	6,5	Facto		NS
	2/2	24	24,05	Facto	p = 0.69	NS
	2/3	2	1,898	Facto	p = 0.57	NS
UGP2	3/3	0	0,026			

Groupe "Afrique de l'Ouest"

Locus	Gén.	Eff.Obs.	Eff.Thé.	Test	Probabilité	Sign.
GSR	1/1	0	0,03	/		
	1/2	2	1,92	Facto	p = 0.58	NS
	2/2	28	28,05	Facto	p = 0.69	NS
IDH	1/1	29	29,01	Facto	p = 0.74	NS
	1/2	1	0,99	/		
	2/2	0	0,009	/		
LAP	1/1	19	15,42	Facto	p = 0.13	NS
	1/2	5	12,18	X2*	0.1 < p < 0.2	NS
	2/2	6	2,4	Facto	p = 0.03	S
ME2	2/2	19	19,2			
	2/3	2	3,21			
	2/4	8	6,39	X2*	0.3 < p < 0.5	NS
	3/3	1	0,12			
	3/4	0	0,54			
NH12	4/4	0	0,54			
	1/1	0	0,54			
	1/2	8	6,9	X2*	0.5 < p < 0.9	NS
PGM	2/2	22	22,56			
	1/1	1	0,21			
	1/2	2	4,47			
	1/3	1	0,09			
	2/2	28	24,3	X2*	0.3 < p < 0.5	NS
UGP1	2/3	0	0,9			
	3/3	0	0,009			
	1/1	0	0,54			
UGP2	1/2	8	6,9	X2*	0.5 < p < 0.9	NS
	2/2	22	22,56			
	2/2	28	28,05	Facto	p = 0.69	NS
6PGD	2/3	2	1,92	Facto	p = 0.58	NS
	3/3	0	0,03	/		
	1/1	29	29,01	Facto	p = 0.74	NS
6PGD	1/2	1	0,99	/		
	2/2	0	0,009	/		

Tableau 17 :

Groupe "Afrique Centrale et Afrique de l'Ouest"

Locus	Gén.	Eff.Obs.	Eff.Thé.	Test	Probabilité	Sign.
GSR	1/1	0	0,0177	/		
	1/2	2	2,006	/		
	2/2	57	56,994	Facto	p = 0.67	NS
IDH	1/1	58	58,056	Facto	p = 0.76	NS
	1/2	1	0,944	/		
	2/2	0	0,0035	/		
LAP	1/1	38	33,571	Facto	p = 0.15	NS
	1/2	13	21,889	X2*	0.2 < p < 0.3	NS
	2/2	8	3,54	Facto	p = 0.02	S
ME2	2/2	24	26,373			
	2/3	2	6,726			
	2/4	29	19,411	X2*	0.01 < p < 0.02	S
	3/3	4	0,413			
	3/4	0	2,478			
NH12	1/1	0	0,238			
	1/2	8	7,493	X2*	p > 0.9	NS
	2/2	51	51,271			
PGM	1/1	2	0,531			
	1/2	5	9,735			
	1/3	2	0,177			
	2/2	50	46,728	X2*	0.2 < p < 0.3	NS
	3/3	0	1,77			
UGP1	1/1	9	4,897	Facto		NS
	1/2	16	24,19	X2	0.001 < p < 0.01	S
	2/2	34	29,913	Facto		NS
UGP2	2/2	55	55,047	Facto	p = 0.64	NS
	2/3	4	3,894	Facto	p = 0.55	NS
	3/3	0	0,059	/		
6PGD	1/1	58	57,997	Facto	p = 0.73	NS
	1/2	1	1,062	/		
	2/2	0	0,0047	/		

Groupe "Afrique de l'Est"

Locus	Gén.	Eff.Obs.	Eff.Thé.	Test	Probabilité	Sign.
GAPD	1/1	19	17,199	Facto	p = 0.24	NS
	1/2	0	3,612	/		
	2/2	2	0,189	Facto	p = 0.015	S
IDH	1/1	10	6,3	Facto		NS
	1/2	3	10,416	X2*	0.05 < p < 0.1	NS
	2/2	8	4,284	Facto		S
LAP	1/1	7	4,767			
	1/2	8	9,534			
	1/3	0	0,966	X2*	0.02 < p < 0.05	S
	2/2	7	4,767			
	2/3	0	0,966			
ME1	1/1	14	11,445			
	1/2	3	8,127	X2*	0.2 < p < 0.3	NS
	2/2	4	1,428			
ME2	1/1	2	0,294			
	1/2	1	3,213			
	1/3	0	1,071			
	1/5	0	0,126			
	2/2	11	8,673	X2*	0.2 < p < 0.3	NS
	2/3	3	5,775			
	2/5	1	0,651			
	3/3	3	0,966			
	3/5	0	0,21			
5/5	0	0,0126				
NH1	1/1	17	13,778	Facto	p = 0.1	NS
	1/2	0	6,468	/		
	2/2	4	0,756	Facto	p = 0.006	S
NHd	1/1	6	3,045			
	1/2	4	9,912	X2*	0.1 < p < 0.2	NS
	2/2	11	8,043			
PGM	1/1	14	10,71			
	1/2	2	6,568	X2*	0.1 < p < 0.2	NS
	2/2	5	1,722			
UGP1	2/2	18	15,414	Facto	p = 0.15	NS
	2/3	0	5,166	/		
	3/3	3	0,42	Facto	p = 0.008	S
UGP2	1/1	4	0,756	Facto	p = 0.006	S
	1/2	0	6,469	/		
	2/2	17	13,755	Facto	p = 0.1	NS

Tableau 18 :

Groupe "Homme Ouest"

Locus	Gén.	Eff.Obs.	Eff.Thé.	Test	Probabilité	Sign.
Icd	2/2	27	26,12	Facto	p = 0,44	NS
	2/4	2	3,75	Facto	p = 0,9	NS
	4/4	1	0,135			
Pgm	2/2	1	0,135	Facto	p = 0,27	NS
	2/3	1	3,68			
	2/4	1	0,067			
	3/3	27	25,23			
	3/4	0	0,92			
	4/4	0	0,0084			
Me 1	1/1	29	28,05	Facto	p = 0,41	NS
	1/2	0	1,92			
	2/2	1	0,033			
Me 2	4/4	7	10,8	X2*	p = 0,014	S
	4/5	2	1,19			
	4/6	20	13,21			
	5/5	0	0,033			
	5/6	0	0,733			
	6/6	1	4,04			

Groupe "Homme Est"

Locus	Gén.	Eff.Obs.	Eff.Thé.	Test	Probabilité	Sign.
Icd	2/2	148	68,19	X2	p < 0,001	S
	2/4	38	197,62			
	4/4	223	143,19			
Pgm	2/2	274	271,94	X2*	p = 0,45	NS
	2/3	118	122,33			
	2/4	1	0,8			
	3/3	16	13,76			
	3/4	0	0,179			
	4/4	0	0,0006			
Asat	1/1	2	0,45	X2*	p = 0,45	NS
	1/2	0	0,46			
	1/3	23	25,65			
	2/2	0	0,12			
	2/3	14	13,21			
Mdh	3/3	370	369,12	X2*	p = 0,17	NS
	1/1	4	0,039			
	1/2	0	7,922			
	2/2	405	401,039			

Groupe "Domestique Ouest"

Locus	Gén.	Eff.Obs.	Eff.Thé.	Test	Probabilité	Sign.
Icd	2/2	177	176,86	Facto	p = 0,64	NS
	2/4	2	2,13	Facto	p = 0,64	NS
	4/4	0	0,0064			
Pgm	2/2	2	2,01	X2*	p = 0,7	NS
	2/3	32	33,7			
	2/4	2	0,23			
	3/3	143	141,15			
	3/4	0	1,91			
	4/4	0	0,0064			
Asat	2/2	1	0,09	X2*	p > 0,9	NS
	2/3	6	7,7			
	3/3	172	171,2			

Groupe "Domestique Est"

Locus	Gén.	Eff.Obs.	Eff.Thé.	Test	Probabilité	Sign.
Icd	2/2	48	45,02	X2	p = 0,24	NS
	2/4	51	56,96			
	4/4	21	18,02			
Pgm	2/2	82	83,27	X2*	p = 0,6	NS
	2/3	32	29,99			
	2/4	4	3,4			
	3/3	2	2,7			
	3/4	0	0,612			
	4/4	0	0,035			
Asat	1/1	33	15,41	X2	p < 0,001	S
	1/3	20	55,18			
	3/3	67	49,41			

Tableau 19 :

Groupe "Sauvage Est"

Locus	Gén.	Eff.Obs.	Eff.Thé.	Test	Probabilité	Sign.
lcl	2/2	13	8,64	X2	p < 0,01	S
	2/4	13	21,7			
	4/4	18	13,65			
Pgm	2/2	38	37,24	Facto	p = 0,5	NS
	2/3	5	4,61	Facto	p = 0,49	NS
	2/4	0	1,862			
	3/3	0	0,143			
	3/4	0	0,115			
	4/4	1	0,0233			
Asat	1/1	4	0,69	X2*	p = 0,25	NS
	1/3	3	9,62			
	3/3	37	33,7			
Mdh	1/1	6	0,88	Facto	p = 2,3 10-4	S
	1/2	0	10,35			
	1/3	0	0,248			
	2/2	36	31,05	Facto	p = 0,07	NS
	2/3	2	1,48	Facto	p = 0,44	NS
	3/3	0	0,0176			

Groupe "Glossine Est"

Locus	Gén.	Eff.Obs.	Eff.Thé.	Test	Probabilité	sign.
Pgm	2/2	52	53,1	X2*	p > 0,9	NS
	2/3	12	10,49			
	2/4	6	5,24			
	3/3	0	0,52			
	3/4	0	0,52			
	4/4	0	0,13			
Asat	1/1	17	8,9	X2	p < 0,001	S
	1/3	10	30,17			
	3/3	43	32,9			
Me 1	1/1	55	47,18	X2*	p = 0,045	S
	1/2	5	20,57			
	2/2	10	2,24			
Me 2	1/1	15	4,9	X2*	p < 0,001	S
	1/2	0	0,264			
	1/3	0	0,264			
	1/4	6	22,19			
	1/6	1	4,48			
	2/2	0	0,0036			
	2/3	0	0,0071			
	2/4	1	0,602			
	2/6	0	0,12			
	3/3	0	0,0036			
	3/4	1	0,602			
	3/6	0	0,12			
	4/4	35	25,2			
	4/6	6	10,22			
6/6	5	1,05				

FACTO sur le génotype hétérozygote au test de χ^2 . Les résultats de ces tests, effectués pour chacun des groupes sont présentés dans les tableaux 16, 17, 18 et 19.

Parmi notre échantillonnage, nous obtenons au minimum un test significatif par groupe étudié. Les tests de χ^2 significatifs sont au nombre de 4. Ils concernent : LAP en Afrique de l'est, ME2 en Afrique centrale et dans l'ensemble Afrique centrale-Afrique de l'ouest, et UGPP1 dans ce même groupe. Dans le cas de la ME2, il s'agit d'un excès d'hétérozygotes. En Afrique de l'ouest, nous observons un écart significatif uniquement pour la LAP, et sur un seul génotype unilocus.

Dans le second échantillonnage, nous obtenons également au minimum un test significatif par groupe étudié, sauf pour le groupe de stocks d'animaux domestiques d'Afrique de l'ouest. Les tests de χ^2 significatifs sont au nombre de 7. Ils concernent : ME2 dans le groupe "Homme Ouest", IDH dans le groupe "Homme Est" et dans le groupe "Animaux sauvages Est", ASAT dans le groupe "Domestique Est", et ASAT, ME1, ME2 dans le groupe "Glossine Est". Ce dernier groupe se distingue par 3 loci sur 4 présentant un écart significatif. Nous observons un excès d'hétérozygotes uniquement pour la ME2, dans le groupe "Homme Ouest".

Il est important de souligner que, si une déviation par rapport à l'équilibre d'Hardy-Weinberg permet de rejeter l'hypothèse d'une reproduction sexuée libre, un accord avec les proportions génotypiques attendues ne signifie pas que l'on doit accepter l'hypothèse, mais plutôt que rien ne permet de la rejeter. Nos résultats ne montrent pas d'écarts significatifs à tous les loci, mais le fait d'en observer à certains loci (écarts souvent très importants) suffit à prouver l'absence de panmixie. Celle-ci peut être due : soit à un isolement génétique d'ordre biologique (lié au mode de reproduction du parasite), soit à l'existence d'une entrave au flux génique d'ordre spatial ou temporel, soit à des phénomènes de sélection naturelle, soit à une combinaison de ces trois facteurs. En cas d'isolement géographique de populations, le déséquilibre se traduit par un déficit en hétérozygotes : c'est l'effet "Wahlund". Le fait d'observer, au contraire, un excès d'hétérozygotes à certains loci permet de penser que la structuration géographique ne saurait constituer une explication globale de nos résultats (Tibayrenc *et al.* 1991).

L'étude des critères de recombinaison sur les différents loci, va permettre d'apporter de nouveaux éléments quant aux problèmes liés à la sélection et à l'isolement spatio-temporel.

1. 4. 2. Tests de recombinaison

Comme nous l'avons vu (chapitre II B § 3.3.), ces tests explorent la réassociation des génotypes d'un locus à l'autre. Celle-ci, dans le cas d'une reproduction sexuée libre, donnera naissance à toutes les combinaisons possibles de génotypes unilocus. Ces combinaisons, ou génotypes multilocus, doivent être observées, dans le cas d'une population panmictique, avec des fréquences égales aux produits des fréquences observées des génotypes unilocus qui les composent. Dans le cas de nos populations de *T. brucei*, on peut voir que certains génotypes multilocus sont absents, alors que d'autres sont surreprésentés, et l'on obtient un nombre de combinaisons génotypiques différentes inférieur à celui que l'on attendrait. Ces observations traduisent un déséquilibre de liaison entre les loci. Ce sont ces divers paramètres qui sont testés ici.

1- Génotypes multilocus surreprésentés et déficit en génotypes recombinants

On calcule 3 probabilités :

- La probabilité d'échantillonner, par simple hasard, un zymodème donné avec un effectif tel que l'on observe dans l'échantillon (test FACTO). Dans chaque échantillon, ce test est utilisé sur les deux ou trois zymodèmes les plus représentés.
- La probabilité d'obtenir un zymodème quelconque avec un effectif égal ou supérieur à celui du zymodème le plus représenté dans l'échantillon (test HAPLO).
- La probabilité d'obtenir un nombre de zymodèmes différents inférieur ou égal au nombre effectivement observé (test HAPLO).

Les résultats des tests FACTO sur les génotypes abondants, pour les deux types d'échantillons (nos données et celles de la littérature), sont réunis dans le tableau 20.

- Sur notre échantillonnage, ce test n'a pas été appliqué au groupe d'Afrique de l'est, puisque celui-ci comporte autant de zymodèmes que de souches (21) : le test serait donc forcément négatif. Par contre, nous l'avons appliqué à 3 zymodèmes de l'échantillon total, représentés 2 ou 3 fois : les zymodèmes Z 01, Z 24 et Z 38. Nous constatons que ces tests sont tous significatifs. Par exemple, le résultat du test sur le génotype le plus abondant du groupe "Afrique de l'ouest", signifie que la probabilité

Echantillon	Nb. Ind.	Nb. Zym	Loci Δ	Zym.	Eff.Obs.	Eff.The.	Résultat	Sign.	
AF Ouest + Centre	59	40	14	44	6	0.035	p = 9,8 .10-12	S	
				14	5	0.04			p = 6,8 .10-10
AF Ouest	30	21	12	14	5	0.013	p = 2,4 .10-12	S	
AF Centrale	26	18	9	44	6	0.375	p = 1,6 .10-6	S	
Afrique	80	58	18	24	3	0.253	p = 2,2 .10-3	S	
				1	2	0.041			p = 8 .10-4
				38	2	10-4			p = 2,1 .10-7
Homme Ouest	30	20	9	268	5	0.32	p = 1.5 10-5	S	
				141	4	1.04			p = 1.9 10-2
				144	3	0.29			p = 3.1 10-3
Domestique Ouest	179	59	7	41	29	5.25	p = 1 10-13	S	
				39	17	17.7			p = 6.1 10-1
				40	15	3.15			p = 8.3 10-7
				166	14	7.75			p = 2.4 10-2
Homme Est	409	92	8	74	45	1.06	p = 2.1 10-57	S	
				2	27	6.62			p = 1.4 10-9
				23	22	2.33			p = 6.4 10-15
				204	21	0.45			p = 8.9 10-28
Domestique Est	120	54	10	90	11	0.13	p = 3.4 10-18	S	
				74	9	0.18			p = 3.5 10-13
				78	9	1.33			p = 8.2 10-6
				81	8	0.09			p = 1.6 10-13
Sauvage Est	44	33	10	25	3	0.66	p = 2.9 10-2	S	
				5	3	0.43			p = 9.2 10-3
				189	3	0.18			p = 8.1 10-4
Glossine Est	70	51	11	29	5	0.03	p = 9.7 10-11	S	
				70	4	10-4			p = 3.7 10-14
				74	4	0.06			p = 3.7 10-7
				78	4	0.26			p = 1.4 10-4
Animaux Lambwe Valley	154	52	6	78	21	1.69	p = 6.2 10-17	S	
				74	15	1.02			p = 3.2 10-8
Homme 1980 Lambwe Valley	24	6	7	74	12	4,54	p = 5.7 10-4	S	
				75	7	2,28			p = 5.6 10-3
Homme 1981 Lambwe Valley	34	9	7	74	17	6,43	p = 4.2 10-5	S	
				75	7	1,60			p = 8.9 10-4
Homme 1982 Lambwe Valley	26	5	6	74	12	4,73	p = 10-3	S	
				25	11	5,51			p = 0.01

Tableau 20 : Résultats des tests FACTO.

Nb.Ind. = nombre d'individus; Nb.Zym. = nombre de zymodèmes observés; Loci Δ = nombre de loci variables; Zym. = numéro d'identification du zymodème; Eff. Obs. = effectif observé; Eff. The. = effectif théorique; Sign. = test significatif (S) ou non significatif (NS) au seuil de 5%; p = probabilité.

d'obtenir le zymodème Z14 représenté 5 fois est de l'ordre de 10^{-12} , c'est à dire pratiquement nulle.

- Sur l'échantillonnage de Godfrey *et al.* (1990), un seul des 22 tests n'est pas significatif, concernant un zymodème représenté 17 fois dans le groupe "Animaux domestiques d'Afrique de l'Ouest".

