ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II

---- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC ----

THESE

présentée à l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

SPECIALITE : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET DES ORGANISMES

Formation Doctorale : Biologie de l'Evolution et Ecologie

Ecole Doctorale : Biologie des Systèmes Intégrés, Agronomie, Environnement

ETUDE DES RELATIONS PARASITES-HÔTES DANS L'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DES TRYPANOSOMOSES BOVINES AU BURKINA FASO

par

Jean-Marc REIFENBERG

ORSTOM
CENTRE DE DOCUMENTATION
Montpellier

Soutenue le 6 décembre 1996 **devant le Jury composé de :**

M. THALER Louis, Professeur, Université Montpellier II,	Président du jury
Mme GRILLOT Renée, Professeur, Faculté de pharmacie de Grenoble,	Rapporteur
M. FREZIL J. Louis, Directeur de Recherche, ORTOM-DES, Montpellier,	Examinateur
M. DUVALLET Gérard, Professeur, CIRAD-EMVT, Montpellier,	Directeur de Thèse
M. COMBES Claude, Professeur, Université de Perpignan,	Rapporteur

17 AVR. 1997

F

ORSTOM Documentation
010053137

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration CIRAD-ORSTOM sur les nombreux aspects communs aux trypanosomoses d'intérêt médical et vétérinaire. Je tiens à remercier le Directeur et la Direction Scientifique du Département d'Elevage et de Médecine Vétérinaire du CIRAD (P. C. Lefèvre et D. Richard), ainsi que tous les services administratifs et financiers, pour le financement de ce travail et pour avoir contribué efficacement au bon déroulement de cette thèse, la Direction du Département Santé de l'ORSTOM (C. Bellec, J. L. Frézil) pour m'avoir accueilli et mis à ma disposition les moyens nécessaires, en terme de compétences et de matériel, pour mener dans les meilleures conditions mon travail de laboratoire, et la Direction du CIRDES (S. M. Touré) pour son accueil chaleureux et les facilités accordées pour réaliser les missions sur le terrain.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Louis Thaler, Professeur à l'Université Montpellier 1, qui honore mon jury de sa présence, et qui m'a accordé sa confiance dès mon entrée dans l'école doctorale qu'il préside et tout au long de mon cursus universitaire montpelliérain.

Je suis également très honoré de la participation en la qualité de rapporteur à mon jury de thèse de Monsieur C. Combes, Professeur à l'Université de Perpignan, et Madame R. Grillot, Professeur à l'Université de Grenoble. Je tiens à leur adresser ma profonde reconnaissance pour les conseils, l'appui, et la disponibilité qu'ils m'ont accordé pour l'évaluation de mon travail.

Je remercie également :

Gérard Duvallet, que je côtoie depuis 1991, date à partir de laquelle j'ai appris à connaître les trypanosomes alors que je foulais le sol africain de mes premiers pas. Je tiens à vous remercier infiniment de votre disponibilité et votre pédagogie au cours de cette phase d'initiation dans ce domaine qui m'était à l'époque totalement inconnu, et pour avoir régulièrement jalonné de conseils judicieux mon parcours de chercheur novice, grâce auxquels j'ai pu progresser efficacement dans mon travail,

Dominique Cuisance, dont la passion communicative pour les glossines, et pour l'Afrique en général, s'est avérée extrêmement bénéfique pour mon travail. Je suis particulièrement fier d'avoir été l'élève d'un des grands spécialistes des trypanosomoses animales et des vecteurs en particuliers. J'ai notamment beaucoup apprécié votre rigueur scientifique, et j'ai été particulièrement sensible à

votre droiture et votre humilité. Merci pour votre soutien fidèle, en toute sincérité, et merci également au nom de tous les étudiants pour lesquels vous vous investissez considérablement,

Gérard Cuny, pour avoir mis à ma disposition tes grandes compétences et le laboratoire que tu diriges, et pour m'avoir épaulé avec beaucoup de professionnalisme et de sympathie dans l'analyse moléculaire des échantillons,

Jean-Louis Frezil, pour votre soutien permanent. Votre expérience africaine de la trypanosomose humaine m'a été d'une grande utilité dans le sens où la vision médicale de ce fléau m'a permis d'élargir mon champ de connaissances nécessaire pour une meilleure compréhension du problème. Pour cela et votre grande convivialité, je tiens à vous exprimer ma très profonde gratitude,

Philippe Solano, pour avoir contribué avec beaucoup d'efficacité à l'avancement et la valorisation des travaux sur l'application de la PCR sur le terrain. Nos chemins parallèles ont quelque peu divergé récemment depuis que tu as décidé de t'intéresser plus finement aux populations de glossines grâce aux marqueurs microsatellites. Tes premiers résultats sont prometteurs et je te le souhaite sincèrement toute la réussite que tu mérites,

Frédérique Garulli qui m'a été d'un grand secours lorsque j'ai eu besoin de compétences informatiques, une collaboration qui s'est transformée en une franche amitié que j'apprécie du fond du coeur, comme tu le sais,

Bernadette Tchikaya et tout le personnel de l'insectarium et de l'animalerie, qui ont contribué toujours avec beaucoup de gentillesse et d'efficacité au bon déroulement de mes expériences au laboratoire,

Michel Tibayrenc et Christian Barnabé, pour m'avoir aimablement alloué un emplacement dans la cryothèque du Laboratoire de Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs de l'ORSTOM, afin que je puisse disposer librement des souches de trypanosomes nécessaires à mes études expérimentales,

Adama Diallo et son équipe de Patho-Trop, E.M.V.T., pour m'avoir gracieusement approvisionné en amorces pour la PCR,

Phélix Majiwa et Marie Maina, que j'ai côtoyé en début de thèse au cours de mon séjour à l'ILRI au Kenya, dans la phase de mise au point des techniques moléculaires,

Saydil M. Touré, Directeur Général du CIRDES, éminent expert des trypanosomoses, pour m'avoir permis de travailler au CIRDES dans des conditions toujours excellentes,

Burckhardt Bauer, Idrissa Kabore, Sandrine Amsler-Delafosse, Joanny Simpore, ainsi que tous les autres membres des équipes d'Epidémiologie et de Lutte Antivectorielle du CIRDES au Burkina Faso, avec qui j'ai étroitement travaillé au cours de mes différentes missions sur le terrain, Je tiens à faire particulièrement honneur à la grande conviviabilité de ces équipes liée à un grand professionnalisme qui m'a été extrêmement profitable et enrichissant,

Bernard Geoffroy, Francine Martin, Ibra Toure et Cécile Maraval pour leur précieuse collaboration dans les dernières étapes de la rédaction du mémoire,

François Renaud, Stéphane de la Rocque, Issa Sidibe, Valérie Dumas, Isabelle Morlais, Frank D'Amico, Véronique Verdier, ainsi que tous les autres collègues, étudiants, chercheurs, agents du personnel administratif des différents centres que je ne nomme pas, mais qui ont su donner au moment voulu un peu de leur temps et de leur personne pour m'aider et me conseiller.

Enfin, je remercie de tout coeur Daniel, ma famille et mes ami(e)s, qui tiennent une place immense dans mon coeur et à qui je dédie ce mémoire.

SOMMAIRE

	Page
AVANT PROPOS	7
RÉSUMÉ	9
SUMMARY	10
CHAPITRE I : INTRODUCTION	11
CHAPITRE II : PRÉSENTATION GÉNÉRALE	
1- Les vecteurs et les parasites	13
1-1. Les glossines	13
1-2. Les trypanosomes	14
1-3. Les différents cycles évolutifs	15
1-4. Les processus d'installation et de maturation des trypanosomes chez la glossine	16
1-5. La transmission mécanique	18
2- Le diagnostic des trypanosomoses	21
2-1. Méthodes parasitologiques	21
2-1-1. Hôte vertébré	21
2-1-2. Hôte invertébré	23
2-1-2-1. Insecte fraîchement tué	23
2-1-2-2. Insecte vivant	24
2-2. Méthodes immunologiques	24
2-2-1. Hôte vertébré	24
2-2-1-1. Tests de détection des anticorps	25
2-2-1-2. Tests de détection des antigènes	26
2-2-2. Hôte invertébré	26
2-3. Méthodes génétiques et moléculaires	26

2-3-1. Le sous-genre *Duttonella* 27
2-3-2. Le sous-genre *Trypanozoon* 27
2-3-3. Le sous-genre *Nannomonas* 28

2-4. Caractéristiques géographiques et écologiques des différents taxons de *T. congolense* 30

CHAPITRE III : CHOIX ET MISE AU POINT DES TECHNIQUES

1- Hybridation moléculaire 33

1-1. Préparation des échantillons 33
1-1-1. Techniques connues 33
1-1-2. Protocole retenu 33

1-2. Marquage des sondes 33
1-2-1. Intérêts du marquage "froid" 33
1-2-2. Kit utilisé 34

2- PCR 34

2-1. Préparation des échantillons 34
2-1-1. La glossine 34
2-1-1-1. Techniques de purification des intestins 34
2-1-1-2. Proboscis et glandes salivaires 35

2-1-2. L'hôte vertébré 37
2-1-2-1. Principales méthodes 37
2-1-2-2. Concentration des parasites dans le "buffy-coat" 37

2-2. Paramètres d'amplification 37

2-3. Evaluation expérimentale de l'application de la technique PCR sur le "buffy-coat" 38
2-3-1. Matériel 38
2-3-2. Méthodes 38
2-3-3. Résultats 40
2-3-3-1. Infections à *T. congolense* et *T. evansi* 40
2-3-3-2. Infections à *T. vivax* 40

2-3-4. Discussion 44

2-4. Evaluation expérimentale de l'application de la technique PCR sur le proboscis de glossines après repas interrompu sur animal infecté 44
2-4-1. But de l'expérience 45
2-4-2. Méthodologie 45
2-4-3. Résultats et discussion 45

CHAPITRE IV : INFECTIONS EXPÉRIMENTALES DES GLOSSINES

1- Matériel 47

1-1. Les clones de trypanosomes 47
1-2. Les glossines 47
1-3. Les marqueurs moléculaires 50
1-3-1. Les sondes 50
1-3-2. Les amorces 50

2- Méthodes 50

2-1. Infections expérimentales de glossines *in vivo* 50
2-1-1. Inoculation des parasites 50
2-1-2. Repas infectant des mouches 51
2-1-3. Repas d'entretien des mouches 51

2-2. Infections expérimentales de glossines *in vitro* 51
2-2-1. Production de formes sanguicoles 53
2-2-2. Repas infectant des mouches 53
2-2-3. Repas d'entretien des mouches 53

2-3. Dissection des glossines 53

2-4. Détection des trypanosomes par salivation de glossines infectées 54
2-4-1. Justification de l'étude 54
2-4-2. Sélection des glossines infectantes 56
2-4-3. Protocole du suivi individuel des individus infectants 56
2-4-4. Sélection des glossines non infectantes 56
2-4-5. Protocole du suivi individuel des individus apparemment non infectants 58

3- Résultats et discussion sur les dissections des glossines 58

3-1. Infections expérimentales de glossines par *T. congolense* type "savane" 58
3-1-1. Comparaison des taux d'infection entre espèces et sous-espèces 58
3-1-2. Comparaison des taux d'infection entre sexes 60
3-1-3. Comparaison des indices de Compétence Vectorielle Intrinsèque 60

3-2. Infections expérimentales de glossines par *T. congolense* type "forêt" 60
3-2-1. Comparaison des taux d'infection entre espèces et sous-espèces 61
3-2-2. Comparaison des taux d'infection entre sexes 61
3-2-3. Comparaison des indices de Compétence Vectorielle Intrinsèque 61

3-3. Infections expérimentales mixtes par *T. congolense* type "savane" et par *T. congolense* type "forêt" 63
3-3-1. Comparaison des taux d'infection entre espèces et sous-espèces 63
3-3-2. Comparaison des taux d'infection entre sexes 63
3-3-3. Comparaison des indices de Compétence Vectorielle Intrinsèque 63
3-3-4. Résultats par la technique PCR 63

3-4. Infections expérimentales mixtes par *T. congolense* type "savane" et par *T. vivax* type "Afrique de l'Ouest" 64
3-4-1. Comparaison des taux d'infection entre espèces et sous-espèces 64
3-4-2. Comparaison des taux d'infection entre sexes 64
3-4-3. Comparaison des indices de Compétence Vectorielle Intrinsèque 64
3-4-4. Résultats par la technique PCR 64

3-5. Analyse statistique globale des taux d'infection 65
3-5-1. Influence du facteur "clone de *T. congolense*" 65
3-5-2. Influence du facteur "espèce de glossine" 65
3-5-3. Influence du facteur "sexe" 65
3-5-4. Influence du mode d'infection 66

3-6. Discussion 66
3-6-1. Infections simples 66
3-6-2. Infections mixtes 69

4- Résultats et discussion sur l'émission salivaire provoquée de *T. congolense* type "savane" chez *G. tachinoides* 72

4-1. Suivi des glossines infectantes 72
4-1-1. Comptage microscopique des trypanosomes 72
4-1-2. Analyse des salivats par PCR 73
4-1-3. Xénodiagnostic inverse sur souriceaux 73

4-2. Suivi des glossines non infectantes 73
4-2-1. Résultat des dissections (examen parasitologique) 73
4-2-2. Xénodiagnostic inverse sur souriceaux 73
4-2-3. Résultats par la technique PCR 76

4-3. Comparaison des techniques de détection des trypanosomes chez les glossines trouvées infectantes 76

4-4. Discussion 76

5- Résumé 81

CHAPITRE V : APPLICATIONS A L'ÉPIDÉMIOLOGIE

1- Analyse par PCR d'isolats sanguins de bovins en provenance de zones d'enzootie du Burkina Faso 82

1-1. Matériel 82
1-2. Méthodes 82
1-3. Résultats 85
1-4. Discussion 85

2- Epidémiologie moléculaire de la Trypanosomose Animale Africaine (TAA) au Burkina Faso 90

2-1. Présentation du site d'étude : la Province de la Sissili 90
2-1-1. Quelques données écologiques et bioclimatiques 92
2-1-2. Justification de l'étude 91

2-2. Résultats de l'enquête entomologique et épidémiologique 91
2-2-1. Descriptif des pièges à glossines utilisés 91
2-2-2. Résultats entomologiques 92
2-2-3. Résultats épidémiologiques 97

2-3. Application de la technique PCR 99
2-3-1. Echantillonnage 99
2-3-2. Identification des trypanosomes dans un échantillon de glossines infectées 99
2-3-2-1. Résultats parasitologiques 99
2-3-2-2. Résultats par la technique PCR 103
2-3-3. Détermination de l'origine des repas de sang d'un échantillon de glossines 103
2-3-3-1. Rappels du principe 105
2-3-3-2. Résultats 105
2-3-4. Identification des trypanosomes dans les échantillons de sang de bovins infectés 105
2-3-4-1. Résultats parasitologiques 105
2-3-4-2. Résultats par la technique PCR 107

2-4. Interprétation des résultats 107

2-5. Contribution à la connaissance des niveaux de transmission 111

3- Observations de terrain liées au phénomène de la transmission mécanique 114

4- Résumé 116

CHAPITRE VI : CONCLUSION ET PERSPECTIVES 117

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 126

ANNEXES

ARTICLES

AVANT PROPOS

Selon Mayr, 1974, le concept biologique de l'espèce se définit par "*des groupes de populations naturelles capables d'intercroisement et qui sont reproductivement isolées d'autres groupes semblables*". Malgré les ambiguïtés induites par cette notion d'espèce lorsqu'elle est appliquée au phylum des protozoaires, nous maintiendrons, afin de rendre la discussion plus aisée, la terminologie émanant de la classification traditionnelle des trypanosomes (Hoare, 1972, revue par Levine *et al.*, 1980) lorsque nous en référerons. Les différentes subdivisions ont été instituées selon des critères plus apparentés au concept typologique, voire nosologique de l'espèce, dans le sens où la morphologie du parasite chez l'hôte définitif, associée au type de cycle évolutif chez l'hôte intermédiaire, constitue un des caractères les plus discriminants. Depuis une dizaine d'années, les caractéristiques isoenzymatiques et moléculaires des trypanosomes ont profondément révolutionné cette classification. Afin de différencier la nomenclature ancienne et moderne, nous attribuerons les termes taxon, entité taxonomique, type, sous-groupe, aux divisions infraspécifiques qui apparaissent selon ces critères contemporains de systématique.

La classification usuelle des glossines est en accord avec le concept biologique de l'espèce de Mayr, du fait que les caractères morphologiques spécifiques sont affiliés à l'isolement reproductif des espèces. La terminologie employée au cours de ce rapport restera conforme à la classification habituelle (Itard, 1981).

La terminologie que nous appliquerons pour désigner les différents partenaires intervenant dans la relation parasite-vecteur mérite également quelques précisions. Dans les interactions parasites-hôtes, on qualifie généralement l'hôte d'intermédiaire ou de définitif en fonction du mode de reproduction du parasite "*l'hôte intermédiaire abrite un stade du cycle qui ne se multiplie pas ou se multiplie de manière asexuée*"...."*L'hôte définitif est celui ou le parasite adulte se reproduit sexuellement* (*in* Combes, 1995). Compte tenu de l'incertitude de nos connaissances en ce domaine, nous adopterons les définitions de Wéry (1995), apparemment plus adaptées, qui distinguent, dans les relations entre l'hôte et le parasite, *l'hôte vertébré* (principal, secondaire, occasionnel ou inadapté) et *l'hôte invertébré*. Chez ce dernier, *l'hôte intermédiaire vrai* prend en charge une phase de reproduction du parasite (c'est le cas de la glossine pour *Trypanosoma congolense* ou *T. brucei*); chez *l'hôte intermédiaire facultatif*, le parasite peut être transmis sans obligatoirement se multiplier (cas de la glossine pour *T. vivax*). Enfin, les trypanosomes peuvent être transmis de manière non cyclique par des vecteurs ou transporteurs mécaniques, principaux ou occasionnels.

La description des populations parasitaires est fonction de leur origine, de leur entretien au laboratoire et de leur utilisation. Pour accéder aux définitions précises des termes *isolat*, *lignée*, *clone*, *souche* et *stabilat*, nous renvoyons le lecteur à l'ouvrage de protozoologie médicale cité précédemment (Wéry, 1995).

En accord avec la nomenclature internationale du SNOAPAD (Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases) (Kassai *et al.*, 1988; Kassai, 1996), nous utiliserons le terme de *trypanosomose* pour qualifier cette maladie, chez l'homme et chez l'animal.

RÉSUMÉ

Les techniques de PCR et d'hybridation moléculaire ont été utilisées pour la détection et l'identification des trypanosomes chez leurs hôtes vertébrés et invertébrés, en conditions expérimentales et naturelles (Burkina Faso). Les protocoles préexistants de préparation des échantillons de glossines et d'hôtes mammifères destinés à l'analyse par PCR ont été simplifiés et évalués.

Au laboratoire, la technique PCR s'est révélée comme un moyen efficace, en complément des techniques parasitologiques, pour étudier :

- les relations d'affinité parasites-vecteurs suggérées par certaines observations sur le terrain,
- l'émission parasitaire de *Glossina tachinoides* expérimentalement infectée par *Trypanosoma congolense* (type "savane"), pour mieux définir le rôle de cette espèce dans l'épizootiologie des trypanosomoses animales.

Sur le terrain, cette technique a été appliquée sur des isolats sanguins de bovins et des glossines provenant de quelques zones d'enzootie.

La technique PCR n'est pas considérée ici comme "l'outil parfait", mais comme une technique d'appoint des méthodes parasitologiques usuelles. Elle permet notamment de caractériser précisément les infections mixtes, et de détecter facilement les faibles concentrations de trypanosomes dans le sang des hôtes mammifères et les organes des vecteurs.

Sur le terrain, elle impose toutefois de grandes précautions techniques et se heurte à la diversité parasitaire naturelle, particulièrement chez certaines glossines qui hébergent des trypanosomes non identifiables avec les marqueurs moléculaires existants.

Nos résultats montrent également :

- un faible indice de compétence vectorielle de *G. tachinoides* infectée par *T. congolense* type "savane",
- l'existence de relations d'affinité complexes entre le type "savane" de *Trypanosoma congolense* et les glossines du groupe *morsitans* d'une part, le type "forêt" de *T. congolense* et les glossines du groupe *palpalis* d'autre part,
- les difficultés d'interprétation de la technique PCR pour évaluer objectivement la transmission mécanique de la maladie.

Enfin, l'ensemble des résultats est discuté pour montrer l'apport réel de ces biotechnologies pour une meilleure connaissance de l'épidémiologie des trypanosomoses.

Mots-clé : trypanosomes africains, glossines, PCR, relations parasites-hôtes, épidémiologie

SUMMARY

Molecular techniques (PCR and nucleic acid hybridization) were used for detection and identification of trypanosomes in both their vertebrate and invertebrate hosts, in experimental and natural conditions (Burkina Faso). Protocols of preparation of tsetse fly and mammalian host samples for PCR analysis were simplified and evaluated.

In the laboratory, the PCR technique was used, in conjunction with parasitological techniques, to study :

- affinity relationships between some parasites and vectors suggested by field observations,
- parasite expulsion by *Glossina tachinoides* experimentally infected with *Trypanosoma congolense* (savannah type), in order to define more precisely this tsetse fly role in the epidemiology of animal trypanosomosis.

In the field, this technique was used to analyse bovine blood samples and tsetse flies originating from a few trypanosomosis foci.

In this work, the PCR technique was used as a complementary tool to the classical parasitological methods of trypanosome identification. It allowed to characterize accurately mixed infections and to detect more easily low trypanosome numbers in animal blood and in tsetse organs.

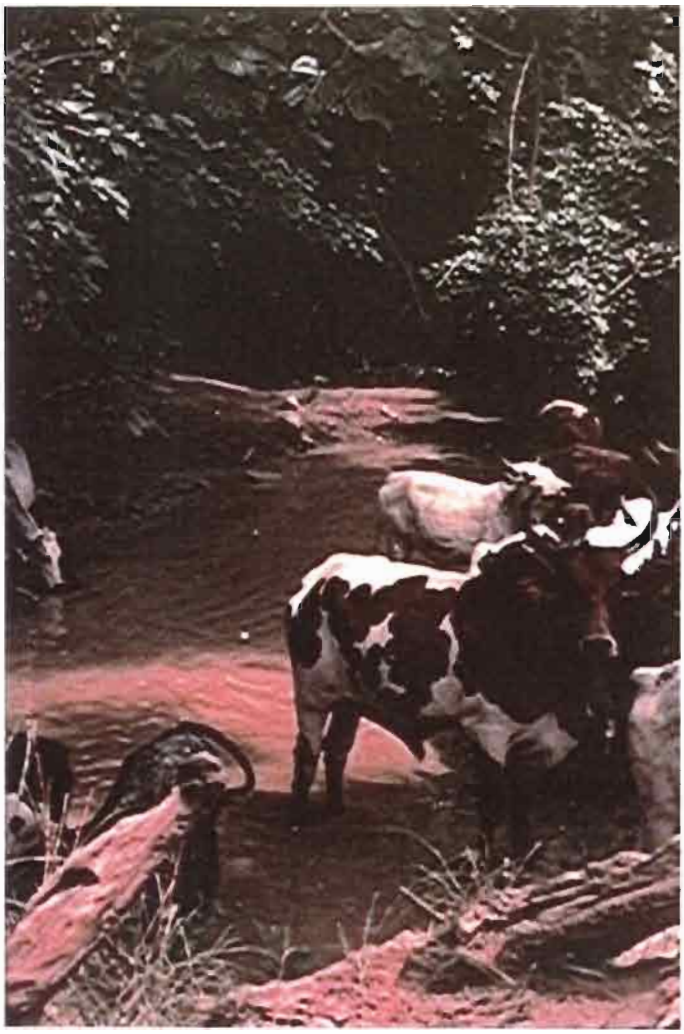
In the field, it required great technical precautions and was faced with natural parasite diversity, in particular in some tsetse fly species that harbour trypanosomes which cannot be identified with existing molecular markers.

Our results showed also :

- low vectorial competence index of *G. tachinoides* infected with *T. congolense* savannah type,
- complicated affinity relationships between, on one hand, the savannah type of *T. congolense* and the *morsitans*-group tsetse flies, and, on the other hand, the riverine-forest type of *T. congolense* and the *palpalis*-group tsetse-flies,
- PCR interpretation difficulty in evaluating the mechanical transmission of the disease.

The results are discussed in order to show how these biotechnologies really contribute to a better understanding of the trypanosomosis epidemiology in Africa.

Key-words : African trypanosomes, tsetse flies, PCR, parasite-host affinity relationships, epidemiology.



Zébus dans une forêt galerie, exposés ainsi aux attaques fréquentes des glossines (Dienkoa, Sipiki, RCA).

(D. Cuisance, 1981)

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Les trypanosomoses, affections parasitaires dont la forme la plus tristement célèbre dans le domaine médical est la maladie du sommeil, sont provoquées par des protozoaires flagellés appartenant à la famille des Trypanosomatidae. Ces parasites, tous du genre *Trypanosoma* Gruby 1843, sont responsables de la maladie chez l'homme (*T. brucei gambiense* Dutton, 1902, *T. b. rhodesiense* Stephens et Fantham, 1910), et de pathologies animales. Ces dernières sont désignées généralement par le terme "nagana" chez le bétail (*T. congolense* Broden, 1904, *T. vivax* Ziemann, 1905 et *T. b. brucei* Plimmer et Bradford, 1899) et le terme "surra" chez le dromadaire (*T. evansi* Steel, 1885).

La maladie du sommeil, malgré des années de lutte, demeure un problème préoccupant en Afrique intertropicale. Sur près de 7 millions de kilomètres carrés du continent infestés par les glossines, ou mouches tsé-tsé, vecteurs cycliques de la maladie, plus de 50 millions de personnes vivent dans environ 200 foyers recensés où elles sont exposées au risque trypanosomien. Environ 25 000 nouveaux cas étaient officiellement répertoriés chaque année (OMS, 1986), mais les dernières estimations portent à 300 000 à 500 000 le nombre d'individus porteurs de trypanosomes (Kuzoe, 1993).

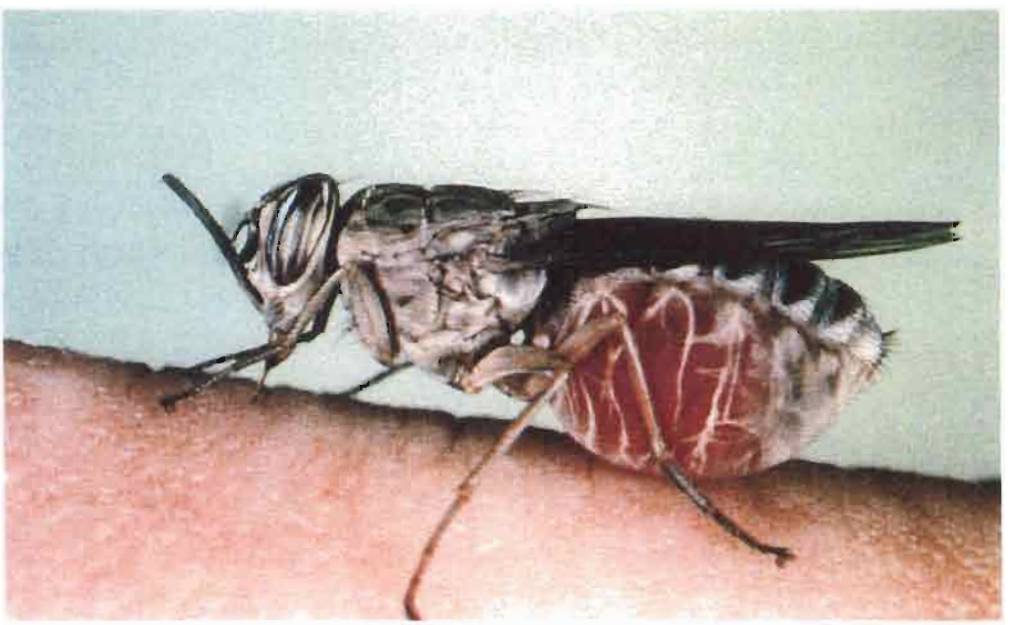
Les trypanosomoses animales représentent la première maladie à transmission vectorielle chez le bétail et constituent encore de nos jours un obstacle majeur au développement de l'élevage en Afrique sub-saharienne (Winrock, 1992). Selon les experts, le manque à gagner annuel causé par cette maladie équivaut à 0,5 million de tonnes de viande et 1,6 million de tonnes de lait. Les projections économiques prédisent que le cheptel bovin pourrait, en l'absence des glossines, être accru de 33 millions de têtes supplémentaires. Les pertes directes par mortalité (anémie, oedèmes, polyadénites et atteintes nerveuses) sont aggravées par les pertes indirectes (amaigrissement, morbidité, avortement), souvent difficiles à quantifier (Tacher *et al.*, 1988; Cuisance, 1994).

La caractérisation des trypanosomes chez l'hôte mammifère a pendant longtemps été fondée sur la morphologie et la motilité des parasites à l'observation microscopique, parfois associées par les cliniciens aux symptômes observés. Chez la glossine, la distinction des principaux sous-genres de trypanosomes a longuement reposé sur leur localisation dans les organes de l'insecte où évoluent les stades successifs du cycle de développement, puisque leur morphologie discriminante n'est acquise que chez l'hôte vertébré. La fiabilité des techniques microscopiques fut souvent remise en question pour la détection de faibles quantités de parasites dans un prélèvement sanguin ou dans les organes d'une glossine. Des situations paradoxales sont souvent apparues sur le terrain où de fortes prévalences chez les bovins étaient constatées alors que les

pourcentages d'infection chez les glossines étaient apparemment très bas (Itard, 1981; Jordan, 1986; D'Amico, 1993; D'Amico *et al*, 1996). De plus, l'identification des trypanosomes chez la glossine basée exclusivement sur leur localisation anatomique peut être biaisée en présence d'infections multiples. Elle est vaine lorsque le cycle du trypanosome n'est pas achevé et que les parasites apparaissent uniquement au niveau intestinal (infections immatures du type *Nannomonas* et *Trypanozoon*).

Les progrès remarquables des nouvelles technologies ont montré que certains trypanosomes morphologiquement semblables, mais présentant des pathogénicités différentes, pouvaient être distingués sur le plan moléculaire. *T. simiae* Bruce *et al.*, 1912 et *T. congolense*, deux espèces appartenant au sous-genre *Nannomonas*, présentent une morphologie quasi identique chez l'hôte vertébré et le même type d'évolution cyclique chez la glossine. Cependant, *T. simiae* est réputé pour être virulent pour les suidés domestiques et peu pathogène pour les bovidés (Stephen, 1962; Roberts, 1971), alors que l'inverse est observé avec *T. congolense* (Killick-Kendrick et Godfrey, 1963; Hoare, 1972). La distinction de ces parasites chez la glossine revêt un intérêt majeur du fait des implications épidémiologiques différentes qui en résultent.

Des recherches plus approfondies ont montré que certaines espèces au sens morphologique du terme rassemblaient en fait des entités taxonomiques différentes identifiables sur le plan moléculaire. C'est le cas notamment de *T. congolense* qui se révèle comme un véritable complexe de "types moléculaires", chacun reconnaissable par un marqueur moléculaire spécifique. Les caractéristiques biologiques de ces taxons restent à préciser, telles que la pathogénicité, la spécificité vectorielle, le spectre d'hôtes vertébrés. L'un des objectifs de notre travail est de donner un concept plus biologique à cette nouvelle taxonomie; nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux relations parasites-vecteurs au laboratoire et en conditions naturelles, après avoir adapté et simplifié les protocoles préexistants d'analyse moléculaire des échantillons. Outre sa spécificité, la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) (Saiki *et al.*, 1988), par sa sensibilité, nous est apparue comme une technologie très prometteuse pour détecter et identifier avec précision un très faible nombre de trypanosomes chez le vecteur cyclique. Nous évaluerons aussi succinctement l'apport de cette technologie pour aborder la problématique de la transmission mécanique des trypanosomoses, qui revêt dans certaines situations une grande importance dans l'épizootiologie de la maladie.



Glossina palpalis gambiensis terminant son repas de sang
(J.P. Hervy, 1994)

CHAPITRE II : PRÉSENTATION GÉNÉRALE

1- Les vecteurs et les parasites

1-1. Les glossines

Connues depuis l'antiquité et responsables du repli tant des cavaliers musulmans que des explorateurs portugais de certaines régions lors de leur conquête du continent africain au XVIe-XVIIe siècle, les mouches tsé-tsé ont fait l'objet d'une première description publiée en 1830 (*in* Mulligan, 1970). Leur existence est pourtant très ancienne puisque des espèces fossiles ont été inventoriées dans les couches miocènes du Colorado.

La morphologie générale de ces diptères de la famille des Glossinidae est celle d'une mouche commune qui aurait les ailes croisées au repos et qui serait pourvue d'un appareil piqueur proéminent traduisant un régime alimentaire hématophage. Alors que, chez d'autres diptères comme les Tabanidae, seule la femelle se nourrit de sang, chez les mouches tsé-tsé les deux sexes sont hématophages. L'autre originalité de ces insectes repose sur leur mode de reproduction, de type larvipare : la femelle fécondée "accouche" directement d'une larve au stade L3. Celle-ci se transforme très rapidement en pupe après son enfouissement dans le sol. L'imago apparaît après une durée de pupaison variant de 20 à 60 jours, selon la saison et l'espèce de glossine considérée. Du fait de leur faible taux de reproduction et d'un long cycle de développement, les glossines sont classées par certains auteurs dans la catégorie des organismes à stratégie démographique de type K (MacArthur et Wilson, 1967).

Les 31 espèces et sous-espèces actuellement inventoriées de glossines appartiennent au genre unique *Glossina*. Leur répartition est exclusivement africaine et continentale, à l'exception de l'île de Zanzibar, ainsi que quelques populations suspectées en Arabie Saoudite. La limite nord de leur aire de répartition suit approximativement le 15°de latitude nord. La limite sud correspond approximativement au 20° de latitude sud, mais s'infléchit le long de la côte orientale de l'Afrique, jusqu'au 30° de latitude sud.

Inféodées à des conditions climatiques très précises, les glossines sont limitées dans leur aire de répartition au nord par le déficit hygrométrique trop élevé. Elles sont absentes des régions du sud à cause des températures trop faibles, de même que dans les sites d'altitude. En effet, les glossines n'existent que dans les zones où la température moyenne annuelle dépasse 20°C, l'optimum thermique étant pour la majorité des espèces de 25°C.

La classification usuelle des glossines repose essentiellement sur leurs caractéristiques écologiques et morphologiques. Trois sous-genres se distinguent ainsi selon ces critères :

- le sous-genre *Glossina sensu stricto* (ou "groupe *morsitans*"), Zumpt, 1935, qui comprend 7 espèces et sous-espèces de savanes boisées ou de forêt claires. Ces espèces ont tendance à régresser en cas de trop forte anthropisation du milieu, et représentent les vecteurs majeurs des trypanosomoses du bétail. Les sous-espèces d'Afrique orientale transmettent la maladie du sommeil à *T. b. rhodesiense.*
- le sous-genre *Nemorhina* (ou "groupe *palpalis*"), Robineau Desvoidy, 1830, qui regroupe 9 espèces et sous-espèces, pour la majorité riveraines. Leurs principaux habitats sont les galeries forestières d'Afrique occidentale et centrale, les mangroves et les "niayes" d'Afrique de l'ouest (bas-fonds argileux à végétation caractéristique où domine le palmier à huile, propres à la région de Dakar). Certaines espèces comme *G. tachinoides* colonisent aussi des habitats très anthropisés qui constituent des gîtes péridomestiques. Ces espèces sont les principaux vecteurs de la trypanosomose humaine : *G. palpalis* transmet *T. b. gambiense* en Afrique occidentale en centrale, *G. fuscipes* transmet *T. b. gambiense* en Afrique centrale et *T. b. rhodesiense* en Afrique orientale. Elles s'avèrent aussi dans certains contextes de redoutables vecteurs des trypanosomoses animales.
- le sous-genre *Austenina* (ou "groupe *fusca*"), Townsend, 1921, qui rassemble 15 espèces et sous-espèces essentiellement forestières. Certaines sont impliquées dans la transmission des trypanosomoses animales. Leurs habitats sont généralement éloignés des zones d'activités humaines et en particulier des zones d'élevage. De ce fait, ces espèces, beaucoup moins connues, ont en général une importance secondaire dans l'épidémiologie de ces maladies.

I-2. Les trypanosomes

Selon la classification traditionnelle (Hoare, 1972; Levine *et al.*, 1980), les trypanosomes de mammifères appartiennent tous au genre *Trypanosoma*, nom créé en 1843 par le médecin hongrois Grüby lorsqu'il découvrit pour la première fois un parasite sanguin de batracien qu'il nomma *Trypanosoma rotarium.*

Les Trypanosomatidae sont subdivisés en deux sections selon leur mode de développement chez l'insecte vecteur. La section *Stercoraria* regroupe des trypanosomes à cycle évolutif postérograde : les formes infectantes se localisent dans la portion postérieure du tube digestif et sont transmises par les fèces du vecteur, par contamination de la peau ou des muqueuses.

La section *Salivaria* regroupe des parasites à cycle de développement antérograde : les formes métacycliques infectantes, stade ultime de maturation des trypanosomes, sont transmises par

inoculation lorsque le vecteur injecte sa salive anticoagulante qui précède immédiatement la prise d'un repas sanguin.

Les trypanosomes pathogènes africains, qui appartiennent à cette seconde section, se développent principalement par multiplication asexuée intense dans le sang des mammifères. L'évolution de l'infection s'exprime le plus souvent par une succession de vagues parasitémiques séparées par des périodes de répit apparent au cours desquelles les parasites disparaissent plus ou moins totalement de la circulation sanguine périphérique. Chaque vague se caractérise par l'expression d'une VSG différente (Variant Surface Glycoprotein) à la surface membranaire des trypanosomes, selon une stratégie de variation antigénique (Pays et Steinert, 1988) permettant aux parasites de déjouer régulièrement le système immunitaire de la victime.

1-3. Les différents cycles évolutifs

A l'exception des souches de *T. vivax* circulant dans les zones indemnes de glossines et de *T. evansi*, qui sont transmises mécaniquement, les trypanosomes de mammifères sont des parasites obligatoires dixènes dont l'hôte invertébré est la glossine. Seul *T. equiperdum* Doflein, 1901, agent de la "dourine", maladie vénérienne des Equidae, est transmis directement par contact sexuel et ne nécessite pas la médiation d'un insecte vecteur. Au cours de leur développement cyclique, les trypanosomes passent par plusieurs stades de maturation au cours desquels ils subissent diverses modifications physiologiques et morphologiques. La perte des glycoprotéines de surface des formes trypomastigotes ingérées au cours du repas sanguin s'accompagne de transformations morphologiques caractéristiques. Dans l'intestin moyen, les trypanosomes se transforment en formes procycliques, à l'allure plus allongée et au flagelle libre à l'extrémité antérieure de la cellule. Les formes épimastigotes, rencontrées dans le labre et les glandes salivaires (pour *T. brucei* s.l.) du vecteur, sont dotées d'un flagelle court qui émerge le long d'une courte membrane ondulante sur un coté du parasite. Les formes trypomastigotes, ou métatrypanosomes, disposent aussi d'une membrane ondulante mais, à la différence des formes précédentes qui présentaient un kinétoplaste en avant du noyau, celles-ci ont un kinétoplaste en arrière du noyau qui se situe à ce stade à l'extrémité postérieure de la cellule.

Les trypanosomes d'intérêt vétérinaire sont subdivisés en trois sous-genres en fonction de leur cycle évolutif chez la glossine (figure 1) :

- le sous-genre *Nannomonas* Hoare, 1964 (*T. congolense, T. simiae, T. godfreyi*), dont le cycle est initié dans l'intestin de la glossine où les trypanosomes se multiplient sous forme procyclique. Ensuite, ils migrent dans le proboscis et se fixent sur les parois du labre pour se

convertir en épimastigotes, précédant le stade infectant des métatrypanosomes dans l'hypopharynx, prolongement du canal salivaire dans la trompe. La durée moyenne du cycle de *T. congolense* est de 14 jours.