- Sur l'échantillonnage de Mihok *et al.* (1990), la surreprésentation des deux zymodèmes les plus abondants est hautement significative.

- Enfin, sur le sondage de Gibson & Welde (1985), les résultats sont également significatifs pour les zymodèmes les plus représentés, ceci pour les trois années étudiées.

Les résultats des tests HAPLO sur le nombre et la représentation des génotypes sont donnés dans le tableau 21.

- Sur notre échantillonnage, ce test n'a pas été appliqué au groupe d'Afrique de l'est, pour les raisons déjà évoquées pour le test FACTO. Pour les autres groupes, ces tests s'avèrent tous significatifs, à la fois sur le nombre de zymodèmes différents (on en obtient moins que ce qui est attendu), et sur l'effectif maximum des zymodèmes (on observe des effectifs plus élevés que ce qui est attendu). Par exemple, sur le groupe "Afrique de l'ouest", la probabilité d'obtenir un génotype quelconque représenté 5 fois ou davantage est 0,02, et la probabilité de n'obtenir que 21 zymodèmes différents ou moins encore est 7.10^{-4} .

- Sur l'échantillonnage de Godfrey *et al.* (1990), un seul test n'est pas significatif : dans le groupe "Animaux sauvages d'Afrique de l'Est", il est possible d'échantillonner un même zymodème trois fois, comme les zymodèmes les plus abondants de ce groupe. Toutefois, le test FACTO a montré que ces zymodèmes abondants particuliers ne pouvaient être observés 3 fois, avec un niveau de signification compris entre 0,03 et 8.10^{-4} , selon le zymodème considéré.

- Sur l'échantillonnage de Mihok *et al.* (1990), les deux tests HAPLO sont très significatifs, puisque sur 10000 tirages, on n'a jamais noté de composition génotypique similaire à celle qui est effectivement observée (c'est-à-dire avec un des génotypes répété 21 fois, et seulement 52 génotypes différents) : le nombre maximum d'individus pour un génotype quelconque est de 12, résultat observé 3 fois sur 10000, et le nombre minimum de génotypes différents est de 95, observé 2 fois sur 10000.

- Enfin, sur le sondage de Gibson & Welde (1985), les deux tests HAPLO sont également significatifs pour les trois années étudiées.

Echantillon	Nb. Ind.	Nb. Zym	Loci.Δ	Test	Résultat	Sign.
Afrique Est	21	21	16	DE	$p = 0$ DE $\geq 3,9 \cdot 10^{-3}$	S
Afrique Ouest + Centre	59	40	14	HAPLO HAPLO DE	gén.rep. ≥ 5 fois $p = 0,01$ jms 40 zym. \neq - min 48 avec $p = 10^{-3}$ $p = 0$ DE $\geq 4,7 \cdot 10^{-3}$	S S S
Afrique Ouest	30	21	12	HAPLO HAPLO DE	gén.rep. ≥ 5 fois $p = 0,02$ ≤ 21 zym. \neq $p = 7 \cdot 10^{-4}$ $p = 0$ DE $\geq 5,3 \cdot 10^{-3}$	S S S
Afrique Centrale	26	18	9	HAPLO HAPLO DE	aucun gén. rep. 6 fois - max 5 fois $p = 3 \cdot 10^{-4}$ jms 18 zym. \neq - min 19 avec $p = 2 \cdot 10^{-4}$ $p = 0$ DE $\geq 9,7 \cdot 10^{-3}$	S S S
Homme Ouest	30	20	9	HAPLO HAPLO DE	gén.rep. ≥ 5 fois $p = 5,6 \cdot 10^{-3}$ jms 20 zym. \neq - min 21 avec $p = 5 \cdot 10^{-4}$ $p = 0$ DE $\geq 6,9 \cdot 10^{-3}$	S S S
Domestique Ouest	179	59	7	HAPLO HAPLO DE	aucun gén. rep. 29 fois - max 27 fois $p = 0,02$ jms 59 zym. \neq - min 70 avec $p = 0,01$ $p = 0$ DE $\geq 1,8 \cdot 10^{-3}$	S S S
Homme Est	409	92	8	HAPLO HAPLO DE	aucun gén. rep. 45 fois - max 22 fois $p = 0,05$ jms 92 zym. \neq - min 235 avec $p = 0,02$ $p = 0$ DE $\geq 6,07 \cdot 10^{-1}$	S S S
Domestique Est	120	54	10	HAPLO HAPLO DE	aucun gén. rep. 11 fois - max 5 fois $p = 0,02$ jms 54 zym. \neq - min 102 avec $p = 0,02$ $p = 0$ DE $\geq 1,5 \cdot 10^{-3}$	S S S
Sauvage Est	44	33	10	HAPLO HAPLO DE	gén. rep. ≥ 3 fois $p = 0,177$ jms 33 zym. \neq - min 36 avec $p = 6 \cdot 10^{-4}$ $p = 0$ DE $\geq 1,9 \cdot 10^{-3}$	NS S S
Glossine Est	70	51	11	HAPLO HAPLO DE	gén. rep. ≥ 5 fois $p = 2 \cdot 10^{-3}$ jms 51 zym. \neq - min 63 avec $p = 1 \cdot 10^{-3}$ $p = 0$ DE $\geq 3,8 \cdot 10^{-3}$	S S S
Animaux Lambwe Valley	154	52	6	HAPLO HAPLO DE	aucun gén. rep. 21 fois - max 12 fois $p = 10^{-4}$ jms 52 zym. \neq - min 95 avec $p = 2 \cdot 10^{-4}$ $p = 0$ DE $\geq 6,9 \cdot 10^{-3}$	S S S
Homme Lambwe Valley 1980	24	6	7	HAPLO HAPLO DE	gén. rep. ≥ 12 fois $p = 10^{-3}$ ≤ 6 zym. \neq $p = 6 \cdot 10^{-4}$ $p = 0$	S S S
Homme Lambwe Valley 1981	34	9	7	HAPLO HAPLO DE	aucun gén. rep. 17 fois ≤ 9 zym. \neq $p = 10^{-4}$ $p = 0$	S S S
Homme Lambwe Valley 1982	26	5	6	HAPLO HAPLO DE	gén. rep. ≥ 12 fois $p = 0,01$ ≤ 5 zym. \neq $p = 0,01$ $p = 0$	S S S

Tableau 21 : Résultats des tests HAPLO et DE.

Nb.Ind. = nombre d'individus; Nb.Zym. = nombre de zymodèmes observés; Loci Δ = nombre de loci variables; Sign. = test significatif (S) ou non significatif (NS) au seuil de 5%; gén.rep. = génotype représenté; jms = jamais; zym. = zymodème (ou génotype); min = minimum; max = maximum; p = probabilité. Pour HAPLO le 1er résultat concerne l'effectif des génotypes, le 2ème concerne le nombre de génotypes (ou zymodèmes)

L'ensemble de ces résultats témoignent donc de la présence excessive de certains zymodèmes particuliers, et d'un nombre de zymodèmes plus faible que celui que l'on attendrait sous l'hypothèse d'une recombinaison sexuée libre. L'hypothèse de sélection, qui pouvait expliquer le déséquilibre observé dans les proportions génotypiques à un locus, devient à présent inacceptable. En effet, si une sélection positive de certains génotypes à un locus donné est envisageable, cette explication devient très lourde lorsque l'on considère plusieurs loci simultanément, et peut donc être rejetée.

2- Déséquilibre de liaison

Les observations précédentes traduisent une association non aléatoire entre les génotypes à des loci différents (cf chapitre II B § 3.3.2.). Ce déséquilibre de liaison est évalué à l'aide du test DE, qui calcule la probabilité d'obtenir un déséquilibre de liaison supérieur ou égal à celui qui est effectivement constaté dans l'échantillon. Les résultats de ce test sont réunis avec ceux du test HAPLO, dans le tableau 21. Pour tous les groupes étudiés, ces résultats sont hautement significatifs, puisque la probabilité est toujours nulle (0 cas observé sur 10000 tirages). Même pour notre groupe d'Afrique de l'est, pour lequel la variabilité observée est très grande, puisque l'on obtient autant de zymodèmes que de stocks, il existe un déséquilibre important.

Par simple observation, on remarque un déséquilibre très important dans notre échantillon d'Afrique de l'ouest. En effet, on trouve toujours associés les génotypes unilocus suivants : ME2 2/4 - NHi2 1/2 - UGPP1 1/2 - (et PEP \neq I). Une telle association inter-loci plaide en faveur d'une reproduction uniparentale.

3- Génotypes surreprésentés ubiquistes

Si l'on s'intéresse de plus près à la constitution des génotypes que nous avons définis comme surreprésentés, nous pouvons voir que certains d'entre-eux regroupent des stocks isolés à de très grandes distances (plusieurs centaines ou des milliers de kilomètres) et sur une période couvrant de nombreuses années (plus de 10 ans).

Ainsi, sur notre échantillon total (cf tableau 9), nous observons que le zymodème surreprésenté Z24 regroupe un stock de Côte d'Ivoire, un du Zaïre et un de l'Ouganda. De même le zymodème Z01 regroupe un stock du Nigéria et un du Soudan. Ces

zymodèmes sont bien ubiquistes puisque les stocks ont été échantillonnés à plus de 4000 km de distance.

Parmi l'échantillonnage de Godfrey *et al.* (1990), nombreux sont les zymodèmes ubiquistes. Dans le groupe "Homme Ouest" le zymodème Z 141 regroupe des stocks isolés au Congo et en Côte-d'Ivoire (3000 km). Dans le groupe "Homme Est" le zymodème Z 27 regroupe des stocks isolés au Kenya, au Mozambique, en Tanzanie et en Zambie (2000 km), sur une période de 13 ans. Dans le groupe "Domestique Est" le zymodème Z 81 regroupe des stocks isolés au Kenya, dans un même foyer, mais sur une période de 11 ans. Dans le groupe "Sauvage Est" le zymodème Z 05 regroupe des stocks isolés en Ethiopie et en Tanzanie (1000 km), sur une période de 9 ans.

Une étude similaire, réalisée à une échelle plus réduite (Truc 1991), met en évidence l'existence de génotypes ubiquistes au Congo. Des stocks appartenant à un même zymodème ont été échantillonnés sur des distances de 500 à 700 km, sur des périodes de 9 ans.

L'ubiquité de ces génotypes surreprésentés est en faveur d'une reproduction clonale. Cette stabilité dans l'espace et dans le temps ne peut être envisagée dans un mode de reproduction sexuée, la recombinaison générant à tout instant de nouvelles combinaisons génotypiques. L'existence de ces zymodèmes ubiquistes permet d'éliminer l'hypothèse d'une structuration géographique comme explication globale des déséquilibres de liaison observés. En effet, dans le cas des organismes à reproduction sexuée, si l'on observe des génotypes multilocus surreprésentés, dus à un phénomène de structuration géographique, ces génotypes surnuméraires ont toujours tendance à se regrouper dans des localisations précises (Tibayrenc *et al.* 1991). C'est, par exemple, ce que l'on observe dans les populations naturelles de triatomes en Bolivie, lorsqu'on leur applique les tests utilisés dans le présent travail (Dujardin, communication personnelle). Il est important de noter, par ailleurs, que pour les deux séries de données qui ont été analysées dans des conditions de sympatrie parfaitement satisfaisantes (Mihok *et al.* 1990 : zymodèmes non humains de la Lambwe valley ; Gibson & Welde 1985 : zymodèmes humains de la Lambwe valley), les tests donnent également des résultats tous convergents et hautement significatifs, alors que le risque de biaisage dû à la structuration géographique est, dans ces cas, réduit au minimum.

Nous concluons donc que la structuration géographique (différence de fréquences alléliques entre populations) ne constitue pas une explication globale parcimonieuse de nos résultats dans l'hypothèse nulle d'échanges sexuels réguliers.

Les populations de *Trypanosoma brucei* apparaissent donc composées de lignées parasitaires discrètes, évoluant indépendamment les unes des autres, ce qui ne pouvait être mis en évidence sans une analyse de génétique des populations. Une fois cette hypothèse de travail acquise, il est souhaitable d'établir les liens de parenté génétique existant entre ces diverses lignées, que l'on peut assimiler, comme nous le verrons dans la discussion, à des clones naturels.

1. 5. Etudes des relations phénétiques et phylétiques

Ces études concernent l'échantillon que nous avons caractérisé par électrophorèse isoenzymatique sur la base de 19 loci polymorphes.

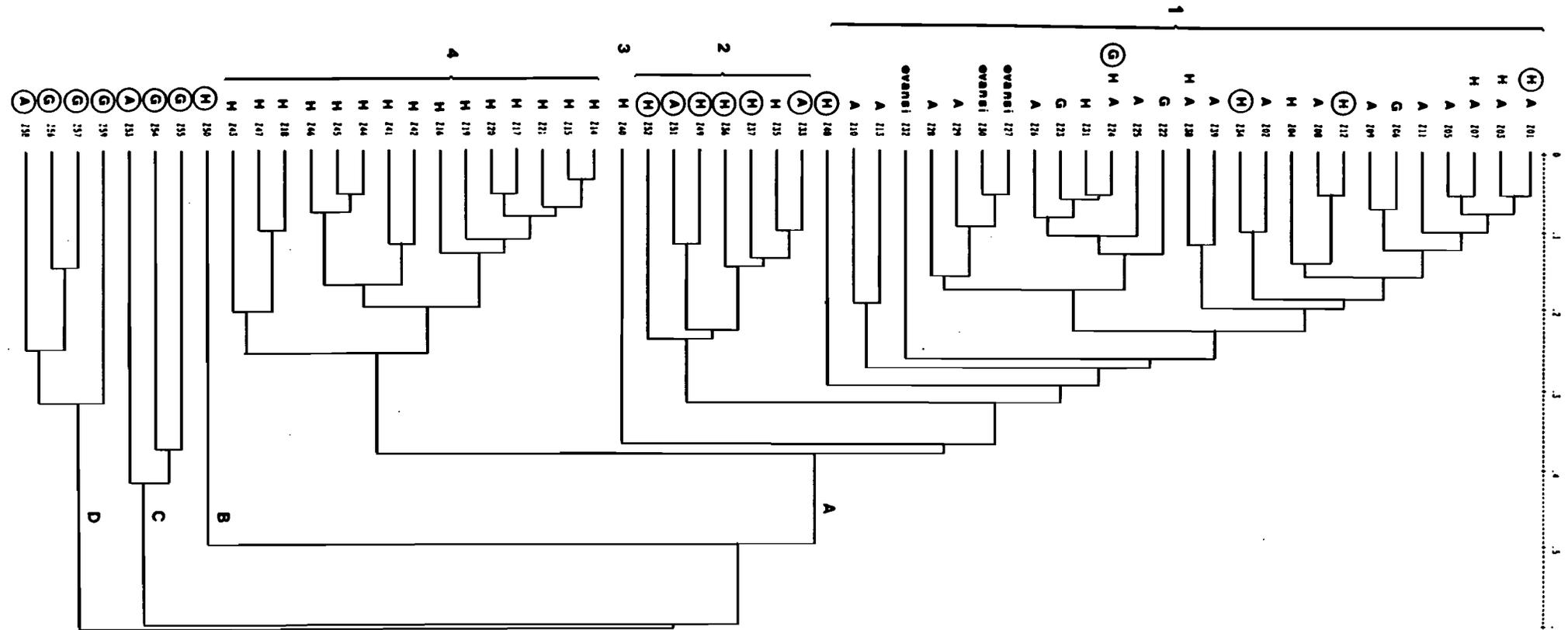
1. 5. 1. Analyse phénétique : le dendrogramme

Le dendrogramme a été construit à partir de la matrice de distances de Jaccard, par classification hiérarchique ascendante et agglomération par liens moyens (cf chapitre II B § 3.2.1.). Il est représenté sur la figure 8. Il fait apparaître quatre rameaux principaux. Le premier forme une "grappe" (A), constitué de 51 zymodèmes. Le second (B) individualise un zymodème (Z50) formé par un seul stock isolé de l'homme en Zambie. Le troisième (C) regroupe 3 zymodèmes (Z53, Z54 et Z55) correspondant à 3 stocks isolés de la glossine et de l'animal domestique au Kenya. Le dernier rameau (D) regroupe 4 zymodèmes (Z56, Z57, Z58 et Z59) formés de stocks isolés de la glossine et de l'animal sauvage au Kenya et en Tanzanie . Les trois rameaux B,C et D ne regroupent donc que des stocks d'Afrique de l'est. Les zymodèmes de ces trois rameaux présentent à la fois des distances élevées entre eux, et des distances importantes avec les zymodèmes du rameau A (cf matrice de distances annexe 13).

Si l'on considère à présent des distances moins élevées (de l'ordre de 0.3), on remarque que la branche A se ramifie elle-même en quatre sous-divisions :

- Le groupe 1, formé de 28 zymodèmes, est un groupe très hétérogène quant à l'origine des stocks qui le composent. En effet, ces stocks ont été isolés de l'homme, de la glossine et de l'animal domestique dans de nombreux pays d'Afrique de l'ouest, d'Afrique centrale et d'Afrique de l'est (pour Z01, Z12, Z24, Z34 et Z48). Ces stocks répondent donc aux trois appellations *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* et *T. b. brucei*. En outre, ce groupe contient les 3 stocks de *Trypanosoma evansi* (Z27, Z30 et Z32).

Figure 8 : Dendrogramme tracé selon la méthode ascendante hiérarchique utilisant la matrice de distances de Jaccard et la technique agglomérative à liens moyens. On distingue quatre rameaux : A, B, C et D. A l'intérieur du rameau A, quatre groupes s'individualisent : 1, 2, 3 et 4. Pour chaque zymodème est indiqué l'hôte et la zone de provenance des stocks : H = homme, A = animal domestique ou sauvage, G = glossine, ○ = Afrique de l'est. Le groupe 4 est exclusivement composé de stocks humains d'Afrique centrale et d'Afrique de l'ouest.



- Le groupe 2, formé de 7 zymodèmes, regroupe essentiellement des stocks humains d'Afrique de l'est (4 zymodèmes sur 7), qui correspondrait à l'appellation *T. b. rhodesiense*. Un zymodème (Z33), représenté par le stock EATRO 1125, isolé d'un animal sauvage en Ouganda, a été caractérisé par divers auteurs comme *T. b. brucei* (cf tableau 1). Enfin, seul le zymodème Z35, représentant un stock humain, a été isolé à l'ouest.

- Le rameau 3 n'est constitué que d'un zymodème à un seul représentant : le stock humain du Sénégal. Celui-ci semble donc bien différent des autres stocks d'Afrique centrale et occidentale.