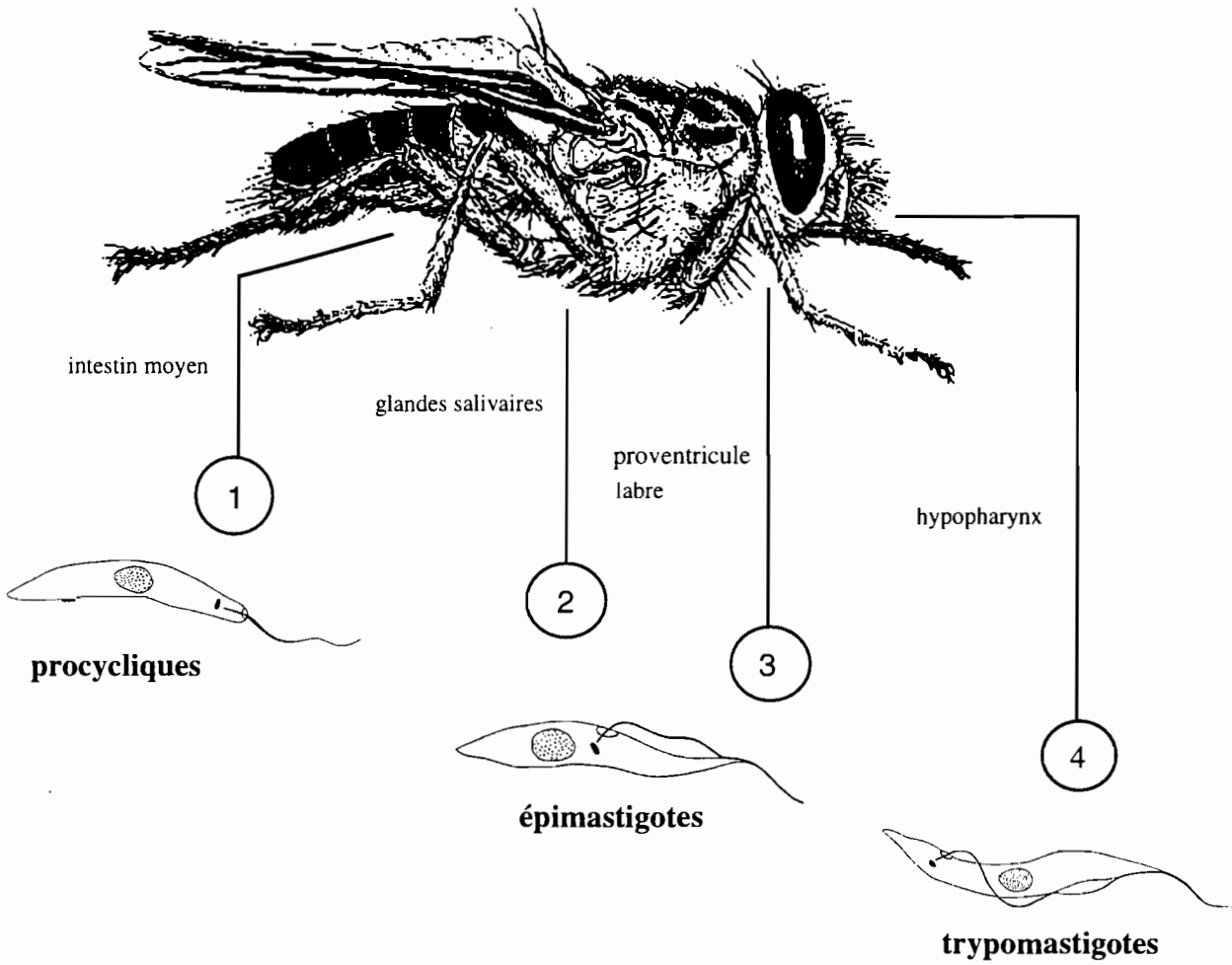
- le sous-genre *Duttonella* Chalmers, 1918 (*T. vivax*) se distingue par un développement restreint au proboscis et à la région cibariale de la glossine. Le cycle débute par la fixation sur les parois du canal alimentaire de trypanosomes absorbés au cours du repas sanguin, qui se multiplient sous la forme épimastigote dans le labre et se transforment en métatrypanosomes infectants dans l'hypopharynx. Certains auteurs ont relaté que le cycle de *T. vivax* pouvait être initié dans la région oesophagienne (Moloo et Gray, 1989). Sa durée moyenne est de 10 jours.

- le sous-genre *Trypanozoon* Lühe, 1906 (*T. brucei* s. l.) opère un cycle identique à celui de *T. congolense* et *T. simiae*, avec un stade supplémentaire de multiplication et de maturation des trypanosomes dans les glandes salivaires. La durée moyenne du cycle est de 29 jours.

1-4. Les processus d'installation et de maturation des trypanosomes chez la glossine (figure 2)

Les formes sanguicoles ingérées par la glossine se retrouvent dans un nouvel environnement dans lequel elles vont devoir s'adapter pour s'installer, se multiplier et se transformer en formes infectantes transmissibles à de nouveaux hôtes. L'action des R.L.O. (Rickettsia-like Organisms), bactéroïdes Gram- qui abondent dans l'intestin moyen, les ovaires et la glande vitelline de l'insecte, est déterminante car elle confère à la glossine son caractère sensible ou réfractaire à l'infection. Ces symbiontes sécrètent des enzymes (endochitinases, N-acéthyl glucaminidases) qui en hydrolysant la chitine engendrent la formation de D-glucosamine, inhibant l'expression trypanolytique des lectines intestinales. Les R.L.O ont donc une action qui favorise l'installation des trypanosomes dans l'intestin de la glossine, comme cela a été démontré expérimentalement (Welburn et Maudlin, 1989; Welburn *et al.*, 1994).

Les lectines sont des glycoprotéines d'origine non-immune, participant aux réactions immunitaires des glossines et de nombreux autres invertébrés. Elles ont une action trypanolytique sur les trypanosomes dont le cycle de développement débute dans l'intestin moyen, et sont sécrétées par certaines cellules intestinales en réponse au sérum du repas sanguin (Welburn *et al.*, 1989). Ceci explique la réceptivité des glossines ténérales (glossines naissantes qui n'ont jamais pris de repas sanguin) à l'infection trypanosomienne, et le caractère plus réfractaire des glossines acquis après l'absorption du premier repas sanguin (Maudlin et Welburn, 1987; 1994). Deux mécanismes plus ou moins connus contrôlent la production des



sous-genres	
Duttonella	3 + 4
Nannomonas	1 + 3 + 4
Trypanozoon	1 + 2 + 3 + 4

dessin glossine : adapté de F. D'Amico, 1991

Figure 1 : Cycle de développement des principaux trypanosomes chez la glossine

lectines : une héritabilité cytoplasmique maternelle du fait que la mère glossine transmet à sa descendance certains R.L.O. qui inhibent les lectines intestinales, et peut être un contrôle lié à un gène récessif du chromosome X, mis en évidence chez *T. brucei* (Maudlin *et al.*, 1991; Milligan *et al.*, 1995).

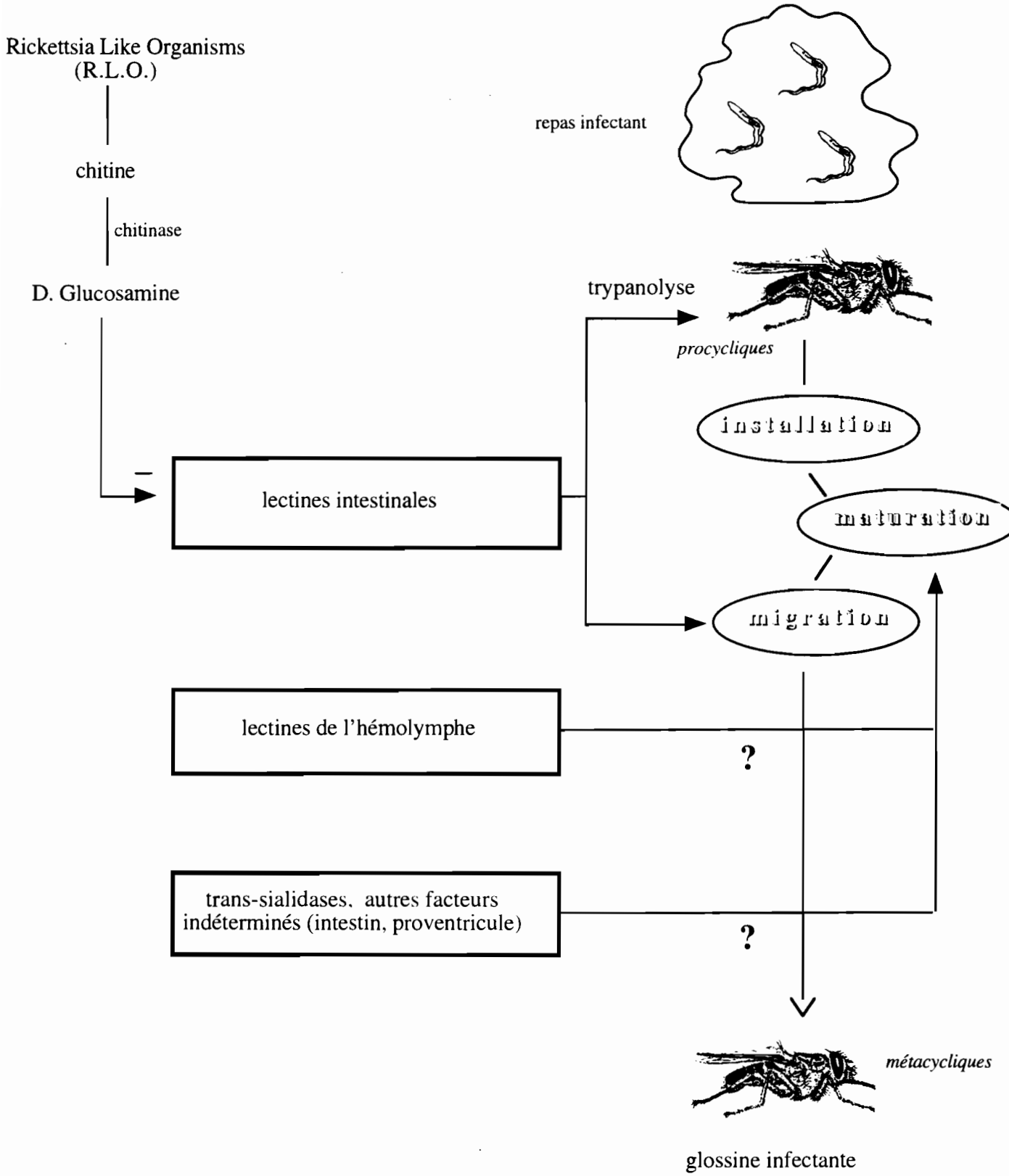
Paradoxalement, les lectines intestinales (Welburn et Maudlin, 1990; Ingram et Molyneux, 1990) semblent avoir également un rôle déterminant dans la migration et la maturation des trypanosomes au cours de leur cycle évolutif (Maudlin et Welburn, 1994).

Certaines enzymes (sialidases, trans-sialidases), absentes chez les trypanosomes transmis de manière non cyclique (*T. evansi*, *T. equiperdum*), interviendraient au cours de la maturation des trypanosomes chez leurs vecteurs cycliques. Certaines de leurs fonctions sont mieux connues chez *T. cruzi*, notamment l'expression des trans-sialidases qui semble s'accroître dans la phase de différenciation des formes épimastigotes en formes trypomastigotes métacycliques (Engstler et Schauer, 1993; Frasch, 1994). Leur rôle présumé dans la maturation des trypanosomes africains et le déterminisme de leur action est encore obscur.

1-5. La transmission mécanique

La transmission mécanique repose sur le principe selon lequel un insecte hématophage "prend" le parasite lors d'un repas sanguin sur un animal infecté et le transmet au cours du repas suivant à un autre hôte. La durée de survie des trypanosomes dans les pièces buccales des vecteurs est variable, allant de 30 secondes pour *T. congolense* à 40 minutes pour *T. vivax* ou 45 minutes pour *T. b. gambiense*. La survie de *T. congolense* et *T. vivax* dans le contenu intestinal de *Stomoxys* sp. fut observée jusqu'à 24 heures après le repas infectant (Wells, 1972). La durée maximale pour que la transmission mécanique de la maladie puisse s'opérer entre deux hôtes varie aussi selon le trypanosome et le vecteur considéré. Par exemple, *Tabanus* sp. peut transmettre *T. congolense* après une interruption du repas de 15 secondes, *T. brucei* peut être transmis par une glossine 10 minutes à 2 heures après le repas infectant (Dixon *et al.*, 1971; Wells, 1972; Robert *et al.*, 1989).

Cette possibilité de passage direct des trypanosomes sans cycle de développement est connue depuis fort longtemps (Bouet et Roubaud, 1912; Buxton, 1955; Mulligan, 1970). Ce mode de transmission est obligatoire pour certains trypanosomes, comme *T. evansi* (Gruvel, 1980; Luckins, 1988; Foil, 1989), ainsi que les souches de *T. vivax* circulant dans des régions indemnes de glossines (Lancelot, 1988; Desquesnes et De la Rocque, 1993; De la Rocque, 1994). Le rôle de la transmission mécanique des trypanosomoses dans la zone de répartition des



(adapté de Maudlin *et al.*, 1991; Cuisance, 1993; glossine : F. D'amico, 1991)

Figure 2 : Installation et maturation des trypanosomes chez la glossine : état des connaissances

glossines est beaucoup moins facile à évaluer en partie du fait de la transmission cyclique dominante; il est néanmoins admis unanimement que dans certains contextes, elle agit comme un facteur amplificateur de la maladie (Buxton, 1955; Mulligan, 1970). Les pullulations saisonnières d'insectes, les rassemblements d'animaux et la circulation de nombreux trypanosomes dans le sang périphérique des hôtes infectés (Gruvel, 1980; Robert *et al.*, 1989) optimisent les conditions de ce mode de propagation.

Les vecteurs les plus fréquemment incriminés appartiennent aux genres *Tabanus*, *Stomoxys*, *Haematopota*, *Chrysops*, *Atylotus*, *Hippobosca* et *Lyperosia*. Les tiques ont été suspectées mais, jusqu'à présent, les études expérimentales n'ont pu conforter cette hypothèse (Kirmse et Taylor-Lewis, 1978; Sridhar *et al*, 1988). L'élevage des tabanides étant très difficile du fait de la grande complexité de leurs cycles biologiques, peu d'études expérimentales ont permis de préciser leur rôle dans la transmission mécanique des trypanosomoses. Certains auteurs ont néanmoins prouvé le rôle de *Tabanus importunus* dans la transmission de *T. vivax* en Guyane française par interruption provoquée de repas sanguin de taons capturés dans la nature (Raymond, 1990). Leur impact a été mis en évidence indirectement par corrélation des prévalences saisonnières des animaux malades et des pullulations simultanées de tabanides (Otte et Abuabara, 1991), comme cela fut aussi démontré chez les stomoxes dans certaines zones d'Afrique centrale (D'Amico *et al.*, 1996).

L'élevage des Stomoxyinae nécessite moins de contraintes (Campau *et al.* 1953; Parr, 1959; Ashrafi, 1964). Malgré l'échec de certaines expériences en conditions naturelles pour mettre en évidence leur rôle dans ce mode de transmission (Boyt *et al.*, 1970; Ngeranwa et Kilalo, 1994), la transmission mécanique de *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei* par ces diptères fut maintes fois démontrée sur le terrain (Soltys, 1954; Lucas, 1955; Krinsky, 1976) et en conditions expérimentales (Bouet et Roubaud, 1912; Riordan, 1972; Wells, 1972; Mihok *et al.*, 1995).

La transmission mécanique de la maladie par les glossines est aussi un phénomène connu et démontré expérimentalement (Riordan, 1972; Wells, 1972; Gingrich *et al.*, 1983; Lancelot, 1988; Roberts *et al.*, 1989). D'après certains auteurs, ces dernières auraient parfois un rôle bien plus important que celui des stomoxes et des tabanides pour ce mode de transmission (Wells, 1972; Gruvel, 1980).

Un rôle mineur est attribué à la transmission des trypanosomes par régurgitation ou par défécation. Si les parasites conservent leur pouvoir infectant malgré l'action des enzymes digestives, ils sont transmissibles dans des conditions tellement limitatives (Straif *et al*, 1990; Mutero et Mutinga, 1993) que dans la nature, ce mode de contamination est vraisemblablement négligeable.

La transmission mécanique des trypanosomoses a fait l'objet de plusieurs synthèses répertoriant l'ensemble des nombreux travaux réalisés dans ce domaine depuis le début du siècle (Wells, 1972; Krinsky, 1976). Malgré cela, son importance épidémiologique reste de nos jours difficile à quantifier précisément. Même si les observations de terrain tendent à montrer l'ampleur de son impact, aucune preuve directe ne peut conforter cette hypothèse. Outre les nuisances des vecteurs mécaniques dans les régions extérieures à l'aire de répartition des glossines, leur rôle présumé en Afrique est de plus en plus inquiétant face aux situations de maintien de la maladie dans certaines zones où la lutte et l'anthropisation du milieu a fortement réduit les densités de populations glossiniennes (Kounda Ggoumbi, 1991; Cuisance, 1994; 1996). Nous tâcherons d'évaluer l'apport des outils sensibles de la biologie moléculaire, notamment la technique PCR, pour appréhender plus précisément cette problématique.

2- Le diagnostic des trypanosomoses

Deux distinctions majeures différencient les nombreuses méthodes de détection et de caractérisation des trypanosomes : celles qui apportent un *diagnostic de certitude*, par observation directe des parasites (examen microscopique), et celles qui apportent un *diagnostic de présomption*, par la mise en évidence de "traces", témoignant de la présence ou du simple passage des parasites responsables d'une modification biologique mesurable chez l'hôte (tests sérologiques).

2-1. Méthodes parasitologiques

2-1-1. Hôte vertébré

La technique la plus classique consiste en l'observation microscopique d'une goutte de sang (ou de suc ganglionnaire pour la recherche de *T. brucei gambiense* ou *rhodesiense*) déposée à l'état frais entre lame et lamelle. Cette méthode est trop peu sensible pour détecter les trypanosomes sur des animaux très faiblement infectés. Elle peut être améliorée en concentrant au préalable les parasites par centrifugation différentielle en microtube capillaire, les trypanosomes se localisant ainsi à l'interface hématies-plasma ou "buffy-coat". La strate parasitaire est examinée soit directement au travers des parois du tube (Woo, 1969; 1970), soit à l'état frais entre lame et lamelle après cassure du microtube et étalement sur lame de la couche leucocytaire (Murray *et al.*, 1977). Cette technique dite de simple micro-centrifugation est pratiquée usuellement sur le

terrain au cours des suivis sanitaires de troupeaux de bovins, qui assujettissent généralement chaque animal au contrôle de l'hématocrite dont la valeur est fortement corrélée à la trypanosomose chez les bovins. Sa sensibilité peut atteindre 700 trypanosomes par millilitre (Desquesne, soumis) et permet de révéler au moins partiellement le nombre d'animaux faiblement parasités.

Les performances de cette technique peuvent être améliorées par une seconde micro-centrifugation de la couche leucocytaire préalablement constituée à partir d'un échantillon de 1,5 ml de sang (Kratzer *et al.* 1989; Very *et al.*, 1990). Malgré un gain de sensibilité (100 parasites/ml), cette technique dite de double micro-centrifugation n'est pas utilisée sur le terrain à cause de la surcharge de travail qu'elle occasionne pour examiner un grand nombre de cas.

La méthode du QBC (Quantitative Buffy Coat) est une autre adaptation de la technique de simple centrifugation. Elle permet de stratifier les constituants sanguins par centrifugation différentielle de l'échantillon dans un tube capillaire muni d'un flotteur dont les parois sont recouvertes d'acridine orange et d'oxalate de potassium (Levine *et al.*, 1989; Bailey *et al.*, 1992; Clendennen *et al.*, 1995). Ce colorant se fixe sur les acides désoxyribonucléiques des parasites qui deviennent ainsi aisément visualisables au microscope à fluorescence. Cette technique pratiquée à l'origine pour le diagnostic de la "malaria" (Spielman *et al.*, 1988) fut aussi utilisée pour le dépistage de la trypanosomose humaine. Il a été démontré expérimentalement que sa sensibilité pouvait atteindre jusqu'à 1 *T. b. rhodesiense* dans un volume de 110 µl (Levine *et al.* 1989). En revanche, son efficacité fut testée sur le terrain dans plusieurs foyers de trypanosomose humaine en Ouganda et en Côte d'Ivoire, révélant une sensibilité globalement équivalente à celle des techniques parasitologiques classiques (Bailey et Smith, 1992; Truc *et al.*, 1994).

Exception faite de la double micro-centrifugation, ces différentes techniques, dont la sensibilité moyenne varie de 5.10^2 à 6.10^3 trypanosomes/ml (Paris *et al.*, 1982), sont facilement praticables sur le terrain. Elles permettent d'établir un diagnostic fiable au niveau subgénérique, d'après la morphologie et la motilité des trypanosomes vivants. L'évaluation quantitative de la parasitémie peut par la suite être réalisée empiriquement selon la méthode classique (Herbert et Lumsden, 1976), ou plus précisément à l'aide d'une cellule de comptage (cellule de Neubauer).

La réalisation de frottis de sang ou de gouttes épaisses et coloration au May-Grünwald Giemsa ou au Giemsa dilué permet une diagnose spécifique des trypanosomes. Cette technique est de nos jours rarement utilisée seule à des fins diagnostiques chez l'homme. Elle reste très utilisée chez le bétail malgré une faible sensibilité (10^4 à 5.10^3 trypanosomes/ml) (OMS, 1986). Elle

permet de confirmer *a posteriori* un diagnostic basé sur l'examen à l'état frais, à l'échelle du sous-genre.

La chromatographie sur mini-colonne de DEAE-cellulose (diéthylaminoéthyl-cellulose) échangeuse d'ions (Lanham et Godfrey, 1970) consiste à filtrer un volume de sang infecté afin de séparer les trypanosomes des éléments figurés sanguins. Le principe consiste en l'élution des trypanosomes par adsorption des composants sanguins globalement négatifs qui sont retenus dans la colonne. Cette technique fut adaptée aux conditions de terrain (Lumsden *et al.*, 1979) à des fins diagnostiques pour la détection de *T. b. gambiense* (Van Meirvenne *et al.*, 1972), notamment pour la confirmation des cas douteux au cours d'enquêtes épidémiologiques. Bien qu'utilisée encore de nos jours pour le dépistage de la trypanosomose humaine (Schares et Mehlitz, 1996), elle reste contraignante à appliquer sur le terrain. Elle est surtout employée au laboratoire pour purifier les trypanosomes sanguins en préambule à des études plus approfondies isoenzymatiques ou moléculaires.

L'inoculation de sang provenant d'animaux malades ou suspects à des rongeurs de laboratoire (souris, rats) est peu pratiquée dans le seul but diagnostique, bien qu'elle se soit montrée parfois plus sensible que la simple micro-centrifugation, notamment pour la détection de *T. brucei* s.l. (Paris *et al.*, 1982). Son intérêt majeur est l'isolement de souches et leur adaptation au laboratoire, malgré la perte partielle de l'hétérogénéité naturelle de l'isolat engendrée par la sélection développée par les rongeurs.

La mise en culture d'inoculats sanguins par son principe a la valeur diagnostique de l'inoculation aux rongeurs. Cependant, malgré la mise au point de kits d'isolement de trypanosomes sur le terrain (Aerts *et al.*, 1992; Truc *et al.*, 1992; McNamara *et al.*, 1995), l'intérêt fondamental des cultures est l'isolement de souches. Cela implique des contraintes d'entretien qui ne sont pas forcément à la portée de tous les laboratoires de terrain, et entraîne les problèmes de sélection précédemment évoqués.

2-1-2. Hôte invertébré

2-1-2-1. Insecte fraîchement tué

La dissection classique de la glossine et l'examen des sites stratégiques du cycle de développement des trypanosomes chez le vecteur permet de distinguer empiriquement les trois sous-genres de trypanosomes (Lloyd et Jonhson, 1924; Itard, 1981). La présence de parasites dans le proboscis uniquement révèle une infection de type *Duttonella* (*T. vivax*), dans l'intestin

moyen et le proboscis du type *Nannomonas* (*T. congolense*, *T. simiae*, *T. godfreyi*), dans l'intestin moyen, le proboscis et les glandes salivaires du type *Trypanozoon* (*T. brucei* s. l.).
Quelques tentatives d'amélioration de la technique de dissection ont été rapportées (Kazadi *et al.*, 1994). L'apparition des outils moléculaires a remis en question la sensibilité de cette technique pour détecter les pauci-infections et les infections multiples. Elle reste néanmoins la base parasitologique fiable de toute tentative d'identification des trypanosomes chez le vecteur.

2-1-2-2. Insecte vivant

La méthode de salivation provoquée par les glossines sur support liquide ou solide chauffé à 37°C (Burtt, 1946; Youdeowei, 1975; Roberts, 1981; Mawuena *et al.*, 1984) a été réhabilitée et améliorée récemment (Gidudu *et al.*, 1995). La salivation par piqûre réflexe peut être substituée par la salivation dite manuelle par pression thoracique des glossines (Kazadi *et al.*, 1995). L'utilisation de ces techniques permet de détecter exclusivement les glossines infectantes (présence de métatrypanosomes dans la trompe).
L'observation microscopique de la goutte anale consécutive au repas sanguin de la glossine est un moyen original et innovateur de déceler une infection naissante et de suivre son évolution au laboratoire (Gidudu *et al,* 1996).
Le xénodiagnostic consiste à nourrir des glossines ténérales sur un sujet malade ou suspect et d'identifier les mouches qui se sont infectées au cours de ce repas par dissection et observation des sites parasitaires. Cette technique fut initialement appliquée pour le diagnostic de la maladie de Chagas (Brumpt, 1914), et adaptée pour le dépistage de la maladie du sommeil à *T. b. gambiense* (Frézil, 1971; Maillot, 1973). Elle est efficace pour révéler la présence de *T. b. gambiense* difficile à mettre en évidence par l'examen direct du sang périphérique.
La technique du nourrissage sur souriceau, ou xénodiagnostic inverse, est un moyen de mesurer l'infectivité d'une glossine au laboratoire (Nitcheman et Jacquiet, 1990). Elle consiste à nourrir individuellement des glossines sur des souriceaux dont l'examen de la parasitémie révélera les mouches infectantes. L'intérêt majeur de cette méthode est de pouvoir identifier les glossines infectantes sans avoir à les disséquer, et de pouvoir ensuite réaliser des observations complémentaires sur l'insecte vivant.

2-2. Méthodes immunologiques

2-2-1. Hôte vertébré

2-2-1-1. Tests de détection des anticorps

L'un des premiers tests basés sur la réponse immune de l'hôte à l'infection était celui de la fixation du complément. Malgré certains résultats prometteurs pour le diagnostic de *T. evansi* (Gill, 1970), des difficultés étaient rencontrées pour préparer et standardiser les solutions antigéniques.

Le test de détection d'anticorps par hémagglutination indirecte repose sur la mise en contact du sérum ou du plasma à analyser avec une suspension d'érythrocytes préalablement sensibilisés avec un antigène bien défini. La présence des anticorps complémentaires entraîne une agglutination des hématies visible à l'oeil nu. Cette technique fut utilisée pour le diagnostic de *T. b. gambiense* (Boné et Charlier, 1975) et *T. evansi* (Gill, 1964; Gill, 1966). Mais elle fut délaissée pour les difficultés de standardisation et des problèmes de sensibilité et de spécificité.

Le test d'immunofluorescence indirecte (Wery *et al.*, 1970; Frézil *et al.*, 1974; Duvallet *et al.*, 1978; Frézil, 1983; Duvallet, 1987) est un test de détection d'anticorps réalisé par le dépôt du sérum à analyser sur une lame de frottis de sang infecté par des trypanosomes sérotypiquement bien définis. Les complexes fluorescents sont alors visualisables sous microscope à la lumière UV. Pour des raisons de contraintes d'application sur le terrain, ainsi que des problèmes de spécificité (antigène mal défini du fait de l'emploi de trypanosomes entiers), cette technique fut délaissée chez le bétail (Nantulya, 1990). Elle demeure néanmoins une technique de référence chez l'homme.

Le test de détection d'anticorps par la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) repose sur le même principe. Ici, les antigènes sont fixés sur des microplaques en polystyrène et la révélation est basée sur une réaction colorimétrique mesurable par spectrophotométrie. Cette méthode fut pratiquée pour le diagnostic de *T. b. rhodesiense* (Voller *et al.*, 1970), *T. evansi* (Luckins *et al.*, 1978; 1979). Elle demeure d'un grand intérêt pour le diagnostic des trypanosomes animaux dans le cadre d'études épidémiologiques de grande envergure (Bocquentin et Duvallet, 1990).

Le test CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis) permet de détecter les anticorps dirigés contre les antigènes invariants de surface (VAT) bien définis (sérotypes connus de trypomastigotes sanguicoles). La solution de parasites est fixée après coloration au bleu de Coomassie. Des agrégats visibles à l'oeil nu se forment si le sérum ou le plasma à analyser contient les anticorps spécifiques des antigènes parasitaires. Cette technique rapide et efficace est considérée comme la mieux adaptée au dépistage en masse de la maladie du sommeil. Elle fut utilisée pour le diagnostic de *T. b. gambiense* (Magnus *et al.*, 1978; Lemesre *et al.*, 1990).

Son efficacité fut aussi bien démontrée pour *T. evansi* (Bajyana *et al.*, 1987). Ce test a été récemment adapté sur un support latex (Jamoneau, 1996)

2-2-1-2. Tests de détection des antigènes

La mise en évidence d'anticorps ne permet pas de distinguer les infections passées des infections présentes (Van Merveinne et Le Ray, 1985). La détection et l'identification par des anticorps bien définis d'antigènes circulants, qui résultent de la lyse immédiate des trypanosomes par le système immunitaire de l'hôte, témoigne d'infections actives. Les anticorps polyclonaux peu spécifiques ont cédé le terrain aux anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement les déterminants antigéniques des principales espèces de trypanosomes (Rae *et al.*, 1984; Nantulya *et al.*, 1987; 1989; Bosompen, 1995). La spécificité et la sensibilité de ces tests pour le diagnostic des trypanosomoses animales a fait l'objet de nombreuses évaluations sous l'égide de l'OIE (Office International des Epizooties), de la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) et de IAEA (Agence Internationale pour l'Energie Atomique) (Kanwe *et al.*, 1992; Bengaly *et al.*, 1994; Delafosse *et al.*, 1995; Delafosse *et al.*, 1996). Les dernières estimations remettent en question l'efficacité de ces tests. D'autres kits de détection rapide d'antigènes circulants, basés sur l'agglutination de microbilles de latex sur lesquelles sont fixés les anticorps monoclonaux spécifiques, sont commercialisées depuis quelques années (Nantulya, 1994).

2-2-2. Hôte invertébré

Des travaux ont récemment rapporté la mise au point de tests sérologiques par Dot-ELISA permettant de différencier *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei* chez la glossine grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques (Bosompem *et al.*, 1995). Les résultats obtenus expérimentalement se sont avérés prometteurs puisque une spécificité de 100% a été observée pour la détection des trois espèces de trypanosomes dans les différents organes de la glossine. La sensibilité de ces tests est en revanche beaucoup plus variable, de 43,8% à 94,4% selon le trypanosome et le site parasitaire chez le vecteur (Bosompem *et al*, 1996).

2-3. Méthodes génétiques et moléculaires

Les méthodes isoenzymatiques et moléculaires représentent un progrès considérable pour l'amélioration du diagnostic et la connaissance de l'épidémiologie des trypanosomoses africaines. Ces techniques sont succinctement décrites dans les paragraphes suivants. Leurs coûts limitent encore l'étendue des applications, mais les perspectives d'utilisation ouvrent la voie à de nouvelles stratégies d'étude sur les parasites, les différents hôtes et les interrelations en cause.

2-3-1. Le sous-genre *Duttonella*

Certaines études comparatives isoenzymatiques sur différents stocks de *T. vivax* ne se sont pas révélées suffisamment discriminantes pour séparer distinctement les souches d'Afrique de l'ouest et celles d'Afrique de l'est (Murray, 1982; Allsopp et Newton, 1985). Des profils très similaires ont été cependant observés entre deux souches d'origine kenyane responsables de formes hémorragiques de la maladie (Fasogbon *et al.*, 1990). Des études moléculaires (analyse karyotypique, hybridation moléculaire, "fingerprinting") ont permis certains regroupements, mais, dans l'état actuel des connaissances, aucune technique n'a permis de dégager de manière discriminante les souches africaines transmises cycliquement et les souches sud américaines transmises mécaniquement (Dirie *et al.*, 1993).
Une sonde spécifique de *T. vivax* fut testée avec succès sur des souches originaires d'Afrique de l'ouest et de l'est, et d'Amérique du sud (Dickin et Gibson, 1989). Cette sonde montre une moindre sensibilité que les autres sondes connues (10^3 trypanosomes au moins), probablement en raison du nombre plus faible de répétitions des séquences satellites cibles. Bien que d'autres sondes génomiques existent (Kukla *et al.*, 1987), ce marqueur moléculaire est le plus utilisé pour identifier les souches de *T. vivax* circulant en Afrique de l'ouest. Des sondes kinétoplastiques pourraient différencier plus spécifiquement les souches d'Afrique de l'est des souches d'Afrique de l'ouest (Nyeko *et al.*, 1990) .

2-3-2. Le sous-genre *Trypanozoon*

La classification sub-spécifique de *T. brucei* s.l. a pendant longtemps été basée essentiellement sur la distribution géographique et le pouvoir pathogène (nosodèmes) des parasites. Grossièrement, elle dissocie ainsi trois groupes principaux. Le "groupe *gambiense*" provoque la forme chronique de la maladie du sommeil en Afrique de l'ouest et centrale, le "groupe *rhodesiense*" est responsable de sa forme aiguë en Afrique orientale et australe, et le "groupe

brucei" comprend des parasites responsables du "nagana" chez l'animal, théoriquement non transmissibles à l'homme. Actuellement, ces subdivisions sont sources de contestations étayées par les études isoenzymatiques et moléculaires qui révélent l'extrême complexité du sous-genre *Trypanozoon*. Globalement, les résultats s'accordent à distinguer deux groupes distincts d'après leurs profils isoenzymatiques et moléculaires : un "groupe *gambiense*" et un "groupe non-*gambiense*" (*T. b. rhodesiense* et *T. b. brucei*) (Paindavoine *et al.*, 1986; Richner *et al.*, 1989; Truc et Tibayrenc, 1992; Waitumbi et Murphy, 1993; Zhang et Baltz, 1994). L'association de certaines isoenzymes a permis de mieux définir le "groupe *gambiense*" en le scindant en deux groupes : le groupe I qui rassemble 80 à 90% de souches prélevées chez l'homme et le groupe II qui comporte des souches prélevées chez l'homme et l'animal, réservoir potentiel de la maladie (Gibson *et al.*, 1980; Stevens *et al.*, 1994). Il existe actuellement des marqueurs moléculaires, notamment kinétoplastiques permettant de différencier ces subdivisions (Massamba *et al*, 1984; Hide *et al.*, 1990; 1991; Bromidge *et al.*, 1993; Mathieu-Daudet *et al.*, 1994), mais pour l'instant peu d'études font cas d'une application exhaustive de ces outils sur le terrain (Schares et Melhitz, 1996).

Deux marqueurs moléculaires reconnaissent le sous-genre *Trypanozoon* dans son ensemble. Basés sur des séquences satellites génomiques, ils sont utilisés pour le diagnostic des trypanosomoses animales à *T. b. brucei* (Sloof *et al.*, 1983; Kimmel *et al.*, 1987).

T. evansi a fait aussi l'objet de nombreuses investigations isoenzymatiques et moléculaires (Artama *et al.*, 1992; Lun *et al.*, 1992). Les mini-cercles d'ADN kinétoplastique se sont révélés comme une cible de choix pour mettre au point des marqueurs diagnostiques (Masiga et Gibson, 1990; Ou *et al.*, 1991). Plusieurs sondes génomiques ont également été élaborées (Wuyts *et al.*, 1994; Zhang et Baltz, 1994).

2-3-3. Le sous-genre *Nannomonas*

Le polymorphisme enzymatique des trypanosomes du sous-genre *Nannomonas* a fait l'objet de nombreuses investigations. L'analyse des profils isoenzymatiques de *T. congolense* et *T. simiae* corrobora leur statut spécifique dans la classification traditionnelle (Gashumba *et al.*, 1986).

Les premières subdivisions taxonomiques chez *T. congolense* sont apparues dans une première étude sur des souches en provenance de diverses régions d'Afrique de l'est et de l'ouest. L'analyse de 12 systèmes enzymatiques de ces souches a permis de distinguer les parasites originaires des régions côtières humides d'Afrique de l'ouest et les parasites plus ubiquistes isolés dans des régions sèches (Young et Godfrey, 1983). Des études similaires appliquées sur des isolats

d'Afrique de l'est ont permis aussi de différencier les souches isolées sur la côte kenyane de celles originaires d'autres régions du même pays et de pays différents.

L'analyse cladistique plus exhaustive de 114 clones de *T. congolense* en provenance d'Afrique de l'est et de l'ouest confirma ces distinctions majeures entre clones isolés dans les régions de savane d'Afrique orientale et occidentale, ceux originaires des régions humides d'Afrique occidentale, et ceux intégrant des trypanosomes originaires des régions côtières du Kenya (Gashumba *et al.*, 1988).

L'hypothèse que ces distinctions se rapportent à des adaptations infra-spécifiques aux vecteurs occupant les différents biotopes fut posée : certaines espèces ou sous-espèces de glossines seraient meilleurs vecteurs que d'autres pour certains taxons de *T. congolense* (Gashumba, 1990).

Afin de tester les hypothèses dérivant des résultats isoenzymatiques, des recherches ont été orientées vers la recherche et la mise au point de marqueurs moléculaires permettant de différencier les taxons indistinguables morphologiquement. La cible privilégiée fut les séquences d'ADN répétées en tandem ou dispersées dans le génome des parasites, équivalentes à l'ADN satellite de mammifère. Elles sont localisées dans les espaces intergéniques, régions hautement conservées du génome, leur conférant une valeur diagnostique indéniable pour différencier les espèces et sous-espèces de parasites grâce à des sondes spécifiques (Barker *et al.*, 1986; Meredith *et al.*, 1989; Dissanayake et Piessens, 1990).

Les études pionnières sur la diagnose moléculaire des trypanosomes du sous-genre *Nannomonas* remonte au milieu des années 80. Le karyotypage moléculaire par les équipes de l'ILRI (International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya) de plusieurs clones de *T. congolense* d'Afrique de l'est permit de distinguer deux groupes, l'un comprenant des clones isolés à Kilifi, sur la côte kenyane, l'autre regroupant des parasites isolés dans divers autres sites du Kenya et de Tanzanie. Sur la base de ces résultats, deux sondes génomiques spécifiques (différenciant les types "Kilifi" et "savane") ont été mises au point (Majiwa *et al.*, 1985). Une étude plus étendue sur 27 souches isolées sur la côte kenyane révéla la présence sympatrique de ces deux populations de *T. congolense*. L'hypothèse d'échanges génétiques entre ces différents types moléculaires fut alors évoquée (Knowles *et al.* 1988).

Afin de différencier le complexe *T. congolense* de *T. simiae*, une sonde spécifique de *T. simiae* fut également mise au point (Majiwa et Webster, 1987). Parallèlement, les équipes travaillant au TRL (Tsetse Research Laboratory, Bristol, Angleterre) élaborèrent sur le même principe trois sondes, proches des précédentes, permettant de distinguer les types "savane" et "Kilifi" de *T. congolense* et *T. simiae*. Une quatrième sonde compléta les précédentes (Gibson *et al.*, 1988).

Spécifique du sous-groupe "forêt", elle est censée reconnaître de manière discriminante les souches de *T. congolense* originaires de régions humides d'Afrique de l'ouest .

Le dernier groupe taxonomique de *T. congolense* isolé à partir du proboscis de *G. pallidipes* est originaire du parc National de Tsavo au Kenya. Les caractéristiques moléculaires de ce taxon montrent des différences notables avec celles des autres groupes génétiques connus. Une quatrième sonde fut élaborée pour identifier spécifiquement ce nouveau groupe nommé "Tsavo" (Majiwa *et al.*, 1993).

Une étude portant sur des isolats en provenance de *G. m. submorsitans* de Gambie a révélé la présence de trypanosomes non reconnus avec les sondes préexistantes (McNamara et Snow, 1991). Ce taxon présente un profil isoenzymatique distinct de celui des différents taxons de *T. congolense* et de *T. simiae*, bien que sa pathogénicité pour les suidés le rapproche *T. simiae*. L'évolution chronique de la maladie qu'il provoque le différencie de *T. simiae* qui est responsable de pathologies généralement aiguës chez le porc domestique. Une sonde spécifique fut mise au point pour identifier ces trypanosomes décrits comme une nouvelle espèce nommée *T. godfreyi* (McNamara *et al.*, 1994; Masiga *et al.*, 1996).

Les liens phylogénétiques entre tous ces taxons ont été étudiés selon d'autres critères moléculaires (hybridation moléculaire avec des sondes non spécifiques, analyse des mini-chromosomes, quantification d'ADN par cytométrie de flux) (Majiwa *et al.* 1985; 1986; Garside *et al.*, 1994; Garside et Gibson, 1995), et ont corroboré très partiellement la scission entre les groupes, telle que suggérée par la spécificité des séquences satellites.

2-4. Caractéristiques géographiques et écologiques des différents taxons de *T. congolense* (figure 3)

L'application sur le terrain des outils de diagnostic moléculaire a permis de préciser les caractéristiques écologiques des différents taxons de *T. congolense*. Le type "savane" apparaît comme le plus ubiquiste. Il est présent dans toutes les régions d'Afrique tropicale, et du fait de son omniprésence chez le bétail, constitue probablement l'un des taxons les plus pathogènes pour les bovidés. Sa présence est surtout liée aux glossines du groupe *morsitans*, comme *G. pallidipes* au Kenya et en Ouganda (Gibson *et al.*, 1988; Mihok *et al.*, 1992), en Zambie et au Zimbabwe (Woolhouse *et al.*, 1993; 1994; 1996), *G. m. submorsitans* en Gambie (McNamara et Snow, 1991). Néanmoins, sa présence a aussi été mise en évidence dans des biotopes plus humides : en Côte d'Ivoire chez *G. p. palpalis* et *G. pallicera* (McNamara *et al.*, 1995; Nzila,

1995; Masiga *et al.*, 1996), et *G. nigrofusca* (McNamara *et al.*, 1995; 1996), en République Centrafricaine chez *G. f. fuscipes* (D'amico, 1994).

La répartition du type "forêt" semble plus restreinte aux régions humides d'Afrique de l'ouest, bien qu'il ait été aussi détecté en Afrique australe (Woolhouse *et al.*, 1996). Dans l'état actuel des connaissances, il n'a pas été répertorié en Afrique orientale. Sa présence a été majoritairement détectée chez les glossines riveraines, notamment les mouches appartenant au groupe *palpalis* (*G. p. gambiensis*, *G. p. palpalis*, *G. p. pallicera*) (McNamara et Snow, 1991; McNamara *et al.*, 1996; Masiga *et al.*, 1996).

La présence concomitante du type "savane" et du type "forêt" chez la glossine a été rapportée chez *G. longipalpis* en Côte d'Ivoire (Solano *et al.*, 1995) et *G. pallidipes* au Zimbabwe (Woolhouse *et al.*, 1996).

C'est à partir d'une étude entreprise en Gambie que le concept selon lequel une affinité particulière pouvait exister entre *T. congolense* type "savane" et les glossines savanicoles d'une part, et *T. congolense* type "forêt" et les glossines riveraines d'autre part, fut évoqué. Dans cette étude, l'identification moléculaire des trypanosomes intestinaux révéla la présence du type "savane" exclusivement chez *G. m. submorsitans* alors que le type "forêt" ne fut détecté que chez *G. p. gambiensis* (McNamara et Snow, 1991). D'autres observations tendraient à confirmer cette hypothèse : au cours d'une étude récente sur des isolats de trypanosomes prélevés sur divers hôtes mammifères vivant dans les régions humides du Zaïre seul le type "forêt" a été signalé (Schares et Mehlitz, 1996). Le même constat a été établi sur des glossines capturées dans certains biotopes humides du Cameroun (I. Morlais, com. pers.).

Le type "Kilifi", originaire de la côte kenyane, prédomine en Afrique de l'est. Considéré auparavant comme une entité géographique, les observations de terrain ont contredit la spécificité vectorielle stricte suspectée entre ce taxon et les glossines des régions côtières d'Afrique de l'est (Majiwa et Otieno, 1990), dont la présence a été détectée aussi au Zimbabwe et en Zambie (Woolhouse *et al.*, 1993; 1994; 1996), en Ouganda (Nyeko *et al.*, 1990), en République Centrafricaine (D'Amico, 1995). La présence du type "Kilifi" a également été mise en évidence récemment en Côte d'Ivoire (Masiga *et al.* 1996; McNamara *et al.*, 1996).

Quant au type "Tsavo", sa présence n'a pour l'instant été répertoriée qu'au Kenya, pays d'origine (Majiwa *et al.*, 1993) et en République Centrafricaine (D'Amico *et al.*, 1995).

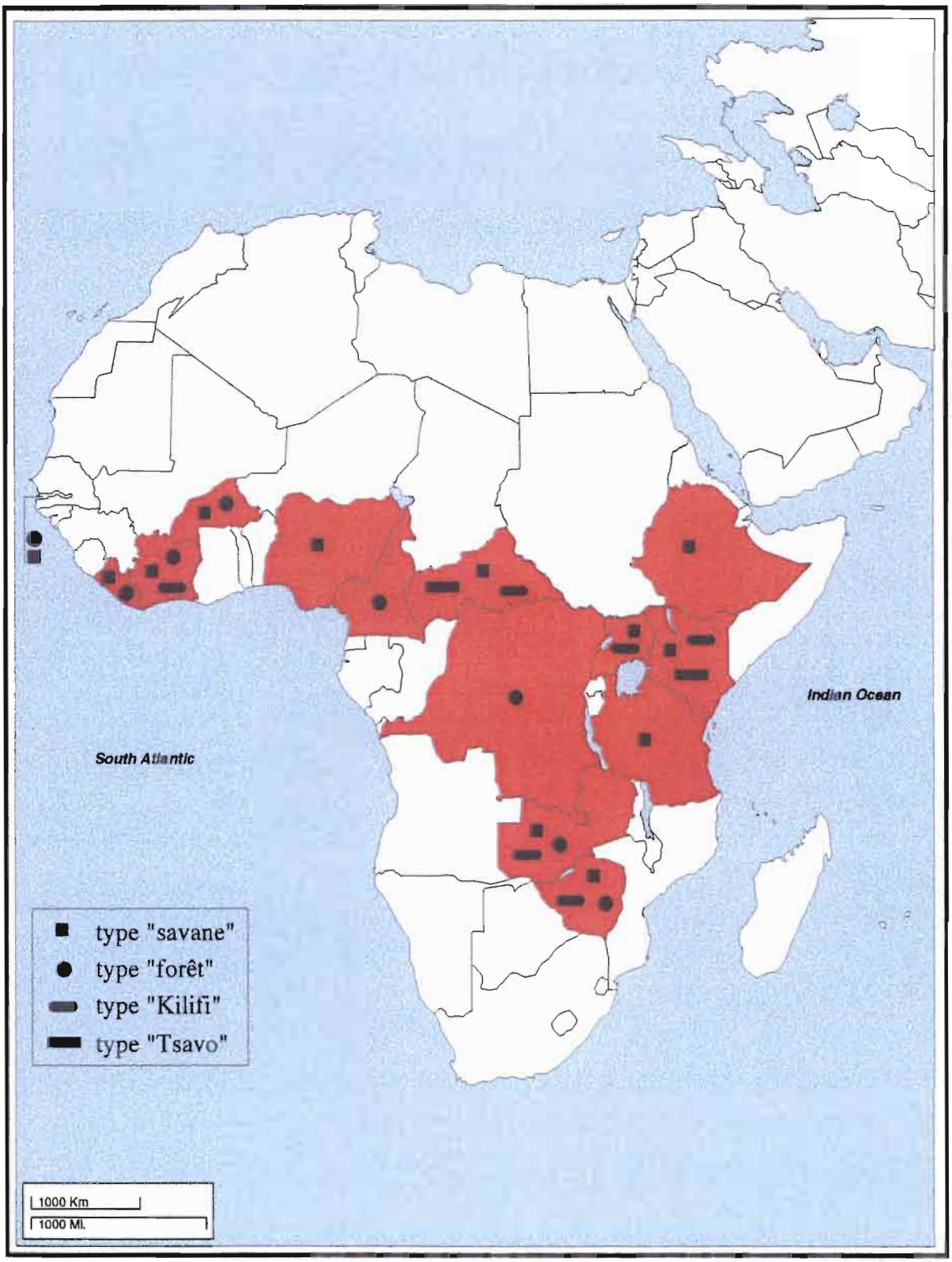
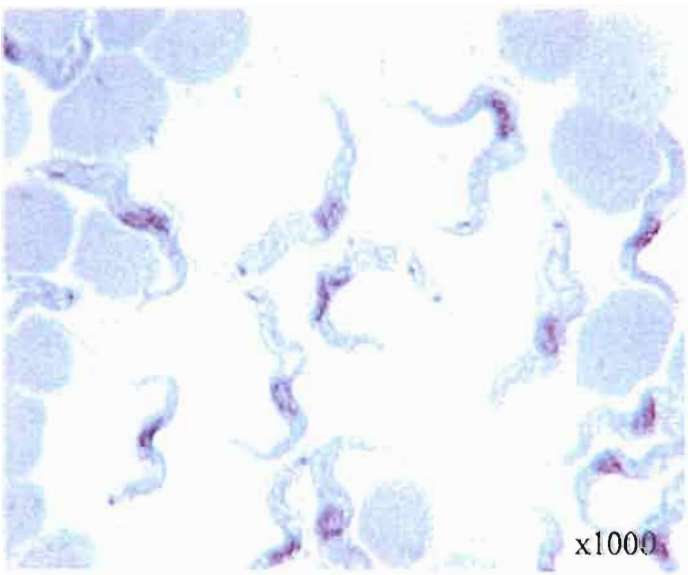


Figure 3 : Répartition en Afrique des 4 taxons de *T. congolense* détectés chez les glossines et les hôtes mammifères

T. vivax (taurin Kouri, Lac Tchad)(D.Cuisance)

T. congolense (souche EATRO 325, sang de souris, CIRAD-ORSTOM)



T. brucei (souche EATRO 1125, sang de souris, CIRAD-ORSTOM)

CHAPITRE III : CHOIX ET MISE AU POINT DES TECHNIQUES

1- Hybridation moléculaire

1-1. Préparation des échantillons

1-1-1. Techniques connues

Les premières applications consistaient à écraser sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose les organes de mouches infectées (méthode de dépôt par "touch-blot"). L'hybridation était réalisée sur le matériel organique préalablement traité (lyse des cellules, lavage, fixation et dénaturation de l'ADN) (Kukla *et al.*, 1987; McNamara *et al.*, 1989). Ce procédé fut amélioré par la purification des suspensions intestinales avant leur dépôt sur membrane grâce à un dispositif permettant d'agencer librement les échantillons (méthode de dépôt par "dot-blot" ou "slot-blot") (McNamara *et al.*, 1989; Majiwa et Otieno, 1990; Nyeko *et al.*, 1990; Mihok *et al.*, 1992; Woolhouse *at al.*, 1996). Le même protocole d'hybridation fut aussi appliqué sur des dépôts de couches leucocytaires constituées à partir de prélèvements sanguins de bovins infectés (Nyeko *et al.*, 1990).

1-1-2. Protocole retenu

Dans le cadre de nos études, nous associerons l'hybridation moléculaire à la technique PCR décrite dans le paragraphe suivant pour confirmer un diagnostic basé sur l'amplification génique. Le principe consiste en l'application de sondes spécifiques sur de l'ADN amplifié grâce aux amorces correspondantes. L'intérêt principal est de s'affranchir ainsi du manque de sensibilité des sondes pour détecter la présence d'un très faible nombre de trypanosomes en amplifiant au préalable son ADN, et de confirmer aussi les cas douteux.

1-2. Marquage des sondes

1-2-1. Intérêts du marquage "froid"

Dans la majorité des études, les sondes sont marquées au ^{32}P. Afin de pallier les servitudes liées à l'usage de la radioactivité, le marquage enzymatique (Stone et Durrant, 1991; Höltke *et al.*, 1992) présente des attraits incontestables, particulièrement pour les pays en voie de développement : facilité d'utilisation, longue conservation des sondes marquées, non nécessité

de structures adaptées et de matériel spécifique, absence de danger d'utilisation et de contraintes de stockage des déchets. Cette technique de marquage a montré son efficacité pour l'identification moléculaire de parasites et de populations de vecteurs (Cooper *et al.*, 1991; Dissanayake *et al.*, 1991; Hill *et al.*, 1991). Son principal inconvénient est une sensibilité généralement inférieure à celle des sondes radioactives : 10^2 à 10^3 trypanosomes dans le meilleur des cas, selon le mode de préparation des échantillons et le parasite recherché (Argiro, 1993; Nzila, 1995). Le tableau I récapitule les sensibilités évaluées selon différents protocoles de marquage et de préparation des échantillons.

1-2-2. Kit utilisé

Nous avons opté pour le kit de marquage enzymatique à la digoxygénine (DIG-DNA labelling and Detection kit, Boehringer Mannheim), du fait de l'apparition de nombreuses hybridations non spécifiques avec le kit testé précédemment (Reifenberg, 1992). La spécificité obtenue est correcte, exceptée pour les sondes pgNRE 372 (*T. congolense* "savane") et DIL 350 (*T. congolense* "forêt") pour lesquelles des réactions croisées avec des ADN hétérologues ont été observées (hybridation de pgNRE 372 avec de l'ADN de *T. congolense* "forêt" et de DIL 350 avec de l'ADN de *T. congolense* "savane") (Reifenberg, 1994). Des réactions croisées similaires ont aussi été observées avec d'autres kits de marquage pour des concentrations importantes d'ADN (Nzila, 1995), et pourraient être dues au fort pourcentage d'homologie (71%) que présentent les séquences satellites spécifiques de chaque taxon (Masiga *et al.*, 1992). La sensibilité de nos sondes marquées à la digoxygénine peut atteindre 10^2 à 10^3 trypanosomes déposés sur membrane (Argiro, 1993).
Le protocole détaillé de marquage des sondes et d'hybridation moléculaire figure en annexe 1.

2- PCR

2-1. Préparation des échantillons (annexe 2)

2-1-1. La glossine

2-1-1-1. Techniques de purification des intestins

Le sang renferme des facteurs qui inhibent l'activité de la Taq Polymerase. D'après certains auteurs, l'hème et/ou les porphyrines (Higuchi, 1989), mais aussi d'autres facteurs non caractérisés sont probablement impliqués dans ces phénomènes d'inhibitions. Les anticoagulants, notamment l'héparine, peuvent également agir à certaines concentrations (Izraeli *et al.*, 1991). D'où la nécessité de traiter les échantillons de sang où les suspensions intestinales de glossines contenant des résidus de repas sanguins avant de les soumettre à la technique PCR. L'extraction classique d'ADN de trypanosome à partir des échantillons biologiques permet de s'affranchir de ces inhibitions, mais bien qu'elle soit encore utilisée (Masiga *et al.*, 1996; Schares et Mehlitz, 1996), cette méthode devient vite astreignante lorsque de nombreux échantillons sont à analyser. Quelques protocoles simplifiés de préparation des intestins de glossines ont donc été élaborés, comme l'utilisation d'un tampon de lyse classique (Masiga *et al.*, 1992; Solano *et al.*, 1995; Woolhouse *et al.*, 1996) ou la simple dilution dans l'eau stérile (Majiwa *et al.*, 1994). Nous avons opté pour l'utilisation d'un kit commercial de purification des échantillons biologiques (Ready AMP™ genomic purification kit, Madison, WI, USA) évalué récemment (Penchenier *et al.*, 1996). Le principe de ce kit repose en partie sur l'action d'une résine apparentée au Chelex qui protège l'ADN en chelatant les ions métalliques catalyseurs de la dégradation de l'ADN à haute température (Walsh *et al.*, 1991). L'efficacité du Chelex a été démontrée dans plusieurs études qui prescrivent la purification d'échantillons biologiques avant d'être soumis à la PCR (Schriefer *et al.*, 1991; Wooden *et al.*, 1992).

2-1-1-2. Proboscis et glandes salivaires

L'application de la technique PCR sur les pièces buccales et les glandes salivaires n'impose pas de purification préalable des échantillons. Les organes sont simplement suspendus dans l'eau stérile, dont une fraction est prélevée pour la recherche des trypanosomes par amplification génique.

La sensibilité de la technique PCR est variable selon le trypanosome recherché et le mode de préparation de l'échantillon (tableau I).

Tableau I : Récapitulatif des évaluations de la sensibilité des techniques moléculaires selon divers auteurs.

	sensibilité	origine	références
sondes/ marquage radioactif	10^4	glossine	Massamba et William, 1984
	10 à 240	ADN purifié	Kukla *et al.*, 1987
	10^2	glossine	Ole-MoiYoi, 1987
	10^2	glossine	Gibson *et al.*, 1988
	10^2	ADN purifié	Masiga *et al.*, 1990
sondes/ marquage chimique	10^3à 5.10^3	ADN purifié	Nzila, 1995
sondes/ marquage enzymatique	10 à 5.10^2	culture	Nzila, 1995
	10^2 à 10^3	tryp. entiers	Argiro, 1993
PCR	0,01 pg = 1/10 tryp.	ADN purifié	Moser *et al.*, 1989
	0,1 pg = 1 tryp.	glossine	Masiga *et al.*, 1992
	1	sang	Penchenier *et al.*, 1996
	1 à 10	culture	Nzila, 1995
	1 à 10	glossine	Nzila, 1995

2-1-2. L'hôte vertébré

2-1-2-1. Principales méthodes

Le protocole classique d'extraction d'ADN de parasites à partir du sang total a fait l'objet de nombreuses adaptations, et a été pendant longtemps l'étape inévitable pour éliminer les composants sanguins inhibiteurs de l'amplification (Barker *et al.*, 1992; Panyim *et al.*, 1992; Majiwa *et al.*, 1994; Wuyts *et al.*, 1995). Outre le mode classique, le sang peut être aussi prélevé sous la forme d'un frottis sur lame, séché, et traité au laboratoire avant d'être analysé par PCR. Cette technique de prélèvement permet de s'affranchir des exigences de conditionnement au froid des échantillons dans les régions très chaudes (Wuyts *et al.*, 1995).
Le moyen le plus efficace pour éviter les contraintes de l'extraction d'ADN consiste à purifier et à concentrer au préalable les trypanosomes présents dans un échantillon de sang soit grâce aux colonnes d'affinité (Lumsden *et al.*, 1979), soit selon la technique du "buffy-coat" décrite au paragraphe 2-1-1 du chapitre II.

2-1-2-2. Concentration des parasites dans le "buffy-coat"

Cette méthode, développée et évaluée au paragraphe 2-3, a été adoptée pour plusieurs motifs. Elle est facilement réalisable sur le terrain au cours des enquêtes sanitaires qui imposent généralement l'examen de l'hématocrite (centrifugation de sang prélevé en microtube capillaire) de chaque animal. En concentrant au préalable les trypanosomes dans la strate leucocytaire, elle augmente la sensibilité de détection d'une infection. Elle permet d'éliminer la phase contenant les hématies, donc de soustraire l'analyse aux risques d'inhibitions de la Taq polymerase.
La technique PCR peut être aisément appliquée directement sur la couche leucocytaire suspendue dans l'eau stérile (Nyeko *et al.*, 1990). Afin d'éliminer les effets inhibiteurs résiduels susceptibles de persister dans le plasma flanquant le "buffy-coat", il est préférable de purifier la suspension grâce au kit décrit précédemment.

2-2. Paramètres d'amplification

La composition du tampon d'amplification figure en annexe 3. Le volume final est aliquoté dans 8 tubes, parmi lesquels 6 seront utilisés pour tester les échantillons et 2 pour les témoins. La fiabilité de chaque réaction d'amplification est contrôlée par un témoin positif (adjonction au

tampon réactionnel de 50 pg d'ADN purifié de la souche clonale de référence) et un témoin négatif (tampon réactionnel contenant tous les constituants nécessaires à l'amplification sans ADN cible).

Trente cycles sont nécessaires pour obtenir des amplifications visualisables sur gel d'agarose, chacun divisé en 3 phases :

- une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 minute,
- une étape d'hybridation des amorces à 56°C pendant 1 minute,
- une étape d'élongation à 72°C pendant 1 minute.

Le programme s'achève par une élongation terminale à 72°C durant 5 minutes. Un volume de 10 µl de chaque échantillon est révélé sur gel à 2% d'agarose teinté au bromure d'éthidium et observé sous lumière UV.

2-3. Evaluation expérimentale de l'application de la technique PCR sur le "buffy-coat"

L'étude qui suit a pour objectif d'évaluer l'application de la technique PCR sur des couches leucocytaires constituées à partir de sang de souris infectées par plusieurs clones de trypanosomes, avant et après traitement trypanocide. Le but est de comparer la sensibilité de la technique à celle de l'examen parasitologique, et de suivre l'évolution des signaux d'amplification après guérison induite des animaux.

2-3-1. Matériel

Les clones de trypanosomes sont *T. congolense* C49 (modèle pour le sous-genre *Nannomonas*), *T. evansi* KEN/87/CRTA/871 (modèle pour le sous-genre *Trypanozoon*) et *T. vivax* Y486 (modèle pour le sous-genre *Duttonella*).

Les amorces pour la PCR sont décrites dans le paragraphe 1-3-2 du chapitre IV.

2-3-2. Méthodes

Chaque clone est inoculé en début de journée à deux souris. A compter du soir, la parasitémie de chaque animal est surveillée quotidiennement (observation microscopique en contraste de phase d'une goutte de sang à l'état frais). Parallèlement, un volume de sang est prélevé sur microtube capillaire hépariné pour analyser par PCR la couche leucocytaire.

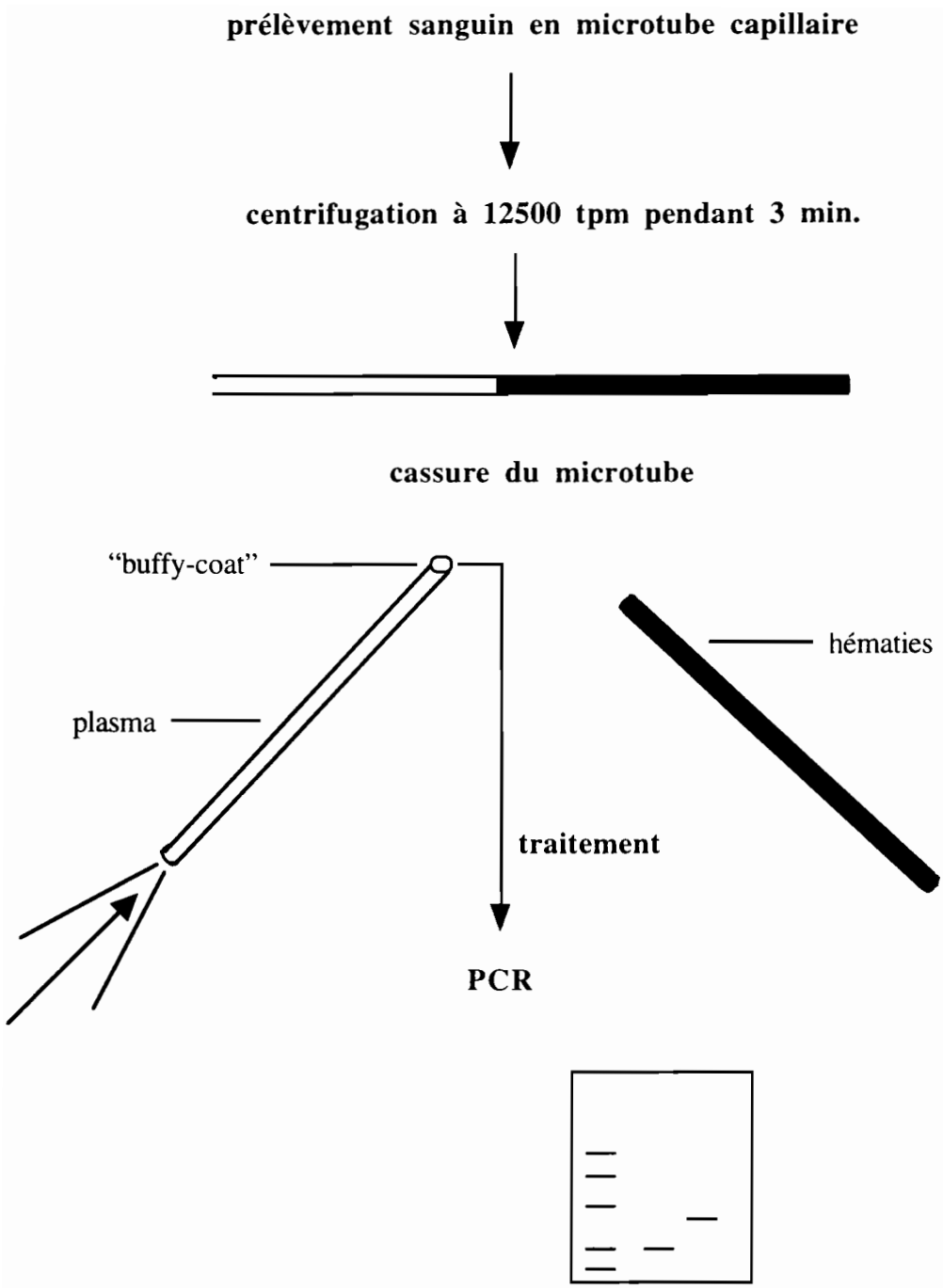


Figure 4 : Protocole schématisé de la technique "buffy-coat"

Dès l'apparition des parasites à l'examen microscopique, les souris sont traitées au trypanocide (acéturate de diminazène, Bérénil®, 3,5 mg/kg poids vif). Les observations et les prélèvements hebdomadaires continuent 7 à 10 jours après le traitement.

Le sang est prélevé sur microtube capillaire hépariné à l'extrémité caudale des souris. Après centrifugation (5 min à 12500 tr/mn), le tube est sectionné au-dessus de l'interface hématies-plasma. La strate leucocytaire ainsi que le plasma flanquant sont expulsés à l'aide d'une pipette dans un tube Eppendorf contenant 50 µl d'eau distillée stérile (figure 4).

La technique PCR est appliquée sur une fraction de 3 µl des suspensions obtenues après purification grâce au kit ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System.

2-3-3. Résultats (figure 5)

2-3-3-1. Infections à *T. congolense* et à *T. evansi* (tableaux II et III)

L'examen microscopique montre que les parasites apparaissent à partir du lendemain de l'inoculation (J1), et disparaissent le lendemain du traitement. La technique PCR montre l'apparition de signaux d'amplification sur l'échantillon prélevé le soir même de l'inoculation (dose inoculée massive, de 2,5 10^4 à 2,5 10^5 trypanosomes). Ils ne persistent pas au-delà du lendemain du traitement (cas de la souris n°1 infectée par *T. evansi*), ou du deuxième jour consécutif au traitement (cas des souris n°1 et 2 infectées par *T. congolense* et de la souris n°2 infectée par *T. evansi*)

2-3-3-2. Infections à *T. vivax* (tableau IV)

Chez la souris n°1, alors que les parasites n'apparaissent qu'à partir de J6, des signaux d'amplification apparaissent à J1, J2, et à partir de J4. Ils disparaissent le lendemain du traitement.

Chez la souris n°2, alors que les parasites n'apparaissent qu'à J8, des signaux d'amplification apparaissent à compter du jour de l'inoculation jusqu'au jour du traitement, puis disparaissent le lendemain du traitement.

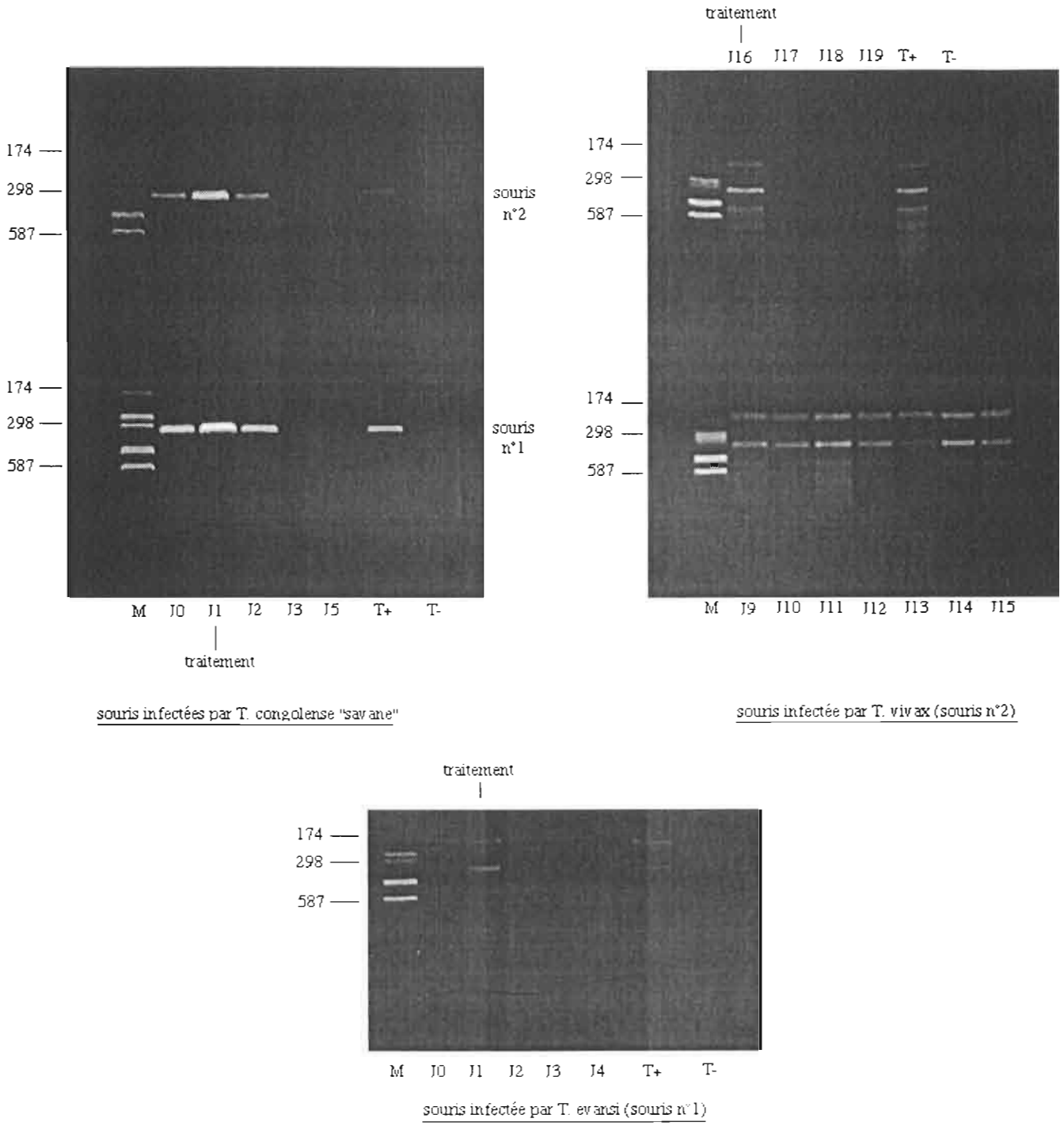


Figure 5: Gels d'électrophorèse montrant l'évolution des signaux d'amplification après application de la technique PCR sur les "buffy-coat" de souris infectées par *T. congolense* "savane", *T. vivax* "Afrique de l'Ouest" et *T. evansi*, avant et après traitement trypanocide (M: marqueur moléculaire pUC 18 Hae III digest, T+: témoin positif, T-: témoin négatif)

Tableaux II et III : Résultats de l'application de la technique microscopique et de la technique PCR pour détecter les trypanosomes sur des souris infectées par *T. congolense* et *T. evansi*, avant et après traitement trypanocide (à J0, inoculation le matin; prélèvement le soir)

Tableau II : **souris infectées par *T. congolense***

souris n°1

	J0	J1 ↓ T	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8
mic.	0/40	2/1	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40
PCR	+	+	+	-	-	-	-	-	-

souris n°2

	J0	J1 ↓ T	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8
mic.	0/40	24/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40
PCR	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Tableau III : **souris infectées par *T. evansi***

souris n°1

	J0	J1 ↓ T	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8
mic.	0/40	4/1	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40
PCR	+	+	-	-	-	-	-	-	-

souris n°2

	J0	J1	J2 ↓ T	J3	J4	J5	J6	J7	J8
mic.	0/40	1/1	50/1	0/40	morte				
PCR	+	+	+	+	morte				

mic. : examen microscopique
- n/40 = nombre de trypanosomes pour 40 champs
- n/1 = nombre moyen de trypanosomes par champ

T : traitement trypanocide

Tableau IV : Résultats de l'application de la technique microscopique et de la technique PCR pour détecter les trypanosomes sur des souris infectées par *T. vivax*, avant et après traitement trypanocide (à J0, inoculation le matin; prélèvement le soir)

souris n°1

	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14 ↓ T	J15	J16	J17	J18	J19	J20	J21	J22	J23
mic.	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	1/40	3/40	7/40	1/40	1/40	0/40	0/40	1/40	5/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40
PCR	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

souris n°2

	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16 ↓ T	J17	J18	J19	J20	J21	J22	J23
mic.	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	1/40	3/40	7/40	1/40	1/40	0/40	0/40	1/40	5/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40
PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

mic. : examen microscopique

- n/40 = nombre de trypanosomes pour 40 champs
- n/1 = nombre moyen de trypanosomes par champ

T : traitement trypanocide

2-3-4. Discussion

Des travaux similaires ont déjà été réalisés pour évaluer l'apport de la technique PCR pour détecter de très faibles parasitémies chez l'hôte mammifère. Panyim *et al.* (1992) décèlent la présence de *T. evansi* à partir du troisième jour consécutif à l'inoculation des souris alors que les parasites ne sont observés au microscope qu'à partir du cinquième jour. Moser *et al.* (1989) sur des animaux infectés par *T. congolense* et *T. brucei*, décèlent la présence des trypanosomes deux jours avant leur apparition au microscope. Dans les deux cas, la technique PCR a été appliquée sur des échantillons qui ont été au préalable purifiés selon une extraction d'ADN classique au phénol-chloroforme.

Nous obtenons ici une meilleure sensibilité grâce à la concentration préliminaire des parasites en microtube capillaire. Dans tous les cas, les signaux PCR apparaissent dès le jour de l'inoculation des rongeurs, du fait de la forte concentration de parasites injectés et de leur virulence pour les rongeurs de laboratoire, jusqu'au jour du traitement curatif. La seule exception est observée chez la souris n°1 infectée par *T. vivax* pour laquelle aucun signal n'apparaît le jour de l'inoculation et le troisième jour suivant. Si l'on exclue l'hypothèse d'un incident technique survenu lors de la préparation des échantillons, trop peu de parasites circulaient probablement dans le sang périphérique au moment du prélèvement pour être détectés.

Le suivi des souris infectées par *T. vivax* met en évidence les performances de la technique PCR pour révéler les animaux aparasitémiques. Des signaux d'amplification sont visualisables jusqu'à 8 jours avant l'apparition des parasites au microscope (souris n°2).

Nous constatons avec intérêt la disparition rapide des signaux d'amplification après le traitement curatif. Il semble donc que l'ADN libre résultant de la lyse des parasites, dont une fraction circule théoriquement dans le plasma flanquant la couche leucocytaire, soit rapidement dégradé, ou tout du moins en trop faible quantité pour être détecté.

D'après ces résultats, l'apparition de bandes d'amplification spécifique à partir d'un échantillon de terrain parasitologiquement négatif devrait théoriquement révéler la présence de trypanosomes circulant "à bas bruit". La détection de faux positifs, occasionnée par d'éventuelles traces d'ADN résultant d'une infection récente ou passée, parait peu plausible compte tenu du faible volume de plasma inclu dans le prélèvement.

2-4. Evaluation expérimentale de l'application de la technique PCR sur le proboscis de glossines après repas interrompu sur animal infecté

2-4-1. But de l'expérience

L'objectif de cette expérience de courte durée est de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse selon laquelle la technique PCR peut détecter le simple passage de trypanosomes (parasites morts, traces d'ADN) dans les organes d'une glossine fraîchement gorgée sur un animal parasité. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au proboscis, organe clef pour la compréhension des cycles de transmission de la maladie sur le terrain.

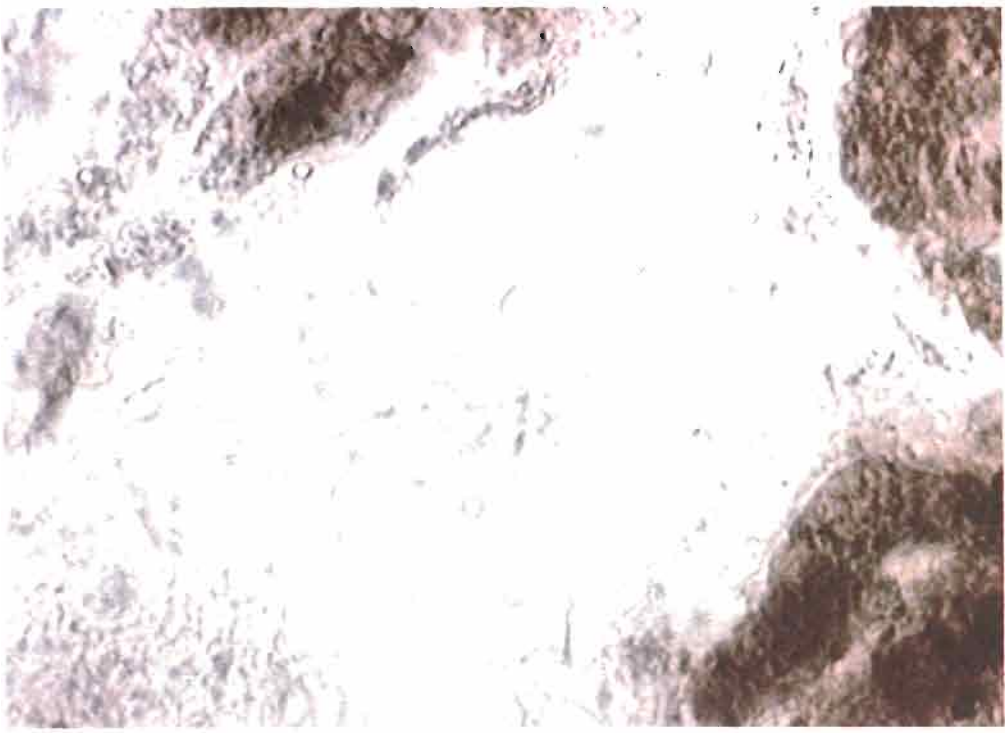
2-4-2. Méthodologie

Vingt six *G. m. morsitans* provenant de l'élevage et à jeun de 48 heures sont nourries sur le flanc de souris infectées par *T. congolense* (clone E325, type "savane") et fortement parasitémiques (2,5 à 5.10^8 trypanosomes par millilitre). Le repas sanguin est interrompu à un stade précoce de la réplétion, et six lots de glossines sont constitués sur la base de la durée retenue entre le repas et le prélèvement du proboscis destiné à être analysé par PCR (immédiatement après le repas, 1 heure, 2 heures, 15 heures, 25 heures et 40 heures après le repas).
Les glossines sont euthanasiées au congélateur (-20°C). Le proboscis est prélevé et transféré dans un microtube contenant 50 µl d'eau distillée stérile qui est agité vigoureusement. Un volume de 3 µl de la solution obtenue est additionné au mélange réactionnel d'amplification pour la recherche des trypanosomes par PCR.

2-4-3. Résultats et discussion

Les résultats figurent dans le tableau A16 placé en annexe. Un seul cas a donné des signaux d'amplification spécifique à partir d'un proboscis prélevé immédiatement après le repas sanguin de la glossine. Tous les autres prélèvements ont répondu négativement. Bien que cette étude soit limitée par le faible effectif de glossines testées (26 individus), elle confirme la faible probabilité d'apparition par PCR de signaux d'amplification de reliquats de trypanosomes (Masiga *et al.*, 1996). De plus, notre expérimentation correspond à une situation rarement rencontrée sur le terrain (glossine fraîchement capturée après un repas sanguin sur un animal très fortement trypanosomé). A la lumière de ces premiers résultats, l'apparition de signaux d'amplification témoignant de traces de trypanosomes à partir de proboscis parasitologiquement négatifs, bien que possible dans certaines conditions, est probablement peu fréquente. Il sera

d'un grand intérêt au cours de futures expériences de suivre le même protocole dans le cadre d'infections à *T. vivax*. On pourra s'attendre à un nombre plus important de proboscis répondant positivement à la technique PCR, puisque le cycle de ce trypanosome débute dans le labre et la région oesophagienne du vecteur, et que ce parasite est réputé pour être le plus facilement transmissible mécaniquement.



Intestin moyen infecté de *Glossina morsitans morsitans* (x 50)
(F. D'Amico, 1993)

Proboscis infecté de *Glossina morsitans morsitans* (x 50)
(F. D'Amico, 1993)

CHAPITRE IV : INFECTIONS EXPÉRIMENTALES DES GLOSSINES

« *La codification actuelle veut que l'on emploie le terme* ***d'infection*** *indifféremment pour les virus, les bactéries et les parasites, et que l'on réserve le terme* ***d'infestation*** *aux seuls arthropodes ectoparasites* » (définition extraite du dictionnaire de Médecine Flammarion, 1991).

1- Matériel

1-1. Les clones de trypanosomes

Les trypanosomes sont conditionnés dans l'azote liquide (- 196°C) sous la forme de stabilats additionnés d'un agent cryoprotecteur (glycérol à 10%).

Le clone E325 de *T. congolense* dérive d'un isolat provenant d'une glossine infectée (*G. pallidipes*) capturée en Ouganda en 1962 (Uilenberg *et al.*, 1973). Ce clone appartient au type moléculaire « savane » (Gashumba *et al.*, 1988).

Le clone Dinderesso/80/CRTA/3 de *T. congolense* provient du Burkina Faso où il a été isolé en 1980 à partir d'un chien naturellement infecté. Ce clone appartient au type moléculaire « forêt » (Duvallet *et al.*, 1993).

Le clone Y486 de *T. vivax* dérive d'un isolat provenant d'un bovin à Zaria (Nigéria) en 1973 (Leeflang *et al.*, 1976).