- Le groupe 4, formé de 15 zymodèmes (Z14 à Z21, et Z41 à Z47), ne regroupe que des stocks isolés de l'homme en Afrique centrale et en Afrique de l'ouest. Bien qu'à l'intérieur de ce groupe certaines distances soient relativement élevées (0.32), ce groupe semble relativement homogène, et pourrait correspondre à une entité génétique.

1. 5. 2. Analyse factorielle des correspondances

Dans un premier temps, nous avons réalisé l'analyse sur les 59 zymodèmes. Les zymodèmes très éloignés (zymodèmes des rameaux B, C, et D de l'analyse précédente), présentaient des positions extrêmes sur les différents couples d'axes testés, entraînant un regroupement très serré de tous les autres zymodèmes sur une surface très réduite. Afin de mieux visualiser le positionnement des zymodèmes du rameau A les uns par rapport aux autres, nous avons alors éliminé les zymodèmes très éloignés. Il s'agit des zymodèmes Z 50, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 et du zymodème Z40. Le résultat de l'AFC sur le plan I-II est présenté figure 9 :

- Dans le cadran inférieur droit, on retrouve les 7 zymodèmes du groupe 2 de l'analyse précédente (essentiellement des stocks humains de l'est), auxquels s'ajoutent les zymodèmes Z34 et Z48 correspondant également à 2 stocks humains d'Afrique de l'est (Ethiopie et Kenya). Ces zymodèmes ne forment pas un nuage distinct.

- Dans le cadran inférieur gauche, on retrouve les 15 zymodèmes d'origine humaine d'Afrique occidentale et centrale regroupés par l'analyse précédente (groupe 4). Ce groupe semble bien discriminé par l'axe I puisque ce sont les seuls (à l'exception de Z09) à être positionnés dans la partie gauche de cet axe.

- Les zymodèmes restants s'ordonnent dans le cadran supérieur droit. Seul le zymodème Z28 s'individualise dans la partie supérieure de l'axe II. Il s'agit des stocks isolés d'animaux domestiques en Gambie.

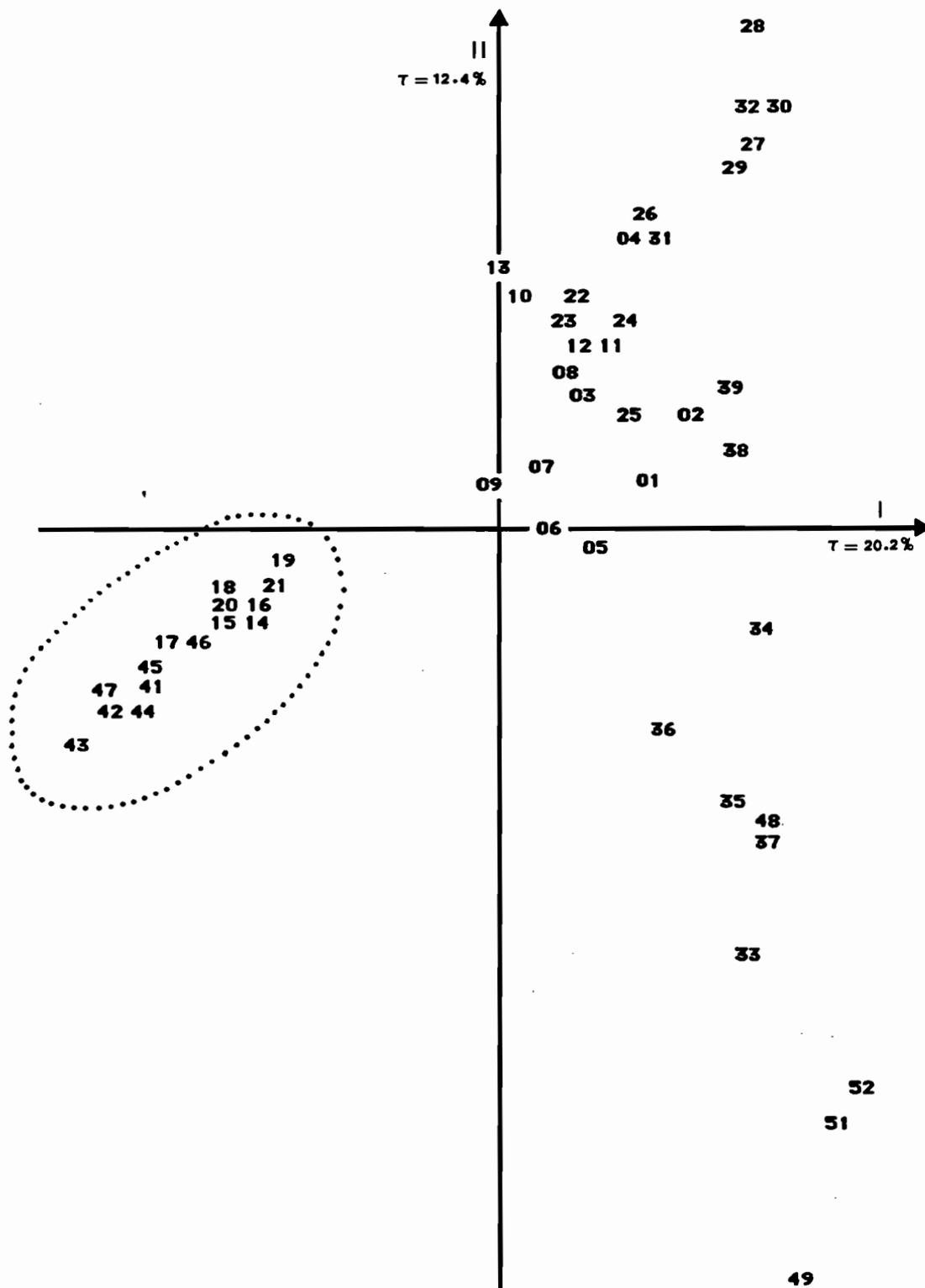


Figure 9 : Analyse factorielle des correspondances (plan I-II). Seul le groupe 4 s'individualise, dans le cadran inférieur gauche, en un nuage relativement compact. Cette analyse confirme l'indépendance de ce groupe individualisé par le dendrogramme.

Les résultats de cette analyse corroborent ceux de l'analyse phénétique précédente basée sur les distances de Jaccard. Elle individualise nettement certains stocks d'Afrique de l'est très différents des autres et elle regroupe un ensemble de stocks humains d'Afrique de l'ouest et d'Afrique centrale. Bien qu'ils présentent une vague tendance à se regrouper, les stocks humains d'Afrique de l'est montrent une grande hétérogénéité.

1. 5. 3. Analyse cladistique

Les deux méthodes d'analyse cladistique de parcimonie et de compatibilité ont été appliquées à un sous-échantillon comprenant 26 stocks, appartenant à 22 zymodèmes. Ces stocks ont été sélectionnés pour être représentatifs de la variabilité totale. Le choix est basé, d'une part sur les distances génétiques de Jaccard, et d'autre part sur les résultats de l'analyse phénétique précédente. Le tableau 22 présente ces stocks, leur origine et les zymodèmes auxquels ils appartiennent. Parmi les zymodèmes on retrouve : un représentant de chacun des rameaux B, C et D, et de nombreux zymodèmes du rameau A, dont 8 appartiennent au groupe 4.

1- Méthode de parcimonie : le réseau de Wagner

Cet arbre non-enraciné est présenté figure 10. Entre chaque intersection est indiquée la distance patristique, ou nombre de pas évolutifs, permettant de quantifier les relations phylogénétiques entre les zymodèmes.

- On retrouve toujours, éloignés, les zymodèmes d'Afrique de l'est Z54 et Z57 (rameaux C et D) à une extrémité du réseau.

- On retrouve aussi le groupe 2 (Z 33, 49, 51, 52) et l'on remarque que le zymodème Z50 (rameau B) se trouve rapproché de ce groupe dont 3 zymodèmes sont des stocks humains de l'est. Le zymodème 33, stock animal, se place en ancêtre hypothétique des stocks humains du groupe, mais également du stock humain du Z50. *T. b. rhodesiense* ne serait pas un groupe homogène, puisque que les stocks de ce groupe présentent de plus grandes distances entre-eux qu'avec le stock de *T. b. brucei*.

- Au centre du réseau, se trouve le groupe 1, dont les différents zymodèmes présentent de faibles distances. Il est intéressant de noter que le zymodème Z03, qui regroupe un stock humain et un stock animal, est placé au centre de ce groupe. Cela confirme l'impossibilité de distinguer certains stocks humains des stocks animaux.

Stock	Hôte	Pays	Année	Zym.
BIYAMINA	Homme	SOUDAN	1982	1
IBADAN 22	M.dom.	NIGERIA	1977	2
TH 112	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	3
TH 2	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	4
KK 39	M.sauv.	BURKINA FASO	1980	8
GAMBELA I	Homme	ETHIOPIE	1967	12
DAL 069	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	14
DAL 967	Homme	COTE D'IVOIRE	1986	
NANA	Homme	COTE D'IVOIRE	19??	
TH 149	Homme	COTE D'IVOIRE	1978	16
ELIANE	Homme	COTE D'IVOIRE	1952	17
NITR 40.12	Glossine	NIGERIA	1970	22
EATRO 1125	M.sauv.	UGANDA	1966	33
MDS	Homme	CAMEROUN	1974	41
C 126	Homme	ZAIRE	1971	43
M 001	Homme	CAMEROUN	1988	44
A 004	Homme	CAMEROUN	1988	
B 014	Homme	CAMEROUN	1988	
PEYA	Homme	CONGO	1980	45
BIM	Homme	CAMEROUN	1975	47
058 (Cl.A3)	Homme	ZAMBIE	1974	49
TRPZ 227	Homme	ZAMBIE	1982	50
TRPZ 166	M.dom.	ZAMBIE	1982	51
*0404	Homme	RUANDA	1970	52
S 29	Glossine	KENYA	1969	54
EATRO 1535	Glossine	KENYA	1969	57

Tableau 22 : Stocks de Trypanosoma brucei utilisés dans l'analyse cladistique et l'étude de l'ADN kinétoplastique. Pour chacun des 26 stocks est indiqué : l'hôte, le pays et l'année d'isolement, ainsi que le zymodème auquel il appartient (ZYM.).

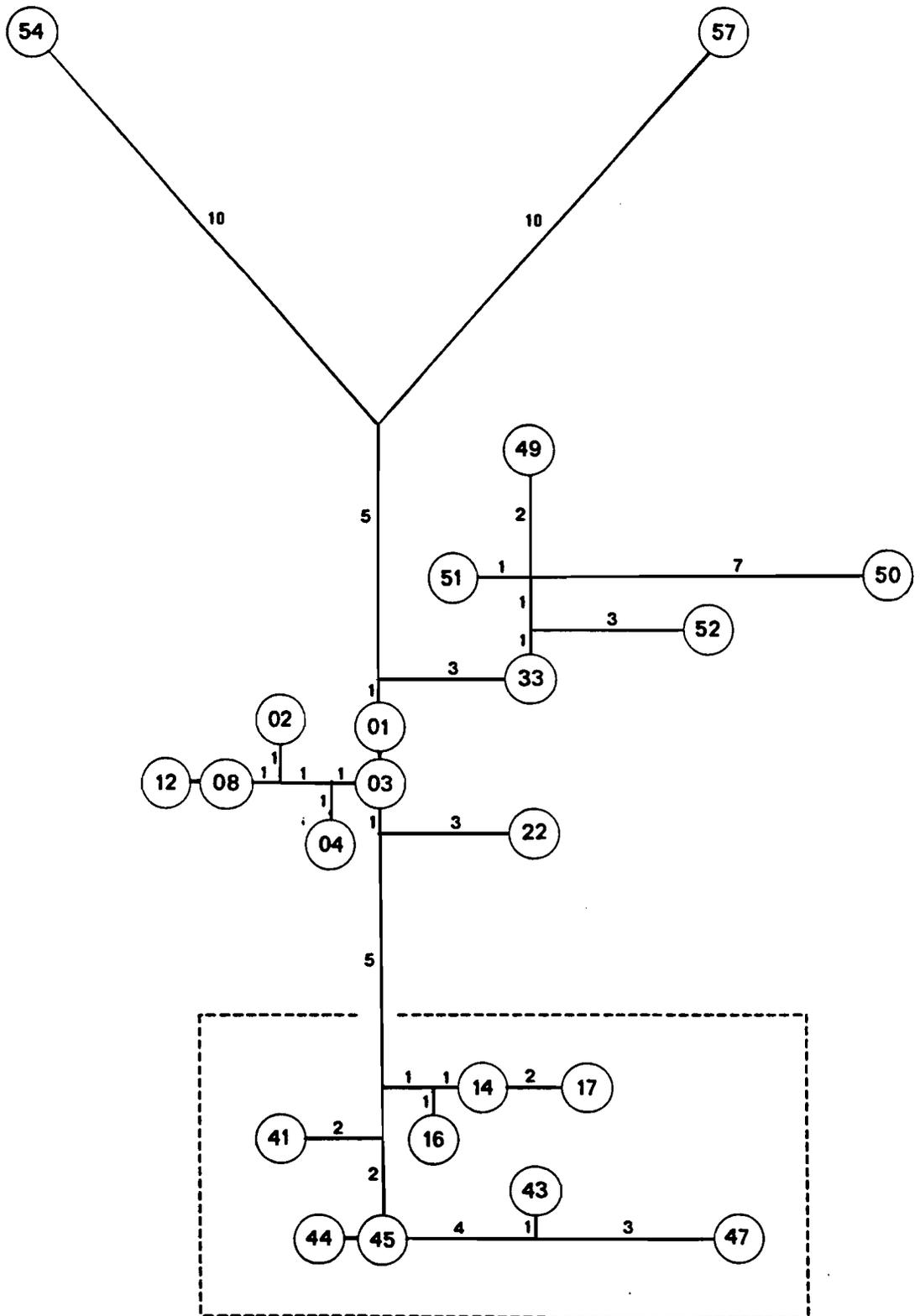


Figure 10 : Méthode de parcimonie : réseau de Wagner reliant les différents zymodèmes de *T. brucei*. Entre chaque intersection est indiquée la distance patristique. Dans l'encadré sont réunis les zymodèmes du groupe 4 formés de stocks humains d'Afrique centrale et d'Afrique de l'ouest.

- Enfin à l'extrémité inférieure, se positionne le groupe 4 formé de 8 zymodèmes regroupant des stocks humains du centre et de l'ouest. Dans ce groupe, s'individualisent 2 stocks d'Afrique centrale (Z43 et Z47) par leur distances relativement élevées avec l'ensemble des autres zymodèmes.

2- Méthode de compatibilité

Le réseau de compatibilité construit sur la base de 30 caractères sélectionnés parmi les 50, pour être mutuellement compatibles, est présenté figure 11. Il présente la même morphologie que le réseau de Wagner. Par la réduction du nombre de caractères, les distances entre zymodèmes se trouvent également réduites. Les différences essentielles observées entre les deux réseaux sont :

- Le zymodème Z54 s'est rapproché de l'ensemble des autres zymodèmes.
- Les zymodèmes du groupe 2 se placent comme ancêtres du zymodème Z50 et du zymodème Z57, alors que le zymodème Z22 se place comme ancêtre du groupe 4.

L'information apportée par ce réseau, ne concerne pas les caractères ancestraux des zymodèmes (considérations qui nous semblent très hypothétiques), mais plutôt la ressemblance entre les différents zymodèmes. En effet, le regroupement des zymodèmes composés de stocks humains (groupe 4) observé par les précédentes méthodes d'analyse est confirmé. La ressemblance entre ces zymodèmes n'est donc pas due à des phénomènes de convergence des caractères (homoplasie).

1. 5. 4. Comparaison des différentes méthodes utilisées

Si ces différentes méthodes d'analyse sont concordantes, elles ne sont pas pour autant redondantes, et apportent chacune des éléments supplémentaires, qui se renforcent ou s'opposent. Ainsi la grande hétérogénéité observée chez les stocks supposés appartenir à la "sous-espèce" *T. b. rhodesiense* est confirmée par toutes les analyses. Le groupe 4, apparaissant comme un rameau distinct sur le dendrogramme et un nuage sur l'AFC, présente une certaine hétérogénéité sur le réseau de Wagner. Si l'on fait une analyse qualitative de la variabilité, on note que ce groupe se caractérise par le génotype hétérozygote ME2/4. Par ailleurs, nos études portant sur l'ADN kinétoplastique, montre que tous les stocks de ce groupe, et eux seuls, sont reconnus par notre sonde (cf § suivant). Ce faisceau d'arguments nous permet de supposer que ce groupe correspond bien à un phylum distinct, un groupe de clones plus spécialement

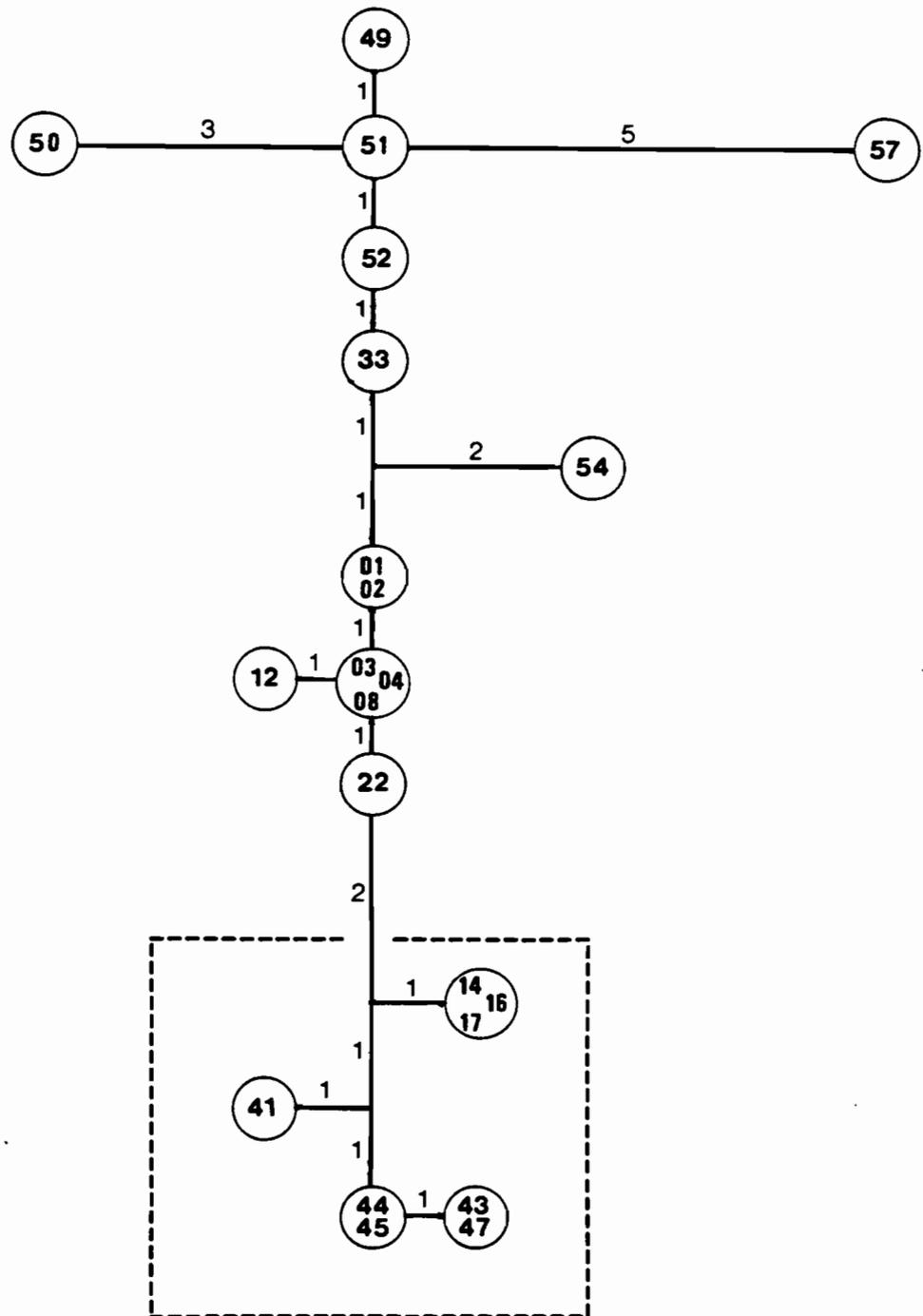


Figure 11 : Méthode de compatibilité : réseau "CLIQUE" de compatibilité des caractères entre les différents zymodèmes de *T. brucei*. Entre chaque intersection est indiqué le nombre de changements d'état de caractères. Dans l'encadré sont réunis les zymodèmes du groupe 4 formés de stocks humains d'Afrique centrale et d'Afrique de l'ouest.

inféodés à l'Homme. Il répondrait au "groupe 1 de *T. b. gambiense*" mis en évidence par Gibson (1986).

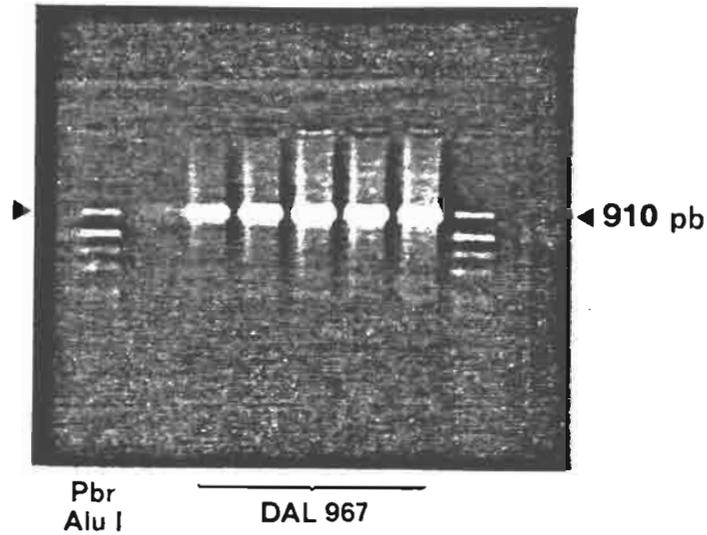
2. ETUDE DE L'ADN KINETOPLASTIQUE

2. 1. Résultats des amplifications

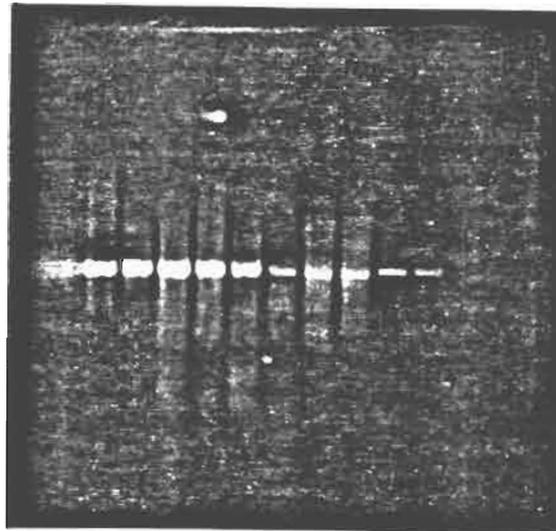
Les stocks de *Trypanosoma brucei* testés en amplification sont au nombre de 26 : il s'agit du sous-échantillon de 22 zymodèmes, représentatifs de la variabilité totale (cf chapitre III § 1.5.3.). Le tableau 22 (cf § 1.5.3) présente ces stocks, leur origine et les zymodèmes auxquels ils appartiennent. En outre, 3 stocks appartenant à 3 autres taxons ont été testés : un stock de *Trypanosoma evansi* (Kassala 4), un stock de *Trypanosoma cruzi* et un stock de *Leishmania mexicana*.

Les 26 stocks de *Trypanosoma brucei* présentent une amplification positive. Ces stocks, analysés sur gel d'agarose, présentent chacun une bande de forte intensité, de 920 à 940 paires de bases, selon les stocks. Cette bande correspond à la région variable des minicercles, amplifiée. Les photos 2 et 3 montrent les résultats des amplifications pour certains de ces stocks. Le stock de *Trypanosoma evansi* présente lui aussi une amplification positive : on observe une bande de poids moléculaire identique, mais d'intensité plus faible que celle observée dans le cas de *Trypanosoma brucei*. Par contre, aucune amplification n'a été observée pour les stocks des deux autres taxons : *Trypanosoma cruzi* et *Leishmania mexicana*.

Ces résultats suggèrent fortement que l'homologie de séquences des minicercles observée par Chen et Donelson (1980) correspond bien à une séquence conservée que l'on retrouve dans tous les stocks de *Trypanosoma brucei*. Cette séquence serait différente des séquences conservées qui ont été mises en évidence chez *Trypanosoma cruzi* et *Leishmania* (Macina *et al.* 1986 ; Kidane *et al.* 1984), puisque nos résultats sont négatifs pour ces deux taxons. Au contraire, l'amplification de la région variable de *Trypanosoma evansi* confirme l'existence, dans cette espèce, d'une région conservée très proche de celle observée chez *Trypanosoma brucei* (Bajyana Songa *et al.* 1990).



DAL 069
ELIANE
TH 149
TH 112
058 cl.A3
KK 39
BIM
C 126
BIYAMINA
GAMBELA I
T. CRUZI
TEMOIN H₂O



Photos 2 et 3 : Amplification de la région variable du minicercle kinétoplastique de *Trypanosoma brucei*. Pour chaque stock on observe une bande de 920 à 940 paires de bases correspondant à la région variable amplifiée (le marqueur de poids moléculaire est Pbr/Alu I).

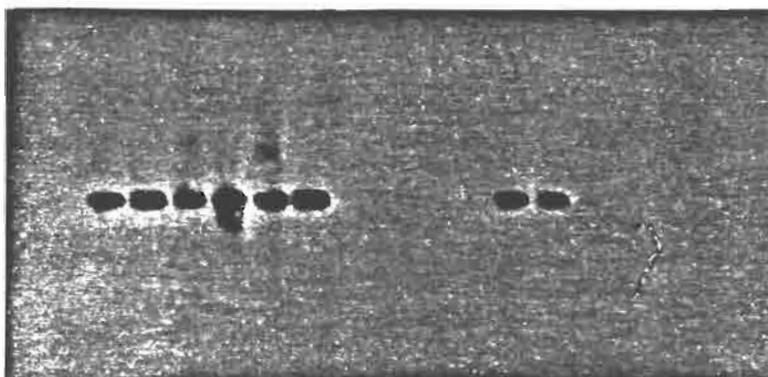
2. 2. Résultats des hybridations

Parmi ces stocks amplifiés, trois ont été choisis pour être utilisés comme sondes, afin de tester l'homologie de séquence de l'ADN du minicercle, entre les différents stocks. Ils ont été sélectionnés pour représenter les trois "sous-espèces" de *Trypanosoma brucei*, c'est-à-dire qu'ils ont été explicitement identifiés comme appartenant à ces trois "sous-espèces" par divers auteurs, soit par études isoenzymatiques, soit au moyen de sondes moléculaires (cf tableau 1). Il s'agit des trois stocks suivants : DAL 967 (*T. brucei gambiense*), NITR 40.12 (*T. b. brucei*) et 058 cl.A3 (*T. b. rhodesiense*).

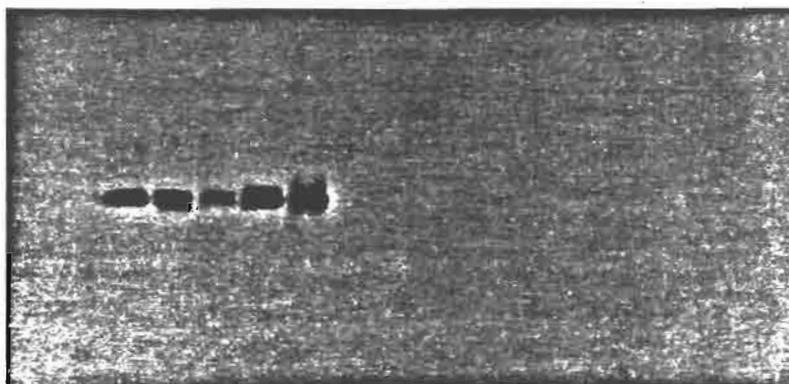
Après digestion par une enzyme de restriction (cf chapitre II B § 4.2.2.), la région variable purifiée (890 à 910 paires de bases) de chacun de ces trois stocks a été hybridée avec les régions variables amplifiées des 26 stocks de *Trypanosoma brucei* sélectionnés pour cette étude. Les photos 4 et 5, ainsi que le tableau 23, montrent les résultats de ces hybridations. On obtient deux cas de figures : les stocks NITR 40.12 et 058 cl.A3 ne s'hybrident qu'avec eux-mêmes, alors que le stock DAL 967 reconnaît 11 stocks en plus de lui-même.

Les minicercles des stocks identifiés comme appartenant aux "sous-espèces" *T. b. brucei* et *T. b. rhodesiense* ne présentent donc aucune homologie avec les divers stocks de l'échantillon. Par contre, la région variable du minicercle de DAL 967 présente une homologie de séquence avec plusieurs stocks. Ces 11 stocks reconnus correspondent à 8 zymodèmes différents : Z 14, 16, 17, 41, 43, 44, 45 et 47. Par l'étude isoenzymatique sur 18 loci polymorphes, nous avons mis en évidence une certaine ressemblance et un lien de parenté entre ces zymodèmes (cf § 1.5. et figures 10 et 11). Le dendrogramme basé sur les distances de Jaccard entre ces 22 zymodèmes est présenté figure 12. Les 8 zymodèmes reconnus forment un groupe (appelé groupe 4 dans l'étude électrophorétique portant sur tous les zymodèmes : cf figure 8). Le stock DAL 967 du zymodème Z14 reconnaît tous les stocks de ce groupe et aucun autre stock en dehors du groupe. Nous avons vu que ce groupe réunit une part notable des stocks isolés de l'homme en Afrique occidentale et centrale, c'est-à-dire ceux qui répondent à l'appellation classique de *T. b. gambiense*. Ces résultats sont donc en faveur de l'existence, au sein des stocks pathogènes pour l'homme en Afrique occidentale et

DAL 069
 DAL 967
 ELIANE
 TH 149
 PEYA
 MOS
 TH 112
 BIYAMINA
 EATRO 1125
 058 cl.A3
 A 004
 M 001



DAL 069
 DAL 967
 BIM
 NANA
 C 126
 TH 112
 NITR 40.12
 EATRO 1535
 058 cl.A3
 TRPZ 227
 0404



Photos 4 et 5 : Résultats de l'hybridation entre la région variable amplifiée de divers stocks de *Trypanosoma brucei* et la sonde DAL 967 (région variable amplifiée). Une hybridation positive est observée pour les stocks : DAL 069, DAL 967, ELIANE, TH149, PEYA, MOS, A 004, M 001, BIM, NANA et C 126.

STOCK	ZYM.	SONDE		
		DAL 967	NITR 4012	058 cl.A3
DAL 069	14	+	-	-
DAL 967	14	+	-	-
NANA	14	+	-	-
TH 149	16	+	-	-
ELIANE	17	+	-	-
MOS 84	41	+	-	-
C 126	43	+	-	-
A 004	44	+	-	-
B 014	44	+	-	-
M 001	44	+	-	-
PEYA	45	+	-	-
BIM	47	+	-	-
BIYAMINA	1	-	-	-
IBADAN 22	2	-	-	-
TH 112	3	-	-	-
TH 2	4	-	-	-
KK 39	8	-	-	-
GAMBELA I	12	-	-	-
NITR 40.12	22	-	+	-
EATRO 1125	33	-	-	-
058 Cl.A3	49	-	-	+
TRPZ 227	50	-	-	-
TRPZ 166	51	-	-	-
*0404	52	-	-	-
S 29	54	-	-	-
EATRO 1535	57	-	-	-

Tableau 23 : Résultats des hybridations avec les 3 sondes DAL 967, NITR 40.12 et 058 cl.A3. Pour chaque stock est indiqué le zymodème auquel il appartient (ZYM.). Le signe + signifie que l'hybridation est positive, et le signe - qu'elle est négative.

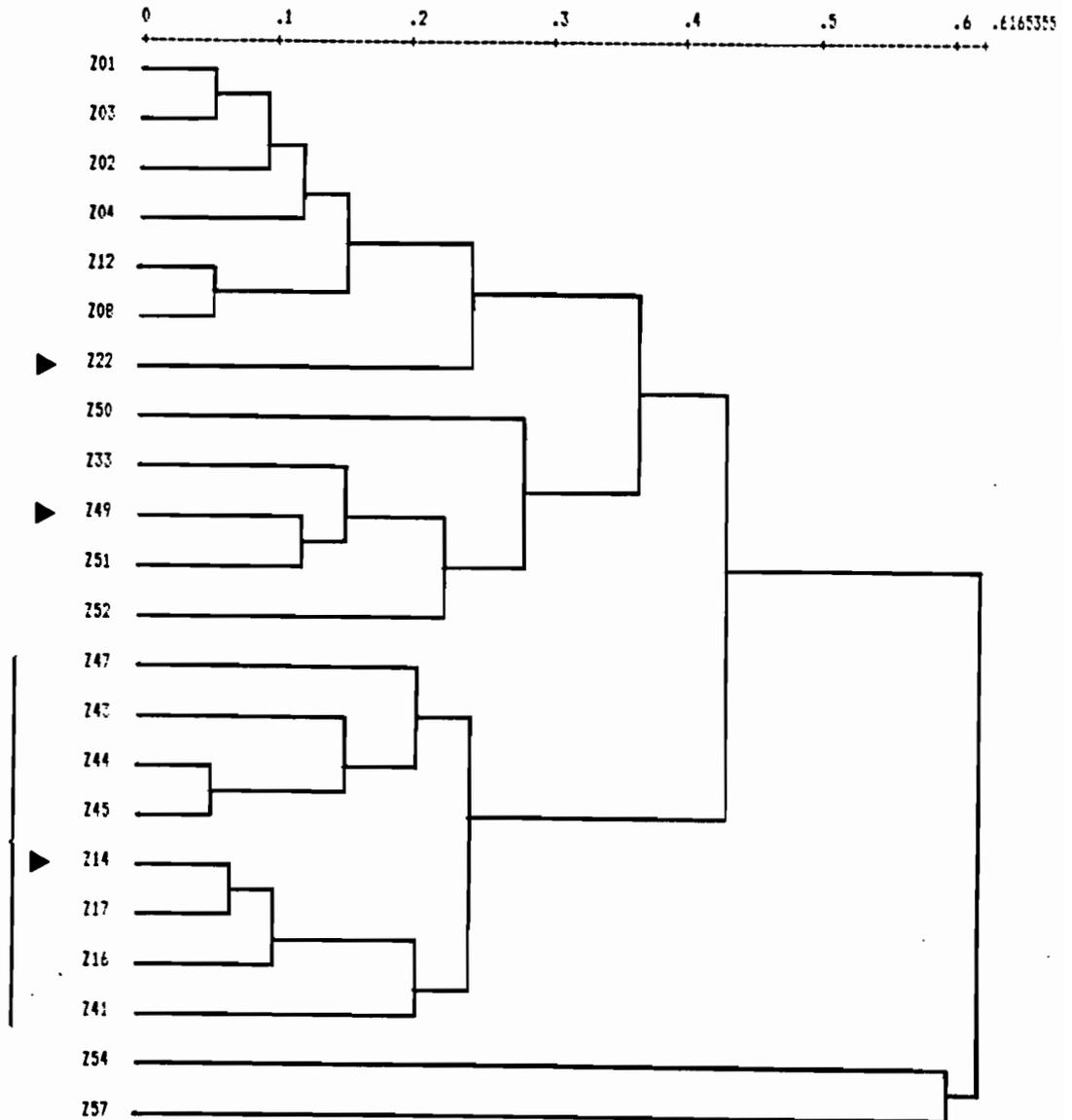


Figure 12 : Dendrogramme tracé d'après la matrice de distances de Jaccard, utilisant le principe de la classification hiérarchique ascendante et l'agglomération par liens moyens. Les flèches indiquent les zymodèmes des 3 stocks utilisés comme sondes : Z22 = NITR 40.12, Z49 = 058 cl.A3 et Z14 = DAL 967. Le crochet délimite le groupe des zymodèmes reconnus par la sonde DAL 967.

centrale, d'un groupe relativement homogène. Celui-ci correspondrait au "groupe 1 de *T. b. gambiense*" défini par Gibson (1986). Nos résultats confirment aussi l'hétérogénéité et le caractère douteux de l'individualité génétique des "sous-espèces" *T. b. brucei* et *T. b. rhodesiense*.

Si l'on considère que dans une même cellule parasitaire, il existe plusieurs classes de minicercles différents, il semble, à la lumière de ces résultats, que les stocks qui se ressemblent possèdent en commun une certaine classe de minicercles largement majoritaire, et quelques minicercles différents propres à chaque stock.