1-2. Les glossines

Les glossines utilisées proviennent de l'élevage commun CIRAD/ORSTOM de Montpellier. La colonie de *G. m. morsitans* Westwood, 1850 est originaire du Zimbabwe (début de l'élevage : 1965). La colonie de *G. tachinoides* Westwood, 1850 est mixte et provient du Tchad (début de l'élevage : 1965) et du Burkina Faso (1984). Les colonies de *G. p. gambiensis* Vanderplank, 1949 (début de l'élevage : 1972) et de *G. m. submorsitans* Newstead, 1910 (début de l'élevage : 1984) sont originaires du Burkina Faso.

Les conditions artificielles de l'insectarium correspondent à une température de 24°C +/- 1,5, une humidité relative de 65 à 85% et une photopériode de 12 heures (Itard et Bauer, 1984). Les glossines sont nourries sur lapin sain 5 jours par semaine.

Tableau V : Marqueurs moléculaires utilisés

espèces/taxons	séquences oligonucléotidiques des amorces	taille de l'amplification attendue	sondes	références amorces
Nannomonas				
T. congolense "savane"	ILO344: 5' CGAGCGAGAACGGGCAC 3' ILO345: 5'GGGACAAACAAATCCCGC 3'	320 pb	pgNRE 372	Majiwa *et al.*, 1990
T. congolense "Kilifi" (1)	TCK1: 5' GTGCCCAAATTTGAAGTGAT 3' TCK2: 5'ACTCAAAATCGTGCACCTCG 3'	294 pb	pgNIK 450	Masiga *et al.*, 1992
T. congolense "Kilifi" (2)	ILO963: 5'GCTGCAGGTCGACGGATC 3' ILO968: 5'CCCTCGAGAACGAGCA 3'	?	pgNIK 450	Majiwa *et al.*, 1994
T. congolense "forêt"	TCF1: 5' GGACACGCCAGAAGGTACTT 3' TCF2: 5' GTTCTCGCACCAAATCCAAC 3'	350 pb	DIL 350	Masiga *et al.*, 1992
T. congolense "Tsavo"	ILO892: 5' CGAGCATGCAGGATGGCCG 3' ILO893: 5' GTCCTGCCACCGAGTATGC 3'	400 pb	pgNgulia	Majiwa *et al.*, 1993
T. simiae (1)	ILO346: 5' CGACTCCGGGCGACCGT 3' ILO347: 5' CATGCGGCGGACCGTGG 3'	504 pb	pgNS 600	Majiwa *et al.*, 1990
T. simiae (2)	TSM1: 5' CGGTCAAAAACGCATT 3' TSM2: 5' AGTCGCCCGGAGTCGAT 3'	407 pb	pgNS 600	Masiga *et al.*, 1992
T. godfreyi	DGG1: 5' CTGAGGCTGAACAGCGACTC 3' DGG2: 5' GGCGTATTGGCATAGCGTAC 3'	149 pb	?	McNamara *et al.*, 1996
Trypanozoon				
T. brucei "ingi"	ILO342: 5' GATCCGCAGCCGGGCCTG 3' ILO242: 5' CCGCGGTGGCTCCTTCCC 3'	1530 pb	pgDR 1	Kimmel *et al.*, 1987
T. brucei "177 bp"	TBR1: 5' GAATATTAAACAATGCGCAG 3' TBR2: 5' CCATTTATTAGCTTTGTTGC 3'	167 pb	177 pb	Moser *et al.*, 1989
Duttonella				
T. vivax "Afr. de l'Ouest" (1)	TVW1: 5' CTGAGTGCTCCATGTGCCAC 3' TVW2: 5' CCACCAGAACACCAACCTGA 3'	150 pb	T. v. 47	Masiga *et al.*, 1992
T. vivax "Afr. de l'Ouest" (2)	VOL1: 5' CCTTCTTCAGGTTGGTG 3' VOL2: 5' CCGGAGCGAGAGGTGC 3'	174 pb	T. v. 47	Dickin & Gibson, 1989

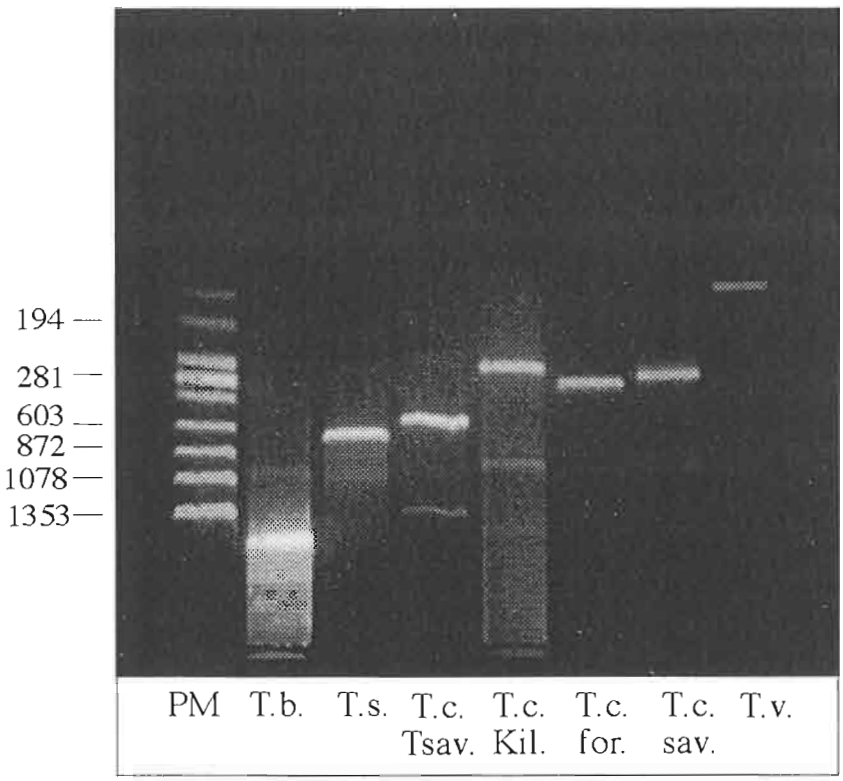


Figure 6 : Identification des trypanosomes par PCR
Marqueurs moléculaires utilisés

T.b.	: *T. brucei s.l.*
T.s.	: *T. simiae*
Tc Tsav.	: *T. congolense* "Tsavo"
Tc Kil.	: *T. congolense* "Kilifi"
Tc For.	: *T. congolense* "Forêt"
Tc Sav.	: *T. congolense* "Savane"
Tv	: *T. vivax*
PM	: marqueur moléculaire Yx 174 Hind II

1-3. Les marqueurs moléculaires (tableau V)

1-3-1. Les sondes

Les sondes nucléiques sont conditionnées sous la forme de plasmides recombinants directement utilisables pour l'hybridation (la purification de l'insert qui correspond à la séquence spécifique du trypanosome recherché n'est pas nécessaire).

1-3-2. Les amorces

Les amorces pour la technique PCR sont issues des séquences nucléotidiques des sondes et ont été sélectionnées de manière à encadrer la séquence spécifique cible de l'amplification. La composition de ces amorces varie selon les laboratoires utilisateurs. Elles sont parfois choisies à différents sites de la séquence recherchée, amplifiant donc des produits de taille différente. Ainsi, il existe pour certains trypanosomes, tels que *T. simiae*, *T. congolense* type "Kilifi" et *T. vivax* deux couples distincts d'amorces, qui engendrent des signaux d'amplification d'intensités variables selon l'origine géographique de la souche parasitaire testée (Masiga *et al.*, 1992). Dans le cadre de nos étude, nous avons utilisé, du fait d'une efficacité supérieure sur les souches d'Afrique de l'ouest, les couples d'amorces TCK1/2, TVW1/2 et TSM1/2 pour la recherche de *T. congolense* type "Kilifi", *T. vivax*, et *T. simiae*, respectivement.
La figure 6 montre la taille attendue des produits d'amplification obtenus avec les différentes amorces. En présence d'une quantité importante d'ADN, la polymérisation des séquences amplifiées peut entraîner l'apparition sur le gel de signaux parasites correspondant à des dimères d'amplifications (c'est le cas pour *T. congolense* types "Tsavo" et "Kilifi" sur la photo).

2- Méthodes

2-1. Infections expérimentales de glossines *in vivo* (figure 7)

2-1-1. Inoculation des parasites

Les stabilats sont inoculés soit au lapin (race Néo-Zélandaise) par voie intraveineuse, soit à la souris (lignée OF1) par voie intrapéritonéale.

Le clone *T. congolense* E325 est bien adapté aux souris et aux lapins. Le clone *T. congolense* Dinderesso/80/CRTA/3, moins virulent, nécessite l'immunodépression des souris (Endoxan, cyclophosphamide, 80 mg/kg poids vif), et se multiplie très difficilement sur lapin. Le clone de *T. vivax* ne prolifère bien que sur souris.

2-1-2. Repas infectant des mouches

Les glossines ténérales (individus naissants et à jeun), donc prédisposées à l'infection (Mitchell *et al.*, 1976) sont nourries sur l'animal infectant lorsque sa parasitémie atteint 0,5 à 2.10^6 trypanosomes par millilitre, selon l'échelle d'évaluation de Herbert et Lumsden (1976). Les cages de glossines sont déposées, soit sur les oreilles d'un lapin placé dans une cage de contention (infections à *T. congolense* type "savane"), soit sur le ventre d'une souris immobilisée manuellement (infections à *T. congolense* type "forêt"). Le repas infectant est unique et dure 10 minutes. Ensuite, les mouches gorgées sont séparées des mouches non gorgées qui sont éliminées.

2-1-3. Repas d'entretien des mouches

Les glossines retenues sont nourries 5 jours sur 7 sur un lapin sain dont la parasitémie est régulièrement contrôlée par examen de sang à l'état frais. Dès l'apparition des trypanosomes, celui-ci est soumis à un traitement trypanocide (acéturate de diminazène, Bérénil®, 3,5 mg/kg poids vif), puis est mis au repos et remplacé pendant cette période par un autre lapin sain. Une rotation est ainsi instaurée de manière à nourrir invariablement les glossines infectées sur des animaux aparasitémiques.

2-2. Infections expérimentales de glossines *in vitro* (figure 7)

Ce mode d'infection nous a permis d'infecter les glossines simultanément avec deux clones de trypanosomes (études des infections mixtes), afin de maîtriser la production de chacun et de pouvoir mélanger au moment du repas infectant un nombre équivalent de parasites.

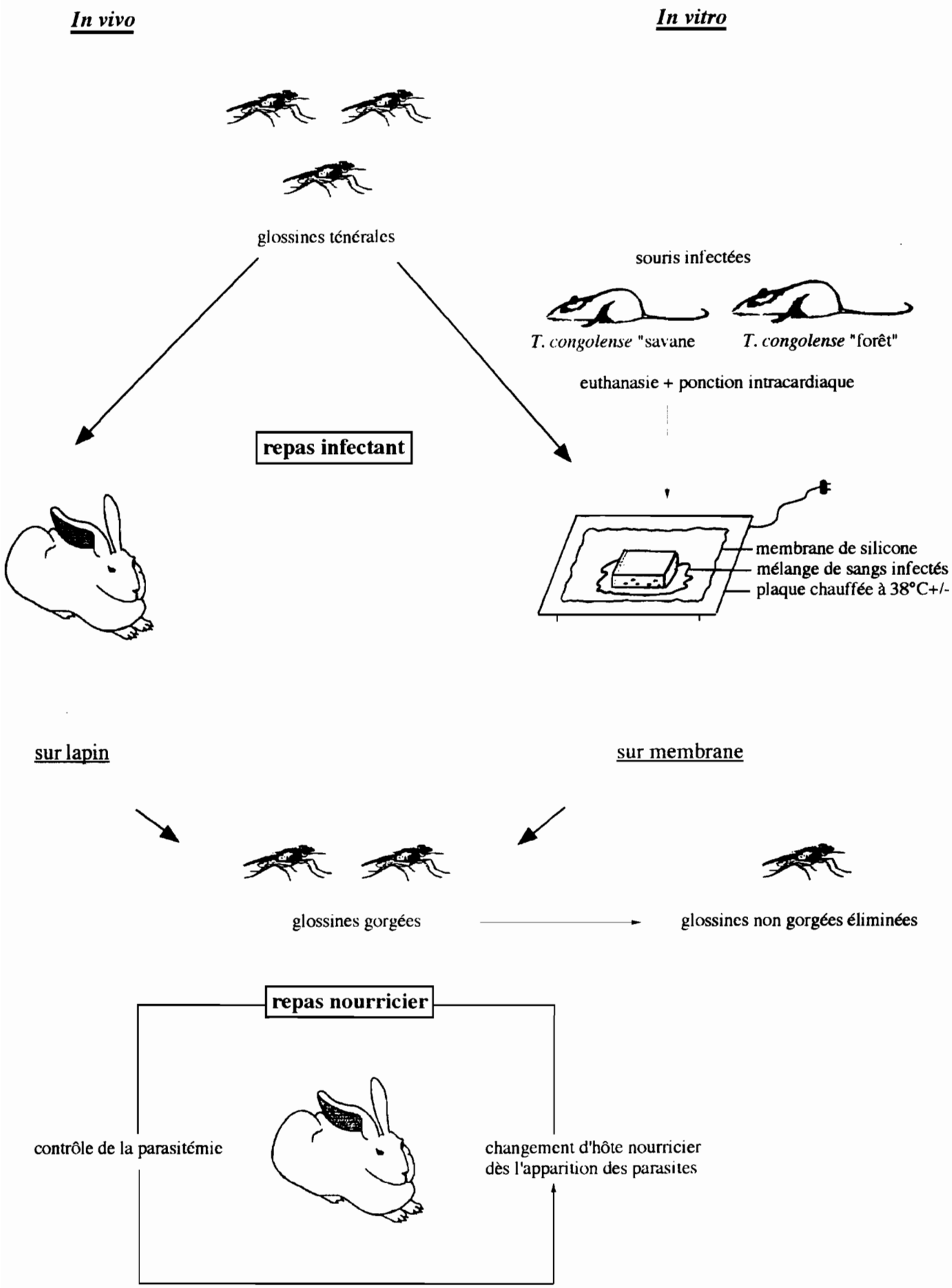


Figure 7 : Schéma montrant les protocoles suivis pour infecter expérimentalement les glossines

2-2-1. Production de formes sanguicoles

Chaque clone de trypanosome est inoculé à plusieurs souris. Dès que la parasitémie atteint environ 10^6 trypanosomes par millilitre, les souris sont sacrifiées et leur sang est ponctionné stérilement par voie intracardiaque.

2-2-2. Repas infectant des mouches

Les prélèvements de sang infecté sont mélangés. Le volume final est étalé sur une plaque stérile en aluminium alvéolée et chauffée à 38°C±1. Une membrane de silicone, préalablement stérilisée, est ensuite déposée sur le sang épandu, et humidifiée superficiellement avec un tampon de coton imbibé d'eau stérile. Des petites cages Roubaud, contenant 20 glossines ténérales, sont alors posées sur la membrane.
Les glossines affamées et stimulées par la chaleur de la plaque piquent au travers de la membrane et se gorgent du sang qui stagne dans les alvéoles.
Le repas se déroule à l'obscurité pendant une durée approximative de 20 minutes. Les glossines non gorgées sont éliminées. Un seul repas infectant est réalisé.

2-2-3. Repas d'entretien des mouches

Les glossines infectées sont nourries sur lapin sain selon le protocole décrit précédemment.

2-3. Dissection des glossines (figure 8)

Lorsque le cycle évolutif du trypanosome est achevé (14 jours en moyenne pour *T. congolense*, 10 jours en moyenne pour *T. vivax*), les glossines sont euthanasiées et disséquées selon la méthode classique (Itard, 1981; Penchenier et Itard, 1981). L'intestin moyen et le proboscis (labre et hypopharynx) sont examinés au microscope en contraste de phase (grossissement x400) afin de localiser et répertorier les infections.
Afin de limiter le risque d'amplifications dues aux contaminations, les instruments doivent être soigneusement nettoyés entre chaque mouche disséquée et entre la dissection des organes de chaque mouche à raison d'un bain dans l'eau distillée, d'un second bain dans l'eau de javel et d'un troisième bain dans l'eau distillée. Pour réduire le risque de contamination du proboscis par les

trypanosomes intestinaux, celui-ci est détaché de la tête de l'insecte avant la dilacération de l'intestin.

Après l'observation microscopique, les échantillons (proboscis, intestin moyen) destinés à être analysés par la technique PCR sont suspendus dans un microtube Eppendorf contenant 50 µl d'eau stérile. Les suspensions intestinales sont purifiées (voir paragraphe 2-1-1-2 du chapitre III). Les échantillons sont ensuite stockés à -20°C avant d'être analysés.

2-4. Détection des trypanosomes par salivation de glossines infectées

2-4-1. Justification de l'étude

Afin d'approfondir nos connaissances sur les relations parasites-vecteurs, nous avons étudié expérimentalement la dynamique d'émission des trypanosomes par des glossines infectantes. Nous avons choisi le modèle *G. tachinoides/T. congolense* E325 pour plusieurs raisons :

- cette espèce de glossine est prédominante en effectif dans nos sites de prospection au Burkina Faso (galeries forestières de la zone soudanienne).
- le clone E325 de *T. congolense* appartient au type "savane", le taxon le plus détecté en Afrique; de plus, il est très bien adapté aux conditions expérimentales.
- les données de la littérature montrent que, paradoxalement, dans certains foyers actifs de la maladie où sévit *G. tachinoides*, les mouches infectées présentent souvent des forts taux d'infection immature (présence de trypanosomes dans l'intestin uniquement) (Buxton, 1955; Baldry, 1964; Mulligan, 1970; Roberts et Gray, 1972). Cette étude expérimentale est destinée à préciser les performances vectorielles de *G. tachinoides* vis-à-vis d'un clone connu de *T. congolense*, en abordant tout particulièrement les questions suivantes : les techniques parasitologiques sont-elles trop peu sensibles pour détecter un nombre infime de parasites dans la trompe ? Une glossine infectante émet-elle toujours des trypanosomes au moment de la piqûre, ou l'émission des parasites est-elle discontinue ?..

La *compétence vectorielle* se définit comme l'aptitude physiologique d'un vecteur à acquérir le pathogène et à le transmettre. La *capacité vectorielle* est le nombre de nouvelles infections par situation et par jour provoquées par un vecteur; elle est estimée *a posteriori* à partir de certains paramètres (abondance du vecteur, survie qui conditionne la taille de la population et l'achèvement du cycle parasitaire, préférences trophiques, nombre de piqûres par jour, etc.) (Reisen, 1989; Toma, 1991; Cuisance, 1995).

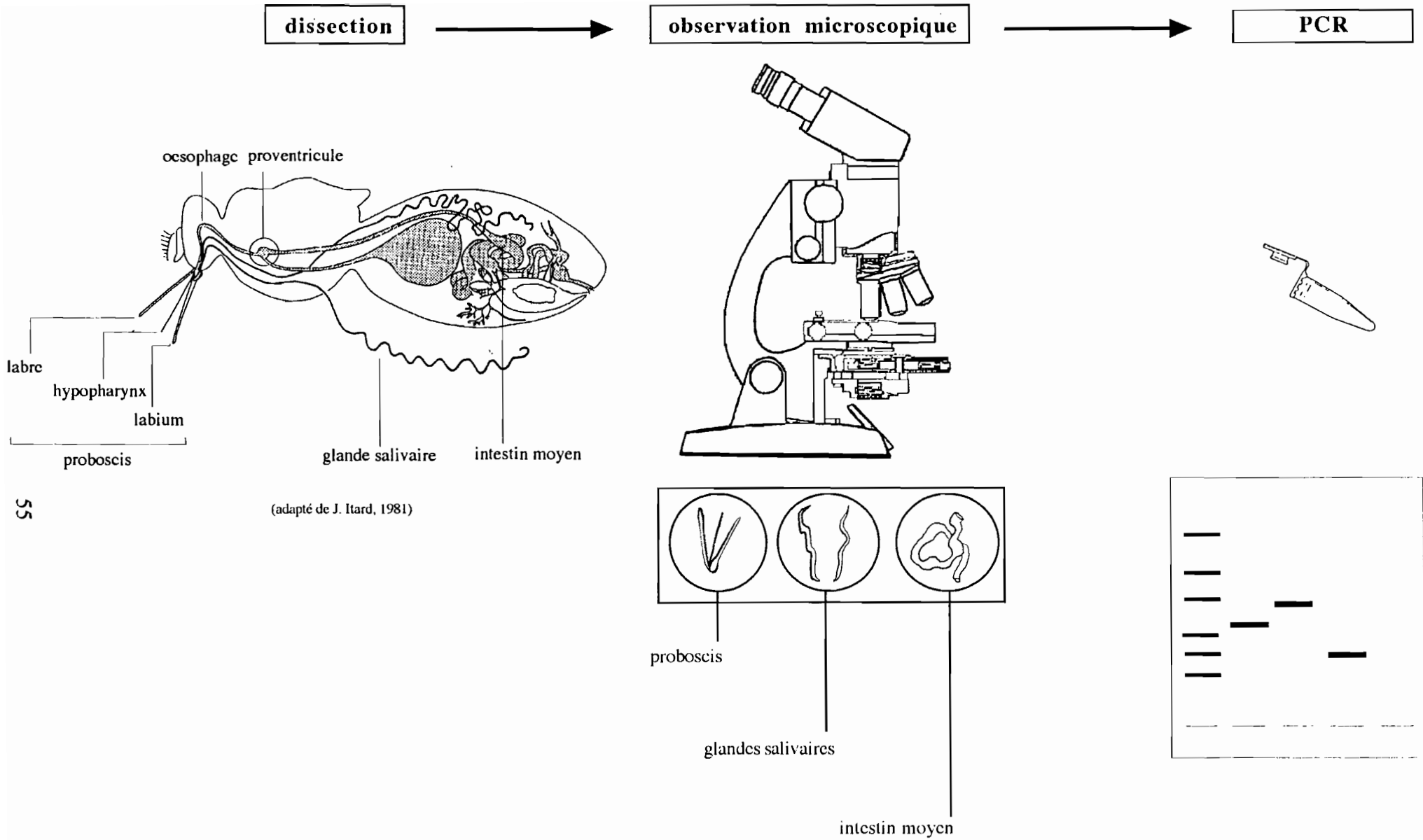


Figure 8 : Méthodologie suivie pour la détection et l'identification des trypanosomes chez la glossine

2-4-2. Sélection des glossines infectantes

Les individus infectants sont donc sélectionnés grâce à la technique de salivation provoquée sur lame chauffée (Burtt, 1946; Youdeowei, 1975) réhabilitée récemment (Gidudu *et al.*, 1995). Notre méthode consiste à faire sonder individuellement chaque mouche 10 fois consécutivement dans trois gouttes de PSG (tampon Phosphate Salin Glucosé) chauffées, soit au total 30 sondages par glossine. Chaque goutte est examinée au microscope et les glossines ayant émis des trypanosomes au cours de ces 30 sondages sont retenues.

Les trypanosomes émis par une glossine infectée présentent deux types morphologiques selon leur stade de maturation. Les épimastigotes, formes non infectantes qui se multiplient dans le labre, présentent une forme allongée et un flagelle libre. Les métatrypanosomes, formes infectantes localisées dans l'hypopharynx, sont plus trapus et sont dotés d'un très court flagelle libre, parfois inexistant.

2-4-3. Protocole du suivi individuel des individus infectants (figure 9)

Chaque glossine ainsi sélectionnée est soumise, après un jeûne de 72 h, à trois tests successifs selon la chronologie suivante :

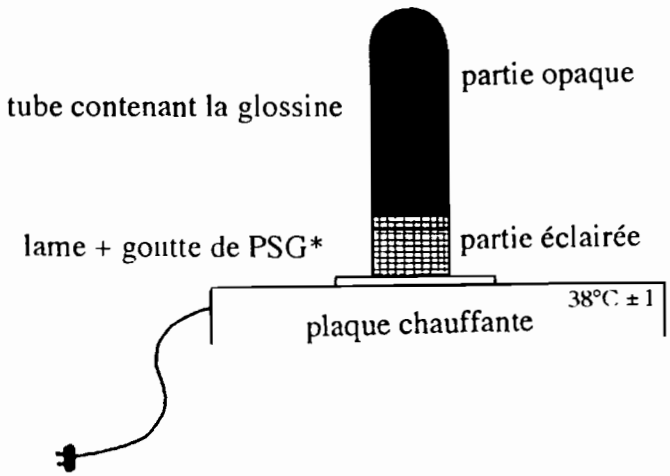
- une première série de 10 sondages successifs dans une première goutte de PSG chauffée, dont l'examen microscopique révèle le nombre et le type morphologique des parasites émis,
- une deuxième série de 10 sondages successifs, immédiatement après la première, dans une seconde goutte de PSG. Celle-ci est récupérée grâce à une micropipette pour être analysée par PCR,
- un repas sur souriceau âgé de 10 à 15 jours, permettant d'étudier l'évolution de l'infectivité de chaque mouche par "xénodiagnostic inverse" (Nitcheman et Jacquiet, 1990).

La durée du suivi varie selon la longévité de l'individu (de 28 à 70 jours).

Afin de faciliter la discussion, un "essai" est défini par l'ensemble des trois tests utilisés pour mettre en évidence les parasites à un moment donné.

2-4-4. Sélection des glossines non infectantes

La sélection des glossines non infectantes, dans le stock initial de mouches ayant pris un repas infectant, consiste à faire sonder les mouches 10 fois consécutivement dans trois gouttes de PSG



* Tampon Phosphate Salin Glucosé

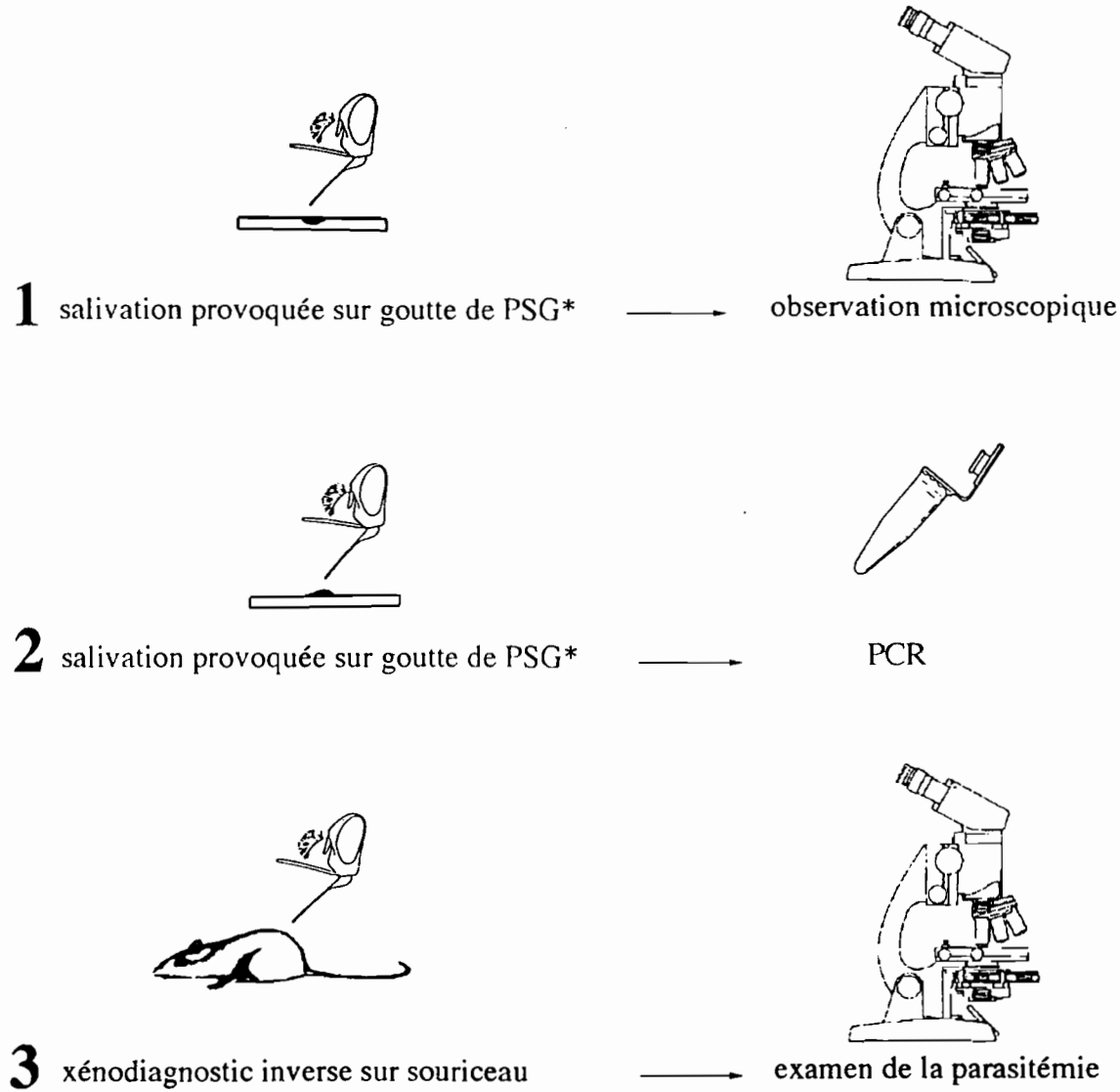


Figure 9 : Schéma représentant la méthodologie utilisée pour étudier les glossines infectantes : comparaison des techniques microscopique, PCR et xénodiagnostic inverse pour mettre en évidence les trypanosomes dans le salivat d'une glossine infectée.

chauffées. Si aucun trypanosome n'est observé au microscope dans les salivats, la glossine est considérée comme non infectante.

2-4-5. Protocole du suivi individuel des individus apparemment non infectants

Chaque glossine est nourrie, à raison de 3 repas successifs espacés de 72 h, sur un même souriceau. Au terme du dernier repas, chaque glossine est sacrifiée et disséquée. L'intestin moyen et le proboscis sont examinés au microscope. Le proboscis est récupéré dans un microtube Eppendorf contenant 50 µl d'eau distillée stérile pour être analysé par PCR.

3- Résultats et discussion sur les dissections des glossines

Toutes les données ont été analysées grâce au test du χ^2. Le seuil de signification est fixé à 0,05. Les performances vectorielles des glossines ont été évaluées selon l'indice proposé par Le Ray (1989). Le calcul de ce coefficient (Compétence Vectorielle Intrinsèque : CVI) repose sur le quotient entre **l'indice procyclique** (nombre de mouches infectées au niveau intestinal/nombre de mouches disséquées), et **l'indice métacyclique** (nombre de mouches infectées au niveau du proboscis/nombre de mouches infectées au niveau intestinal).

3-1. Infections expérimentales de glossines par *T. congolense* type "savane" (figure 10)

3-1-1. Comparaison des taux d'infection entre espèces et sous-espèces (annexe tableau A1)

Six cent vingt six glossines ont été infectées. Les pourcentages d'infection procyclique des glossines du groupe *morsitans* et des glossines du groupe *palpalis* ne diffèrent pas significativement (χ^2=0,87, p>0,05). Les pourcentages d'infection métacyclique sont significativement plus élevés chez les glossines du groupe *morsitans* que chez celles du groupe *palpalis* (χ^2=168,34, p<0,005). Au regard de ces résultats, nous constatons un taux d'infection immature (présence de parasites uniquement dans l'intestin moyen) significativement supérieur chez les glossines du groupe *palpalis* que chez les glossines du groupe *morsitans* (χ^2 =174,28, p<0,005).

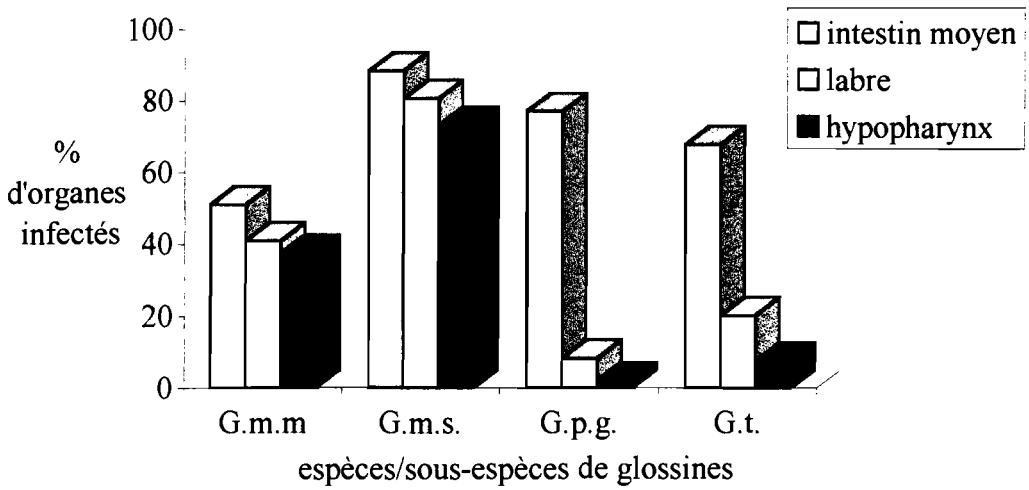


Figure 10 : Pourcentages d'infection obtenus dans les différents organes des 4 espèces et sous-espèces de glossines infectées par *T. congolense* E325 (type "savane")

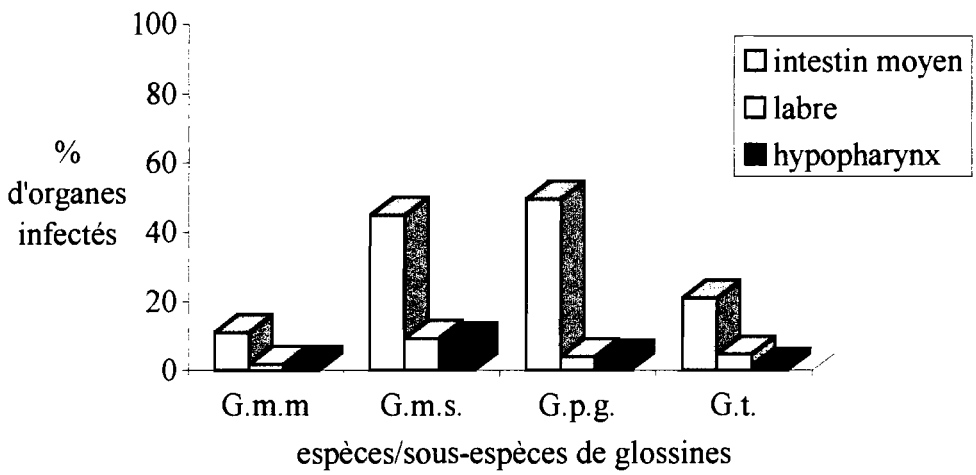


Figure 11 : Pourcentages d'infection obtenus dans les différents organes des 4 espèces et sous-espèces de glossines infectées par *T. congolense* Dinderesso/80/CRTA/3 (type "forêt")

G. m. m. : *G. morsitans morsitans*
G. m. s. : *G. morsitans submorsitans*
G. t. : *G. tachinoides*
G. p. g. : *G. palpalis gambiensis*

Dans le détail (annexe tableau A2), les pourcentages d'infection enregistrés dans l'intestin moyen, le labre et l'hypopharynx différent tous significativement.

Lors des dissections, les charges parasitaires ont été quantifiées selon le barème suivant :

(+) de 1 à 50 trypanosomes

(++) de 50 à 100 trypanosomes

(+++) non estimable

Les pourcentages d'infection massive (catégorie +++) sont significativement supérieurs aux pourcentages d'infection faible et moyenne (catégories + et ++ cumulées) chez les glossines du groupe *morsitans* par rapport aux glossines du groupe *palpalis*, quelle que soit la localisation anatomique (χ^2 =42,03, p<0,005 pour l'intestin moyen; χ^2 =17,78, p<0,005 pour le labre) (annexe tableau A13)

3-1-2. Comparaison des taux d'infection entre sexes

Les différences observées entre sexes ne sont pas significatives, à l'exception des pourcentages d'infection métacyclique chez *G. p. gambiensis* en faveur des mâles (χ^2 =32,55, p<0,005) et des pourcentages d'infection procyclique chez *G. tachinoides* en faveur des femelles (χ^2 =7,54, p<0,010).

3-1-3. Comparaison des indices de Compétence Vectorielle Intrinsèque (CVI) (annexe tableau A3)

Pour ce clone de parasite, les indices des glossines du groupe *morsitans* sont les plus élevés, notamment chez *G. m. submorsitans*. Les indices des glossines du groupe *palpalis* sont beaucoup plus bas, particulièrement *G. p. gambiensis*, qui exprime les performances vectorielles les plus faibles.

La compétence vectorielle des femelles de *G. m. morsitans* et de *G. tachinoides* est supérieure à celle des mâles. La compétence vectorielle des mâles de *G. m. submorsitans* et de *G. p. gambiensis* est supérieure à celle des femelles.

3-2. Infections expérimentales de glossines par *T. congolense* type "forêt" (figure 11)

3-2-1. Comparaison des taux d'infection entre espèces et sous-espèces (annexe tableau A4)

Sept cent huit glossines ont été infectées. Les infections intestinales sont significativement plus nombreuses chez les glossines du groupe *palpalis* que chez les glossines du groupe *morsitans* (χ^2 =16,68, p<0,005). En revanche, aucune différence significative n'est observée au niveau du labre entre les deux groupes.

Les infections immatures prédominent significativement chez les espèces et sous-espèces du groupe *palpalis* par rapport aux glossines du groupe *morsitans* (χ^2=18,70, p<0,005).

Les comparaisons entre sous-espèces sont détaillées dans le tableau 5 de l'annexe : toutes les différences observées au niveau intestinal sont significatives, sauf entre *G. m. submorsitans* (43%) et *G. p. gambiensis* (49,5%). Dans le labre, les écarts notés entre *G. m. morsitans* et *G. p. gambiensis*, *G. m. morsitans* et *G. tachinoides*, *G. p. gambiensis* et *G. tachinoides* ne sont pas statistiquement significatifs.

Aucune différence significative dans les classes de charges parasitaires (annexe tableau A13) entre les glossines du groupe *morsitans* et les glossines du groupe *palpalis* n'est enregistrée.

3-2-2. Comparaison des taux d'infection entre sexes

A l'exception de *G. p. gambiensis*, où les femelles porteuses de parasites dans l'intestin moyen sont significativement plus nombreuses que les mâles (χ^2 =18,18, p<0,005), mâles et femelles des autres sous-espèces ne diffèrent ni par la prévalence de l'infection procyclique ni par celle de l'infection métacyclique.

3-2-3. Comparaison des indices de Compétence Vectorielle Intrinsèque (annexe tableau A6)

Pour ce clone de *T. congolense*, les sous-espèces de glossines se classent par ordre d'indice décroissant selon la chronologie suivante : *G. m. submorsitans*, *G. tachinoides*, *G. p. gambiensis* et *G. m. morsitans*. Ces indices sont très faibles du fait de la quantité très modeste d'infections matures.

La compétence vectorielle des femelles du groupe *morsitans* est supérieure à celle des mâles. La compétence vectorielle des mâles du groupe *palpalis* est supérieure à celle des femelles.

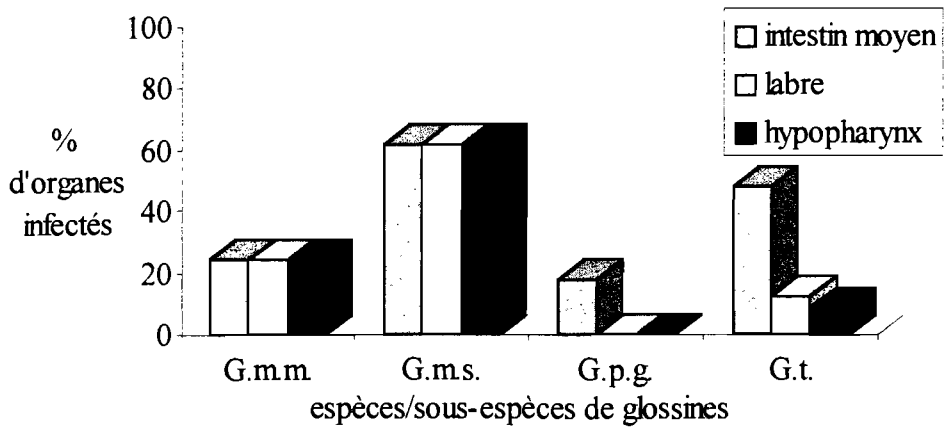


Figure 12 : Pourcentages d'infection obtenus dans les différents organes des 4 espèces et sous-espèces de glossines infectées simultanément par *T. congolense* E325 (type "savane") et par *T. congolense* Dinderesso/80/CRTA/3 (type "forêt")

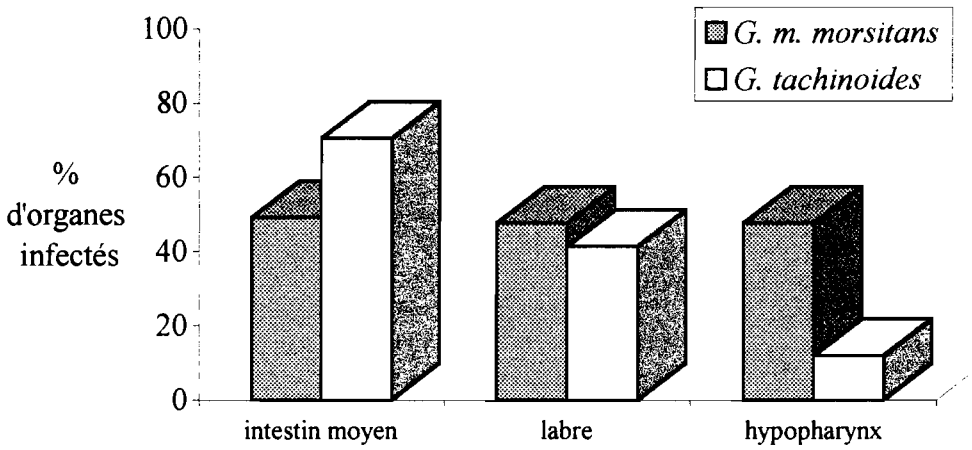


Figure 13 : Pourcentages d'infection obtenus dans les différents organes de *G. m. morsitans* et *G. tachinoides* infectées simultanément par *T. congolense* E325 (type "savane") et par *T. vivax* Y486 (type "Af. de l'Ouest")

G. m. m. : *G. morsitans morsitans*
G. m. s. : *G. morsitans submorsitans*
G. t. : *G. tachinoides*
G. p. g. : *G. palpalis gambiensis*

3-3. Infections expérimentales mixtes par *T. congolense* type "savane" et par *T. congolense* type "forêt" (figure 12)

3-3-1. Comparaison des taux d'infection entre espèces et sous-espèces (annexe tableau A7)

Deux cent soixante dix huit glossines ont été infectées. L'atteinte intestinale par les formes procycliques révèle qu'il n'y a pas de différence significative entre les glossines du groupe *morsitans* et celles du groupe *palpalis* (χ^2 =0,34, p>0,05). Par contre, les pourcentages d'infection dans le labre des mouches du groupe *morsitans* sont significativement supérieurs à ceux des glossines du groupe *palpalis* (χ^2=36,59, p<0,005).
Les comparaisons entre les taux d'infection dans les trois organes sont détaillées dans le tableau A8 placé en annexe.