Si l'on admet que les minicercles présentent un héritage biparental (cf chapitre I § 3.2.2.), on devrait obtenir, sous l'hypothèse d'échanges sexués fréquents, une multitude de combinaisons possibles entre les marqueurs de l'ADN nucléaire et ceux de l'ADN kinétoplastique. La concordance observée ici entre les deux séries de marqueurs différents, une portant sur l'ADN nucléaire (loci étudiés en analyse isoenzymatique), et une sur l'ADN kinétoplastique (région variable des minicercles), déjà notée pour *Trypanosoma cruzi* (Tibayrenc & Ayala 1987 ; Veas *et al.* 1991 ; Brenière *et al.* sous presse) est un argument très robuste en faveur d'une reproduction asexuée (cf critères de clonalité, chapitre I § 4.3.). En effet, il s'agit là d'un cas extrême de déséquilibre de liaison, impliquant deux parties du génome (nucléaire et extranucléaire) très dissemblables. On observe notamment dans nos résultats un déséquilibre de liaison entre la séquence d'ADN de la région variable du minicercle et le génotype unilocus de la ME2 (ME2 2/4 pour tous les stocks reconnus par la sonde). La probabilité qu'un tel résultat soit généré par le seul fruit du hasard, dans l'hypothèse de recombinaison potentiellement panmictique, est comprise entre 0,01 et 0,001. Ceci est confirmé par le test FACTO, qui donne la probabilité de 0,004 pour observer cette association entre ME2 2/4 et la séquence reconnue par la sonde. Encore ces tests ne considèrent-ils que ces deux seuls loci. La spécificité de cette sonde pour l'identification des clones du "groupe 1" apparaît donc comme prometteuse, mais devra être confirmée sur un sondage plus important.

CHAPITRE IV :
DISCUSSION ET CONCLUSIONS

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1. LE PROBLEME DU MODE DE REPRODUCTION CHEZ *TRYPANOSOMA BRUCEI*

Cette analyse de génétique des populations permet d'éclaircir considérablement les problèmes du mode de reproduction et de la structure des populations naturelles de *Trypanosoma brucei*. Toutefois, certains points demeurent ambigus dans l'état actuel de ces recherches. Nous nous attacherons à distinguer les résultats qui nous semblent robustes, de ceux qui restent encore hypothétiques.

Les observations de Tait (1980 ; 1983) avaient fortement accrédité l'hypothèse selon laquelle *Trypanosoma brucei* était un organisme à reproduction sexuée régulière, dont les populations naturelles présentaient une structure quasi-panmictique, analogue à celle de l'espèce humaine par exemple. Ces résultats insolites, allant à contre-courant des hypothèses généralement admises, ont suscité un grand nombre de travaux expérimentaux, qui ont semblé confirmer les hypothèses de Tait. En effet, des recombinants ont effectivement été obtenus au laboratoire (voir en particulier Jenni *et al.* 1986). Cependant, ces recombinaisons expérimentales, résultat d'un travail très laborieux, n'apparaissent pas comme un processus obligatoire. Par ailleurs, les expériences de laboratoire ne disent rien sur l'impact réel de ces phénomènes dans les populations naturelles (Tibayrenc & Ayala 1988). Un exemple comparatif pris chez les bactéries est illustratif : chez l'espèce *Escherichia coli*, il est relativement aisé d'obtenir des recombinants (par divers phénomènes de parasexualité) au laboratoire. Cependant, les études de génétique des populations ont montré clairement que dans les populations naturelles de cette bactérie, les échanges génétiques ne sont pas suffisamment fréquents pour "brouiller un tableau" prépondérant de structure clonale (Selander *et al.* 1987).

Le modèle quasi-panmictique de Tait a été mis en doute par Cibulskis (1988). Celui-ci a suggéré qu'il existait, au sein du taxon *T. brucei*, des lignées parasites isolées génétiquement les unes des autres, tout en soulignant le fait que la variabilité génétique observée ne pouvait être obtenue sans postuler des échanges génétiques notables. Mihok *et al.* (1990) ont par ailleurs observé que les populations de *T. brucei* de la Lambwe Valley ne suivaient pas l'équilibre de Hardy-Weinberg, et donc, ne

pouvaient être considérées comme panmictiques. Ces auteurs ont fait largement appel à l'hypothèse de sélection naturelle pour expliquer la distribution génotypique observée.

Dans le cadre de la théorie clonale des protozoaires parasites, Tibayrenc *et al.* (1990 ; 1991), s'appuyant sur des données de la littérature, ont postulé que pour *Trypanosoma brucei*, comme pour plusieurs autres espèces majeures de protozoaires, les échanges génétiques ne sont pas suffisamment fréquents pour empêcher l'apparition de clones stables dans l'espace et dans le temps, qui se comportent comme de véritables taxons. La nuance est importante entre un modèle simplement "non panmictique" comme celui présenté par Cibulskis (1988) et Mihok *et al.* (1990) d'une part, et un modèle clonal explicite tel que celui de Tibayrenc *et al.* d'autre part : le clone naturel stable dans l'espace et dans le temps est une entité dont le comportement épidémiologique et évolutif peut faire l'objet de prévisions fiables et réfutables au fur et à mesure de l'enrichissement des données. Le modèle postule qu'une telle entité se comporte comme un véritable taxon évoluant pour son propre compte, et dont les caractéristiques sont transmises en bloc à chaque génération, y compris, et c'est ce qui intéresse le médecin et l'épidémiologiste, les caractéristiques médicalement importantes (dissémination, virulence, pathogénicité, résistance aux drogues). Ce modèle est très comparable à celui qui a été proposé par Selander *et al.* (1987) pour de nombreuses espèces bactériennes.

La présente étude de génétique des populations est basée sur une série de résultats nettement plus riches que ceux considérés par Tibayrenc *et al.* (1990) et Tibayrenc *et al.* (1991). Elle présente par ailleurs l'avantage, par rapport à ces études sur des données de la littérature, d'apporter de nouveaux résultats expérimentaux, ceci pour deux séries de marqueurs génétiques (isoenzymes et sondes moléculaires). Nos résultats montrent de nombreux indices en faveur d'une structure clonale chez les populations naturelles de *Trypanosoma brucei s.l.* : les différents tests, appliqués à notre ensemble d'échantillons, montrent des caractéristiques classiques de populations clonales, en particulier, de très forts déséquilibres de liaison, et des génotypes multilocus en excès, stables dans l'espace et dans le temps.

En faveur de l'hypothèse clonale, nous observons en particulier une concordance nette entre nos résultats isoenzymatiques et les données de biologie moléculaire, qu'il s'agisse de travaux sur le kinétoplaste ou de l'utilisation de sondes basées sur des séquences répétées de l'ADN nucléaire (Hide *et al.*, 1988 ; 1990). En effet, parmi les 42 stocks de *T. brucei* étudiés par ces auteurs pour le polymorphisme de longueur des fragments de restriction de séquences d'ADN répétées, 5 stocks font

partie de notre propre échantillonnage (NITR 40.12, EATRO 1125, ELIANE, MOS et BIM). Les positions phylogéniques relatives de ces stocks, telles qu'elles ont été déterminées par cette analyse, sont identiques à celles révélées par notre étude isoenzymatique : NITR 40.12 se trouve dans un groupe réunissant des stocks animaux et humains d'Afrique de l'ouest, EATRO 1125 est regroupé avec des stocks animaux et humains d'Afrique de l'est, tandis que les trois stocks humains ELIANE, MOS et BIM sont dans un groupe ne réunissant que des stocks humains d'Afrique centrale et de l'ouest. Cette concordance entre deux séries de marqueurs nucléaires différents reflète un intense déséquilibre de liaison, et donc, une absence de recombinaison. Dans notre travail sur le minicercle de l'ADN kinétoplastique, nous avons par ailleurs mis en évidence un parallélisme entre la ressemblance des minicercles et celle des loci isoenzymatiques. Truc (1991) a obtenu des résultats qui convergent avec les nôtres par l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction du maxicercle kinétoplastique. Sur l'ensemble des stocks de *T. brucei* d'Afrique centrale qu'il a étudiés, les résultats de l'analyse isoenzymatique sont corroborés par ceux du RFLP : les stocks se groupant dans des zymodèmes différents répondent également à des schizodèmes différents. Cette corrélation existant entre marqueurs de l'ADN nucléaire et marqueurs de l'ADN kinétoplastique est aussi un cas particulier de déséquilibre de liaison signant une absence de recombinaison entre ces deux parties du génome.

Enfin, nous avons pu vérifier la présence de génotypes ubiquistes stables dans l'espace et dans le temps. Ces génotypes surreprésentés retrouvés identiques sur de très grandes distances et à de nombreuses années d'intervalle, constituent l'argument le plus fort en faveur d'une reproduction clonale. De tels génotypes pérennes sont assimilables à des clones naturels, ou à des familles de clones étroitement apparentés.

Le résultat de notre travail sur les sondes, c'est-à-dire la possibilité de marquer un groupe de stocks donné, et eux seuls, par un marqueur spécifique au sein de l'espèce *T. brucei s.l.*, est à la fois une confirmation et une application pratique du modèle clonal. C'est grâce au mode de reproduction clonal, donc au fait que les caractéristiques génétiques du parasite sont transmises en bloc d'une génération à l'autre (déséquilibre de liaison), que l'on peut envisager de marquer, par une séquence d'ADN choisie au hasard, un groupe de génotypes. C'est la structure même de la population qui permet de concevoir des applications telles que la recherche d'un caractère particulièrement intéressant (virulence par exemple) par l'intermédiaire d'un autre caractère, sans qu'il soit nécessaire d'aller chercher le gène responsable, comme il faudrait le faire dans une population sexuée, où les individus sont de simples variants individuels éphémères.

Le modèle clonal proposé par Tibayrenc *et al.* (1990) est en fait un modèle "subclonal", ou "quasi-clonal": comme ces auteurs l'ont eux-mêmes souligné, les données observées pour les protozoaires parasites qu'ils ont étudiés (dont *T. brucei*) ne permettent pas de dire que des échanges sexuels n'interviennent pas, mais simplement qu'ils sont rares. Ce modèle est ainsi très proche de celui élaboré par Selander *et al.* (1987) pour les bactéries. La plus ou moins grande "rareté" de ces échanges est dans l'état actuel de la génétique des populations un paramètre difficile, sinon impossible à quantifier. Or, il s'agit d'une question cruciale, car ces échanges génétiques résiduels conditionnent la pérennité des clones. Une réponse définitive à ce problème est actuellement impossible ; cependant, certains éléments de discussion peuvent être apportés.

Un premier exemple concerne les *Daphnia*, crustacés cladocères à reproduction uniparentale pendant la majeure partie de l'année, qui présentent classiquement un cycle sexué seulement pendant une partie de la mauvaise saison. En fait, les différentes espèces de *Daphnia* présentent un éventail varié de situations, depuis les populations à cycle sexué annuel régulier, à celles qui sont des parthénogènes quasi-obligatoires ou obligatoires. On observe que, dans les premières, la structure des populations s'écarte assez peu d'une situation subpanmictique, tandis que dans les secondes, cette structure est typiquement clonale (Mort & Wolf 1986). Ce premier exemple nous montre que même quand le flux génique est restreint à une courte période de l'année, ceci est insuffisant pour générer une structure clonale comme celle que nous observons chez *T. brucei* : les épisodes de recombinaison chez ce parasite doivent donc être "plus rares" que chez les Daphnies à cycle sexué annuel.

Un deuxième contre-exemple, cité par Tibayrenc, Kjelleberg & Ayala (1990), nous vient des bactéries. Selander *et al.* (1987) ont montré une structure "quasi-clonale" chez la majeure partie des espèces de bactéries qu'ils ont étudiées. Cependant, en utilisant la même approche de génétique des populations que pour les autres espèces bactériennes (approche très similaire à la nôtre), ils n'ont pas réussi à mettre en évidence une telle structure "quasi-clonale" chez deux espèces : *Pseudomonas aeruginosa* et *Neisseria gonorrhoeae*. Pourtant ces bactéries, comme toutes les autres, sont capables de propagation clonale. Il semble cependant que chez elles, les phénomènes de parasexualité soient suffisamment énergiques pour "brouiller le tableau clonal", du moins tel qu'on peut le mettre en évidence avec les méthodes employées par nous-mêmes. Il semble donc que chez *T. brucei*, la sexualité soit notablement moins importante que chez ces deux espèces de bactéries.

Cibulskis (1988) avait postulé que la recombinaison génétique jouait un rôle notable dans la structure des populations de *T. brucei*. Le principal argument retenu était l'homoplasie observée au niveau des allèles : les différents zymodèmes observés tendent en effet à partager les mêmes allèles (plus exactement : les mêmes allozymes), simplement réassortis d'un locus à l'autre de façon différente selon les zymodèmes. La statistique présentée par l'auteur ne tenait pas compte du fait que des bandes isoenzymatiques semblables ne recouvrent pas forcément des protéines identiques. L'argument vaut cependant la peine d'être relevé, car l'auteur l'a repris plus récemment (Cibulskis, sous presse) pour présenter un autre modèle populationnel. Dans ce travail, l'existence de clones au sens propre du terme est acceptée chez *T. brucei*, mais la pérennité des clones sur le long terme est fortement mise en doute, ce qui diminue bien sur la portée du modèle clonal en termes d'épidémiologie. Un argument en faveur de ce "modèle clonal instable" serait le fait que les zymodèmes de *T. brucei* semblent n'avoir qu'une brève existence. Notre propre échantillonnage, et ceux que nous avons étudié dans la littérature nous indiquent que cette assertion n'est pas vérifiée : de nombreux zymodèmes ont été isolés à des années d'intervalle, et, même dans la Lambwe Valley, exemple spécialement étudié par Cibulskis, nous observons la présence de certains zymodèmes avec des fréquences importantes sur les trois années consécutives que nous avons analysées.

Nous retiendrons de cette controverse que nous ne disposons à l'heure actuelle d'aucun moyen statistique fiable pour estimer la fréquence de cette sexualité résiduelle, c'est-à-dire pour quantifier le "rare" et le "très rare". Nous pouvons seulement postuler que cette sexualité existe, car l'obtention de recombinants au laboratoire montre que le processus biologique est toujours présent : il serait très surprenant qu'il ne s'agisse là que d'un "fossile", à tout jamais disparu des cycles naturels.

Un autre problème, directement lié au précédent, est la structure comparée des populations parasites dans les cycles domestiques et dans les cycles sylvestres : il semble que la diversité zymodémique tende à être plus élevée dans les seconds, un résultat qui confirmerait ce qui est observé chez *Trypanosoma cruzi* (Lewicka 1991). Chez *T. brucei*, ce phénomène a été noté par Tait (communication personnelle), et Gibson (1990) a proposé comme explication d'un tel résultat un brassage génétique énergique dans les populations parasites des cycles sylvestres. En fait, dans ces cycles sylvestres, pas plus que dans les cycles domestiques, les populations ne révèlent aucun signe de panmixie, et les tests de déséquilibre de liaison montrent que les génotypes ne sont pas associés randomiquement d'un locus à l'autre, résultat également

observé chez *T. cruzi*. En face d'un tel tableau, il est impossible de dire si une recombinaison "moins rare" est l'explication de la diversité zymodémique supérieure des cycles sylvestres, ou s'il convient d'imputer seulement une plus grande diversité clonale.

Pour conclure ce chapitre sur le problème du mode de reproduction du parasite, nous considérons comme robuste l'hypothèse de travail d'une structure clonale, et de l'existence de clones stables dans l'espace et dans le temps. Mais la question de l'impact d'une sexualité occasionnelle sur le devenir évolutif des clones reste ouverte : ces phénomènes de recombinaison sont-ils plus fréquents dans le réservoir sauvage du parasite? L'impression intuitive que la "dose de sexe" chez *T. brucei* est supérieure à celle que l'on peut imputer chez *T. cruzi* sera-t-elle confirmée? De telles questions restent actuellement du domaine de la spéculation. La génétique des populations des protozoaires parasites, plus généralement des microorganismes, est une discipline encore balbutiante, fort loin d'être codifiée (Tibayrenc & Ayala 1991). Il est raisonnable d'espérer qu'un enrichissement des données (échantillon de stocks plus important, sondages microgéographiques, amélioration de la résolution des marqueurs génétiques), en même temps qu'un raffinement de l'analyse théorique de génétique des populations, apporteront des éléments décisifs pour répondre à ces difficiles questions.

2. COROLLAIRES TAXONOMIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES

La structure des populations naturelles de *Trypanosoma brucei* et le mode de reproduction du parasite ont des conséquences importantes sur l'épidémiologie de la maladie. En effet, si la recombinaison est exceptionnelle, les nouvelles mutations restent confinées au génotype dans lequel elles apparaissent, et de fortes associations se développent entre les allèles de différents loci. En ce sens, le modèle "subclonal" que nous observons est radicalement différent, quant à ses implications taxonomiques et épidémiologiques, du modèle "subpanmictique" qui avait été proposé pour *T. brucei*. Si la recombinaison était importante, comme l'énonce ce dernier modèle, la différenciation des lignées parasitaires les unes par rapport aux autres serait réprimée par un échange continu de gènes dans la population. Ainsi, l'importance quantitative avec laquelle l'échange génétique se produit influence la distribution et l'évolution des caractères d'importance médicale et vétérinaire. Alors qu'un variant individuel est une entité instable et éphémère, dont les caractères globaux ne

persistent que le temps d'une génération, un clone est une entité stable, reproduite à de nombreux exemplaires, retrouvée inchangée sur des milliers de kilomètres et sur des dizaines d'années. Ces clones constituent donc l'unité taxonomique à considérer dans toute étude appliquée. Les zymodèmes révélés par notre étude sont des clones ou des familles de clones étroitement apparentés, tels que les met en évidence l'analyse isoenzymatique.

Le modèle clonal permet une interprétation nouvelle de la variabilité génétique de *Trypanosoma brucei s.l.* Il est nécessaire, au moins jusqu'à preuve du contraire, de considérer que l'unité taxonomique utile n'est plus, ni l'espèce, ni la sous-espèce, mais le clone naturel, tel que l'identifie le marquage génétique.