3-3-2. Comparaison des taux d'infection entre sexes

Aucune différence significative liée au sexe n'a été notée.

3-3-3. Comparaison des indices de Compétence Vectorielle Intrinsèque (annexe tableau A9)

L'indice de *G. m. submorsitans* est le plus fort et celui de *G. tachinoides* est le plus faible. L'ordre des indices est très proche de celui obtenu dans la cadre des infections simples à *T. congolense* type "savane".
La compétence vectorielle des femelles est supérieure à celle des mâles chez *G. tachinoides*.
La compétence vectorielle des mâles est supérieure à celle des femelles chez *G. m. morsitans* et *G. m. submorsitans*.

3-3-4. Résultats par la technique PCR

Parmi tous les échantillons identifiés par PCR, 5 infections mixtes ont été détectées (intestin moyen et proboscis), dont 1 chez *G. m. morsitans* et 4 chez *G. m. submorsitans*. Aucune amplification n'est apparue à partir de suspensions intestinales infectées de 7 individus, conséquence probable d'inhibitions résiduelles de la Taq Polymerase. Parmi ces 7 échantillons, 4

sont originaires de glossines présentant une infection métacyclique à *T. congolense* type "savane", donc hébergeant vraisemblablement au moins ce taxon dans l'intestin moyen.

3-4. Infections expérimentales mixtes par *T. congolense* type "savane" et par *T. vivax* type "Afrique de l'ouest" (figure 13)

3-4-1. Comparaison des taux d'infection entre espèces et sous-espèces (annexe tableaux A10 et A11)

Cent dix neuf glossines ont été infectées. Le taux d'infection dans l'intestin moyen est significativement plus élevé chez *G. tachinoides* que chez *G. m. morsitans*. Le pourcentage d'infection dans le labre est supérieur chez *G. m. morsitans*, mais de manière non significative. En revanche, la colonisation des trypanosomes dans l'hypopharynx apparaît significativement supérieure chez *G. m. morsitans* que chez *G. tachinoides*.

3-4-2. Comparaison des taux d'infection entre sexes

Une seule différence significative apparaît dans le pourcentage d'infection procyclique chez *G. tachinoides* en faveur des femelles (χ^2=5,39, p<0,010).

3-4-3. Comparaison des indices de Compétence Vectorielle Intrinsèque (annexe tableau A12)

La compétence vectorielle de *G. m. morsitans* est supérieure à celle de *G. tachinoides*. L'indice des femelles est supérieur à celui des mâles chez les deux sous-espèces, plus particulièrement chez *G. m. morsitans*.

3-4-4. Résultats par la technique PCR

La technique PCR n'a été appliquée que sur les proboscis trouvés positifs en microscopie puisque les infections mixtes matures ne peuvent se développer que dans les pièces buccales (le cycle de *T. vivax* ne passe théoriquement pas dans l'intestin moyen). Toutefois, 20 intestins parasitologiquement positifs ont été également testés. Quatre infections mixtes ont été ainsi révélées (1 chez *G. m. morsitans* et 3 chez *G. tachinoides*). L'identification par PCR des

trypanosomes observés dans l'intestin moyen et le proboscis d'un même individu (*G. tachinoides*) a révélé la présence concomitante de *T. congolense* dans l'intestin (infection immature) et de *T. vivax* dans la trompe (infection mature). Tous les intestins testés par PCR ont indiqué la présence de *T. congolense*. Aucune trace intestinale de *T. vivax* n'a été décelée par cette méthode.

3-5. Analyse statistique globale des taux d'infection

3-5-1. Influence du facteur "clone de *T. congolense*"

Si nous considérons l'ensemble des infections simples obtenues avec les 4 espèces et sous-espèces de glossines, les taux d'infection obtenus avec le clone "savane" sont significativement plus élevés dans l'intestin (72,8%) (χ^2 =237,39, p<0,005) et le labre (32,2%) (χ^2 =173,75, p<0,005) que les taux obtenus avec le clone "forêt" (intestin : 30,3%; labre : 5,2%).

3-5-2. Influence du facteur "espèce de glossine"

Sur la totalité des résultats, les taux d'infection procyclique sont significativement supérieurs chez les glossines du groupe *palpalis* (55,7%) par rapport à ceux des glossines du groupe *morsitans* (43,8%) (χ^2=24,3, p<0,005). En revanche, les pourcentages d'infection métacyclique sont beaucoup plus élevés chez les glossines du groupe *morsitans* (32,8%) que les glossines du groupe *palpalis* (10,9%) (χ^2 =122,5, p<0,005). Il en résulte un taux d'infection immature prédominant chez les glossines du groupe *palpalis* (44,8%) par rapport aux glossines du groupe *morsitans* (10%) (χ^2=261,9, p<0,005).

3-5-3. Influence du facteur "sexe"

Dans le groupe *morsitans*, quel que soit le site de localisation parasitaire, nous n'enregistrons pas de différence significative du taux d'infection entre les mâles et les femelles (intestin moyen : χ^2 = 0,59, labre : χ^2=1,82, p>0,05).

Dans le groupe *palpalis*, les femelles (63%) sont plus infectées que les mâles (43,2%) au niveau intestinal (χ^2 =32,57, p<0,005). Par contre, dans le proboscis, aucune différence significative n'est constatée entre les sexes (χ^2=0,015, p>0,05).

De manière globale, toutes données cumulées, les femelles (52,7%) s'infectent mieux que les mâles (41,8%) dans l'intestin moyen (χ^2 =19,24, p<0,005). Le taux d'infection métacyclique est en revanche significativement supérieur chez les mâles (24,4%) par rapport aux femelles (19,9%) (χ^2=4,80, p<0,010).

3-5-4. Influence du mode d'infection

Le taux d'infection procyclique (toutes glossines confondues) obtenu lorsque le repas infectant a été réalisé *in vivo* (50,3%) ne diffère pas statistiquement du taux obtenu lorsque les mouches sont infectées *in vitro* (49,3%) (χ^2=0,10, p>0,05).
En revanche, les taux obtenus dans le labre (37,4%) et l'hypopharynx (32,4%) après infection *in vivo* sont significativement supérieurs à ceux obtenus après infection sur membrane (labre : 17,9%; χ^2=67,3 p<0,005 et hypopharynx : 13,9%, χ^2=70,6 p<0,005).
Le mode d'infection n'a donc pas d'influence significative sur l'installation des trypanosomes dans l'intestin moyen. Cependant, compte tenu de ces résultats, l'hypothèse selon laquelle il influe sur le déroulement de la métacyclogénèse dans le proboscis ne peut être exclue.

3-6. Discussion

3-6-1. Infections simples

Les taux d'infection mature obtenus avec *T. congolense* type "savane" confirment l'excellente compétence vectorielle reconnue des glossines du groupe *morsitans* vis-à-vis des trypanosomes du sous-genre *Nannomonas*. Les pourcentages d'infection obtenus chez *G. m. morsitans* sont très proches de ceux obtenus par Lamine Dia (1993) dans des conditions très semblables. La réceptivité de *G. m. submorsitans* est particulièrement remarquable avec un taux d'infection mature de 73,3%. Un taux de maturation de 75% fait figure de record chez *G. m. centralis* infectée par un autre clone de *T. congolense* (Moloo et Kutuza, 1988). Des taux d'infection mature de 100% ont été rapportés pour le même couple parasite/vecteur, lorsque le sang est additionné de manière contrôlée de D+ glucosamine, qui en inhibant les lectines intestinales accroît la réceptivité des glossines (Welburn et Maudlin, 1989).
De nombreuses études relatent des observations analogues sur le terrain (Harley et Wilson, 1968; Roberts et Gray, 1972; Diallo, 1985) et au laboratoire (Lyndhurst, 1936; Moloo et Kutuza, 1988; Moloo *et al*, 1992; Moloo *et al.*, 1994; Moloo et Gooding, 1995).

Une nuance doit être cependant apportée puisque, dans notre expérience, des taux d'infection immature excédant 70% ont été enregistrés chez *G. m. morsitans* et *G. m. submorsitans* infectées par le clone "forêt". Ce résultat contradictoire ne peut être attribué à l'origine géographique distincte des parasites et des vecteurs. Les meilleurs taux d'infection mature ont été obtenus avec *G. m. submorsitans*, originaire du Burkina Faso, infectée par *T. congolense* E325, isolé en Ouganda. Le taux de maturation est très faible chez *G. p. gambiensis* infectée par le clone "forêt", alors que le vecteur et le parasite sont tous deux originaires du Burkina Faso. Moloo et Kutuza (1988) parviennent à des conclusions comparables en infectant au laboratoire plusieurs espèces et sous-espèces de glossines avec deux autres clones de *T. congolense*, l'un originaire de Tanzanie, l'autre originaire du Nigeria.

Le contrôle systématique de la parasitémie des animaux infectants avant d'infecter les mouches a permis de s'affranchir du doute de la présence effective des trypanosomes dans la circulation périphérique des animaux au moment du repas sanguin. Une glossine absorbe en moyenne l'équivalent de son propre poids en sang. Sur la base d'un volume moyen de 25 milligrammes de sang provenant d'un animal infecté dont la parasitémie varie de 0,5 à 2.10^6 trypanosomes par millilitre, une glossine absorbe entre 12 500 et 50 000 trypanosomes au cours de son repas. Sachant qu'un seul trypanosome suffit pour infecter une glossine (Maudlin et Welburn, 1989), l'hypothèse de l'absence ou de trop peu de parasites dans le sang ingéré (Mihok *et al.*, 1991) pour justifier les différences enregistrées au niveau de l'intestin entre les deux clones, n'est pas concevable.

L'origine du repas sanguin pourrait expliquer au moins partiellement les différences de comportement observées entre les clones de *T. congolense* chez la glossine. Les repas infectants avec le type "savane" et le type "forêt" ont été réalisés respectivement sur lapin et sur souris. Des études ont montré que le sang contient des facteurs indéterminés qui, selon l'hôte d'origine, influent plus ou moins sur le succès ou l'échec de l'installation des trypanosomes dans l'intestin des glossines (Mihok *et al.*, 1993). La diversité des hôtes au cours des repas de sang ultérieurs (Geigy *et al.*, 1971) a aussi son importance, mais toutes les glossines infectées de notre expérience, quelle que soit le clone de trypanosome, ont été entretenues sur le lapin dont les qualités d'hôte nourricier au laboratoire sont bien reconnues (Moloo, 1981), ce qui rend peu probable une quelconque influence du repas d'entretien sur les taux d'infection.

Les glossines appartenant au groupe *palpalis* sont considérées, de manière générale, comme des vecteurs peu efficaces de *T. congolense* (Willett *et al.*, 1964; Moloo et Kutuza, 1988; Moloo *et al.*, 1992; Lamine Dia, 1993) et *T. simiae* (Agu, 1984; Moloo *et al.*, 1994). Les faibles taux d'infection mature acquis par *G. p. gambiensis* et *G. tachinoides*, quelle que soit le clone de *T.*

congolense utilisée dans notre expérience, confirment cette tendance. Cette incompatibilité ne s'exprime pas invariablement au stade de l'acquisition de l'infection puisque les taux d'infection dans l'intestin sont dans certains cas très importants, mais surtout pendant les phases de migration des trypanosomes et de maturation dans les pièces buccales.
Les différences constatées dans les performances vectorielles sont attribuées surtout, dans l'état actuel des connaissances, aux mécanismes complexes d'action des symbiontes intestinaux, les R.L.O. (Rickettsia-Like Organisms) (Welburn et Maudlin, 1989; Maudlin et Welburn, 1994), qui favorisent non seulement l'installation des trypanosomes dans l'intestin moyen, mais aussi leur migration et leur maturation dans le proboscis pour aboutir au stade infectant (voir chapitre II, paragraphe 1-4). Les mécanismes intimes de la métacyclogénèse des trypanosomes sont loin d'être élucidés. Certaines connaissances sont néanmoins acquises : ce processus serait au moins partiellement lié à un déterminisme génétique associé aux différents stocks de parasites, qui conférerait un nombre variable de sites de fixation membranaire des lectines intestinales aux formes procycliques (Maudlin et Welburn, 1988). D'après ces derniers auteurs (1990), la faible compétence vectorielle des glossines du groupe *palpalis* pour *T. congolense* serait aussi déterminée par l'activité de lectines présentes en concentrations moindres que chez *G. m. morsitans*. D'autres lectines spécifiques au rôle exact méconnu, absentes chez *G. m. morsitans*, ont été découvertes chez *G. p. palpalis* (Maudlin et Welburn, 1994).

L'objectif qui prévalait dans cette étude était de conforter au laboratoire certains faits de terrain, à savoir les relations d'affinité suspectées entre d'une part *T. congolense* type "savane" et les glossines du groupe *morsitans*, et d'autre part *T. congolense* type "forêt" et les glossines du groupe *palpalis*. Il aurait alors été envisageable d'assigner un critère biologique à ces taxons dont la seule particularité véritablement discriminante est la séquence satellite génomique sur laquelle est basé le marqueur moléculaire spécifique. Les taux d'infection mature obtenus avec *T. congolense* "savane" corroborent cette hypothèse : les espèces savanicoles sont significativement plus infectées (en nombre d'individus), et plus massivement (en nombre de parasites), que les espèces riveraines. En revanche, bien que *G. p. gambiensis* montre le plus fort taux d'infection intestinale, l'hypothétique affinité entre les glossines riveraines et le type "forêt" apparaît de manière beaucoup moins forte. En terme de compétence vectorielle vis-à-vis de ce taxon, *G. m. submorsitans* représente le meilleur vecteur, et *G. p. gambiensis* et *G. tachinoides* ont un indice légèrement supérieur à celui de *G. m. morsitans*. En raison du très faible nombre d'infections matures, ces indices ont une valeur généralement basse et il serait audacieux de donner une interprétation catégorique à ces comparaisons d'indices.

Sur la base de ces résultats, on ne peut conclure à une relation d'affinité stricte liant les taxons de *T. congolense* et les sous-espèces de glossines choisis pour cette étude. Notre modèle expérimental concrétise une hypothèse plus générale basée sur des spécificités vectorielles observées sur le terrain. D'autres facteurs biotiques et abiotiques régissent le système parasite/vecteur en conditions naturelles : le spectre d'hôtes vertébrés, la disponibilité en nourriture et ses variations saisonnières, la diversité des parasites ingérés au cours des différents repas sanguins, la température, autant d'éléments naturels qui ne peuvent être pris en compte en conditions expérimentales. De plus, les colonies de glossines et les souches de trypanosomes sont entretenus au laboratoire depuis de nombreuses années. La "consanguinité" de l'élevage de glossines et les lignées parasitaires sont probablement un reflet appauvri du polymorphisme génétique originel. N'oublions pas également que les méthodes artificielles d'infection sont potentiellement perturbatrices pour les mouches, et nos conditions volontairement optimales d'infection (ténéralité des glossines, animaux infectants fortement parasitémiques...) offrent une situation très simplifiée de la complexité naturelle.

3-6-2. Infections mixtes

Le pourcentage de réussite d'infection mixte avec les deux clones de *T. congolense* s'est avéré très faible (1,8%). Excepté 5 individus du groupe *morsitans*, dont 4 appartenant à la sous-espèce *submorsitans*, qui ont développé des infections mixtes matures, toutes les autres glossines ont révélé une infection du type "savane". Le mode d'infection sur membrane pourrait avoir favorisé le maintien d'un clone par rapport à l'autre, présomption suggérée par la faible pathogénicité du type "forêt" pour les rongeurs et les lapins par rapport au type "savane". Son exclusion de la plupart des glossines pourrait s'expliquer par une fragilisation préalable due aux paramètres artificiels d'infection.

Nos résultats expérimentaux montrent que le protocole utilisé pour infecter les glossines n'influence pas significativement les taux d'infection intestinale. De plus, des essais préliminaires d'infections simples à *T. congolense* type "forêt", dans les mêmes conditions d'infection *in vitro*, ont engendré avec succès des glossines infectées et infectantes, confirmant l'improbabilité de ces suppositions.

Il est concevable qu'un phénomène de compétition soit responsable de l'exclusion du type "forêt" au moment de l'installation de l'infection dans l'intestin. Des faits analogues ont été observés dans le cadre d'infections expérimentales de glossines avec des clones différents de *T. brucei*, réalisées dans des conditions similaires, se traduisant dans l'intestin par la disparition fréquente

d'un clone au profit de l'autre (W. Gibson, com. pers.). Les deux souches se multiplient en effet dans un environnement limité en espace et en ressources. Le comportement du type "forêt" chez l'animal de laboratoire suggère un taux de multiplication inférieur à celui du type "savane"; un désavantage numérique initial du type "forêt" est possible, malgré notre volonté d'infecter les glossines avec une concentration parasitaire équivalente de chaque clone. D'après Mayr (1974), ces conditions suffisent à justifier ce phénomène de compétition apparent entre les deux souches de trypanosomes dans l'intestin des glossines. Néanmoins, il est important de tenir compte dans ces observations du caractère plus ou moins réceptif de la glossine vis-à-vis de clones différents de trypanosomes. L'exclusion d'un clone au profit de l'autre est vraisemblablement liée à la fois à des phénomènes de compétition intra ou "intertaxonique", et à des différences de compatibilité génétique avec l'hôte invertébré.

Il est intéressant de constater que toutes les glossines présentant une infection mixte dans l'intestin montraient également une infection mixte dans le proboscis. Ces observations sont à rapprocher de résultats similaires obtenus dans le cadre des infections expérimentales mixtes avec des clones différents de *T. brucei* citées précédemment (W. Gibson, com. pers.), où toutes les glossines présentant les deux clones dans l'intestin moyen révélaient également leur présence concomitante dans les glandes salivaires. Cela montre que ces phénomènes de compétition, s'ils existent, opèrent essentiellement au niveau intestinal et ne semblent pas interférer avec les processus de maturation des trypanosomes.

La présence concomitante de ces deux taxons de *T. congolense* fut mise en évidence chez *G. longipalpis* en Côte d'Ivoire (Solano *et al.*, 1995) et chez *G. pallidipes* au Zimbabwe (Woolhouse *et al.*, 1996). D'après ces derniers auteurs, *T. congolense* type "forêt" ne pourrait se développer chez certaines sous-espèces de glossines qu'en présence du type "savane". Les quelques infections mixtes que nous avons pu acquérir expérimentalement chez *G. m. submorsitans*, observation faite pour la première fois chez cette sous-espèce, pourraient étayer cette éventualité.

D'après les résultats de Gibson et Ferris, 1992, sur la base d'infections séquentielles de glossines avec plusieurs clones de *T. congolense* et *T. brucei*, la conception selon laquelle une souche acquise au niveau intestinal pourrait sécréter des facteurs aidant l'installation et la multiplication d'une seconde souche ingérée lors d'un repas suivant parait très improbable. Notre étude expérimentale mériterait d'être complétée par une expérience similaire avec nos deux clones de *T. congolense*, afin de vérifier si le caractère simultané ou séquentiel de l'ingestion de plusieurs souches de trypanosomes a une influence sur la proportion et l'évolution des infections mixtes.

Deux raisons principales ont guidé notre choix d'aborder les infections mixtes avec *T. congolense* "savane" et *T. vivax*. D'un point de vue appliqué, ces parasites figurent parmi les trypanosomes pathogènes les plus importants pour le bétail en Afrique. D'un point de vue plus fondamental, ce modèle diffère du précédent dans la mesure où la phase d'initiation du cycle évolutif de *T. vivax* siège dans le proboscis et la région cibariale (Moloo et Gray, 1989), écartant ainsi toute possibilité de compétition éventuelle avec *T. congolense* au niveau intestinal en début de cycle.

Le taux d'infection procyclique lorsque *G. tachinoides* et *G. m. morsitans* sont infectées simultanément avec *T. congolense* type "savane" et *T. vivax* est sensiblement équivalent à celui obtenu lorsque les glossines sont infectées avec *T. congolense* "savane" seul; ce taux était nettement inférieur dans le cadre des infections mixtes à *T. congolense* types "savane" et "forêt". A la différence de *T. congolense* type "forêt", la présence de *T. vivax* dans le repas sanguin infectant ne semble pas modifier le taux d'infection à *T. congolense* type "savane" au niveau intestinal. Ceci corrobore l'hypothèse selon laquelle une compétition pourrait s'instaurer entre les souches de trypanosomes dont le cycle évolutif débute dans l'intestin moyen.

En revanche le taux d'infection dans le labre est supérieur à celui qui a été obtenu dans le cadre des infections simples et mixtes avec les deux taxons de *T. congolense*. Ceci apparaît nettement chez *G. tachinoides* avec une variation de 20,4% (infections simples à *T. congolense* "savane") à 41,3% (infections mixtes à *T. congolense* "savane" et *T. vivax*). Cette observation conforte l'hypothèse énoncée au paragraphe précédent (Woolhouse *et al.*, 1996), qui stipule que la présence d'une souche de trypanosome peut aussi faciliter la maturation d'une seconde. La majorité des infections mixtes à *T. congolense* "savane" et *T. vivax* se sont développées chez *G. tachinoides*, alors que la métacyclogénèse de *T. congolense* est habituellement difficile chez cette sous-espèce.

G. tachinoides est réputée pour sa forte capacité à transmettre *T. vivax* (Baldry, 1968; 1969; Leak, 1996). Cette tendance se dessine aussi dans cette expérience, malgré le faible effectif des glossines.

Cette approche expérimentale des infections mixtes à *T. congolense* et *T. vivax* souligne l'intérêt des biotechnologies pour s'affranchir des erreurs ou des lacunes induites par les techniques parasitologiques classiques de détection et d'identification des trypanosomes chez la glossine. Ainsi, la présence de *T. vivax* n'aurait pu être mise en évidence selon les seuls critères de l'examen microscopique qui aurait déduit des dissections une infection du type *Nannomonas*, du fait de la présence de trypanosomes à la fois dans l'intestin et le proboscis.

Certains auteurs en inoculant à des souris des suspensions de proboscis infectés, ont montré la difficulté de révéler les infections mixtes à *T. congolense* et *T. brucei* compte tenu que *T. brucei* masque très souvent la présence de *T. congolense* (Tarimo *et al.*, 1987). Peu de souches de *T. vivax* s'adaptent aux rongeurs de laboratoire, et il est probable qu'une situation similaire se présente en inoculant à des souris un broyat de proboscis infectés par plusieurs souches de trypanosomes dont *T. vivax*. La technique PCR, en complément de l'examen microscopique, permet de contourner ces obstacles en identifiant les trypanosomes, même en faible nombre, *in situ*.

Notre étude montre que l'influence du sexe sur les taux d'infection est très variable en fonction de la glossine et du trypanosome considérés. Néanmoins, sur la totalité des infections, nos résultats sont en accord avec la tendance globale qui mentionne que la maturation de *T. congolense* en conditions expérimentales prévaut chez les mâles par rapport aux femelles (Mihok *et* al., 1992; Moloo *et al.*, 1992), comme cela fut démontré aussi avec *T. brucei* (Maudlin *et al.*, 1991). La forte capacité vectorielle des femelles sur le terrain (évaluée à trois fois supérieure à celle des mâles) est en grande partie liée à leur durée de vie (40 jours en moyenne) supérieure à celle des mâles (20 jours en moyenne) (Maudlin *et al.*, 1991).

4- Résultats et discussion sur l'émission salivaire provoquée de *T. congolense* type "savane" chez *G. tachinoides*

4-1. Suivi des glossines infectantes

4-1-1. Comptage microscopique des trypanosomes (figure 14; annexe tableau A14)

Pendant toute la durée de l'expérimentation (39 jours) qui a porté sur 9 femelles, l'observation microscopique révèle une très grande variabilité du nombre de trypanosomes émis, allant toutes formes confondues de 0 à 153 par essai. Le nombre de formes courtes (148 au maximum) est toujours supérieur au nombre de formes longues (36 au maximum). Les proportions respectives sont très fluctuantes dans le temps (figure 15).

Le nombre moyen de formes courtes émis par glossine varie de 5,36 (nombre d'essais : 22, e.t.= 5,2) chez l'individu G3 à 19,41 (nombre d'essais : 26, e.t.= 32,3) chez l'individu G8. Le nombre moyen de formes longues varie de 0,26 (nombre d'essais : 19, e.t.=0,6) chez l'individu G13 à 6,53 (nombre d'essais : 13, e.t.= 9,9) chez l'individu G4.

4-1-2. Analyse des salivats par PCR (annexe tableau A15)

Les pourcentages de salivats détectés positifs par PCR varient entre un minimum de 75% pour l'individu G2 à un maximum de 100% pour les individus G4 et G13. Ces pourcentages se situent autour de 80% pour les autres glossines, excepté pour l'individu G6 où il atteint 93% (figure 16).

4-1-3. Xénodiagnostic inverse sur souriceaux (annexe tableau A15)

Les pourcentages de souriceaux infectés varient entre un minimum de 22% pour l'individu G9 à 100% pour les individus G4 et G13. Les glossines G2, G3, G7 et G8 ont transmis la maladie à plus de 64% des souriceaux. Ce pourcentage atteint 85 et 90% chez les individus G6 et G11, respectivement.

Notons que l'analyse des salivats par PCR et le xénodiagnostic inverse donnent des résultats concordants pour les individus G4 et G13 (100% de salivats positifs par PCR et 100% de souriceaux infectés) (figure 16).

4-2. Suivi des glossines non infectantes (tableau VI)

4-2-1. Résultat des dissections (examen parasitologique)

Sur les 40 glossines considérées comme non infectantes lors de leur sélection par la technique de salivation, la dissection révèle en fait 10 individus (25%) présentant des trypanosomes dans le proboscis. Sur ces 10 mouches, 7 sont infectées à la fois dans le labre et l'hypopharynx (statut infectant) et 3 uniquement dans le labre (statut non infectant). L'âge de ces mouches varie de 52 à 90 jours.

4-2-2. Xénodiagnostic inverse sur souriceaux

Le suivi de la parasitémie des souriceaux montre que parmi les 7 glossines infectantes, 2 n'ont pas transmis la maladie au rongeur nourricier, ceci malgré les trois repas consécutifs sur le même animal. Les trois mouches infectées au niveau du labre mais pour lesquelles aucune forme métacyclique n'avait été constatée dans l'hypopharynx n'ont pas infecté leur animal nourricier.

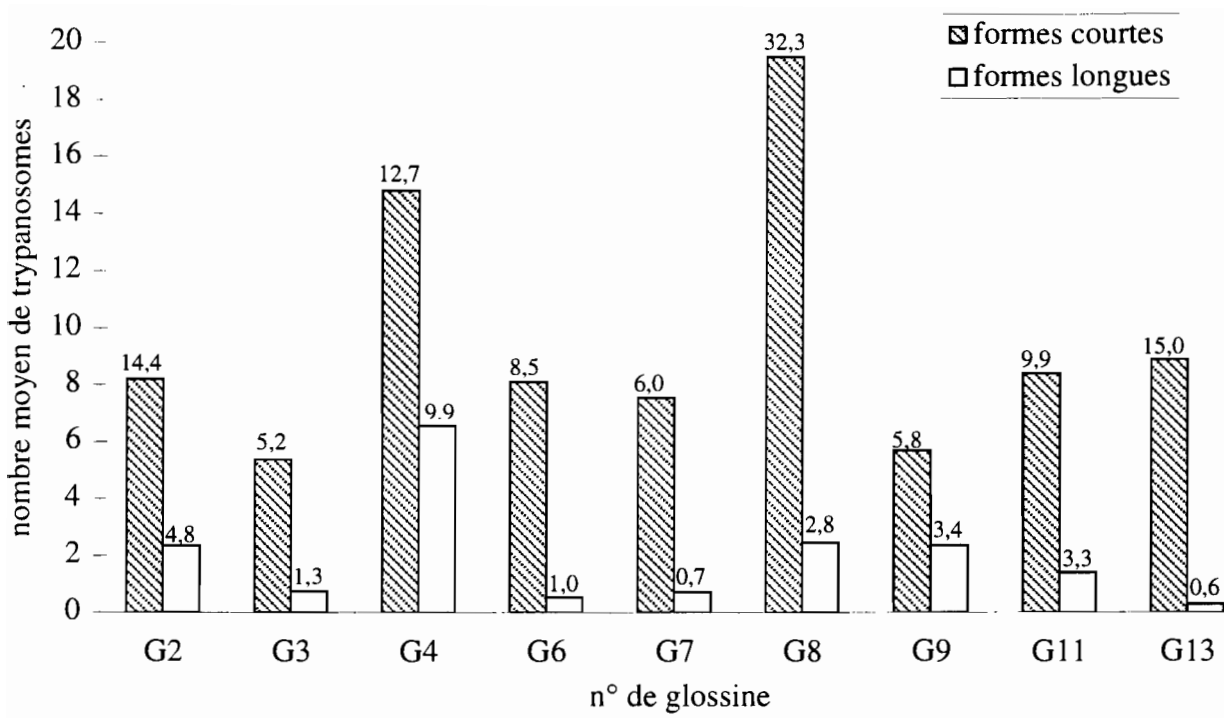


Figure 14 : Nombre moyen de trypanosomes observés dans les salivats de chaque *G . tachinoides* infectée par *T. congolense* type "savane" au cours de l'expérience (écarts type mentionnés au-dessus des diagrammes)

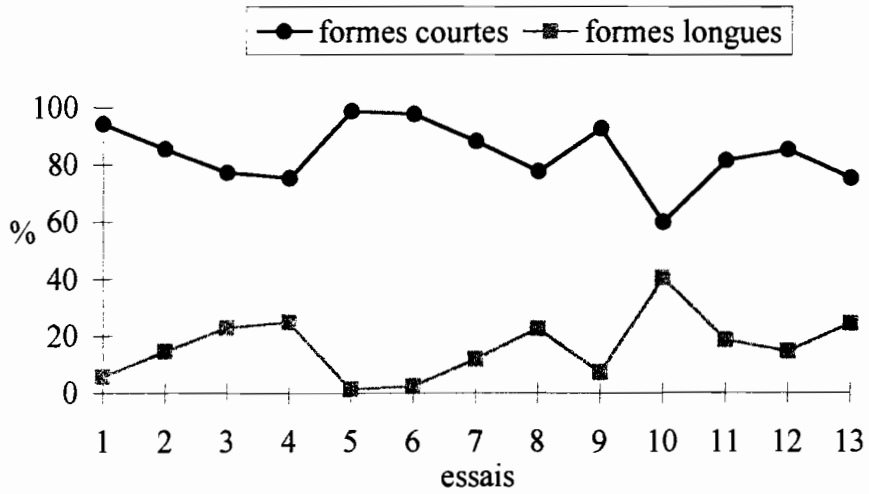


Figure 15 : Evolution du pourcentage de formes courtes et longues (toute glossine confondue) de *T. congolense* émises par *G. tachinoides* femelles au cours de 13 essais espacés de 72h (durée du suivi : 39j)

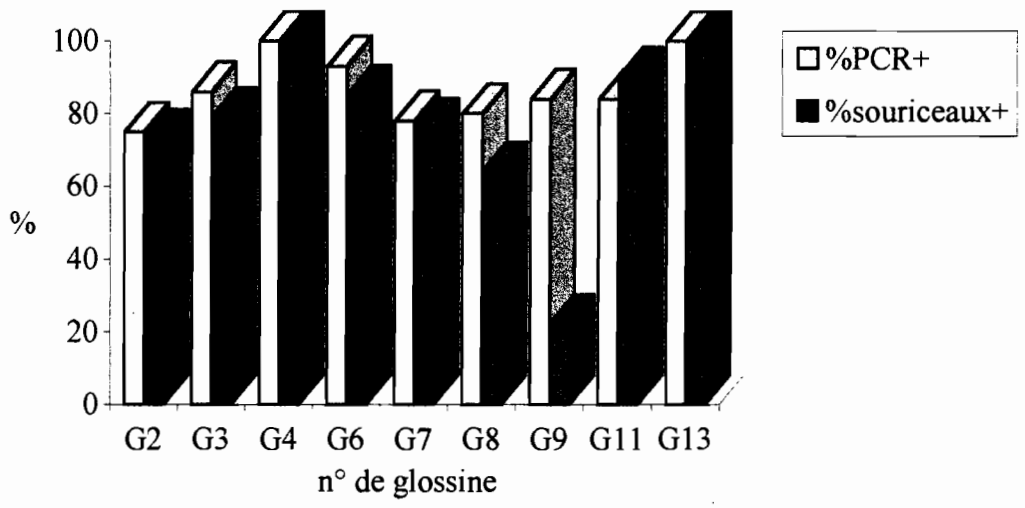


Figure 16 : Proportions de PCR positives et de souriceaux positifs observés pendant l'expérience pour chaque *G. tachinoides* infectée par *T. congolense* E325

4-2-3. Résultats par la technique PCR

La technique PCR appliquée sur les pièces buccales confirme les résultats parasitologiques. Les 10 proboscis dans lesquels ont été observés des parasites donnent un signal positif. Les 30 proboscis restants, négatifs à l'examen microscopique, sont aussi négatifs par PCR.

4-3. Comparaison des techniques de détection des trypanosomes chez les glossines trouvées infectantes (tableau VII)

Dans la grande majorité des essais, les trypanosomes sont détectés par une ou plusieurs des trois techniques (examen microscopique et/ou PCR et/ou xénodiagnostic inverse). Néanmoins, dans 2,9% des observations (5 essais sur un total de 171), aucun parasite n'a été détecté par l'ensemble des trois techniques au cours du même essai. La technique microscopique apparaît plus performante que la technique de xénodiagnostic inverse (χ_2 =17,12, p<0,005). La technique PCR est également plus efficace que le test d'infectivité sur souriceaux (χ_2 =9,60, p<0,005). Mais le pourcentage de cas positifs détectés au microscope (90%) n'est pas statistiquement différent (χ_2 =1,14, p>0,05) du pourcentage de salivats détectés positifs par PCR (86,2%).

4-4. Discussion

Le but de cette expérience était de mieux définir le comportement vecteur de *G. tachinoides* infectée par un clone de trypanosome appartenant à l'espèce *T. congolense*. Ce modèle expérimental nous a également permis d'évaluer différentes techniques de détection des parasites chez l'insecte vivant et chez l'insecte fraîchement disséqué. Les résultats des tests de salivation provoquée sur lame chauffée montrent que les techniques microscopiques et moléculaires appliquées sur les salivats sont sensiblement équivalentes pour détecter les glossines infectantes. En revanche, la méthode dite de xénodiagnostic inverse sur souriceau s'est révélée la moins performante. Cette constatation pourrait résulter des contraintes imposées aux glossines au cours des différentes manipulations. Une émission massive des parasites lors des premiers sondages est envisageable, les quantités éjectées diminuant si la glossine est stimulée de manière trop intensive (Roberts, 1981). Cette hypothèse pourrait expliquer que la transmission de la maladie aux souriceaux échoue parfois après deux séries préalables de 10 sondages successifs dans une goutte de PSG.

Tableau VI : Résultats sur les salivats de glossines infectées mais non détectées par la méthode de salivation sur lame chauffée : examen microscopique, analyse des proboscis par PCR et test d'infectivité sur souriceaux.

	Parasitologie			
Effectifs	Dissections	Interprétation	**PCR/proboscis**	**Souriceaux**
11/40 **(27,5%)**	IM- L- H-	négatives	11 -	11-
19/40 **(47,5%)**	IM+ L- H-	non infectantes	19 -	19-
3/40 **(7,5%)**	IM+ L+ H-	non infectantes	3 +	3-
7/40 **(17,5%)**	IM+ L+ H+	infectantes	7 +	5+

IM : intestin moyen
L : labre
H : hypopharynx.

Tableau VII : Résultats sur les salivats de glossines infectées : comparaison des techniques (observation microscopique des salivats, PCR sur les salivats, et xénodiagnostic inverse sur souriceaux) pour mettre en évidence les glossines infectantes.

	Microscopie	**PCR**	**Xénodiagnostic inverse**
présence (1)	153	144	146
absence (2)	17	23	54
total (3)	170	167	200
% de cas positifs	90	86,2	73,3

(1) Nombre d'observations où la présence de trypanosomes a été détectée
(2) Nombre d'observations où aucun trypanosome n'a été détecté
(3) Nombre total d'observations

Cette étude expérimentale révèle une grande variabilité individuelle dans la capacité de *G. tachinoides* à émettre des trypanosomes infectants au cours de la salivation. Dans notre modèle, les quantités émises se rapprochent des moyennes observées antérieurement chez *G. m. morsitans* infectée par d'autres souches de *T. congolense* (Mawuena *et al.*, 1984). Des observations similaires ont été décrites au laboratoire avec *G. m. morsitans* infectée par le même clone de trypanosome (Gidudu *et al.*, 1995). Cependant, comparativement à *G. m. morsitans*, les quantités émises par *G. tachinoides* sont moins importantes, corroborant les différences indéniables de capacité vectorielle entre les glossines du groupe *morsitans* et les glossines du groupe *palpalis* pour *T. congolense* type "savane" (Gidudu *et al.*, 1996). Ici, certaines femelles se révèlent des vecteurs plus efficaces que d'autres, tels les individus G4 et G13 qui ont transmis la maladie aux souriceaux dans 100% des cas et pour lesquels la technique PCR a révélé 100% des salivats positifs.

Les glossines infectantes ont été suivies à partir du moment où des trypanosomes avaient été observés par l'examen microscopique de leurs salivats au moment de leur sélection. Pour ces individus âgés de plus de 25 jours, le pourcentage de formes courtes, bien que fluctuant, est toujours supérieur au pourcentage de formes longues. Ceci est à rapprocher d'observations antérieures montrant à des stades plus précoces de l'infection une augmentation progressive du nombre de formes courtes métacycliques, contrairement aux formes longues qui dominaient en début d'infection (Gidudu *et al.*, 1995).

Au cours de l'expérience, cinq cas se sont présentés où, au cours du même essai, aucune des trois techniques n'a révélé la présence des trypanosomes, alors que les mouches étaient sûrement infectées au moment de leur sélection. Le solide ancrage des trypanosomes sur la paroi de l'hypopharynx pourrait expliquer qu'ils restent parfois fixés malgré le flux salivaire. De plus, deux glossines sur les sept montrant des métatrypanosomes dans le canal salivaire lors de la dissection n'ont pas transmis la maladie au souriceau nourricier, malgré les trois repas consécutifs. Peut-être est-ce aussi la conséquence d'une discontinuité de maturation et de passage des formes métacycliques non infectantes du labre vers les formes métacycliques infectantes de l'hypopharynx. Ce phénomène d'interruption de l'émission des trypanosomes par une glossine infectante est probablement accentué aussi par les conditions artificielles perturbatrices pour les insectes.

L'intérêt de cette étude était aussi de comparer la technique PCR et les méthodes parasitologiques pour détecter les trypanosomes dans le proboscis des glossines, afin de vérifier que les faibles taux d'infection mature rencontrés fréquemment chez *G. tachinoides* sur le

terrain ne soient pas la conséquence d'un manque de sensibilité de l'examen microscopique des pièces buccales.

Dans cette expérience, la technique PCR appliquée sur les proboscis confirme dans tous les cas les résultats parasitologiques. Elle n'apporte pas d'information supplémentaire permettant d'étayer l'hypothèse du manque de fiabilité de l'examen microscopique pour détecter l'absence ou la présence de très peu de parasites dans la trompe. En revanche, les circonvolutions intestinales sont susceptibles de masquer la présence de formes procycliques, à fortiori si elles sont peu nombreuses. Une étude expérimentale récente a montré que la technique PCR peut mettre en évidence dans le tractus digestif de très faibles infections indécelables à l'examen microscopique (Penchenier *et al.*, 1996). Il n'est donc pas exclu que dans cette expérience, le nombre d'intestins positifs observés au microscope soit inférieur à la réalité.

Divers travaux ont évalué la célérité du processus de maturation des formes procycliques vers les formes métacycliques infectantes. Elle a été estimée à 3 à 7 jours chez *G. m. morsitans* infectée par *T. congolense* (Welburn et Maudlin, 1989) et à 12 jours en moyenne avec différentes souches de *T. brucei* (Maudlin et Welburn, 1994). Nos observations tendent à montrer que ces mécanismes de maturation, s'ils sont en général précoces, peuvent aussi s'engager parfois tardivement. En effet, l'achèvement différé du cycle pourrait expliquer que 25% des glossines trouvées non infectées sur lame chauffée, toutes âgées de plus de 30 jours, présentent après dissection des métatrypanosomes dans le proboscis.

Toutes ces observations ne relèvent que de faits de laboratoire. Sur le terrain, le comportement de piqûre d'une glossine infectée est souvent perturbé du fait des réactions défensives de l'hôte pour se débarrasser de la gène occasionnée par les diptères. Son pouvoir infectant dépend de la quantité de trypanosomes inoculée et de la réponse immunitaire de la victime à l'infection. Des études portant sur l'infectivité de glossines infectées par *T. b. rhodesiense* (Fairbairn et Burtt, 1946; Harley *et al.*, 1966) et *T. congolense* (Harley et Wilson, 1968) ont montré que très peu de parasites suffisaient pour infecter l'hôte. Dans la nature, les populations de vecteurs, y compris les vecteurs mécaniques potentiels, tels les tabanides et les stomoxes, peuvent pulluler en certaines saisons. La dose minimale infectante peut se trouver répartie en de multiples piqûres occasionnant les prévalences parfois déconcertantes observées sur le bétail. Le caractère éventuellement discontinu de l'émission des parasites à chaque piqûre et les décharges parasitaires parfois faibles sont probablement contrebalancés par l'abondance des vecteurs en présence et de leurs piqûres interrompues mais répétées.

L'étude de l'émission provoquée des trypanosomes par *G. tachinoides* montre que, si l'expulsion des parasites au moment de la salivation et de la piqûre n'est pas un phénomène continu,

l'interruption du processus semble relativement rare. De plus, une grande variabilité intra et inter-individuelle est constatée dans l'émission parasitaire, vraisemblablement accentuée par les conditions artificielles de l'expérience.

Malgré sa faible aptitude à acquérir l'infection au laboratoire, la forte capacité vectorielle de *G. tachinoides* à transmettre *T. congolense* sur le terrain résulte probablement davantage de son comportement bien particulier. Cette espèce est naturellement très agressive, capable de suivre longtemps son hôte. Cette agressivité peut être accentuée par l'état infectant de la glossine, du fait de la gène occasionnée par les métacycliques souvent nombreux dans le canal salivaire au moment de la prise du repas sanguin, entraînant une interruption des repas plus fréquente favorable à une meilleure propagation du parasite (Jenni *et al.*, 1980).

Bien que *G. tachinoides* soit une espèce de galerie forestière, elle est aussi d'une grande adaptibilité aux modifications d'environnement d'origine anthropique. Cette espèce au comportement parfois péridomestique est en contact étroit et souvent permanent avec ses hôtes (Baldry, 1969; 1980; Jordan, 1986), si bien qu'un petit nombre d'individus infectants peut assurer l'apparition et le maintien de foyers de la maladie, dont l'amplification et l'extension dépend d'autres vecteurs cycliques et mécaniques présents dans les mêmes sites.

5- Résumé

Des différences très nettes apparaissent dans la compétence vectorielle des glossines selon le clone de *T. congolense*. Les glossines s'infectent globalement mieux avec le clone "savane" qu'avec le clone "forêt".

Quel que soit le type moléculaire de *T. congolense*, les glossines du groupe *morsitans*, notamment *G. m. submorsitans*, se révèlent meilleurs vecteurs que les glossines du groupe *palpalis*, ces dernières se caractérisant par de forts taux d'infection immature.

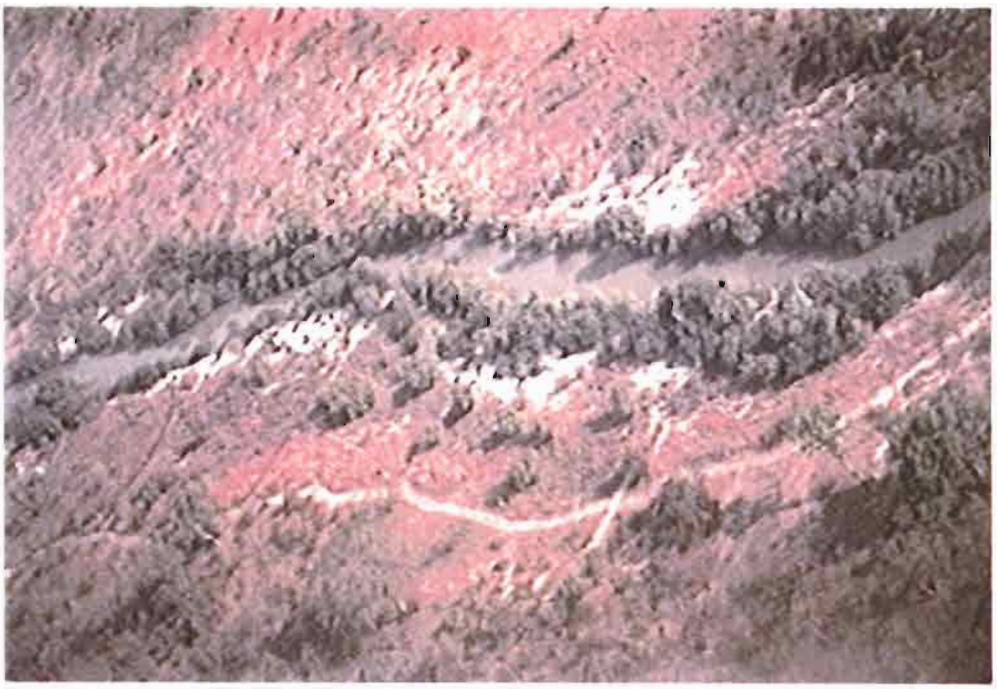
Les femelles sont globalement plus réceptives que les mâles pour l'acquisition de l'infection au niveau intestinal, et les mâles pour la maturation des parasites dans les pièces buccales. Dans le détail, une grande variabilité est constatée selon le clone de parasite et la sous-espèce de glossine considérée.

Conformément aux hypothèses postulées sur l'existence éventuelle de couples préférentiels parasite-vecteur, la compétence vectorielle des glossines du groupe *morsitans* est supérieure à celle des glossines du groupe *palpalis* pour *T. congolense* type "savane", selon l'indice calculé.

En revanche, les hypothétiques relations d'affinité entre les glossines du groupe *palpalis* et *T. congolense* type "forêt" apparaissent moins nettement. Bien que *G. p. gambiensis* affiche le plus fort taux d'infection intestinale, les indices de compétence vectorielle sont généralement faibles et ne sont pas significativement plus élevés chez les mouches du groupe *palpalis* que chez les mouches du groupe *morsitans*.

Peu d'infections mixtes incluant, soit les deux taxons de *T. congolense*, soit *T. congolense* type "savane" et *T. vivax*, ont été obtenues, ce qui pourrait être la conséquence des conditions artificielles de l'expérience ou de phénomènes de compétition entre clones de trypanosomes au moment de l'installation de l'infection dans l'intestin.

Les expériences de salivation provoquée de *G. tachinoides* infectée par *T. congolense* type "savane" montrent une grande variabilité, inter et intra-individuelle, dans le nombre de trypanosomes émis au moment de la salivation. Nos résultats montrent qu'une glossine infectée présentant des formes métacycliques dans le proboscis transmet la maladie dans la majorité des cas. En conditions naturelles, la forte capacité vectorielle de *G. tachinoides* vis-à-vis de *T. congolense*, malgré un faible taux d'infection mature, est probablement liée à son comportement caractéristique. Un contact étroit et permanent avec les hôtes mammifères évoluant dans les mêmes zones justifie le fait que peu de mouches infectées assure avec efficacité le maintien de la maladie.



Galerie forestière du Burkina Faso (Koba, Sideradougou)
(D. Cuisance, 1981)

CHAPITRE V : APPLICATIONS À L'ÉPIDÉMIOLOGIE

1- Analyse par PCR d'isolats sanguins de bovins en provenance de zones d'enzootie du Burkina Faso

1-1. Matériel

L'analyse porte sur 33 isolats de sang infecté (trypanosomes observés au microscope). Les stabilats correspondants, dont le volume varie de 500 µl à 1 ml, sont additionnés d'un agent cryoprotecteur, le glycérol (10% volume final), et stockés dans l'azote liquide (-196°C). Chaque stock a été isolé sur souris et a subi plusieurs passages sur rongeurs de laboratoire avant d'être conditionné.

La nomenclature utilisée (tableau VIII) précise chronologiquement le lieu, l'année d'isolation, l'institution et le numéro de stabilat. Les prélèvements, constitués au cours d'enquêtes sanitaires, proviennent de bovins naturellement infectés, exceptés Dinderesso/80/CRTA/3 et Samorogouan/81/CRTA/24 qui sont d'origine canine (chien). La plupart des localités se situent dans la région de Bobo-Dioulasso. Quelques isolats sont originaires du pays Lobi, au sud est de Bobo-Dioulasso (région de Gaoua), et de la région de la Komoé, à proximité de la frontière ivoirienne (figure 17). La référence "Est Africaine", Serengeti/71/STIB/212, aimablement fournie par l'ILRI, a été isolée en Tanzanie (Geigy et Kauffmann, 1973).

1-2. Méthodes

Chaque stabilat est décongelé rapidement (le bon état des trypanosomes est dépendant d'une décongélation rapide) et, après contrôle microscopique de la vivacité des trypanosomes, est inoculé à deux souris par voie intrapéritonéale. L'évolution de la parasitémie est contrôlée quotidiennement par examen de sang frais au microscope à contraste de phase. Lorsqu'elle atteint environ 10^6 trypanosomes par millilitre, un prélèvement sanguin en microtube capillaire est effectué à l'extrémité caudale de chaque souris. La strate leucocytaire contenant les trypanosomes est isolée selon la technique de centrifugation décrite paragraphe 2-3 du chapitre III.

Un aliquot de chaque échantillon est dilué 10 fois dans l'eau distillée stérile, le reste est purifié selon le protocole décrit au chapitre III. Une fraction de 3 µl de chaque suspension obtenue est soumise à la technique PCR. Ces deux méthodes de préparation des échantillons sont comparées

Tableau VIII : Résultats de l'analyse par PCR d'isolats de trypanosomes selon deux méthodes de préparation des échantillons (les résultats entre parenthèses correspondent aux échantillons purifiés). Tous les résultats ont été confirmés au moins deux fois.

	PARASITOLOGIE	PCR						
		T. congolense						
STABILATS		"savane"	"forêt"	"Kilifi"	"Tsavo"	*T. simiae*	*T. vivax*	*T. brucei* s.l.
BANAN/83/CRTA/67	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
BANAN/84/CRTA/79	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
BANAN/94/CRTA/360	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
BOBO/82/CRTA/40-1	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
BOBO/82/CRTA/42	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
BOBO/82/CRTA/44	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
DINDERESSO/80/CRTA/3	*Nannomonas*	- (-)	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
FARAKOBA/79/CRTA/5	*Trypanozoon*	- (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	+ (+)
FARAKOBA/78/CRTA/19	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	+ (+)	- -
FARAKOBA/84/CRTA/76	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
GAOUA/89/CRTA/259	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	+ (+)
KARANKASSO/83/CRTA/56	*Nannomonas*	- (+)	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	+ (+)	- -
KARANKASSO/83/CRTA/61	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
KARANKASSO/83/CRTA/66	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
KOMOE/87/CRTA/147	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
KOMOE/87/CRTA/153	*Nannomonas*	- (+)	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
SAMANDENI/82/CRTA/27	*Nannomonas*	- (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
SAMANDENI/82/CRTA/29	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
SAMANDENI/82/CRTA/31	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
SAMANDENI/82/CRTA/33	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
SAMANDENI/82/CRTA/35-4	*Trypanozoon*	- (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	+ (+)
SAMANDENI/82/CRTA/81	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
SAMOROGOUAN/81/CRTA/22	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
SAMOROGOUAN/81/CRTA/24	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
SAMOROGOUAN/82/CRTA/47-1	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
SAMOROGOUAN/82/CRTA/48-1	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (+)	- -
SAMOROGOUAN/82/CRTA/49-1	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
SAMOROGOUAN/82/CRTA/50	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
SAMOROGOUAN/80/CRTA/63	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
SARFALAO/80/CRTA/1	*Duttonella*	- (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	+ (+)	- -
SATIRI/87/CRTA/197-1	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -
SATIRI/87/CRTA/236-1	*Duttonella*	- (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	+ (+)	- -
SERENGETI/71/STIB/212	*Nannomonas*	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- -	- -

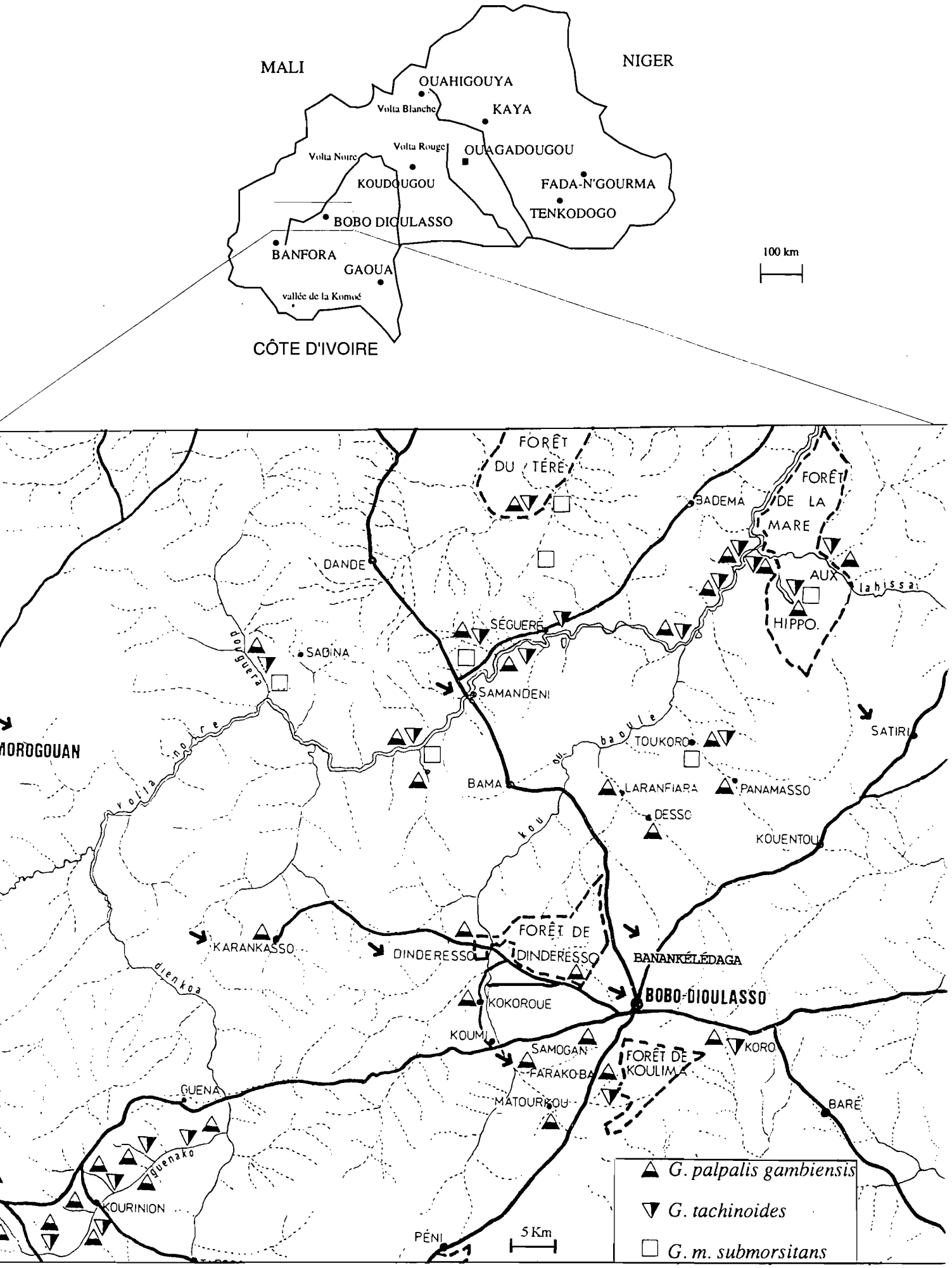


Figure 17 : Origine géographique des différents isolats sanguins de bovins analysés par PCR

L'identification parasitologique des trypanosomes (observation microscopique de leur vivacité et leur morphologie) est confrontée à leur caractérisation moléculaire.

1-3. Résultats (figure 18)

La technique PCR appliquée sur les couches leucocytaires simplement diluées révèle 23 infections à *T. congolense* type "savane", 3 à *T. congolense* type "forêt" , 2 à *T. vivax* et 1 à *T. brucei* s.l. Aucune amplification n'a été obtenue à partir du stabilat Samandeni/82/CRTA/27 présentant des trypanosomes à morphologie de *T. congolense*. Trois infections mixtes ont été détectées, la première à *T. congolense* type "savane" et à *T. vivax*, la seconde à *T. congolense* type "savane" et à *T. brucei* s.l. et la troisième à *T. congolense* type "forêt" et à *T. vivax* (figure 19).

Après purification des échantillons, la technique PCR révèle 9 infections mixtes, dont 3 à *T. congolense* type "savane" et *T. brucei* s.l., 4 à *T. congolense* type "savane" et *T. vivax*, et 1 à *T. congolense* type "savane" et *T. congolense* type "forêt". Une triple infection comprenant *T. vivax*, *T. congolense* type "savane" et *T. congolense* type "forêt" a été détectée dans le stabilat Karankasso/83/CRTA/56. La souche Samandeni/82/CRTA/27 pour laquelle aucun signal d'amplification n'est apparu sur l'échantillon simplement dilué, donne après purification une réaction positive avec les amorces de *T. congolense* type "savane".

Selon l'examen microscopique et la technique PCR appliqués sur les échantillons dilués, les stabilats Farakoba/79/CRTA/5 et Samandeni/82/CRTA/35-4 ont été identifiés comme appartenant au sous-genre *Trypanozoon*. Après purification, des signaux d'amplification ont été obtenus avec les amorces spécifiques de *T. congolense* type "savane". De même, la présence "à bas bruit" de *T. vivax* a été détectée dans les stabilats Farakoba/78/CRTA/19, Karankasso/83/CRTA/56, et Samorogouan/82/CRTA/48-1, et celle de *T. congolense* type "savane" dans les stabilats Sarfalao/80/CRTA/1 et Satiri/87/CRTA/236-1.

Aucune amplification n'a été obtenue avec les amorces spécifiques de *T. simiae*, *T. congolense* types "Kilifi" et "Tsavo".

1-4. Discussion

Cette étude met bien en évidence les limites de l'examen microscopique pour détecter les infections mixtes chez l'hôte mammifère. La technique PCR a ainsi révélé des mélanges de taxons morphologiquement identiques (*T. congolense* types "savane" et "forêt"), mais aussi de

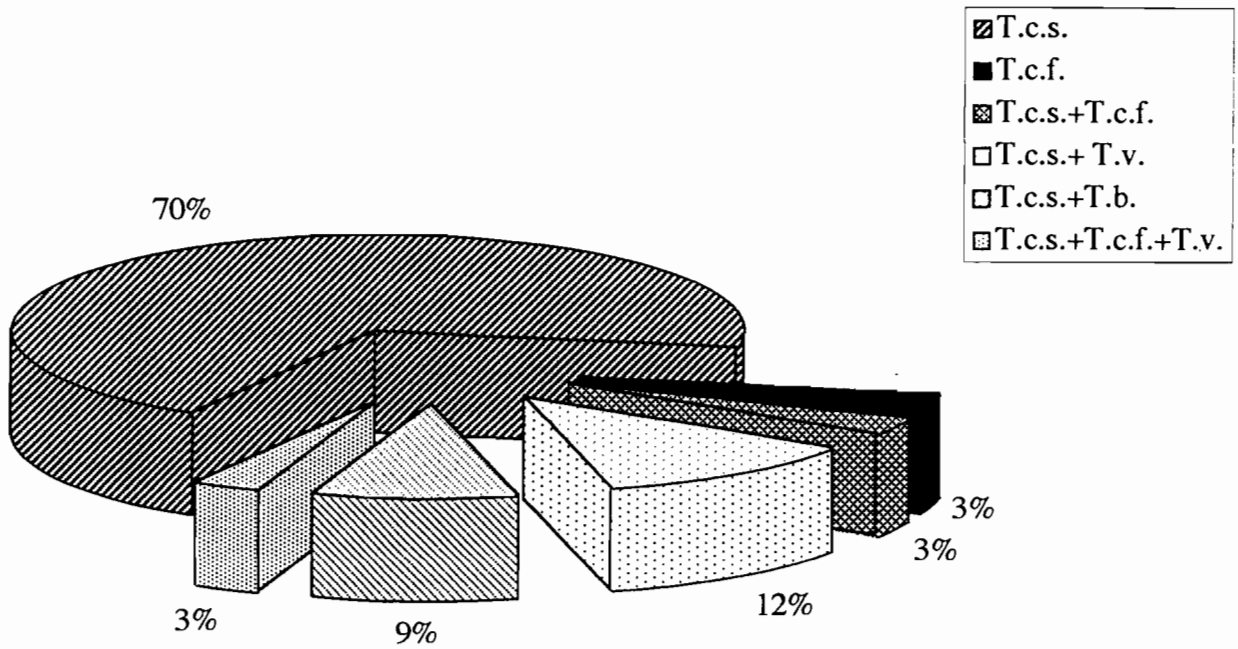


Figure 18 : Pourcentages d'infections simples et multiples détectées par PCR dans 33 isolats de trypanosomes provenant du sud-ouest du Burkina Faso

T.c.s. : *T. congolense* "savane"
T.c.f. : *T. congolense* "forêt"
T.v. : *T. vivax*
T.b. : *T. brucei* s.l.

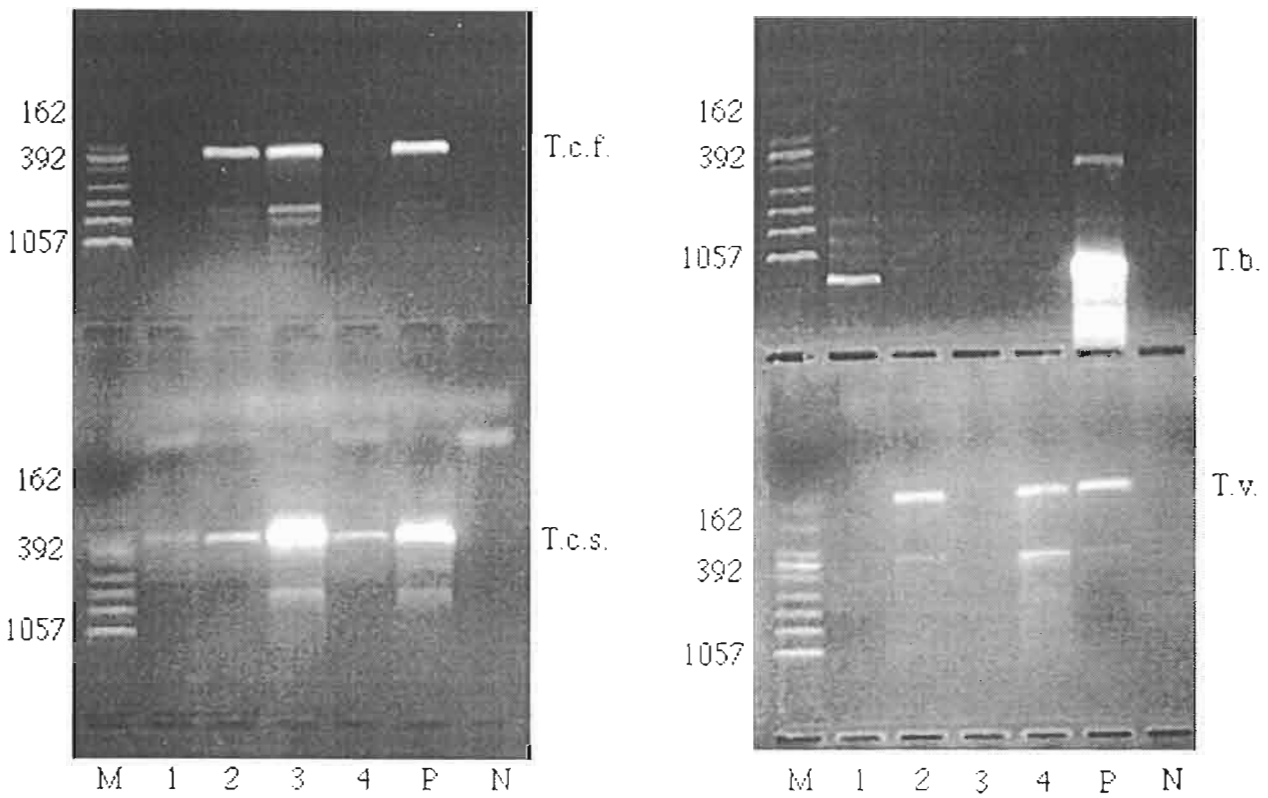


Figure 19 : Détection par PCR des infections mixtes dans les stabilats Farakoba/79/CRTA/5 (1), Karankasso/83/CRTA/56 (2), Komoe/87/CRTA/153 (3), Samorogouan/83/CRTA/48-1 (4).

T.c.s.	: *T. congolense* type "savane
T.c.f.	: *T. congolense* type "forêt"
T.v.	: *T. vivax*
T.b.	: *T. brucei* s.l.
P	: témoin positif
N	: témoin négatif
M	: marqueur moléculaire Ψx 174 Hind II

trypanosomes appartenant à des niveaux subgénériques distincts. Ainsi, la présence de *T. congolense* fut décelée dans certains stabilats affichant *T. brucei* au microscope. *T. vivax* a été détecté dans des stabilats identifiés parasitologiquement comme étant *T. congolense*. La présence "à bas bruit" de certains trypanosomes est souvent masquée par la prédominance des parasites les mieux adaptés à l'hôte mammifère (Tarimo *et al.*, 1987); c'est en particulier ce type de sélection qui s'opère sur les animaux de laboratoire.

D'un point de vue strictement technique, la simple dilution des échantillons a montré une efficacité très relative compte tenu du fait que 9 infections mixtes ont été révélées par amplification génique après purification, alors que 3 seulement apparaissaient après dilution. L'addition d'eau stérile diminue probablement le seuil de sensibilité de la technique, ou n'est pas suffisamment efficace pour libérer l'ADN des trypanosomes présents en nombre infime dans l'échantillon, qui deviennent alors difficilement détectables. De plus, elle ne suffit parfois pas à lever les inhibitions résiduelles de la Taq polymerase, comme cela fut probablement le cas pour le stabilat Samandeni/82/CRTA/27.

Malgré l'isolement par les différents passages de ces isolats de trypanosomes sur souris de laboratoire, cette étude souligne l'importance des infections mixtes et multiples sur le terrain, fréquemment révélées chez le vecteur (Jordan, 1963; Clarke, 1969; Tarimo *et al.*, 1987; Solano *et al.*, 1995; Masiga *et al.*, 1996), plus rarement chez l'hôte vertébré (Nyeko *et al.*, 1990).

La présence chez les bovins de *T. congolense* type "forêt" a rarement été signalée, et les isolats référencés jusqu'à présent proviennent surtout de porcs domestiques, de petits ruminants et de chiens (Gibson *et al.*, 1988; Masiga *et al.*, 1992; Schares et Melhitz, 1996). Outre les spécificités vectorielles que l'on a abordé expérimentalement, ce taxon se distingue vraisemblablement aussi par un spectre particulier d'hôtes vertébrés. La faible virulence pour les souris du clone expérimental que nous avons utilisé pour infecter les glossines conforte cette différence de comportement suspectée par rapport au clone "savane". Cette souche "forêt" est originaire de Dinderesso, à proximité de Bobo-Dioulasso. Cette zone de forêt relicte est infestée par *G. p. gambiensis*, probablement impliquée localement dans la transmission de ce parasite. Les deux autres stabilats contenant ce taxon sont originaires l'un de la région forestière de la Komoé, où sévissent *G. tachinoides* et secondairement *G. medicorum* et *G. p. gambiensis*, l'autre de Karankasso, secteur essentiellement infesté de *G. p. gambiensis*. Ces résultats reflètent indirectement les associations préférentielles parasites-vecteurs suggérées par d'autres études en d'autres sites.

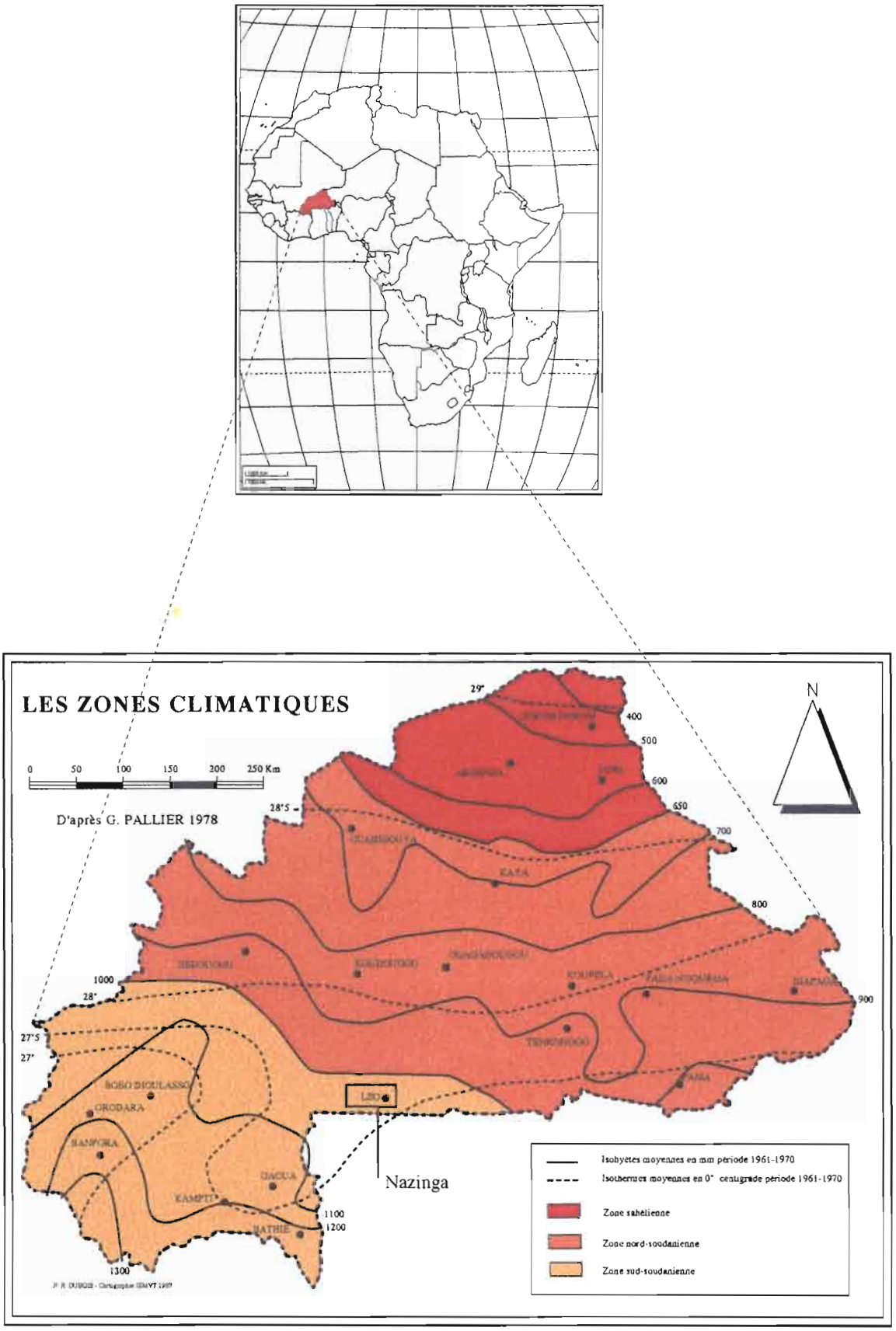


Figure 20 : Situation géographique de la province de la Sissili

L'absence logique de *T. simiae* dans ces stabilats est confirmée par PCR. Cette espèce, très peu pathogène pour les bovidés, est de plus très difficile à isoler sur rongeur (McNamara *et al.*, 1994).

D'après plusieurs études moléculaires approfondies sur d'autres souches de trypanosomes en provenance de la cryothèque du CIRDES, *T. congolense* types "Kilifi" et "Tsavo" sont suspectés au Burkina Faso (Masake *et al.*, 1993; Masake *et al.*, 1994). Cette hypothèse se trouve renforcée par la découverte du type "Kilifi" dans l'intestin de glossines de Côte d'Ivoire (McNamara *et al.*, 1995; Masiga *et al.*, 1996). Dans notre étude, aucune amplification fiable par PCR n'a garanti la présence de ces taxons parmi ces souches. Une exploration plus exhaustive dans la cryothèque du CIRDES permettra d'évaluer le bien fondé de ces présomptions.

2- Epidémiologie moléculaire de la Trypanosomose Animale Africaine (TAA) au Burkina Faso

2-1. Présentation du site d'étude : la Province de la Sissili (figure 20)

2-1-1. Quelques données écologiques et bioclimatiques

L'étude de terrain a été réalisée au Burkina Faso, dans la Province de la Sissili, située dans la zone climatique sud-soudanienne qui regroupe les régions localisées à l'ouest et à l'est du Mouhoun. Cette zone climatique, assez humide du fait de sa proximité avec le Golfe de Guinée, se caractérise par un alignement de reliefs et de falaises. Les pluies dépassent en moyenne 1000 mm/an. Elles peuvent atteindre 1300 à 1400 mm dans sa partie sud ouest. La température, l'humidité relative et l'évaporation subissent des variations moins marquées que dans les autres zones climatiques. Les températures les plus élevées se situent en mars et avril, les plus basses en décembre et janvier. L'évaporation moyenne atteint une valeur annuelle de 1950 à 2250 mm au sud ouest et de 2300 à 2350 mm au sud est.

Le réseau hydrographique de la Sissili se situe dans le bassin "des voltas" qui s'étend au centre et à l'ouest du pays sur une superficie de 120 000 km^2

La zone sud-soudanienne est la mieux fournie en forêts claires et en savanes avec une strate arborée presque continue comprenant des espèces comme *Vitellaria paradoxa*, *Terminalia* spp., *Combretum* spp. et *Acacia* spp. La strate herbacée est composée d'*Andropogon ascinodis*, *A. gayanus* et *Schizachyrium* spp. Les savanes sont traversées de galeries forestières, véritables formations hygrophiles plus ou moins denses, plus ou moins larges, composée d'essences

diverses telles que : *Mitragyna inermis*, *Syzygium guineense*, *Raphia vinifera*, *Eleaeis guineensis*, *Ficus* spp., *Vitex* spp. La végétation est fortement influencée par les feux de brousse. Les sites de prospection se situent à proximité du ranch de gibier de Nazinga qui est situé entre 11°9' N et 1°30' O. Il abrite l'un des derniers noyaux de faune sauvage du pays : *Sylvicapra grimmia* L. (céphalophe de Grimm), *Ourebia ourebi* Zimmermann (ourébi), *Hippotragus equinus* Desmarest (hippotrague), *Loxodonta africana* Brummenbach (éléphant), *Phacocherus aethiopicus* Pallas (phacochère), *Tragelaphus scriptus* Pallas (guib harnaché), *Kobus ellipsiprymnus* Ogilby (cob defassa), des singes, quelques carnivores et de nombreux reptiles (crocodiles, varans, serpents).

2-1-2. Justification de l'étude

Suite à la demande du SPRA (Service Provincial des Ressources Animales) de cette région, constatant depuis plusieurs années une régression alarmante du cheptel bovin, une enquête a été menée par le CIRDES en 1993 sur le réseau hydrographique de la zone agro-pastorale de Yallé, proche du ranch de gibier de Nazinga, afin d'évaluer l'impact de la TAA sur l'élevage local.
Afin de limiter le coût de notre étude, nous avons intégré ces équipes au cours de leurs missions sur le terrain pour capturer des glossines et prélever des échantillons de sang de bovins trouvés parasitologiquement positifs, dans l'optique d'appréhender de manière plus précise les niveaux de transmission des trypanosomes dans cette région.

2-2. Résultats de l'enquête entomologique et épidémiologique

2-2-1. Descriptif des pièges à glossines utilisés

Les principaux pièges utilisés contre les mouches tsé-tsé sont constitués d'une enceinte principale de forme variable, d'un dispositif anti-retour (pyramide ou fente en V renversé) débouchant sur une cage de capture (Cuisance *et al.*, 1994). Les glossines sont attirées tout particulièrement par le contraste entre les couleurs bleu royal et noir du tissu qui constitue le corps des pièges (Laveissière, 1986). L'attractivité du dispositif peut être accrue selon l'espèce de glossine par l'imprégnation d'attractifs olfactifs (acétone, butanone, octénol, dérivés phénoliques).
Afin d'évaluer le risque trypanosomien au cours des différentes enquêtes entomologiques, deux types de pièges ont été retenus du fait de leur efficacité pour capturer les glossines ripicoles et

pré-forestières : le piège biconique Challier-Laveissière, décrit en 1973, et le piège monoconique "Vavoua" (Laveissière et Grebaut, 1990) (figure 21).

2-2-2. Résultats entomologiques

Six missions d'évaluation de la situation ont été réalisées par les équipes de l'Unité de Lutte Anti-Vectorielle du CIRDES en 1993 (Bauer, 1993). Au cours de ces missions, soixante pièges (30 pièges biconiques Challier-Laveissière et 30 pièges monoconiques type "Vavoua", disposés en alternance) étaient installés pendant 48 heures à différents points du réseau hydrographique de la Sissili, avec des relevés à 24 et 48 heures.

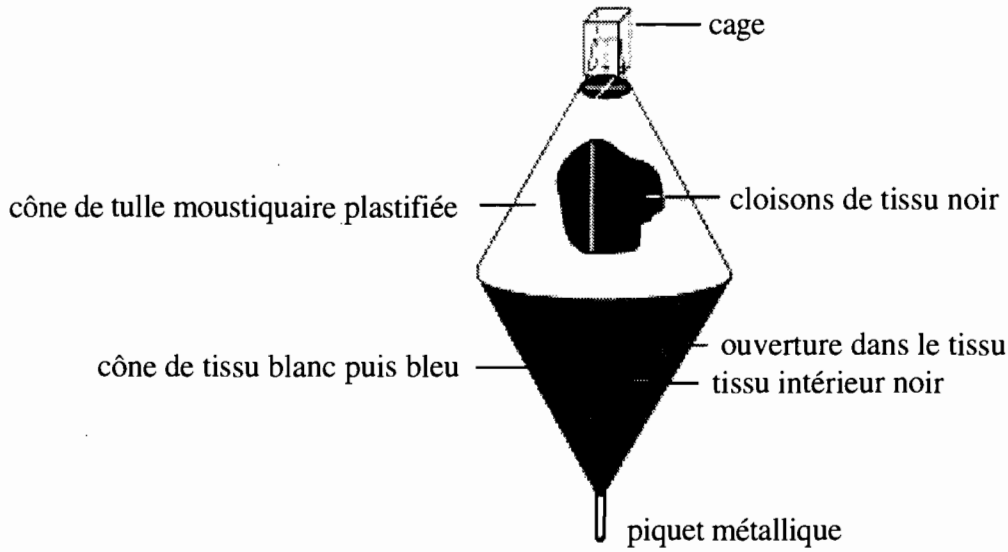
L'âge des glossines a été estimé à partir de l'usure du bord postérieur des ailes chez les mâles (Jackson, 1946), et à partir du stade de développement des ovaires et des ovarioles (âge physiologique) chez les femelles (Saunders, 1961).

Trois espèces de glossines occupent cette zone. *G. tachinoides* est prédominante, *G. m. submorsitans*, glossine de savane, est apparemment moins abondante compte tenu du fait que les sites prospectés se situent essentiellement le long des lignes de drainage, dans les zones de contact glossines-troupeaux de bovins, tandis que *G. p. gambiensis* s'avère sporadique. De nombreux tabanides (*Chrysops distinctipennis*, *Tabanus gratus*, *T. augustus*, *T. taeniola*, *T. brumpti*, *Atylotus agrestis*...) peuplent également les aires de prospection.