La division classique de *T. brucei s.l.* en trois "sous-espèces" apparaît douteuse. Le seul groupe dont l'individualité génétique peut être actuellement retenue est celui qui correspondrait au "groupe 1" de *Trypanosoma brucei gambiense* de Gibson (1986). Ceci confirme les hypothèses de Godfrey *et al.* (1990) et de Stevens *et al.* (1991). L'intérêt de cette observation est que ce groupe semble inclure une part très notable des stocks humains d'Afrique de l'ouest, et la majorité des stocks humains d'Afrique centrale (au total 80% des stocks humains) : il y a là un espoir de réhabiliter le concept de *T. brucei gambiense* sur des bases génétiques rigoureuses. Ce "groupe 1" apparaît comme une collection de clones étroitement apparentés entre eux, et préférentiellement ou exclusivement inféodés à l'hôte humain. L'élaboration d'une sonde spécifique de ce groupe, résultat obtenu pour la première fois dans le présent travail, mis à part son caractère informatif sur la structure des populations du parasite, est prometteuse comme outil épidémiologique : en effet, la forte spécificité que nous pensons avoir mise en évidence (et qui devra être confirmée sur un nombre plus élevé d'isolats) est assortie de l'extrême sensibilité que la technique de PCR permet d'espérer : il serait alors possible d'identifier de façon spécifique ces clones rattachés au *T. brucei gambiense* "groupe 1", chez les patients, les hôtes animaux ou les glossines, même en cas de pauciparasitémie. Il sera alors important de vérifier que les propriétés épidémiologiques et médicales des différents clones composant ce groupe sont homogènes, ce qui n'a rien de certain, a priori. On peut noter le fait intéressant que ce groupe comprend des stocks d'Afrique centrale et d'Afrique de l'ouest. Il semble donc que les stocks pathogènes pour l'homme en Afrique de l'ouest soient apparentés à ceux d'Afrique centrale, bien que nous n'ayons pas mis en évidence de zymodèmes communs aux deux régions.

A part ce "groupe 1", aucune subdivision génétique ne peut être individualisée de façon fiable dans le taxon *T. brucei* s.l. Les "sous-espèces" *T. brucei brucei* et *T. brucei rhodesiense* sont davantage à considérer comme des "pathotypes", ou des "nosodèmes" (Frézil, communication personnelle) que comme des phylums. Donner à de telles entités un statut subspécifique est affaire de convenance personnelle, mais il doit être bien clair que ces "taxons" ne constituent pas des lignées parasitaires discrètes. La seule unité génétique fiable est le clone naturel mis en évidence par la génétique des populations. A la place des traditionnelles "sous-espèces", c'est cette entité taxonomique que nous proposons, en particulier pour reconsidérer des problèmes tels que le réservoir animal de la THA, ou la dissémination des épidémies.

Enfin, pour l'espèce *Trypanosoma evansi*, la distinction entre celle-ci et l'espèce *Trypanosoma brucei* ne peut être assise sur des considérations génétiques. En effet, les trois stocks, qui correspondent au trois zymodèmes Z27, Z30 et Z32, montrent entre eux des distances génétiques plus fortes qu'ils n'en présentent avec certains stocks de *T. brucei*. De même, certains stocks de *T. brucei* sont plus proches génétiquement de certains *T. evansi* que de certains autres *T. brucei*. Hoare (1972) souligne que ces deux espèces sont indistinguables morphologiquement, qu'elles présentent les mêmes relations hôte-parasite chez tous les animaux, et que le statut de *T. evansi* est très ambigu. D'après nos résultats de l'analyse isoenzymatique et de l'amplification de l'ADN kinétoplastique, ces stocks seraient à considérer comme des clones de *T. brucei*, transmis de façon mécanique par des Tabanidés et pathogènes pour les animaux domestiques. Ces clones auraient été apportés dans des zones où l'on ne trouve pas de glossine (Afrique du Nord et Amérique du Sud notamment) par des chameaux ou des chevaux infectés, et se seraient adaptés à un autre mode de transmission. La définition des espèces chez les animaux à reproduction uniparentale étant arbitraire, tout comme celle des sous-espèces, le choix de conserver pour *T. evansi* son statut spécifique est affaire de convenance personnelle, et peut être justifié par les particularités épidémiologiques très spéciales de ce taxon (transmission mécanique).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bajyana Songa, E., Painsavoine, P., Wittouck, E., Viseshakul, N., Muldermans, S., Steinert, M. & Hamers, R. (1990).** Evidence for kinetoplast and nuclear DNA homogeneity in *Trypanosoma evansi* isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43, 167-180.
- Barrois, M., Riou, G. & Galibert, F. (1981).** Complete nucleotide sequence of minicircle kinetoplast DNA from *Trypanosoma equiperdum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3323-3327.
- Bellofatto, V. (1990).** The new trypanosomatid genetics. *Parasitol. Today* 6, 299-302.
- Benzécri, J.P. (1984).** L'analyse des données. Vol. II. L'analyse des correspondances. *Dunod*, Paris, 635 p.
- Bold, R., Jones, T.W. & Payne, R.C. (1989).** Malic enzyme type VII isoenzyme as an indicator of suramin resistance in *Trypanosoma evansi*. *Exp. Parasitol.* 69, 317-323.
- Borst, P. (1991).** Why kinetoplast DNA networks? *Trends Genet.* 7, 139-141.
- 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. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3, 117-131.
- Borst, P., Van der Ploeg, M., Van Hock, J.F.M., Tas, J. & James, J. (1982).** On the DNA content and ploidy of trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 13-23.
- Brenière, S.F., Bosseno, M.F., Revollo, S., Rivera, M.T. & Tibayrenc, M.** Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and host blood by PCR technique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (sous presse).
- Chen, K.K. & Donelson, J.E. (1980).** Sequences of two kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 2445-2449.
- Cibulskis, R.E. (1988).** Origins and organization of genetic diversity in natural populations of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 96, 303-322.
- Cibulskis, R.E. (sous presse).** Genetic variation in *Trypanosoma brucei* and the epidemiology of sleeping sickness in the Lambwe Valley, Kenya. *Parasitology* 104.
- Cunningham, I. (1977).** New culture medium for maintenance of tsetse tissues and growth of trypanosomatids. *J. Protozool.* 24, 325-329.
- Cuny, G., Veas, F. & Roizes, G. (1991).** Pocket-blotting : A method for transferring nucleic acid onto nylon membrane . *Anal. Biochem.* 193, 45-48.
- De Puytorac, P., Grain, J. & Mignot, J.P. (1987).** Précis de Protistologie. Fondation Singer-Polignac, *Société nouvelle des éditions Boubée*, Paris, pp 581.
- Dukes, P., Kaukas, A., Hudson, K.M., Asonganyi, T. & Gashumba, J.K. (1989).** A new method for isolating *Trypanosoma brucei gambiense* from sleeping sickness patients. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83, 636-639.

- Duteurtre, J.P., Noireau, F. & Frézil, J.L. (1986). Trypanosomoses africaines. *Encycl. Méd. Chir. (Paris, France), Thérapeutique*, 25070 A¹⁰, 3, pp 6.
- Fairlamb, A.H., Weislogel, P.O., Hoeijmakers, J.H.J. & Borst, P. (1978). *J. Cell Biol.* 76, 293-309.
- Felsenstein, J. (1978). The number of evolutionary trees. *System. Zool.*, 27, 27-33.
- Gentilini, M., Duflo, B., Lagardère, B., Danis, M. & Richard-Lenoble, D. (1982). Trypanosomiasis humaines - Médecine tropicale. *Flammarion et Cie* eds, Paris, pp 682..
- Gibson, W.C. (1986). Will the real *Trypanosoma b. gambiense* please stand up ? *Parasitol. Today* 2, 255-257.
- Gibson, W.C. (1989). Analysis of a genetic cross between *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitology* 99, 391-402.
- Gibson, W.C. (1990). Trypanosome diversity in Lambwe Valley, Kenya - Sex or selection. *Parasitol. Today* 6, 342-343.
- Gibson, W.C. & Borst, P. (1986). Size-fractionation of the small chromosomes of *Trypanozoon* and *Nannomonas* trypanosomes by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18, 127-140.
- Gibson, W.C., Borst, P. & Fase-Fowler, F. (1985). Further analysis of intraspecific variation in *Trypanosoma brucei* using restriction site polymorphisms in the maxi-circle of kinetoplast DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 15, 21-36.
- Gibson, W. & Garside, L. (1990). Kinetoplast DNA minicircles are inherited from both parents in genetic hybrids of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42, 45-54.
- Gibson, W. & Garside, L. (1991). Genetic exchange in *Trypanosoma brucei brucei*: variable chromosomal location of housekeeping genes in different trypanosome stocks. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45, 77-90.
- Gibson, W.C., Marshall, T.F. & Godfrey, D.G. (1980). Numerical analysis of enzyme polymorphism: a new approach to the epidemiology and taxonomy of trypanosomes of the subgenus *Trypanozoon*. *Adv. Parasitol.* 18, 175-246.
- Gibson, W.C., Osinga, K.A., Michaels, P.A.M. & Borst, P. (1985). Trypanosomes of the sub-genus *Trypanozoon* are diploid for housekeeping genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 231-242.
- Gibson, W.C. & Wellde, B.T. (1985). Characterization of *Trypanozoon* stocks from the South Nyanza sleeping sickness focus in Western Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 671-676.
- Gibson, W.C., Wilson, A.J. & Moloo, S.K. (1983). Characterisation of *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* from camels in Kenya using isoenzyme electrophoresis. *Res. Vet. Sci.* 34, 114-118.

- Godfrey, D.G., Baker, R.D., Rickman, L.R. & Mehlitz, D. (1990).** The distribution, relationships and identification of enzymic variants within the subgenus *Trypanozoon*. *Adv. Parasitol.* 29, 1-74.
- Godfrey, D.G. & Kilgour, V. (1976).** Enzyme electrophoresis in characterizing the causative organism of Gambian trypanosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70, 219-224.
- Godfrey, D.G., Scott, C.M., Gibson, W.C., Mehlitz, D. & Zillmann, U. (1987).** Enzyme polymorphism and the identity of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Parasitology*, 94, 337-347.
- Gottesdiener, K., Garcia-Anoveros, J., Gwo-Shu Lee, M. & Van der Ploeg, L.H.T. (1990).** Chromosome organization of the protozoan *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 6079-6083.
- Harris, H. & Hopkinson, D.A. (1976).** Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. *North-Holland Publishing Co.*, Amsterdam.
- Hide, G. (1988).** Variation in repetitive DNA in African trypanosomes. PhD thesis, University of Glasgow, Glasgow, pp 264.
- Hide, G., Cattand, P., Le Ray, D., Barry, J.D. & Tait, A. (1990).** The identification of *Trypanosoma brucei* subspecies using repetitive DNA sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39, 213-226.
- Hoare, C.A. (1972).** The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. *Blackwell Scientific Publications* (ed.), Oxford and Edinburgh, pp 749.
- Jaccard, P. (1908).** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44, 223-270.
- Jenni, L., Marti, J., Schweizer, J., Betschart, B., Le Page, R.W.F., Wells, J.M., Tait, A., Painsavoine, P., Pays, E. & Steinert, M. (1986).** Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature* 322, 173-175.
- Jess, W., Palm, P., Evers, R., Köck, J. & Cornelissen, A.W.C.A. (1990).** Phylogenetic analysis of the RNA polymerases of *Trypanosoma brucei*, with special reference to class-specific transcription. *Curr. Genet.* 18, 547-551.
- 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. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 242-245.
- Kidane, G., Hughes, D. & Simpson, L. (1984).** Sequence heterogeneity and anomalous electrophoretic mobility of kinetoplast minicircle DNA in *Leishmania tarentolae*. *Gene* 27, 265-277.
- Kilgour, V. (1980).** The electrophoretic mobilities and activities of eleven enzymes of bloodstream and culture forms of *Trypanosoma brucei* compared. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 51-62.
- Kimmel, B.E., Ole-Moiyol, O.K. & Young, J.R. (1987).** Ingi, a 5.2-kb dispersed sequence element from *Trypanosoma brucei* that carries half of a smaller mobile element at either end and has homology with mammalian lines. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1465-1475.

- Kooy, R.F.** (1991). Cellular differentiation and genetic aspects of the trypanosome life cycle. PhD thesis, University of Amsterdam, Amsterdam, pp 115.
- Kooy, R.F., Hirumi, H., Moloo, S.K., Nantulya, V.M., Dukes, P., Van Der Linden, P.M., Duijndam, W.A.L., Janse, C.J.K. & Overdulve, J.P.** (1989). Evidence for diploidy in metacyclic forms of African trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 5469-5472.
- Kreutzer, R.D. & Christensen, H.A.** (1980). Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 199-208.
- Kreutzer, R.D. & Sousa, O.E.** (1981). Biochemical characterization of *Trypanosoma* spp. by isozyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 308-317.
- Kreutzer, R.D., Semko, M.E. & Hendricks, L.D.** (1983). Identification of *Leishmania* spp. by multiple isozyme analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 703-715.
- Kuzoe, F.A.S.** (1991). Perspectives in research on and control of African trypanosomiasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 85, 33-41.
- Lanham, S.M. & Godfrey, D.G.** (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Expt. Parasitol.* 28, 521-534.
- Lanham, S.M., Grendon, J.M., Miles, M.A., Pova, M.M. & De Souza, A.A.** (1981). A comparison of electrophoretic methods for isoenzyme characterization of trypanosomatids. I: Standard stocks of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from northeast Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 742-750.
- Lanotte, G., Rioux, J.A. & Serres, E.** (1986). Approche cladistique du genre *Leishmania* Ross, 1903. A propos de 192 souches originaires de l'Ancien Monde. In: *Leishmania. Taxonomie et phylogenèse* (Rioux, J.A., ed.). IMEEE, Montpellier, 269-288.
- Lester, H.M.O.** (1933). The characteristics of some Nigerian strains of the polymorphic trypanosomes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 27, 361-395.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Hönigberg, B., Lom, J., Lynn, D., Loeblich, A.R., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, J., Vavra, J. & Wallace, F.G.** (1980). A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.*, 27, 37-58.
- Lewicka, K.** (1991). Etude de la variabilité génétique de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* en Guyane française. DEA Parasitologie, USTL- Montpellier II, Montpellier, pp 32.
- Macina, R., Sanchez, D., Gluschankof, D., Burrone, O. & Frasch, A.** (1986). sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21, 25-32.
- Magnus, E., Vervoort, T. & Van Merveinne, N.** (1978). A card agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 58, 169-176.
- Majiwa, P.A.O. & Otieno, L.H.** (1990). Recombinant DNA probes reveal simultaneous infection of tsetse flies with different trypanosome species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 40, 245-254.

- Mehlitz, D., Zillman, U., Scott, C.M. & Godfrey, D.G. (1982). Epidemiological studies on the animal reservoir of *gambiense* sleeping sickness. Part. III. Characterization of *Trypanozoon* stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Tropenmed. Parasitol.* 33, 113-118.
- Mihok, S., Otieno, L.H. & Darji, N. (1990). Population genetics of *Trypanosoma brucei* and the epidemiology of human sleeping sickness in the Lambwe Valley, Kenya. *Parasitology* 100, 219-233.
- Mort, M.A. & Wolf, H.G. (1986). The genetic structure of the large-lake *Daphnia* populations. *Evolution* 40, 756-766.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106, 283-292.
- Nei, M. (1975). Molecular population genetics and evolution. In: *Frontiers of biology*. Vol.40 (Neuberger, A. & Tatum, E.L., eds.) *North-Holland Publ. Co.*, Amsterdam, 288 p.
- 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. & Britton-Davidian, J. (1987). Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. *TEC et DOC* (Lavoisier), Paris, pp 217.
- Pays, E., Van Assel, S., Le Ray, D., Van Meirvenne, M., Mehlitz, D. & Steinert, M. (1984). Discrimination of the *Trypanosoma brucei gambiense* subspecies by molecular hybridization with specific cloned DNA probes. In: *New approaches to the identification of parasites and their vectors* (Newton, B.N. & Michal, F. eds), 217-223. Basel, *Tropical Diseases Research Series*, Schwabe and Co. AG.
- 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.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pralong, F., Bastien, P. & Perieres, J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65, 3, 111-125.
- Schweizer, J. & Jenni, J. (1991). Hybrid formation in the life cycle of *Trypanosoma (T.) brucei*: Detection of hybrid trypanosomes in a midgut-derived isolate. *Acta Trop.* 48, 319-321.
- Schweizer, J., Tait, A. & Jenni L. (1988). The timing and frequency of hybrid formation in African trypanosomes during cyclical transmission. *Parasitol. Res.* 75, 98-101.
- Scott, C.M., Frézil, J.L., Toudic, A. & Godfrey, D.G. (1983). The sheep as a potential reservoir of human trypanosomiasis in the Republic of the Congo. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 397-401.
- Selander, R.K., Musser, J.M., Caugant, D.A., Gilmour, M.N. & Whittam, T.S. (1987). Population genetics of pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis* 3, 1-7.

- Serres, E. & Roux, M. (1986).** Pratique de la classification automatique. L'exemple des *Leishmania*. In: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse (Rioux, J.A., ed.). IMEEE, Montpellier, 27-40.
- Shaw, C.R. & Prasad, R. (1969).** Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Genet.* 4, 297-320.
- Simpson, L. (1987).** The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa : genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 363-382.
- Simpson, L. (1990).** RNA Editing-A novel genetic phenomenon? *Science* 250, 512-513.
- Sneath, P.H.A. (1957).** Some thoughts on bacterial classification. *J. Gen. Microbiol.* 17, 184-200.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. (1973).** Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification. *W.H. Freeman and Company*, San Francisco (D. Kennedy & R.B. Park eds). pp 573.
- Sokal, R.R. & Sneath, P.H.A. (1963).** Principles of Numerical Taxonomy. *W.H. Freeman and Company*, San Francisco (D. Kennedy & R.B. Park eds). pp 359.
- Sternberg, J. & Tait, A. (1990).** Genetic exchange in African trypanosomes. *Trends Genet.* 6,10, 317-322.
- Sternberg, J., Tait, A., Haley, S., Wells, J.M., Le Page, R.W.F., Schweizer, J. & Jenni, L. (1988).** Gene exchange in African trypanosomes: characterisation of a new hybrid genotype. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 191-200.
- Sternberg, J., Turner, C.M.R., Wells, J.M., Ranford-Cartwright, L.C., Le Page, R.W.F. & Tait, A. (1989).** Gene exchange in African trypanosomes: frequency and allelic segregation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 269-280.
- Stevens, J.R., Lanham, S.M., Allingham, R. & Gashumba, J.K. (1991).** A simplified method for identifying subspecies and strain groups in *Trypanozoon* by isoenzymes. (sous presse).
- 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., Babiker, E.A. & Le Ray, D. (1984).** Enzyme variation in *T.brucei* ssp. I. Evidence for the sub-speciation of *T.b.gambiense*. *Parasitology* 89, 311-326.
- Tait, A., Barry, J.D., Wink, R., Sanderson, A. & Crowe, J.S. (1985).** Enzyme variation in *T.brucei* ssp. II. Evidence for *T.b.rhodesiense* being a set of variants of *T.b.brucei*. *Parasitology* 90, 89-100.
- Tait, A., Turner, C.M.R., Le Page, R.W.F. & Wells, J.M. (1989).** Genetic evidence that metacyclic forms of *Trypanosoma brucei* are diploid. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 247-256.
- Tait, A. & Turner, C.M.R. (1990).** Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today* 6, 70-75.

- Tibayrenc, M. (1979).** Les isoenzymes et l'entomologie médicale. *Cah. ORSTOM sér. Ent. méd. Parasitol.* 17 (4), 249-256.
- Tibayrenc, M. (1980).** Application of the calculations of genetic distances for Flagellate Systematics. *Cah. ORSTOM sér. Ent. méd. Parasitol.* 18 (3), 301-302.
- Tibayrenc, M. & Ayala, F.J. (1987).** Forte corrélation entre classification isoenzymatique et variabilité de l'ADN kinétoplastique chez *Trypanosoma cruzi*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 304, 89-93.
- Tibayrenc, M. & Ayala, F.J. (1991).** Towards a population genetics of microorganisms : the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol. Today* 7, 228-232.
- Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Solignac, M., Dedet, J.P., Poch, O. & Desjeux, P. (1985).** New electrophoretic evidence of genetic variation and diploidy in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. *Genetica* 67, 223-230.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F. & Ayala, F.J. (1990).** A clonal theory of parasitic protozoa : The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2414-2418.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Brenière, S.F., Dardé, M.L. & Ayala, F. (1991).** Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5129-5133.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A. & Ayala, F.J. (1986).** Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 115-119.
- Truc, P. (1991).** Apport de la génétique des populations à la taxonomie de *Trypanosoma brucei* et à l'épidémiologie de la trypanosomiase humaine en Afrique centrale. Thèse de Doctorat, USTL- Montpellier II, Montpellier, pp 131.
- 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.
- Turner, C.M.R., Sternberg, J., Buchanan, N., Smith, E., Hide, G. & Tait, A. (1990).** Evidence that the mechanism of gene exchange in *Trypanosoma brucei* involves meiosis and syngamy. *Parasitology* 101, 377-386.
- Van der Ploeg, L.H.T., Cornelissen A.W.C.A., Barry, J.D. & Borst, P. (1984).** Chromosomes of *Kinetoplastida*. *EMBO J.* 3, 3109-3115.
- Veas, F., Cuny, G., Breniere, S.F. & Tibayrenc, M. (1991).** Subspecific kDNA probes for major clones of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 48, 79-82.
- Vickerman, K. (1985).** Development cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br. Med. Bull.* 41, 105-114.
- Vickerman, K. & Luckins A.G. (1969).** Localization of variable antigens in the surface coat of *Trypanosoma brucei* using ferritin-conjugate antibody. *Nature* 224, 1126-1126.

Wagner, W.H. (1961). Problems in the classification of ferns. In: Recent advances in botany. University Toronto Press, Montréal. 841-844.

Wells, J.M., Prospero, T.D., Jenni, L. & Le Page, R.W.F. (1987). DNA contents and molecular karyotypes of hybrid *T.brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24, 103-116.

Wéry, M., Weyn, J., Ngimbi Nkuku, M. & Colaert, J. (1977). Isolement de souches de *Trypanosoma gambiense* au Zaïre et leur adaptation aux animaux de laboratoire. *Ann. Soc. belge Méd. Trop.* 57, 425-437.

Wijers, D.J.B. (1960). Studies on the behaviour of trypanosomes, belonging to the *brucei* sub-group, in the mammalian host. PhD thesis, University of Amsterdam, Amsterdam.

World Health Organization (1986). Epidemiology and control of African trypanosomiasis. Report of a W.H.O. Expert Committee, *Technical Report Series 739*, Geneva, pp 127.

ANNEXES

Annexe 1

Préparation des microtubes d'amplification

- Tampon <i>Taq</i> :	- 670 mM Tris-HCl pH 8.8	5 μ l
	- 166 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
	- 67 mM MgCl_2	
	-100 mM β -Mercaptoéthanol	
- BSA (1 mg/ml)		0.5 μ l
- dXTP (50 pmoles/ μ l)		6 μ l
- oligonucléotide n°1 (45 pmoles/ μ l)		1.7 μ l
- oligonucléotide n°2 (58 pmoles/ μ l)		1.3 μ l
- H_2O		24.5 μ l *

- <i>Taq</i> DNA polymérase (2.5 UI/ μ l)		1 μ l
- échantillon parasite		10 μ l **

* Ce mélange, recouvert de 50 μ l de paraffine pour éviter toute évaporation, est conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

** Ajoutés au dernier moment.

Gel d'agarose et protocole de transfert sur membrane

- | | |
|---|------------|
| - Tampon TAE (40 mM Tris-Acetate/1 mM EDTA) | 120 ml |
| - Agarose | 0.96 g |
| - Bromure d'ethidium (solution à 10 mg/ml) | 10 μ l |
| - Migration à 100 V durant 30 à 40 mn. | |
- Découper le gel sous UV
 - Rincer sous agitation 2 fois 15 mn dans NaOH 0.5 M / NaCl 1.5 M.
 - Placer le gel sur:
 - la membrane nylon (pré-imbibée)
 - du papier Whatman 3 mm
 - 3 épaisseurs d'ouate
 - une plaque de verre
 - Mettre le tout dans une pochette en plastique, sous-vide.
 - Laisser 1 à 2 heures.
 - Rincer la membrane sous agitation 2 fois 5 mn dans le tampon SSPE x 2 *.
 - Laisser sécher la membrane.

* SSPE x 20 = NaCl 3 M - NaH_2PO_4 0.2 M - EDTA 0.02 M pH 7.4

Annexe 2

Protocole de digestion par la GELase™ (Epicentre Technologies Corporation, Madison, USA)

- Peser le microtube contenant les bandes de gel découpées, afin de déterminer le poids d'agarose.
- Placer le tube au bain-marie à 65-70°C jusqu'à la fonte complète.
- Incuber à 40°C pendant 5 mn.
- Ajouter la GELase: 1 UI/100 mg d'agarose, et laisser 1 h à 40°C.
- Ajouter 2.5 volumes d'éthanol absolu et placer au congélateur (environ 15 mn /100 µl de solution).
- Centrifuger 15 mn et éliminer le surnageant.
- Rincer avec le même volume d'éthanol 80% et centrifuger 5 mn.
- Sécher au speed-vac et resuspendre dans 100 µl d'H₂O.

Protocole de digestion et précipitation de l'ADN

- Ajouter l'enzyme de restriction *Msp* I (0.6 UI/µg d'ADN) et laisser 2 heures à 37°C.
- Précipiter au Chlorure de Lithium 4 M (1/10 vol.) et éthanol absolu (2.5 vol.), 1/2 heure à -70°C..
- Centrifuger, rincer dans l'éthanol 80% et sécher au speed-vac.
- Resuspendre l'ADN dans un volume de 50 à 100 µl d'H₂O.

Annexe 3

Hybridation des membranes et Marquage de la sonde (ECL gene detection system, Amersham[®], UK)

1- Préhybridation :

- Disposer la membranes dans le tube, ajouter le tampon d'hybridation (0.25 ml / cm² de membrane) et mettre au four rotatif 15 mn à 42°C.

2- Marquage :

- Préparer une dilution de l'ADN de façon à marquer un volume de 20 µl (la quantité de sonde utilisée est 20 ng/ml de tampon d'hybridation).
- Prélever dans un microtube 20 µl d'ADN et dénaturer dans un bain porté à ébullition durant 5 mn.
- Placer sur de la glace fondue 5 mn.
- Ajouter le réactif marqueur à la peroxydase (vol/vol) et mélanger.
- Ajouter la glutaraldéhyde (vol/vol) et mélanger.
- Placer au bain- marie 10 mn à 37°C.

3- Hybridation :

- Prélever du tube contenant la membrane un peu de tampon d'hybridation, y ajouter la sonde marquée et verser l'ensemble dans le tube.
- Placer au four rotatif à 42°C. Laisser toute la nuit.

Annexe 4

Protocole de révélation des hybridations (ECL gene detection system, Amersham[®], UK)

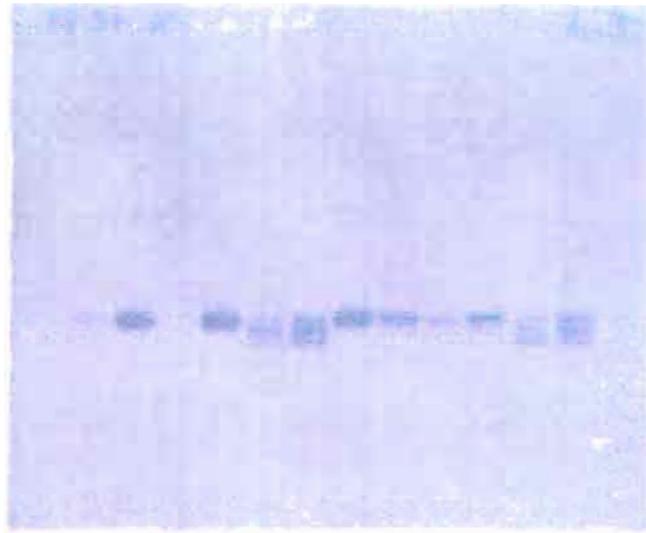
- Rincer les membranes dans le tampon Urée * dans le four rotatif à 42°C, 2 fois 20 mn.
- Rincer dans le tampon SSC x 2 à température ambiante 2 fois 10 mn.
- Préparer dans la chambre noire le réactif au luminol.
- Egoutter la membrane sur du papier Wathman, déposer le réactif sur la face supérieure et laisser 1 mn.
- Absorber délicatement le réactif avec du papier Wathman, déposer la membrane face supérieure vers le haut dans une cassette de type auto-radiographie, sur du papier Saran.
- Recouvrir la membrane de papier Saran, déposer un film et fermer la cassette.
- Laisser exposer 5 mn.
- Sortir et révéler le film (révélateur, eau, fixateur).
- Placer un nouveau film sur la membrane pour une exposition plus longue si nécessaire (15 mn).

* Tampon Urée : Urée 6 M - SDS 0.1% - SSC x 0.1

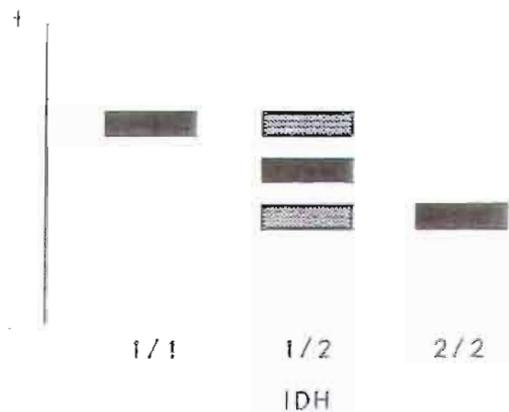
** Tampon SSC x 20 = Na₃ Citrate 0.3 M - NaCl 3 M pH 7.0

Annexe 5

Zymogrammes obtenus pour l'isocitrate déshydrogénase :
IDH.

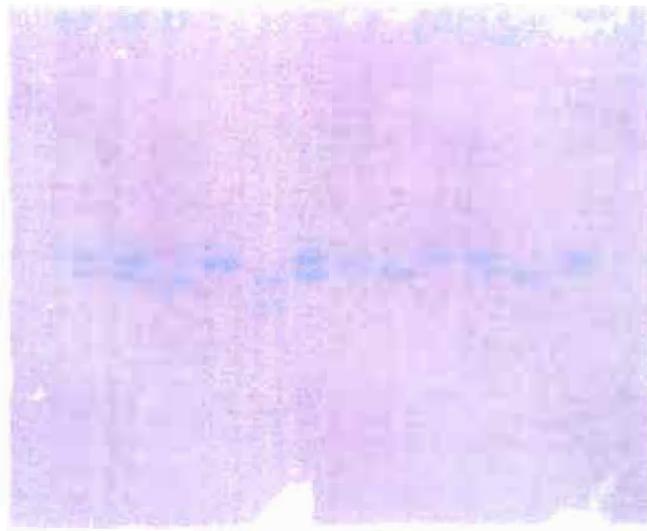


L'échantillon n 11 est un mélange de stocks, l'un présentant le profil hétérozygote 1/2 et l'autre le profil homozygote 2/2.

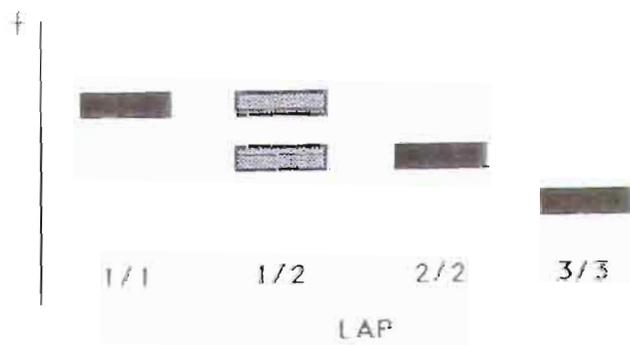


Annexe 6

Zymogrammes obtenus pour la leucine aminopeptidase :
LAP.

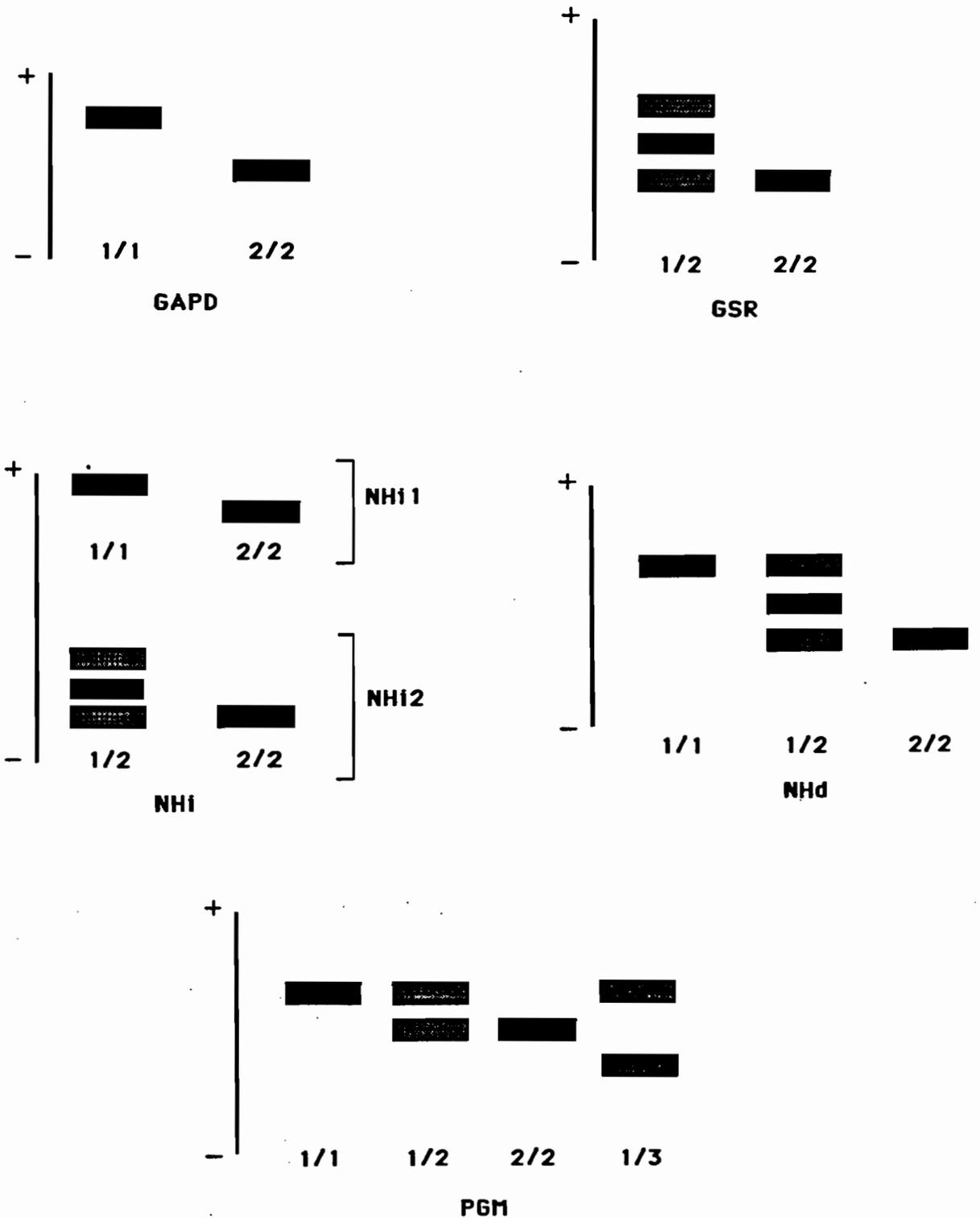


L'échantillon n° 5 est un mélange de stocks, l'un présentant le profil homozygote 2/2 et l'autre le profil homozygote 3/3