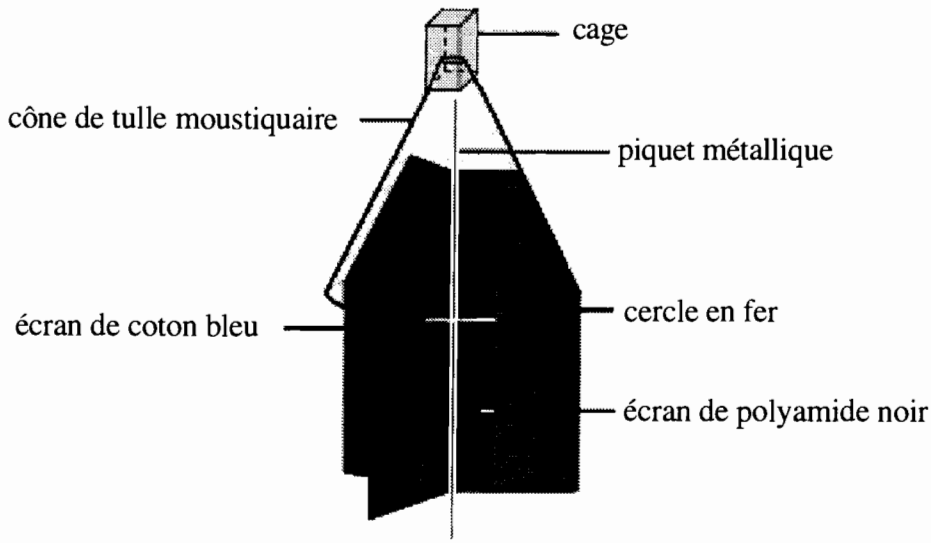
Le tableau IX récapitule l'ensemble des captures effectuées au cours de l'année. Les piègeages réalisés au mois de janvier ont révélé de véritables pullulations de glossines avec des densités apparentes de 11 à 52 mouches par piège et par jour. Sachant que cette saison s'avère de manière générale défavorable pour *G. tachinoides* (optimum climatique en mai) et pour *G. m. submorsitans* (optimum climatique en septembre-octobre), cette constatation a justifié à elle seule le classement du secteur dans la catégorie des zones à très forte pression glossinienne, expliquant les grandes difficultés de développement de l'élevage des ruminants.

Le fléchissement brutal des densités apparentes en juin (figure 22) provient en grande partie de la mise en place très irrégulière de la saison pluvieuse, ponctuée de précipitations abondantes responsables de crues très importantes dans tout le réseau, et de périodes sèches perdurant parfois jusqu'à 3 semaines. Les inondations provoquent la destruction de la majorité des stocks de pupes présents dans les gîtes de larviposition, aggravée par la forte chaleur et les longues périodes sèches nuisibles au bon développement des pupes.

Le faible effectif de mouches capturé dans la période d'août à octobre s'explique par les conditions climatiques favorables (humidité élevée, température moyenne), occasionnant une



Piège biconique Challier-Laveissière (adapté de Challier *et al.*, 1973)



Piège monoconique "Vavoua" de Laveissière (adapté de Laveissière, 1988)

Figure 21 : Pièges utilisés au cours des prospections entomologiques dans la zone pastorale de Yallé

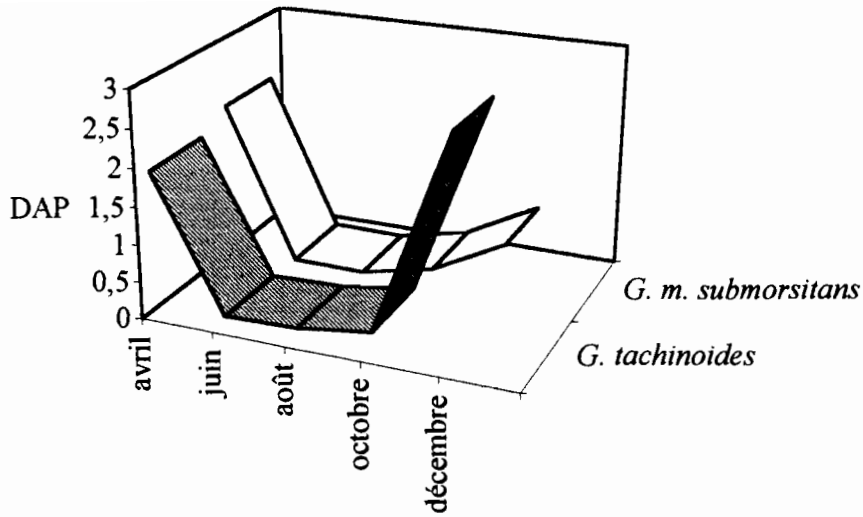


Figure 22 : Evolution des densités apparentes (nb glossines/piège/jour) de *G. tachinoides* et *G. m. submorsitans* au cours des enquêtes entomologiques de l'année 1993

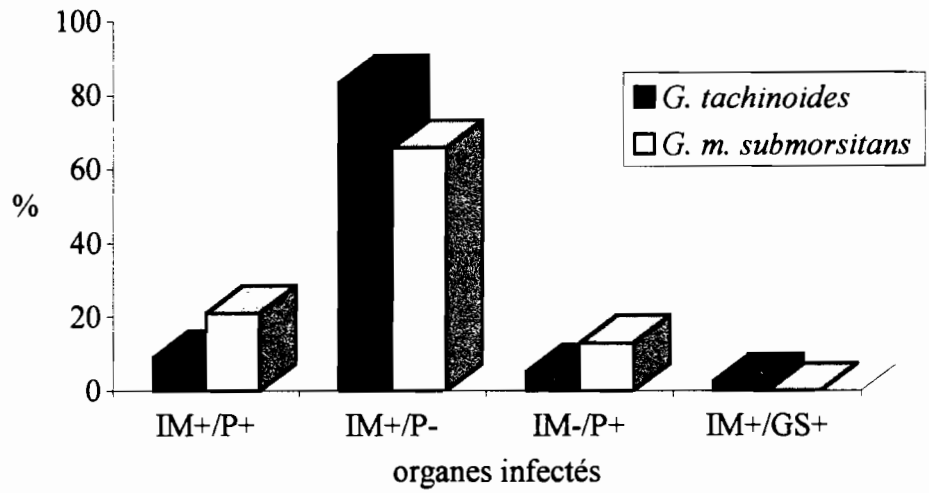


Figure 23 : Pourcentages d'infection observés en microscopie dans les organes de *G. tachinoides* (n=78) et *G. m. submorsitans* (n=85), capturées dans l'ensemble des sites de prospection de la zone pastorale de Yallé

IM+P+ : intestin moyen positif et proboscis positif
IM+P- : intestin moyen positif et proboscis négatif
IM-P+ : intestin moyen négatif et proboscis positif
IM+GS+ : intestin moyen positif et glandes salivaires positives

Tableau IX : Prospections entomologiques dans la zone pastorale de Yallé (1993) : détail des captures

	G.t.♂	âge* moyen	G.t.♀	âge moyen	G.t. (total)	DAP**	G.m.s.♂	âge moyen	G.m.s.♀	âge moyen	G.m.s. (total)	DAP
janvier	2688	28	3525	31	6313	52	871	29	444	34	1315	11
mars	91	15	158	28	249	2,1	110	24	100	34	210	1,7
avril	71	18	122	33	193	1,85	141	24	85	43	226	2,07
juin	1	32	9	25	10	0,075	0	0	1	46	1	0,03
août	1	14	4	28	5	0,10	0	0	1	42	1	0,017
octobre	7	19	11	22	18	0,23	2	23	5	35	7	0,23
décembre	168	22	75	38	243	2,9	22	25	44	38	66	0,74

* Age évalué (en nombre de jours) par l'usure alaire chez les mâles, âge physiologique chez les femelles
** Densité Apparente par Piège (nombre de glossines capturées par piège et par jour)
G.t. *Glossina tachinoides*
G.m.s. *Glossina morsitans submorsitans*

Tableau X : Prospections entomologiques dans la zone pastorale de Yallé (1993) : infections détectées par dissection des glossines

		taux global	IM+ P-	IM+ P+	IM- P+	IM+ GS+
janvier	G. t.	5/13 (**38,5%**)	5/5 (**100%**)	-	-	-
	G. m. s.	6/21 (**29%**)	6/6 (**100%**)	-	-	-
mars	G. t.	8/84 (**9,5%**)	7/8 (**87,5%**)	1/8 (**12,5%**)	-	-
	G. m. s.	15/79 (**19%**)	9/15 (**60%**)	5/15 (**33,3%**)	1/15 (**6,6%**)	-
avril	G. t.	22/100 (**22%**)	11/22 (**50%**)	5/22 (**22,7%**)	4/22 (**18,1%**)	2/22 (**9,1%**)
	G. m. s.	52/137 (**37,9%**)	34/52 (**65,4%**)	12/52 (**23%**)	6/52 (**11,5%**)	-
juin	G. t.	2/9 (**22,2%**)	2/2 (**100%**)	-	-	-
	G. m. s.	0	-	-	-	-
août	G. t.	3/5 (**60%**)	2/5 (**40%**)	1/5 (**20%**)	-	-
	G. m. s.	1/1 (**100%**)	-	-	1/1 (**100%**)	-
octobre	G. t.	2/14 (**14,3%**)	2/2 (**100%**)	-	-	-
	G. m. s.	3/6 (**50%**)	3/3 (**100%**)	-	-	-
décembre	G. t.	36/150 (**24%**)	36/36 (**100%**)	-	-	-
	G. m. s.	8/48 (**16,6%**)	4/8 (**50%**)	1/8 (**12,5%**)	3/8 (**37,5%**)	-
total	G. t.	78/375 (**20,8%**)	65/78 (**83,3%**)	7/78 (**8,9%**)	4/78 (**5,1%**)	2/78 (**2,5%**)
	G. m. s.	85/292 (**29,1%**)	56/85 (**65,8%**)	18/85 (**21,1%**)	11/85 (**12,9%**)	-

G.t. *Glossina tachinoides*
G.m.s. *Glossina morsitans submorsitans*
IM+ intestin moyen positif
IM- intestin moyen négatif
P+ proboscis positif
P- proboscis positif
GS+ glandes salivaires positives

plus grande dispersion des populations glossiniennes dans toute la zone, alors qu'elles se concentrent le long des cours d'eau, où sont installés la majorité des pièges, pendant les mois les plus secs. De plus, la forte poussée des plantes herbacées pendant l'hivernage entraîne une moindre visibilité, donc une moindre efficacité du dispositif de piègeage.

L'augmentation des densités apparentes en décembre se justifie en partie par un accroissement de la visibilité des pièges du fait de la destruction du couvert végétal par les feux de brousse et un rapprochement des glossines des lignes de drainage (forte diminution de l'humidité relative).

Les taux d'infection calculés sur l'ensemble des dissections des glossines de l'année sont représentés sur la figure 23. Les taux d'infection mature du type *Nannomonas* sont relativement faibles, significativement plus élevés chez *G. m. submorsitans* que chez *G. tachinoides* (χ^2=4,66; p<0,05). Les taux d'infection mature du type *Duttonella* sont également plus importants chez *G. m. submorsitans*, mais de manière non significative.

Les taux d'infection immature sont globalement élevés, statistiquement supérieur chez *G. tachinoides* par rapport à *G. m. submorsitans* (χ^2=6,47; p<0,05). Deux cas de glandes salivaires positives, marquant la présence de *T. brucei* s. l., ont été décelés chez *G. tachinoides* (tableau X).

2-2-3. Résultats épidémiologiques

Cette enquête entomologique fut associée au suivi sanitaire de 200 à 300 bovins répartis dans 9 unités de la zone agro-pastorale de Yallé. Les ruminants ont été marqués et suivis individuellement, par prélèvement de sang et examen du "buffy-coat". Dans un premier temps, tous les animaux ont été traités systématiquement par un trypanocuratif (acéturate de diminazène, Bérénil®) pour obtenir un blanchiement permettant ultérieurement de suivre le niveau des ré-infections : les animaux trouvés ensuite parasitologiquement positifs ou suspects (hématocrite inférieur à 25) étaient alors soumis au traitement trypanocide. Ainsi, le nombre moyen d'infections que chaque animal est susceptible de contracter chaque année constitue ce que l'on appelle *l'indice bérénil*, qui mesure l'ampleur de l'infection dans une région donnée.

Le tableau XI montre l'évolution globale des prévalences mais ne tient pas compte de la variabilité constatée dans les troupeaux évoluant dans les différentes unités de prospection. Cette prévalence globale augmente constamment au cours de l'année pour atteindre son paroxysme de 35,6% en décembre. Dans tous les cas, les infections à *T. congolense* prédominent, suivies par les infections du type *T. vivax*. Quelques rares infections mixtes à

Tableau XI : Infections détectées par examen microscopique du sang des bovins (1993)

			identification microscopique		
	nbre de bovins prélevés	nbre de cas positifs (taux d'infection)	*T. congolense*	*T. vivax*	*T. congolense* + *T. vivax*
mars	204	20 **(9,8%)**	18/20 **(90%)**	2/20 **(10%)**	0
avril	268	26 **(9,8%)**	-	-	-
juin	298	55 **(18,4%)**	35/55 **(63,7%)**	18/55 **(32,7%)**	2/55 **(3,6%)**
août	236	55 **(23,3%)**	-	-	-
octobre	256	77 **(30%)**	46/77 **(59,7%)**	31/77 **(40,3%)**	0
décembre	251	88 **(35,6%)**	72/88 **(81,9%)**	15/88 **(17%)**	1/88 **(1,1%)**

T. congolense et *T. vivax* ont été constatées, et aucune infection à *T. brucei* s.l. n'a été détectée au microscope.

Ce suivi sanitaire confirme l'absence d'efficacité du seul traitement curatif des animaux, même si une sensible régression de la maladie a pu être observée dans certaines zones. De plus, le coût d'une telle stratégie serait rapidement devenu trop élevé pour les éleveurs, du fait du rythme accéléré de la chimiothérapie ou prophylaxie imposée par le niveau de risque et l'apparition de chimiorésistances aux produits utilisés.

Ces constatations justifient la lutte intégrée menée par le CIRDES depuis mai 1994, associant la lutte anti-vectorielle (piégeage, écrans imprégnés d'insecticides, traitement insecticide épicutané du bétail) et le traitement systématique des animaux infectés ou suspects au cours du suivi sanitaire.

2-3. Application de la technique PCR

2-3-1. Echantillonnage

La récolte d'échantillons a commencé alors que la lutte antivectorielle était déjà fortement engagée. Les populations de *G. m. submorsitans* avaient alors nettement régressé du fait de l'efficacité des campagnes, et aucune glossine infectée de cette sous-espèce n'a été capturée dans les sites prospectés.

De ce fait, aucune méthodologie précise d'échantillonnage des glossines ne fut adoptée et toutes les mouches trouvées parasitologiquement infectées au cours des différentes missions ont été retenues pour l'analyse (84 *G. tachinoides*).

L'étude sur les bovins a porté sur 92 échantillons dont 44 étaient parasitologiquement positifs. Les 48 cas négatifs restants ont été choisis au hasard.

Les méthodes de prélèvement, de traitement et d'analyse des échantillons sont décrites au chapitre III. Les échantillons de sang et d'insectes étaient conservés dans la glace en attendant d'être ramenés au laboratoire.

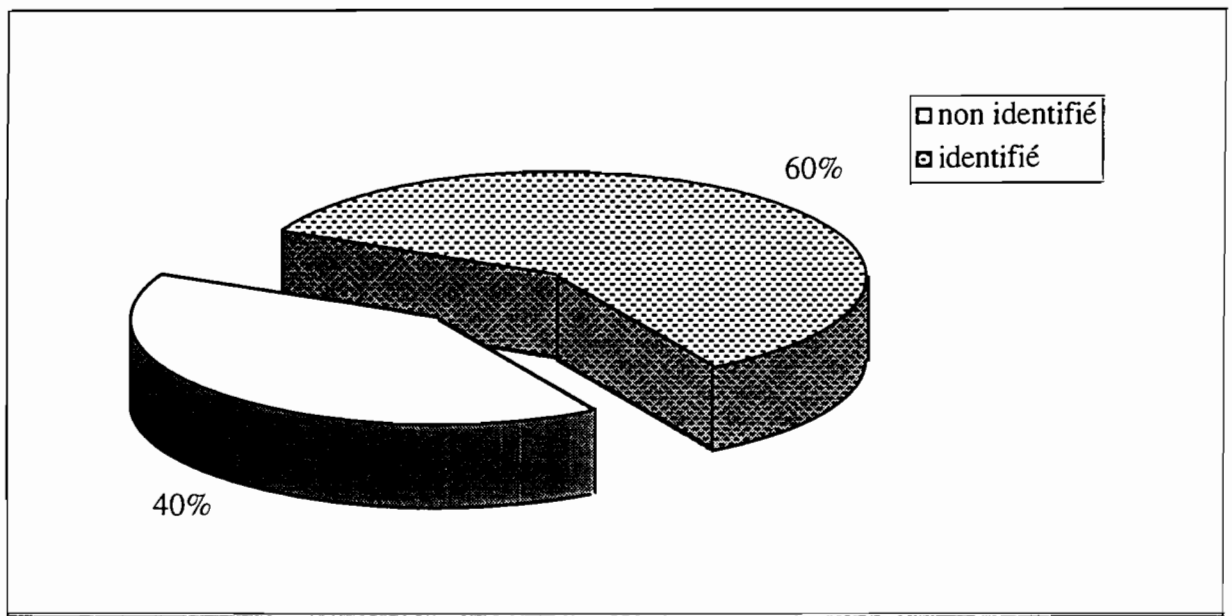
2-3-2. Identification des trypanosomes dans un échantillon de glossines infectées (tableau XII)

2-3-2-1. Résultats parasitologiques

Tableau XII : Bilan de l'analyse par PCR des infections observées en microscopie dans les organes de *G. tachinoides* (zone pastorale de Yallé)

nombre d'intestins positifs par examen parasitologique	nombre (pourcentage) d'intestins positifs par PCR	identification	nombre (pourcentage) de chaque parasite
84	50 (**59,5%**)	T. c. s. T. s. T. c. f. T. c. s. + T. c. f. T. v. T. c. s. + T. s. T. s. + T. v.	23 (**46%**) 12 (**24%**) 4 (**8%**) 4 (**8%**) 3 (**6%**) 2 (**4%**) 2 (**4%**)
	nombre (pourcentage) d'intestins négatifs par PCR		
	34 (**40,5%**)	non identifiés	
nombre de proboscis positifs par examen parasitologique	**nombre (pourcentage) de proboscis positifs par PCR**	**identification**	**nombre (pourcentage) de chaque parasite**
1	1	T. v. + T. s.	
nombre de proboscis négatifs par examen parasitologique			
83	8 (**9,6%**)	T. c. s. T. s. T. v.	2 (**25%**) 2 (**25%**) 4 (**50%**)

T.c.s.:*T. congolense* type "savane", T.c.f.:*T. congolense* type "forêt", T.s.:*T. simiae*, T.v.:*T. vivax*



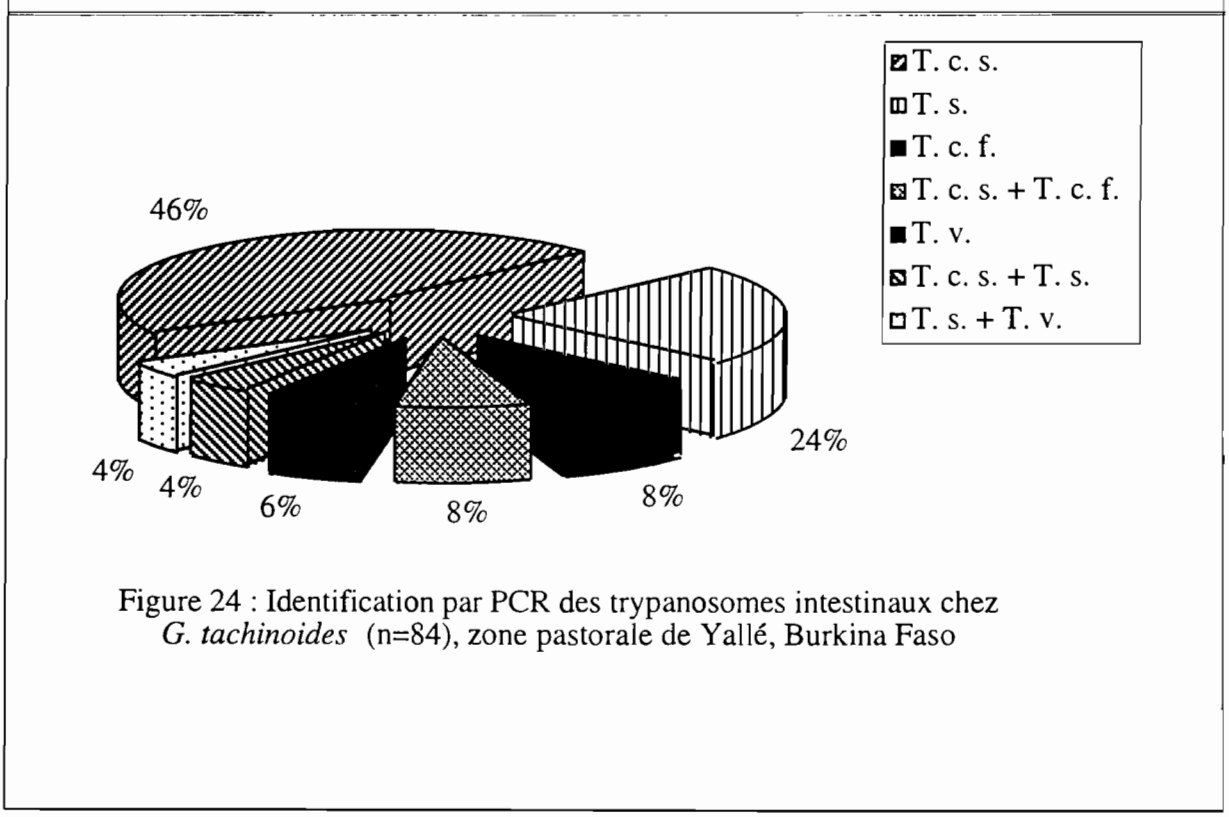


Figure 24 : Identification par PCR des trypanosomes intestinaux chez *G. tachinoides* (n=84), zone pastorale de Yallé, Burkina Faso

Diagramme du haut : pourcentages globaux
Diagramme du bas : détail des infections identifiées

T.c.s. : *T. congolense* "savane"
T.c.f. : *T. congolense* "forêt"
T.s. : *T. simiae*
T.v. : *T. vivax*
T.b. : *T. brucei* s.l.

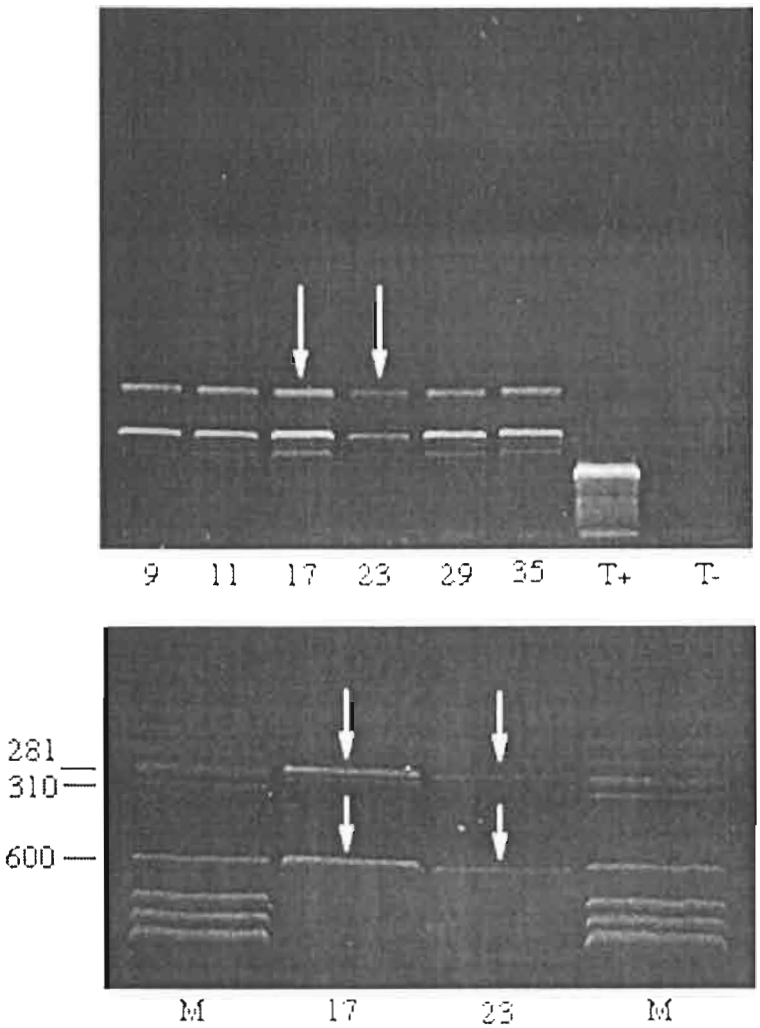


Figure 25 : Amplifications non spécifiques obtenues par PCR avec les amorces "ingi" reconnaissant *T. brucei* s.l. sur des parasites intestinaux de plusieurs *G. tachinoides* (individus n°9, 11, 17, 23, 29, 35) capturées dans la zone pastorale de Yallé.

T+ : témoin positif
T- : témoin négatif
M : marqueur moléculaire

La quasi totalité des infections analysées par PCR (83 sur 84), provenaient toutes de *G. tachinoides*) et étaient immatures (présence de trypanosomes uniquement dans l'intestin moyen), rendant impossible le diagnostic d'espèce basé classiquement sur la localisation anatomique des trypanosomes chez le vecteur. La seule infection mature était du type *Nannomonas*, montrant la présence de trypanosomes à la fois dans l'intestin moyen et le proboscis.

2-3-2-2. Résultats par la technique PCR (figure 24)

Les échantillons ont été analysés par PCR en utilisant les amorces spécifiques de *T. congolense* types "savane", "forêt", "Kilifi", "Tsavo", *T. simiae*, *T. brucei* s.l. et *T. vivax*. Ne disposant pas d'ADN témoin de *T. godfreyi*, ce taxon a été exclu de nos recherches.

Parmi les 84 intestins positifs testés, 50 (59,5%) ont pu être identifiés par PCR. Les taxons mis en évidence sont *T. congolense* types "savane" et "forêt", *T. simiae* et *T. vivax*. Des infections mixtes associant *T. congolense* type "savane" et "forêt", *T. congolense* type "savane" et *T. simiae*, *T. simiae* et *T. vivax* ont également été révélées.

Une amplification spécifique de *T. simiae* et *T. vivax* a été obtenue à partir des métacycliques présents dans le seul proboscis trouvé infecté. La présence de *T. simiae* a aussi été révélée dans le contenu intestinal de la même glossine.

Parmi les 34 infections intestinales qui n'ont pu être caractérisées, certaines ont entraîné des réactions d'amplification atypiques avec les amorces spécifiques de *T. brucei* s. l. ("ingi"). Ces amplifications se présentent sous la forme de deux bandes nettement séparées, l'une dont le poids moléculaire est environ de 300 paires de bases, la seconde de 600 paires de bases. La configuration de ces signaux ressemble à celle des dimères d'amplification des séquences satellites, hypothèse qui n'a malheureusement pas pu être confirmée par séquençage du fait de la trop faible quantité d'ADN obtenue après migration sur gel d'agarose et purification des bandes sélectionnées. Ce signal a été constaté sur plusieurs échantillons intestinaux testés avec ces amorces (figure 25), témoignant de la présence probable d'un trypanosome inconnu commun à plusieurs glossines.

Parmi les 83 proboscis trouvés indemnes de trypanosomes au microscope, 8 ont donné des signaux d'amplification par PCR, dont 2 à *T. congolense* type "savane", 2 à *T. simiae* et 4 à *T. vivax*.

2-3-3. Détermination de l'origine des repas de sang d'un échantillon de glossines

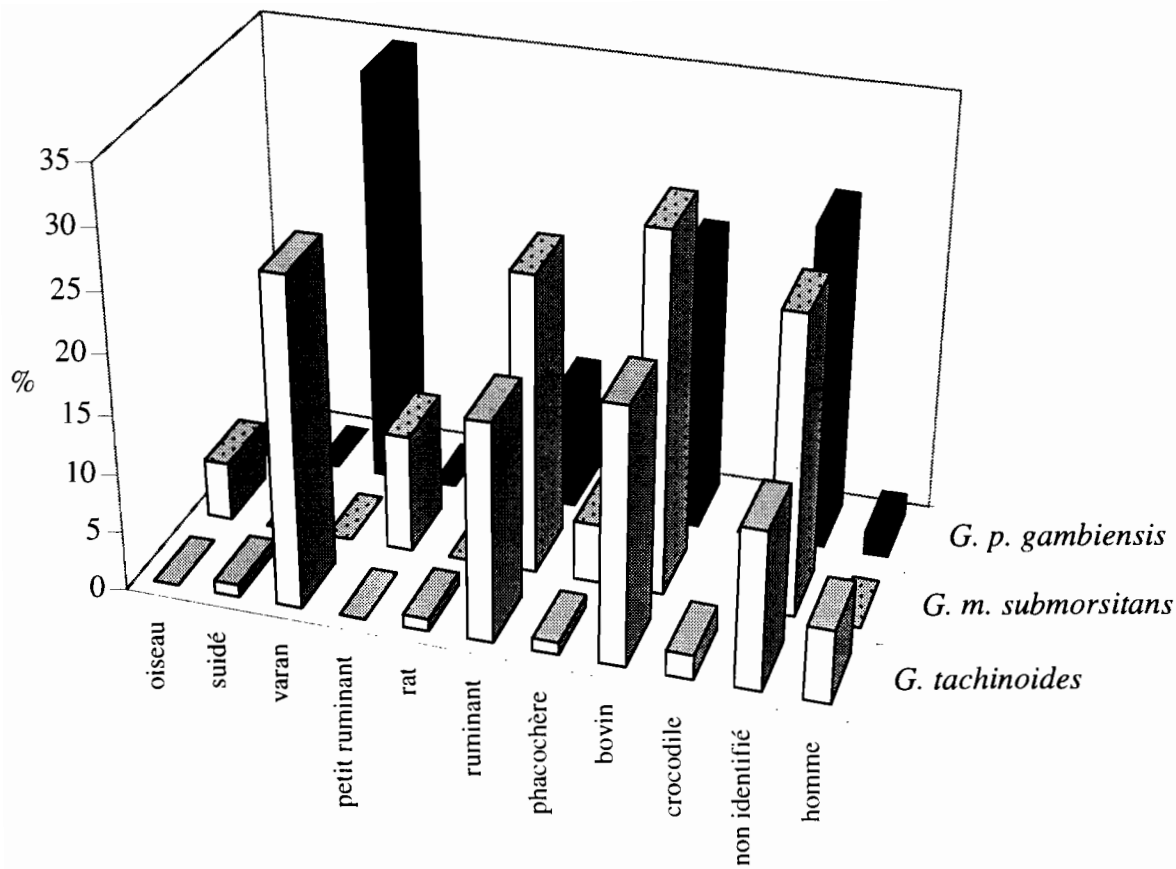


Figure 26 : Pourcentages des repas de sang par hôte et par espèce de glossine
(J. Filledier, sur la base des captures de 1993-1994)

2-3-3-1. Rappels du principe

Cette technique repose sur l'analyse sérologique du reliquat du repas de sang se trouvant dans l'intestin des diptères hématophages par la technique ELISA utilisant des antisera spécifiques des espèces d'hôtes. Perfectionnée depuis l'apparition des premiers tests des précipitines (Weitz, 1952), elle est utilisée actuellement de manière routinière par très peu de laboratoires et permet de connaître de manière de plus en plus discriminante l'origine des repas de sang des insectes hématophages. Le prélèvement se présente sous la forme d'échantillon de sang séché sur papier filtre. Il est traité ensuite au laboratoire d'analyse des repas de sang du CIRDES.

2-3-3-2. Résultats (figure 26)

L'analyse porte sur des glossines capturées (20 *G. m. submorsitans* et 98 *G. tachinoides*) au cours de la saison pluvieuse (juillet-août) de l'année 1993. Des pièges placés dans des aires plus fermées de galeries forestières ont permis de compléter l'échantillon avec des captures de *G. p. gambiensis* (52 individus).

Les spectres d'hôtes rencontrés par *G. p. gambiensis* et *G. tachinoides* sont relativement similaires, caractérisés surtout par une forte proportion de repas prélevés sur les varans et les ruminants, dont les bovins. Les préférences trophiques associent généralement *G. m. submorsitans* et les ruminants, tout particulièrement les bovins. Cette espèce semble s'attaquer très peu à l'homme dans cette région, alors qu'un faible pourcentage de repas chez les glossines du groupe *palpalis* a une origine humaine. Notons le fort pourcentage de repas non identifiés, notamment chez *G. p. gambiensis*.

2-3-4. Identification des trypanosomes dans les échantillons de sang de bovins infectés (tableau XIII)

2-3-4-1. Résultats parasitologiques

Parmi les 44 prélèvements de sang positifs, l'identification parasitologique des trypanosomes a révélé 26 cas d'infections à *T. congolense*, 17 à *T. vivax*, et 1 infection mixte à *T. congolense* et *T. vivax*. Aucune infection à *T. brucei* s.l. n'a été observée.

Tableau XIII : Bilan de l'analyse par PCR des échantillons de sang examinés au microscope à partir des prélevements sur les bovins de la zone pastorale de Yallé

sous-genre	examen microscopique	PCR	% identifiés
Nannomonas	26	22 *T. congo* "savane" (4 non identifiés)	**84,6%**
Duttonella	17	7 *T. vivax* "Af. de l'Ouest" (10 non identifiés)	**41,1%**
Nannomonas+Duttonella	1	*T. congo* "savane" (*T. vivax* non détecté)	
Trypanozoon	0	0	0
nombre total de cas positifs	44	30	**68,2%**
nombre total de cas négatifs	48	7 *T. congo* "savane" *	**14,6%**
nombre total	92	37	**40,2%**

* animaux présentant un mauvais indice de condition avec un hématocrite < 27

2-3-4-2. Résultats par la technique PCR

Les prélèvements positifs ont été testés avec les amorces spécifiques des 4 taxons de *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei* s.l. Une prospection restreinte dirigée sur les types "savane" et "forêt" de *T. congolense*, sur *T. vivax* et *T. brucei* s.l a été menée sur les échantillons parasitologiquement négatifs.

Sur les 26 infections du type *Nannomonas*, 22 (84,6%) ont été identifiées comme appartenant à *T. congolense* type "savane"; sur les 17 infections du type *Duttonella*, 7 (41,1%) seulement ont pu être confirmées par PCR. 14 échantillons (4 infectés par *T. congolense* et 10 par *T. vivax*) n'ont donné aucun signal d'amplification avec les amorces connues. La présence de *T. vivax* n'a pas été confirmée par PCR dans l'échantillon où une infection mixte à *T. congolense* et *T. vivax* avait été observée au microscope.

Sur les 48 cas parasitologiquement négatifs, 7 ont donné des signaux d'amplification avec les amorces spécifiques de *T. congolense* type "savane". Sur ces 7 animaux, 5 présentaient un hématocrite inférieur à 25, valeur limite correspondant à un état encore physiologiquement satisfaisant, les deux bovins restants ayant respectivement un hématocrite de 26 et 27.

L'absence de *T. brucei* s.l. selon les techniques parasitologiques fut confortée par la technique PCR : aucun signal n'est apparu avec les amorces spécifiques du sous-genre *Trypanozoon*.

2-4. Interprétation des résultats

Le faible taux d'infection mature chez *G. tachinoides* corrobore les observations décrites dans le chapitre expérimental. La majorité des glossines infectées avaient un âge supérieur à 30 jours. Sachant que la durée moyenne du cycle de *T. congolense* est de 14 jours, que celle de *T. vivax* est de 10 jours, la majorité des infections acquises au moment du premier repas sanguin (la réceptivité d'une glossine est fortement liée à son état ténéral) devrait théoriquement avoir atteint le stade infectant. Il est donc probable que ce fort taux d'infection immature soit plus associé à des incompatibilités physiologiques entre les trypanosomes et leurs vecteurs qu'à l'interruption du cycle évolutif lié à la dissection de jeunes mouches.

La majorité des infections intestinales identifiées par PCR sont causées par des trypanosomes appartenant au sous-genre *Nannomonas* (*T. congolense* types "savane" et "forêt", *T. simiae*), qui arrivent difficilement à maturité comme en témoigne le très faible pourcentage de proboscis infectés. Parmi les glossines analysées par PCR, la seule qui présentait des trypanosomes dans la trompe s'est avérée infectée à la fois par *T. vivax* et par *T. simiae*. Bien que fondée, la conception

selon laquelle les glossines du groupe *palpalis* sont réputées pour être des vecteurs peu efficaces des trypanosomes du sous-genre *Nannomonas* mérite d'être nuancée dans certaines situations. Force est de constater que de nombreux cas d'infections à *T. simiae* ont été détectés, corroborant d'autres résultats récents révélant aussi sa présence, en terme d'infections matures, dans certaines populations de *G. p. gambiensis* et de *G. tachinoides* sévissant le long du Mouhoun (Solano *et al.*, sous presse).

La proximité du ranch de gibier implique des rencontres permanentes ou saisonnières entre les populations de glossines et la faune sauvage qui sillonne les alentours de la zone agro-pastorale. Les suidés domestiques et sauvages constituent un réservoir naturel de trypanosomes, dont *T. simiae*, qui est particulièrement inféodé à ces mammifères (Claxton *et al.*, 1992; Torr, 1994). La présence de *T. simiae* dans les organes de *G. tachinoides* résulte probablement de contacts fréquents avec cet hôte dans les gîtes favorables. Cette espèce oriente facilement ses attaques vers les porcs domestiques des villages autours desquels elle abonde (Baldry, 1964; Laveissière, 1986), et vers les suidés sauvages dans les zones moins anthropisées (Gruvel, 1974). Le phacochère ne figure pas, d'après notre analyse, parmi ses sources de nourriture préférentielles, conséquence vraisemblable de la période (saison pluvieuse) au cours de laquelle ont été capturées les mouches destinées à l'analyse du repas de sang. La dispersion des vecteurs et des hôtes pendant l'hivernage rend plus aléatoire leurs rencontres dont la fréquence augmente en saison sèche quand les animaux et les vecteurs se concentrent autour des points d'eau. La disponibilité plus restreinte en suidés sauvages justifierait alors la forte proportion de repas prélevés sur les varans. Il est bien connu que l'opportunisme alimentaire de *G. tachinoides* lui confère des capacités d'adaptation aux périodes de restriction temporaire en hôtes nourriciers habituels, d'où les variations saisonnières des préférences trophiques fréquemment constatées (Gruvel, 1964; Boreham et Hill, 1973; Laveissière et Boreham, 1976; Laveissière, 1986; Küpper *et al.*, 1990). Les reptiles, tout particulièrement les varans et les crocodiles connus comme hôtes nourriciers de prédilection de *G. tachinoides* (Nash, 1948; Laveissière et Boreham, 1976; Moloo, 1993), hébergent des trypanosomes inoffensifs pour les mammifères (*T. varani*, *T. grayi*-like) (Minter-Goebdloed *et al.*, 1993), dont le cycle évolutif postérograde restreint le développement à l'intestin des vecteurs. Une fraction des infections immatures chez *G. tachinoides* relève probablement de ces trypanosomes, présomption confortée par le nombre élevé d'échantillons intestinaux qui n'ont pu être caractérisés avec les marqueurs moléculaires utilisés. De plus, la mobilité des trypanosomes observée au cours de l'examen microscopique de nombreux intestins parasités rappelle celle décrite antérieurement par d'autres auteurs (Bourzat et Gouteux, 1990).

Nos observations de terrain tendent à confirmer l'hypothèse selon laquelle, outre les relations privilégiées entre *T. congolense* type "forêt" et certains vecteurs, ce taxon disposerait aussi d'un spectre d'hôtes vertébrés particulier. Alors que sa présence a été détectée à plusieurs reprises chez *G. tachinoides*, il est totalement absent des prélèvements de bovins, ce qui pourrait conforter l'hypothèse d'une pathogénicité plus faible que celle de *T. congolense* type "savane" pour les bovidés. La circulation de ce taxon dans cette région pourrait alors être liée à la faune sauvage. L'hypothèse selon laquelle les populations locales de phacochères sont également un réservoir naturel de ce parasite mériterait d'être étudiée, appuyée par le fait que la majorité des souches connues isolées antérieurement proviennent de porcs domestiques (Gibson *et al.*, 1988; Masiga *et al.*, 1992; Schares et Mehlitz, 1996). Ceci confirmerait les présomptions selon lesquelles les phacochères comptent parmi les mammifères dont le "pouvoir réservoir" est le plus élevé en Afrique (Ashcroft, 1959; Snow et Boreham, 1979). D'autres mammifères, tels que le guib hanarché, connus pour être très souvent sollicités (Gruvel, 1974; Laveissière et Boreham, 1976) sont aussi suspectés d'héberger de nombreux trypanosomes pathogènes. L'étude antérieure de Mattioli et al. (1990) sur la faune sauvage du ranch de gibier de Nazinga montra au demeurant que cet animal figurait parmi les animaux présentant le plus fort taux d'infection, notamment aux trypanosomes du sous-genre *Nannomonas*.