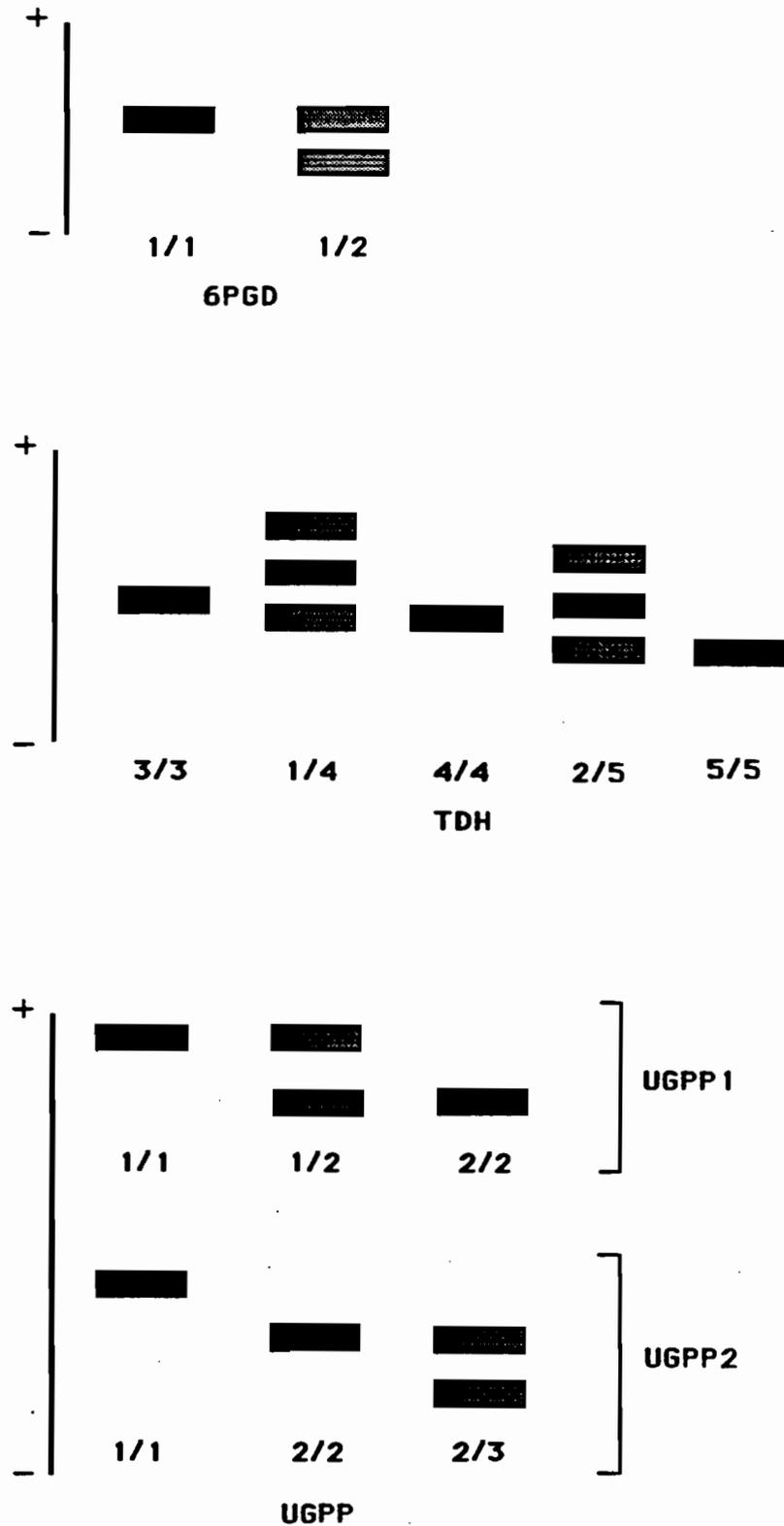
Annexe 8

**Zymogrammes obtenus pour la glycéraldéhyde 3-phosphate
déshydrogénase, la glutathione réductase, les nucléoside
hydrolases et la phosphoglucomutase :
GAPD, GSR, NHi, NHd et PGM.**



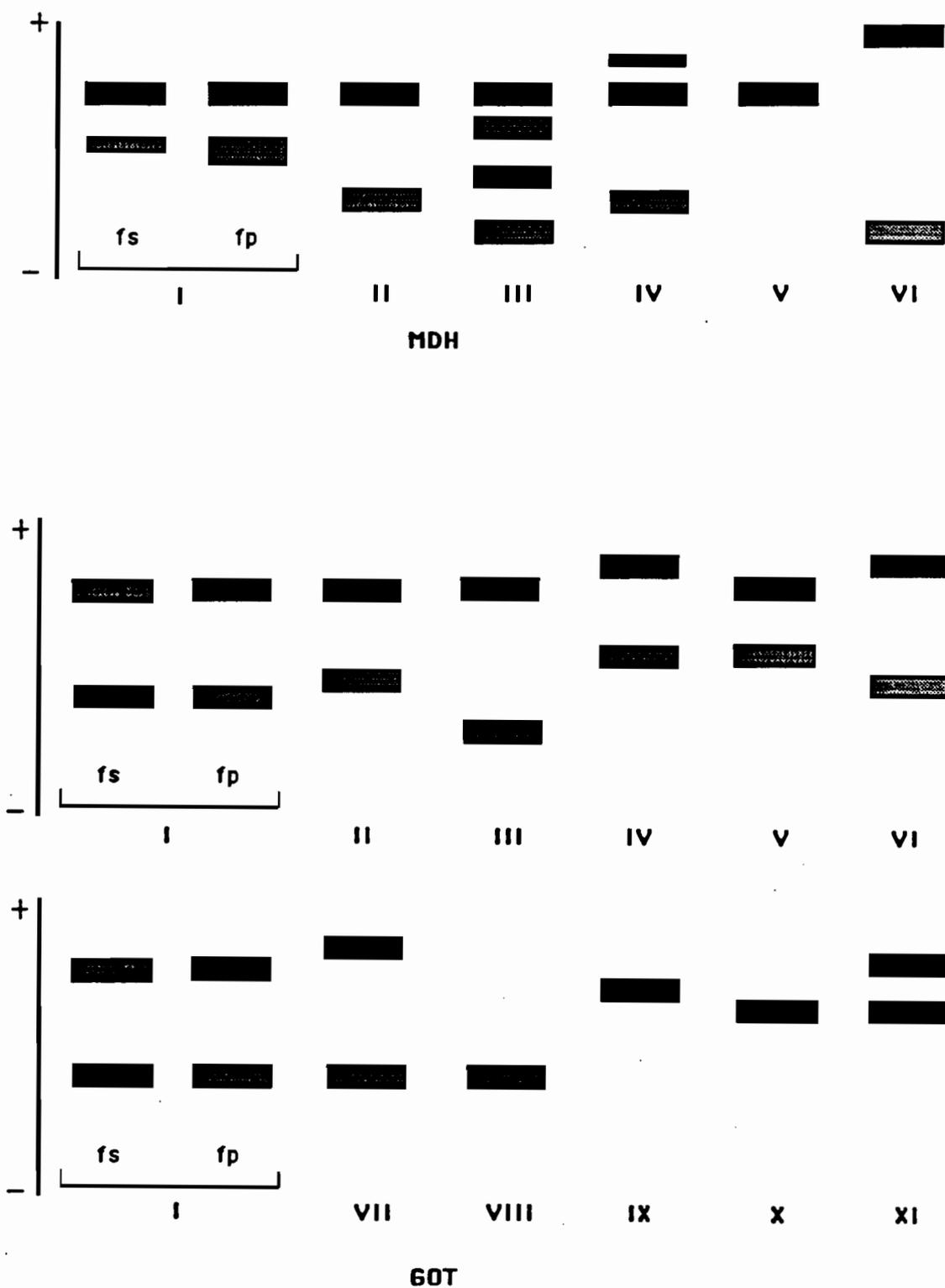
Annexe 9

Zymogrammes obtenus pour la thréonine déshydrogénase, l'uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase et la 6-phosphogluconate déshydrogénase : TDH, UGPP et 6PGD.



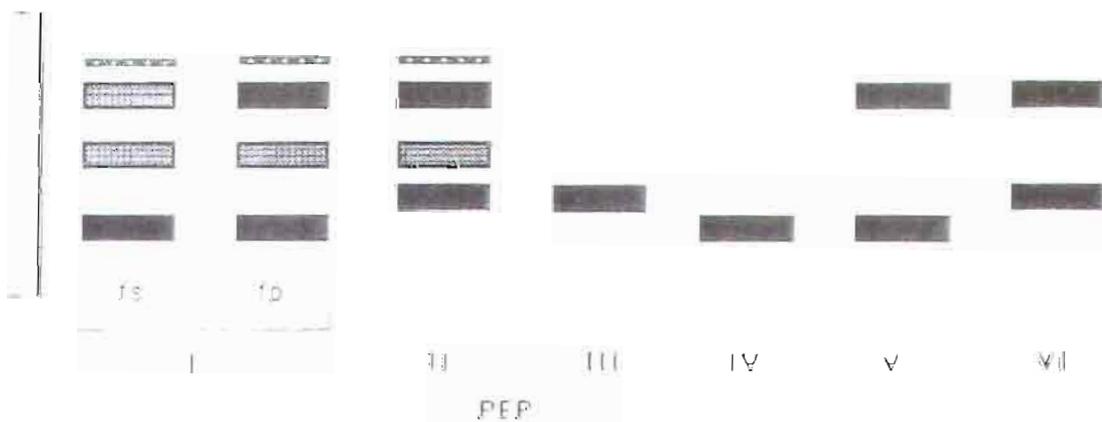
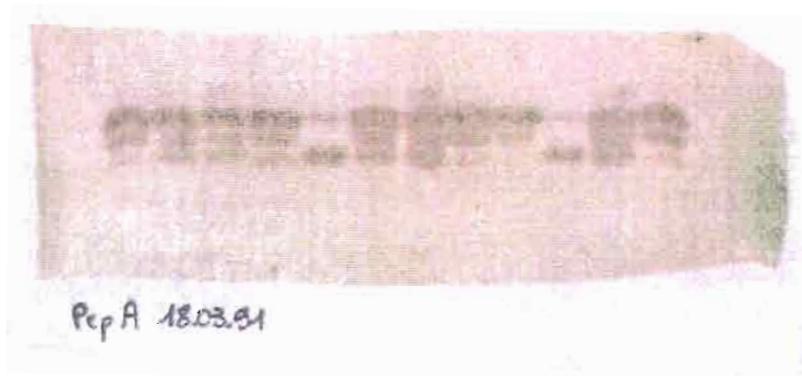
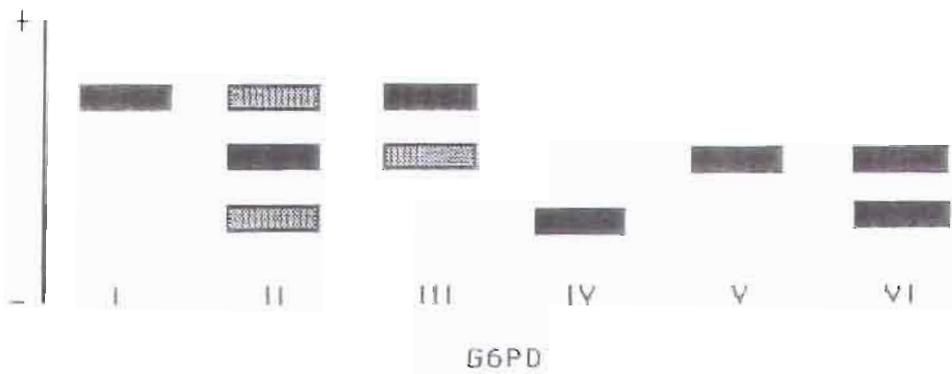
Annexe 10

**Zymogrammes obtenus pour la glutamate oxaloacétate
transaminase et la malate déshydrogénase : GOT et MDH.**
(fs = forme sanguine ; fp = forme procyclique)



Annexe 11

Zymogrammes obtenus pour la glucose 6-phosphate
déshydrogénase et la peptidase : G6PD et PEP.
(fs = forme sanguine ; fp = forme procyclique)



Annexe 12

Matrice de distances de Nei entre les 41 zymodèmes caractérisés par l'étude sur 14 loci polymorphes interprétés de façon allélique.

CODE	ZYMODEMES	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM	AN	AO	AP										
A	1-2																																																			
B	14-15-16-17	0,1																																																		
C	6-7-8-9-10	0,03	0,05																																																	
D	22-23	0,05	0,11	0,09																																																
E	27-28-29-30	0,11	0,17	0,14	0,05																																															
F	33	0,07	0,19	0,11	0,21	0,29																																														
G	49	0,15	0,27	0,19	0,31	0,37	0,04																																													
H	57	0,44	0,71	0,59	0,49	0,46	0,44	0,34																																												
I	50	0,21	0,34	0,25	0,37	0,44	0,05	0,02	0,41																																											
J	43-44	0,21	0,11	0,17	0,23	0,29	0,31	0,41	0,82	0,48																																										
K	34	0,04	0,19	0,11	0,13	0,19	0,04	0,11	0,44	0,13	0,31																																									
L	53	0,4	0,57	0,56	0,42	0,44	0,4	0,52	0,73	0,48	0,67	0,3																																								
M	52	0,29	0,35	0,31	0,39	0,31	0,11	0,11	0,48	0,09	0,49	0,18	0,44																																							
N	12	0,07	0,1	0,03	0,13	0,19	0,15	0,24	0,69	0,31	0,21	0,15	0,52	0,37																																						
O	58	0,39	0,64	0,53	0,43	0,46	0,39	0,29	0,13	0,35	0,61	0,36	0,73	0,46	0,62																																					
P	54	0,34	0,48	0,48	0,35	0,37	0,34	0,44	0,5	0,41	0,58	0,24	0,12	0,37	0,56	0,66																																				
Q	45-46	0,15	0,1	0,11	0,17	0,23	0,24	0,34	0,73	0,41	0,02	0,24	0,66	0,42	0,15	0,53	0,56																																			
R	35	0,07	0,16	0,11	0,19	0,19	0,04	0,07	0,39	0,13	0,28	0,07	0,46	0,11	0,15	0,36	0,39	0,22																																		
S	36	0,04	0,1	0,03	0,13	0,19	0,04	0,07	0,44	0,13	0,21	0,07	0,52	0,19	0,07	0,36	0,44	0,15	0,04																																	
T	24-25	0,03	0,13	0,07	0,02	0,07	0,19	0,28	0,46	0,34	0,25	0,11	0,44	0,41	0,11	0,42	0,37	0,19	0,19	0,11																																
U	46	0,17	0,24	0,17	0,19	0,25	0,21	0,31	0,79	0,28	0,37	0,17	0,46	0,34	0,21	0,71	0,41	0,31	0,31	0,21	0,17																															
V	3-4	0,02	0,07	0,02	0,04	0,09	0,13	0,21	0,52	0,29	0,19	0,08	0,46	0,34	0,05	0,46	0,41	0,13	0,13	0,05	0,02	0,15																														
W	56	0,5	0,79	0,66	0,55	0,53	0,5	0,39	0,04	0,46	0,75	0,5	0,81	0,53	0,77	0,09	0,56	0,66	0,44	0,5	0,53	0,66	0,58																													
X	42	0,21	0,11	0,17	0,23	0,29	0,31	0,41	0,82	0,46	0,07	0,31	0,67	0,49	0,21	0,66	0,59	0,09	0,29	0,21	0,25	0,37	0,19	0,82																												
Y	31	0,05	0,13	0,09	0,02	0,02	0,21	0,31	0,46	0,37	0,25	0,13	0,42	0,34	0,13	0,43	0,35	0,19	0,17	0,13	0,02	0,19	0,04	0,52	0,25																											
AA	40	0,11	0,26	0,22	0,13	0,07	0,19	0,29	0,37	0,34	0,39	0,11	0,33	0,22	0,29	0,37	0,29	0,32	0,11	0,19	0,14	0,34	0,17	0,42	0,39	0,09																										
AB	47	0,13	0,11	0,09	0,15	0,21	0,21	0,31	0,68	0,37	0,07	0,21	0,87	0,39	0,13	0,49	0,58	0,02	0,19	0,13	0,17	0,29	0,11	0,81	0,15	0,17	0,29																									
AC	32	0,09	0,11	0,09	0,07	0,02	0,21	0,31	0,52	0,37	0,23	0,17	0,46	0,25	0,13	0,52	0,41	0,17	0,13	0,13	0,09	0,23	0,07	0,58	0,23	0,04	0,09	0,15																								
AD	41	0,15	0,1	0,11	0,17	0,23	0,24	0,34	0,73	0,41	0,09	0,24	0,66	0,42	0,15	0,59	0,56	0,07	0,22	0,15	0,19	0,31	0,13	0,73	0,02	0,19	0,32	0,09	0,17																							
AE	51	0,14	0,3	0,21	0,24	0,3	0,09	0,02	0,27	0,04	0,44	0,1	0,44	0,13	0,27	0,22	0,37	0,37	0,1	0,1	0,21	0,29	0,2	0,32	0,44	0,24	0,21	0,34	0,29	0,37																						
AF	39	0,04	0,19	0,11	0,05	0,11	0,15	0,24	0,39	0,31	0,07	0,35	0,37	0,15	0,39	0,29	0,24	0,15	0,11	0,03	0,21	0,05	0,44	0,31	0,05	0,11	0,21	0,13	0,24	0,18																						
AG	39	0,04	0,16	0,09	0,11	0,17	0,1	0,18	0,42	0,24	0,29	0,08	0,39	0,3	0,14	0,42	0,32	0,22	0,1	0,06	0,09	0,24	0,07	0,48	0,29	0,11	0,13	0,2	0,15	0,22	0,16	0,04																				
AH	37	0,06	0,18	0,13	0,13	0,17	0,06	0,1	0,34	0,15	0,31	0,06	0,39	0,17	0,19	0,29	0,32	0,25	0,04	0,09	0,13	0,29	0,11	0,4	0,31	0,13	0,09	0,22	0,15	0,25	0,06	0,1	0,06																			
AI	5	0,02	0,07	0,02	0,11	0,17	0,05	0,13	0,52	0,19	0,19	0,05	0,48	0,25	0,05	0,46	0,41	0,13	0,05	0,02	0,09	0,19	0,04	0,58	0,19	0,11	0,17	0,11	0,11																							

Annexe 14

Noms latins et noms vernaculaires des différents hôtes dont ont été isolés les stocks de *Trypanosoma brucei* et *Trypanosoma evansi* présentés dans le tableau 1. (les quatre premières lettres du code OMS concernent l'hôte d'isolement).

Code OMS	Nom latin	Nom vernaculaire
GMOS	<i>Glossina morsitans submorsitans</i>	Glossine
GPAL	<i>Glossina pallidipes</i>	Glossine
GPAP	<i>Glossina palpalis palpalis</i>	Glossine
MALC	<i>Alcelaphus buselaphus</i>	Bubale
MBOI	<i>Bos indicus</i>	Zébu
MBOT	<i>Bos taurus</i>	Boeuf domestique
MCAM	<i>Camelus dromadarius</i>	Chameau
MCAP	<i>Capra</i>	Chèvre domestique
MHOM	<i>Homo sapiens</i>	Homme
MHYD	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>	Ragondin
MKOK	<i>Kobus kob</i>	Kob de Buffon
MOVS	<i>Ovis</i>	Mouton domestique
MPAN	<i>Panthera leo</i>	Lion
MSUS	<i>Sus</i>	Porc domestique
MTRG	<i>Tragelaphus scriptus</i>	Guib harnaché