L'identification de *T. vivax* dans le contenu intestinal de plusieurs glossines témoigne vraisemblablement de l'absorption récente d'un repas sanguin prélevé sur un animal infecté, compte tenu du fait que le cycle de *T. vivax* est limité à la région cibariale et au proboscis des glossines. Cette constatation pose le problème de la positivité du test suite à l'amplification par PCR d'ADN de trypanosomes récemment ingérés ou de résidus de trypanosomes subsistant dans l'intestin des glossines. La fréquence de tels résultats peut entraîner des interprétations épidémiologiques erronées, notamment dans les foyers actifs de trypanosomose où les contacts glossines-hôtes vertébrés sont fréquents. Des expériences au laboratoire devraient permettre, dans un proche avenir, de mieux quantifier chez la glossine les infections intestinales avortées détectables par PCR.

Plusieurs infections mixtes avec les deux taxons de *T. congolense* ont été détectées chez *G. tachinoides*. Cette sous-espèce de glossine affectionne une gamme variée de biotopes alors que la majorité des glossines du groupe *palpalis* sont plutôt riveraines. Comme cela a déjà été mentionné à plusieurs reprises, la présence concomitante de ces deux taxons a été décrite chez *G. longipalpis* en Côte d'Ivoire (Solano *et al.*, 1995) et chez *G. pallidipes* (Woolhouse *et al.*, 1996) au Zimbabwe. Ces glossines, bien qu'appartenant au groupe *morsitans*, qui réunit en majorité des espèces savanicoles, se distinguent par une plus grande ubiquité des gîtes occupés.

La niche écologique de ces espèces ni strictement savanicoles, ni strictement ripicoles, favorise une diversification des sources de nourriture, et en conséquence l'hétérogénéité parasitaire rencontrée dans ces populations de vecteurs. Ces observations sont en accord avec le modèle hypothétique qu'il convient de préciser : le taxon "forêt" serait transmis plus spécifiquement par les espèces de glossines vivant dans les biotopes humides, alors que le type "savane" aurait un spectre vectoriel moins restrictif. Ainsi, dans les zones infestées uniquement de glossines riveraines ou forestières (McNamara et Snow, 1991; Schares et Mehlitz, 1996; I. Morlais, com. pers.), seul le type "forêt" circule; en revanche, dans les aires plus ouvertes de savanes, les espèces de glossines qui s'adaptent facilement aux différents habitats peuvent aussi propager le type "savane".

Les amplifications non spécifiques obtenues à partir des trypanosomes observés microscopiquement dans plusieurs échantillons avec les amorces reconnaissant théoriquement le sous-genre *Trypanozoon* ne présagent en rien de l'identité taxonomique de ces trypanosomes intestinaux. La fréquence de ces "supposées" séquences satellites témoigne seulement de la présence du même "trypanosome inconnu" chez plusieurs individus.

L'hypothèse de la circulation de trypanosomes pathogènes non identifiables avec les marqueurs moléculaires connus est plausible. Il existe au Burkina Faso des taxons de *T. congolense* qui sont distincts des groupes référencés et en cours de caractérisation (I. Sidibe, com. pers.). Outre les souches de *T. vivax* qui n'ont pas réagi avec les amorces usuelles, quatre isolats de sang de bovins infectés par *T. congolense* ne correspondent à aucun des taxons connus. De plus, les amorces spécifiques de *T. godfreyi* n'ont pas été testées sur nos échantillons. Compte tenu de la proximité taxonomique de ce taxon avec *T. simiae*, et d'une répartition apparemment étendue sur tout le continent africain (Masiga *et al.*, 1996), l'éventualité de sa présence dans nos sites d'étude est aussi envisageable. Des inhibitions de l'amplification sont peut être également responsables des problèmes rencontrés dans l'identification de certaines infections.

L'intégration tardive (en cours de campagne de lutte) des équipes de prospection entomologique n'a pas permis l'étude de la capacité vectorielle de *G. m. submorsitans*, dont les populations ont rapidement régressé consécutivement à la lutte. Elle aurait probablement apporté d'utiles informations complémentaires. Cette sous-espèce est renommée pour s'attaquer fréquemment aux phacochères (Snow et Boreham, 1979; Jordan *et al.* 1962; Jordan, 1964; Moloo, 1993), ce qui fut aussi démontré au cours des études antérieures dans l'enceinte même du ranch de gibier de Nazinga (Mattioli *et al.*, 1990; Mattioli, 1991). L'étude des trypanosomes transmis par ce vecteur dans cette zone aurait été probablement fructueuse, car *G. m. submorsitans* est considérée comme le vecteur majeur des trypanosomoses animales du bétail, et dispose d'un

spectre d'hôtes mammifères plus ciblé que celui de *G. tachinoides*, dont le régime alimentaire se distingue par un plus grand éclectisme. La diversité parasitaire rencontrée chez *G. m. submorsitans* devrait être plus aisée à caractériser que celle qui affecte *G. tachinoides*, du fait que les trypanosomes de reptiles, tenus partiellement pour responsables des difficultés de caractérisation des infections intestinales des glossines riveraines, sont probablement moins fréquents dans l'intestin de *G. m. submorsitans*.

Une proportion non négligeable (9,6%) de proboscis négatifs à l'examen parasitologique se sont révélés positifs par PCR. A la lumière des études expérimentales, il paraît peu probable que des trypanosomes soient passés inaperçus au contrôle microscopique du proboscis, à moins qu'ils ne soient localisés dans la région cibariale (Jefferies *et al.*, 1987) et aient diffusé dans des parties dissimulées de la trompe au moment de la dissection. La moitié de ces amplifications sont spécifiques de *T. vivax*. D'après certaines études (Moloo et Gray, 1989), le cycle de ce trypanosome serait initié au niveau du cibarium et de l'oesophage de la glossine; ceci pourrait expliquer le plus grand nombre de cas de détection par PCR de *T. vivax* dans des proboscis de glossines parasitologiquement négatives (Masiga *et al.*, 1996).

L'analyse des prélèvements animaux montre que la majorité des infections sont dues à *T. vivax* et *T. congolense* type "savane". De nombreuses souches de *T. vivax* n'ont pas pu être identifiées par PCR. La sensibilité relativement moyenne du marqueur moléculaire utilisé et les inhibitions éventuelles nous paraissent insuffisantes pour justifier que 41,1% des infections du type *Duttonella*, parmi lesquelles figuraient des infections massives, n'aient donné aucun signal positif par PCR avec les amorces spécifiques testées. Par conséquent, il semblerait que certaines souches de *T. vivax* circulant dans cette région, pour lesquelles quelques tentatives d'isolement sur souris se sont malheureusement soldées par un échec, ne soient pas reconnues par les marqueurs moléculaires utilisés.

Des signaux d'amplification avec les amorces spécifiques de *T. congolense* type "savane" ont été obtenus à partir d'échantillons provenant de 7 bovins aparasitémiques, mais pour la plupart suspectés d'être infectés du fait d'un hématocrite faible et d'un état général faible. L'évaluation expérimentale décrite au paragraphe 2-3 du chapitre III nous permet d'attribuer à ces animaux une infection vraisemblablement naissante ou chronique en phase aparasitémique, indécelable à l'examen microscopique. Malgré le coût élevé que peut représenter la recherche de trypanosomes par PCR sur les animaux parasitologiquement négatifs, il est intéressant de souligner une fois de plus l'apport de cet outil pour révéler les pauci-infections.

2-5. Contribution à la connaissance des niveaux de transmission

Malgré la complexité écologique de la situation et les difficultés logistiques, certains aspects relatifs à la nature et la circulation des trypanosomes pathogènes dans ce foyer de TAA ont pu néanmoins être dégagés. Deux cycles parasitaires avec de multiples interactions peuvent schématiser de manière simplifiée la situation (figure 27). Un cycle de transmission "domestique" implique les trypanosomes les plus détectés chez les bovidés, *T. vivax* et *T. congolense* type "savane", tandis qu'un cycle "sauvage" implique ces mêmes trypanosomes, ainsi que d'autres (*T. congolense* type "forêt", *T. simiae*, éventuellement d'autres trypanosomes non identifiés), peu ou pas pathogènes pour les bovidés, essentiellement originaires d'une faune résiduelle occasionnellement rencontrée par les vecteurs. L'identification de tous ces trypanosomes chez *G. tachinoides* donne une estimation approximative de la diversité parasitaire prédominante dans cette zone et qui est amenuisée par le "filtre immunitaire" des bovins.

Malheureusement, il subsiste de nombreuses lacunes qui limitent la compréhension des cycles de transmission, et qui mériteraient des investigations complémentaires :

- l'étude des populations de *G. m. submorsitans*, qui nécessiterait une extension des prospections entomologiques dans les zones de savane adjacentes au réseau hydrographique de la Sissili, voire dans la réserve même de Nazinga. Le peu d'infections matures constaté chez *G. tachinoides* laisse penser que *G. m. submorsitans* est certainement aussi très impliquée dans la propagation de la maladie en assurant notamment un lien étroit entre la faune sauvage évoluant principalement dans les zones de savane et le bétail domestique au moment des transhumances. A la faveur de ces présomptions, l'étude de Mattioli *et al.* (1990) sur les populations glossiniennes de la même zone a montré que *G. m. submorsitans* est significativement plus infectée que *G. tachinoides.*
- l'évaluation plus précise de la transmission mécanique nécessitant une stratégie d'étude plus appropriée (voir paragraphe suivant), afin de justifier les flambées de trypanosomoses en certains lieux et certaines saisons,
- l'étude de la faune sauvage afin de corroborer nos hypothèses sur le "pouvoir réservoir" de certains hôtes mammifères et ainsi d'améliorer nos connaissances sur les relations parasites-hôtes vertébrés.

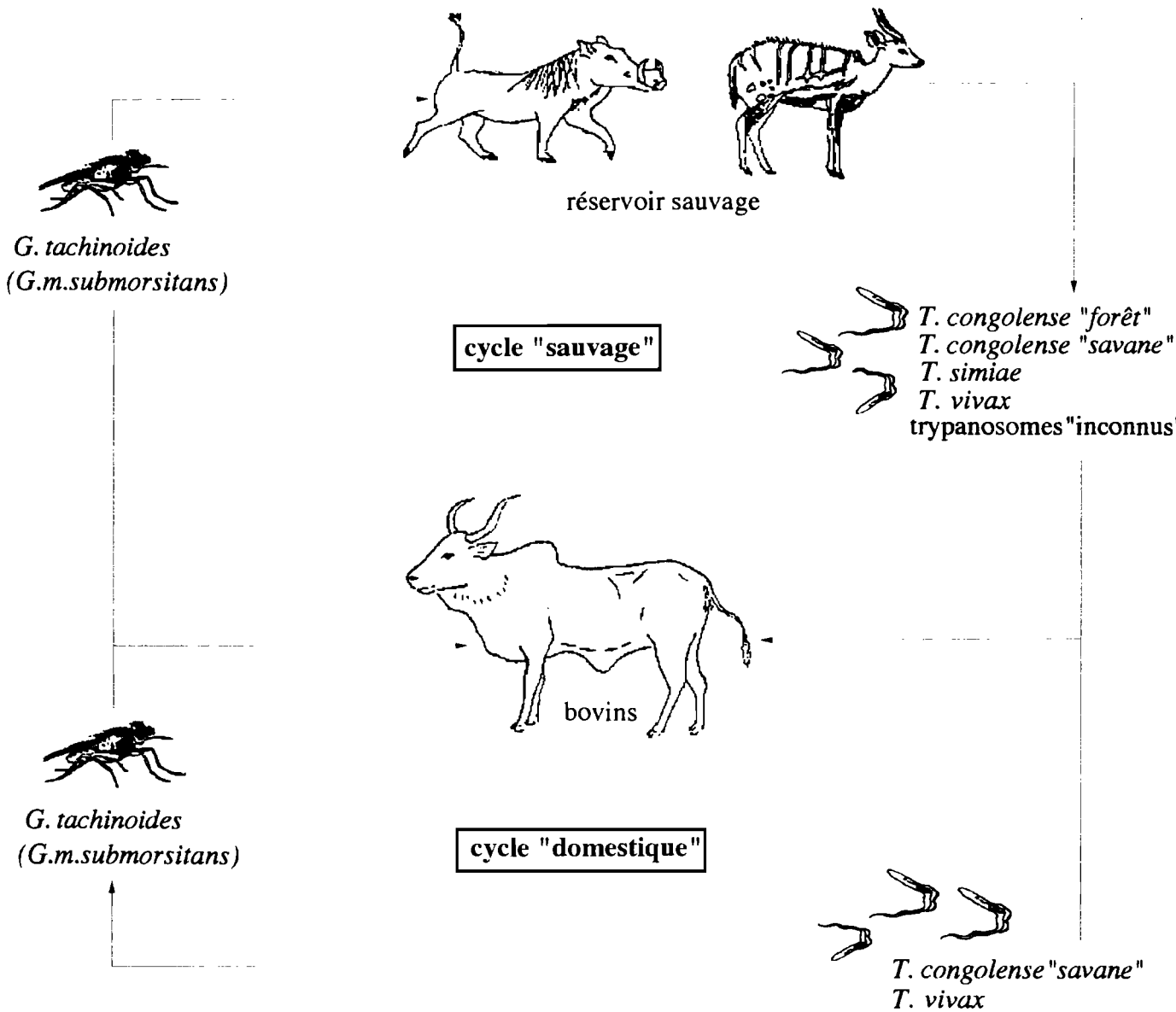


Figure 27 : Ebauche des cycles présumés de transmission d'après l'analyse par PCR des trypanosomes chez *G. tachinoides* et les bovins de la zone pastorale de Yallé, Province de la Sissili, Burkina Faso

3- Observations de terrain liées au phénomène de la transmission mécanique

Les tabanides et les stomoxes capturés au cours des différentes missions sur le terrain ont fait ponctuellement l'objet d'investigations (dissection de l'intestin et des pièces buccales et recherche microscopique des trypanosomes). Lors d'une étude réalisée sur des tabanides capturés dans la station expérimentale du CIRDES, à proximité de Bobo-Dioulasso, la technique PCR a révélé la

la présence de *T. congolense* type "savane" dans le contenu intestinal de ces insectes (Solano *et al.*, 1995). Bien qu'aucune indication n'atteste de la présence de trypanosomes dans leurs pièces buccales, ces diptères sont probablement impliqués dans l'apparition et le maintien de la maladie importée dans la ferme par des bovins qui se sont probablement infectés aux points d'abreuvements externes. D'autres cas de tabanides capturés dans d'autres foyers de trypanosomose, dont les intestins contenaient des protozoaires flagellés, ont été répertoriés, mais les trypanosomes n'ont pu être identifiés par PCR. Il est vraisemblable qu'il s'agit d'infections à *T. theileri*, trypanosome de bovin non pathogène à développement cyclique postérograde et transmis préférentiellement par ces insectes.

L'application de la technique PCR pour mettre en évidence l'existence de trypanosomes dans les pièces buccales de stomoxidés fut peu révélatrice. Le seul cas intéressant rapporte l'identification de *T. vivax* dans le stylet piqueur d'un stomoxe dont l'examen microscopique révélait la présence effective de trypanosomes (Reifenberg, 1995).

L'approche de la problématique de la transmission mécanique des trypanosomes exige une méthodologie spécifique. L'apparition par PCR de signaux d'amplification à partir de trompes d'insectes hématophages n'a pas obligatoirement une signification épidémiologique, même si des trypanosomes vivants ont été observés au préalable à l'examen microscopique. En effet, la vivacité apparente des parasites n'atteste pas du maintien de leur pouvoir infectant au moment de la piqûre sur un animal sain.

Le procédé le plus explicite pour démontrer la transmission mécanique consisterait à nourrir sur des souris saines immunodéprimées les tabanides ou les stomoxes fraîchement piégés sur le terrain. Malgré la sélection de souches inévitable par ce procédé, la technique PCR permettrait d'identifier les trypanosomes les plus virulents pour les rongeurs de laboratoire. Cette adaptation de la technique du xénodiagnostic inverse peut cependant s'avérer délicate étant donné le fragilité des insectes capturés, dont le comportement piqueur peut être en outre fortement perturbé en présence d'un hôte inhabituel.

Une telle étude implique un mode de piégeage plus approprié, source de perfectionnements récents (Holloway et Phelps, 1991; Djiteye, 1992; Amsler et Filledier, 1994; Amsler *et al.*, 1994; Mihok *et al.*, 1995), et un investissement qui n'est pas toujours compatible avec les objectifs fixés par les équipes de lutte antivectorielle au cours de leurs missions. La dissection et l'examen des pièces buccales des tabanides et des stomoxes, la méthode de xénodiagnostic inverse envisagée précédemment, requièrent une surcharge de travail très importante, notamment en certaines saisons où l'on assiste à de véritables pullulations d'insectes. Face à l'augmentation alarmante des situations où ce mode de transmission apparaît fortement impliqué dans le maintien ou l'explosion de foyers de la maladie, il parait important de consacrer plus de moyens à l'évaluation de la transmission mécanique pour mieux comprendre ce phénomène, et ainsi combattre plus efficacement les vecteurs incriminés.

4- Résumé

L'analyse d'isolats de la cryothèque du CIRDES montre l'intérêt de la technique PCR pour détecter les infections multiples qui affectent les hôtes vertébrés, en dépit de la sélection qui s'opère par l'isolement et le maintien des souches sur des animaux de laboratoire.

Ces résultats permettent par déduction de confirmer certaines tendances relatives aux relations privilégiées associant *T. congolense* type "forêt" et les glossines du groupe *palpalis*, plus particulièrement *G. p. gambiensis*, alors que *T. congolense* type "savane" dispose d'un spectre vectoriel moins spécifique.

L'étude engagée dans la zone pastorale de Yallé fait ressortir certaines difficultés liées à l'application exhaustive des outils moléculaires de diagnostic sur le terrain, dont la principale est la non reconnaissance de certains trypanosomes, inhérente à la grande diversité parasitaire naturelle.

La détection de *T. simiae* chez *G. tachinoides*, observée ici mais aussi par d'autres équipes en Afrique occidentale, remet en question la conception dogmatique selon laquelle les glossines du groupe *palpalis* représentent de mauvais vecteurs des trypanosomes du sous-genre *Nannomonas*.

La mise en évidence d'infections mixtes chez *G. tachinoides* avec les types "savane" et "forêt" de *T. congolense* complète d'autres observations révélant la présence concomitante des deux taxons chez des glossines aux caractéristiques écologiques moins tranchées (ni strictement savanicoles, ni strictement forestières).

Exemple d'un réseau de galeries forestières de la zone soudano-guinéenne, habitats préférés des glossines du groupe *palpalis* (Image SPOT IK.96 I 339 du 15.11.86).

(G. Dewispeleare, 1990)

CHAPITRE VI : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de nos différentes investigations, nous avons montré le haut intérêt de la technique PCR qui révèle plus aisément que les techniques parasitologiques classiques les infections mixtes et les pauci-infections chez le vecteur et chez l'hôte vertébré, au laboratoire et sur le terrain.

Les données de la littérature montrent que les modes de prélèvement et de traitement des échantillons conditionnent fortement les performances de la technique PCR. D'après nos résultats et les méthodes de préparation des échantillons que nous préconisons, cette technique, appliquée sur les proboscis et les salivats de glossines expérimentalement infectées, n'apparaît globalement pas plus sensible que l'examen microscopique pour détecter les trypanosomes. Son intérêt réside dans l'identification exacte des parasites préalablement observés au microscope. L'amplification de traces d'ADN susceptibles de persister dans les pièces buccales du vecteur après un repas sanguin pris sur un animal infecté est vraisemblablement peu fréquente; en revanche, l'amplification d'ADN de reliquats de trypanosomes dans l'intestin des glossines est possible, et son importance doit être impérativement évaluée. Chez l'hôte vertébré, l'application de la technique PCR sur le "buffy-coat" est suffisamment fiable pour mettre en évidence les parasites à des concentrations très faibles. Elle permet de s'affranchir de la détection éventuelle de traces d'ADN susceptibles de persister dans le plasma des animaux après guérison spontanée ou provoquée.

La sensibilité de cette technique est un atout important, mais elle peut également se révéler comme un grand inconvénient à cause des contaminations potentielles. L'examen micoscopique des échantillons demeure la base parasitologique du diagnostic, et de nombreuses précautions doivent conjointement contribuer à la rigueur d'une analyse : nettoyage soigneux des instruments de dissection des glossines, séparation des principales étapes pour l'analyse des échantillons (préparation, amplification, révélation) dans des salles distinctes, utilisation de témoins positifs et négatifs à chaque réaction d'amplification, répétitions des tests pour assurer une bonne reproductibilité des résultats. Une certaine circonspection doit aussi être observée au moment de l'interprétation des résultats si des signaux d'amplification spécifique apparaissent alors qu'aucun parasite n'a été détecté par examen microscopique. Cela explique en partie les difficultés d'interprétation lorsque l'étude de la transmission mécanique repose seulement sur la technique PCR appliquée à l'appareil piqueur des insectes étudiés. Un important effort doit être poursuivi dans une évaluation plus approfondie de ces techniques au laboratoire pour mieux appréhender, et ainsi mieux maîtriser, les difficultés liées à un usage plus routinier sur le terrain.

L'usage extensif de la technique PCR se heurte aussi à la diversité parasitaire à laquelle on se trouve confronté en conditions naturelles. Les marqueurs moléculaires ont été mis au point à partir de clones bien définis. Sur le terrain, leur application sur des parasites appartenant à un groupe inconnu peut donner lieu à une absence d'amplification ou à des amplifications non spécifiques. Afin de limiter de tels aléas, il serait d'un grand intérêt de s'attarder sur la diversité génétique des trypanosomes à cycle de développement postérograde, tels ceux rencontrés chez les reptiles. D'une part, cela permettrait de tester les marqueurs moléculaires connus sur un éventail plus large d'isolats de trypanosomes incluant les agents non pathogènes pour les mammifères; d'autre part, il serait d'une grande utilité de différencier chez le vecteur ces parasites de trypanosomes d'intérêt médical et vétérinaire, compte tenu du fait que l'analyse porte souvent sur des parasites de glossines dont les préférences trophiques s'orientent au moins partiellement vers des hôtes poïkilothermes (serpents, varans, crocodiles...), connus pour abriter de nombreux trypanosomes non transmissibles aux mammifères.

Connaissant les différences de pathogénicité pour le bétail entre certains taxons de trypanosomes (*T. congolense*, *T. simiae*) qu'il est impossible de différencier selon les critères parasitologiques classiques, leur identification précise chez la glossine, tout particulièrement au niveau de l'appareil piqueur, est d'un grand intérêt pour mieux comprendre l'épizootiologie de la maladie. La reconnaissance précise du taxon transporté doit permettre d'orienter les recherches vers des différences probables de virulence entre les taxons existants de *T. congolense*. Dans l'état actuel des connaissances, le statut biologique attribué à ces types moléculaires est surtout lié à leurs différences biochimiques, leurs distributions géographiques et leurs relations avec les vecteurs cycliques. Nous avons pu constater au cours de nos études que les types "savane" et "forêt" de *T. congolense* ont aussi un comportement différent vis-à-vis de certains de leurs hôtes vertébrés. Les marqueurs satellites utilisés pour les identifier reconnaissent aussi des différences de pathogénicité, ce qui ouvre la voie à un vaste champ d'investigations portant sur l'étude du pouvoir pathogène et du spectre d'hôtes vertébrés (notamment le réservoir sauvage) des différents taxons de *T. congolense*.

La diversité génétique chez les parasites eucaryotes et procaryotes est connue et constitue l'un des principaux atouts qui leur permet de déjouer les défenses de leurs hôtes. L'expression de cette diversité dépend des pressions de sélection, naturelles ou artificielles, qu'exercent des facteurs extrinsèques et intrinsèques aux hôtes vertébrés et invertébrés sur ces organismes. La

variabilité des micro-organismes à reproduction asexuée peut être considérablement accrue lorsque cette reproduction majoritairement clonale se trouve ponctuée d'échanges génétiques qui contribuent aussi à l'apparition de nouveaux génotypes. La mise en évidence expérimentale d'hybrides chez des glossines infectées simultanément par plusieurs clones de *T. brucei* (Jenni, 1990; Schweizer *et al.*, 1991; Gibson et Bailey, 1994) est source de nombreuses discussions sur l'apparition possible de nouvelles souches virulentes, par mobilisation de nouvelles combinaisons génétiques favorisant une meilleure propagation de l'agent pathogène. Le déterminisme de ces échanges génétiques n'est pas connu, et leur fréquence chez la glossine semble faible, d'où l'évaluation difficile de leur contribution dans l'évolution des trypanosomes. De plus, un tel phénomène requiert l'absorption simultanée ou séquentielle par la glossine de trypanosomes dont les niches écologiques sont parfois distinctes, et ne peut se produire que dans des situations épidémiologiques bien particulières (Gibson et Bailey, 1994). Ces mécanismes évolutifs concernent surtout les trypanosomes appartenant aux sous-genres *Nannomonas* et *Trypanozoon*. Le polymorphisme génétique plus modéré de *T. vivax* est sans doute lié à un cycle évolutif chez la glossine moins complexe (il ne passe pas par l'intestin où les interactions avec les autres micro-organismes sont très nombreuses), associé à un mode de transmission mécanique probablement important en Afrique sub-saharienne, et obligatoire dans les régions indemnes de mouches tsé-tsé.

Le trypanosome est soumis à de grandes pressions sélectives au cours de son cycle parasitaire (figure 28). La sélection agit au niveau du système de défense des glossines et des hôtes vertébrés qui constitue le premier obstacle à l'installation du parasite dans un environnement où il pourra se multiplier. Les nombreux facteurs biotiques et abiotiques extérieurs au système parasites-hôtes sont également impliqués dans l'évolution du parasite, comme la prédation et la compétition qui, en affectant surtout le vecteur, agissent indirectement sur les micro-organismes qu'il transporte.

L'action humaine sur les trypanosomes est multifactorielle. Elle agit directement par les thérapies largement utilisées, sur le continent africain en particulier (chimioprophylaxie, chimiothérapie), qui sélectionnent à plus ou moins long terme l'expression par les trypanosomes de gènes de résistance aux trypanocides utilisés (Authié, 1984; Clausen *et al.*, 1992).

Elle influe au travers des vecteurs, involontairement en modifiant l'environnement propice aux glossines, et volontairement en luttant contre les insectes (épandages insecticides, piégeage, lutte génétique, etc.) . En effet, l'anthropisation croissante du milieu et la lutte antivectorielle sont

responsables d'une régression parfois importante des populations glossiniennes. C'est le cas dans certaines régions d'Afrique occidentale, où ce phénomène affecte tout particulièrement les glossines du groupe *morsitans*, les plus sensibles aux actions d'origine humaine. La situation de plus en plus fréquemment observée est la disparition de ces espèces et le maintien de celles qui s'adaptent à des gîtes refuges naturels ou artificiels, ce type de situation devenant fréquent avec les glossines du groupe *palpalis*.

L'action de l'homme sur les trypanosomes agit aussi au travers des hôtes vertébrés. Le métissage des races domestiques sensibles (zébus) avec les races trypanotolérantes (taurins) peut entraîner l'apparition de races présentant un certain niveau de résistance (c'est le cas du zébu "Galana" au Kenya). La transformation croissante des paysages et le braconnage effréné en Afrique sont responsables d'une raréfaction parfois dramatique de la faune sauvage, d'où la tendance à une réorientation des préférences trophiques des glossines vers le bétail et l'homme, seuls hôtes disponibles (Laveissière, 1986; Cuisance, 1995). Les conséquences des pressions d'origine anthropique sur l'évolution des trypanosomes sont difficiles à évaluer, bien que l'on puisse en observer certains prémices : le maintien de foyers (notamment à *T. vivax*) dans des zones où les populations de glossines ont disparu, traduisant le rôle croissant du mode de transmission mécanique, la tendance dans certaines régions à l'augmentation chez le bétail de taux d'infection à *T. congolense* et une diminution des taux d'infection à *T. vivax*, alors que l'inverse était observé plusieurs dizaines d'années auparavant. Cette dernière tendance est liée en partie au fait que les éleveurs colonisent de plus en plus les zones humides, certes plus riches en ressources pastorales, mais dans lesquelles le bétail se trouve confronté à des populations de glossines et des parasites inhabituels.

La pathogénicité d'un parasite est la résultante *de la sélection du ou des caractères qui assurent au parasite le meilleur succès reproductif* (Combes, 1995). Dans le cas des trypanosomes, une souche très virulente entraînant la mort rapide de l'hôte a une probabilité moindre d'être transmise qu'une souche moins pathogène, et aura donc plus de chances d'être contre-sélectionnée. Néanmoins, il existe un coût à un tel comportement, dans le sens où les trypanosomes à pathologie réduite s'assurent une plus grande probabilité de transmission, mais sont aussi responsables de leur propre perte par les conséquences indirectes qu'ils entraînent chez leurs hôtes (pertes par morbidité du bétail domestique, moindre compétitivité des animaux, plus grande sensibilité à la prédation et aux autres maladies, etc.). Il est important d'avoir à l'esprit cette notion que Combes (1995) définit par "*le coût imcompressible du parasitisme*",

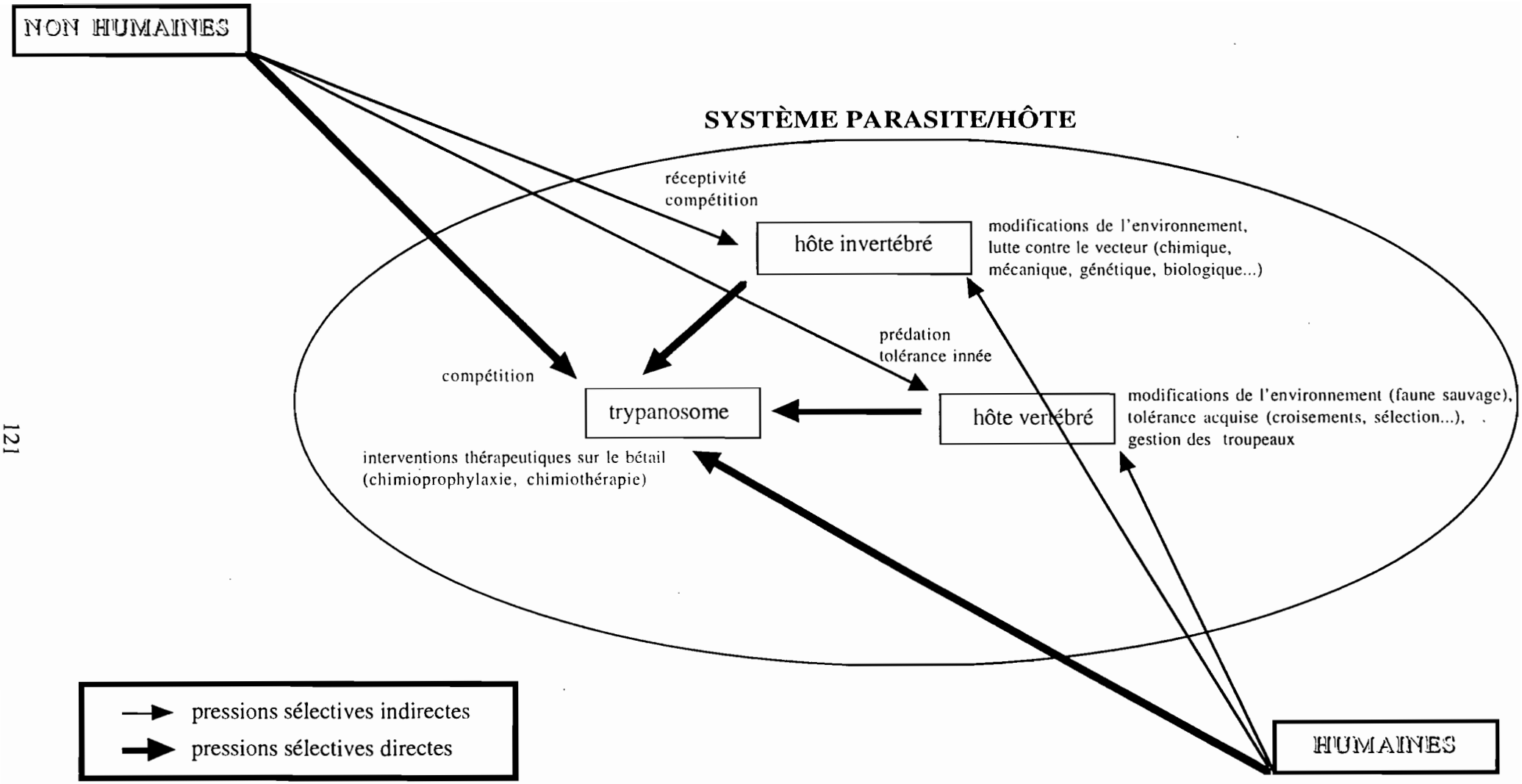


Figure 28 : Représentation schématique des différentes pressions de sélection agissant sur le trypanosome au cours du cycle parasitaire

pour comprendre le compromis que le trypanosome doit satisfaire pour assurer son meilleur succès reproductif.

Dans les faits, *T. brucei*, et vraisemblablement *T. congolense*, forment un étonnant complexe de parasites par les nombreux degrés de pathogénicité exprimés envers leurs hôtes vertébrés. Rétrospectivement, on peut imaginer que les trypanosomes africains coexistaient avec les ongulés autochtones depuis très longtemps, grâce à un équilibre qui à l'origine ne devait affecter significativement ni la *fitness* (succès reproductif) du parasite, ni celle des hôtes. L'arrivée de l'homme il y a quelques millénaires a modifié cet équilibre par l'introduction d'espèces bovines domestiques sensibles aux trypanosomes. Cette "perturbation" fut accentuée par le métissage intense de ces races sensibles avec des races trypanotolérantes; d'où l'apparition chez l'hôte vertébré de nombreux mécanismes intermédiaires de résistance à l'infection trypanosomienne, sélectionnant aussi une diversification de la pathogénicité des trypanosomes attesté par les nombreuses formes intermédiaires de virulence observées dans la nature. Ces mécanismes ont sans doute été intensifiés par l'anthropisation du milieu dont certaines conséquences ont été décrites précédemment (régression de la faune sauvage, changement de la composition et du comportement des populations de glossines, modification des pratiques d'élevage, etc.).

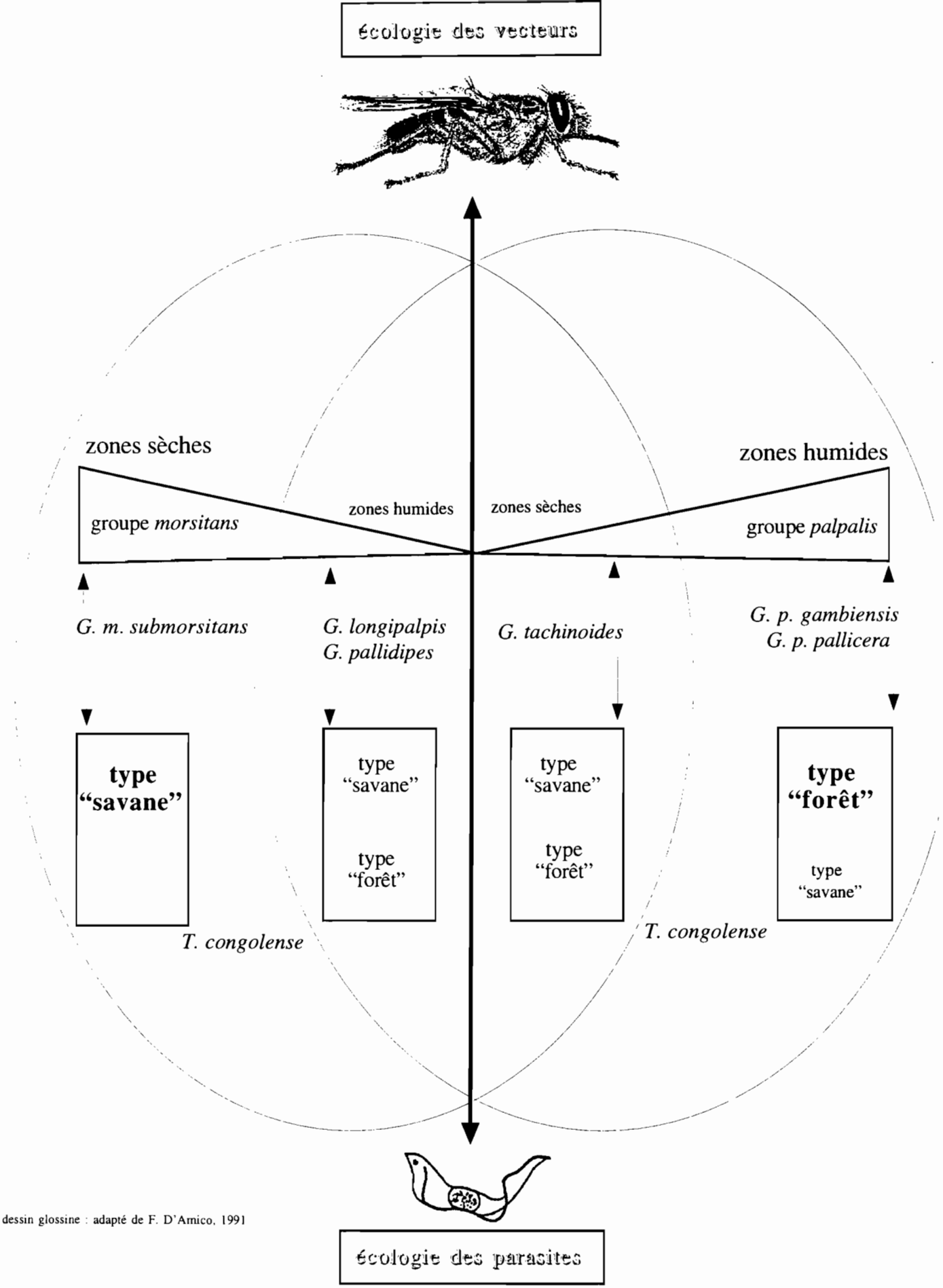
L'approche moléculaire de l'épizootiologie des trypanosomoses animales en Afrique a permis de connaître plus précisément les relations complexes qui associent les taxons "savane" et "forêt" de *T. congolense* et leurs différents hôtes. Elles se présentent schématiquement sous la forme de deux systèmes parasites-hôtes (figure 29). L'un comprend les glossines du groupe *morsitans*, dont la majorité des espèces vivent dans les zones arides, et qui sont les vecteurs préférentiels de *T. congolense* type "savane"; ce dernier dispose d'un spectre encore mal connu d'hôtes vertébrés, dont les bovidés domestiques pour lesquels il exprime une grande virulence. L'autre comprend les glossines du groupe *palpalis*, peuplant surtout les galeries forestières des savanes humides, les zones pré-forestières ou forestières, et qui sont les vecteurs préférentiels de *T. congolense* type "forêt". Ce taxon exprime une moindre virulence pour les bovidés d'élevage, mais semble affecter préférentiellement les suidés domestiques. La niche écologique des deux taxons de parasites inclut un réservoir sauvage probablement conséquent qui n'a, à ce jour, jamais été abordé avec les outils moléculaires de diagnostic.

La niche écologique de certaines espèces de glossines est intermédiaire entre celle des glossines fortement savanicoles (groupe *morsitans*) et celle des glossines fortement ripicoles (groupe *palpalis*). Ces espèces aux caractéristiques écologiques originales fréquentent des biotopes plus diversifiés que les glossines du système "groupe *morsitans*/*T. congolense* savane" et que celles du système "groupe *palpalis*/*T. congolense* forêt". De part leur chevauchement de zones éco-

climatiques (voir figure 29), elles rencontrent à la fois les taxons "savane" et "forêt" de *T. congolense*, pouvant expliquer la cohabitation plus facile de ces parasites chez ces vecteurs, alors qu'ils ont tendance à s'exclure dans leur espace hôte-parasite originel.

Les orientations des stratégies de lutte tiennent de plus en plus compte du soucis écologique selon lequel il ne faut pas lutter *contre le parasite*, mais *contre le parasite dans son environnement*. Les stratégies thérapeutiques de grande envergure sont dorénavant périmées du fait de leur coût, de l'apparition croissante de résistances, et du réservoir sauvage impossible à contrôler. De même, l'éradication des populations glossiniennes par des méthodes certes très efficaces (lutte par lâcher de mâles stériles), mais coûteuses et imposant une surveillance intense pour anticiper et contrôler les éventuelles ré-invasions de glossines dans les régions traitées. De nos jours, le combat contre les trypanosomoses animales a évolué vers une lutte de type intégré, associant au contrôle des parasites le contrôle des populations glossiniennes. De plus, cette méthode de lutte s'adapte plus facilement aux exigences des éleveurs qui tendent à se sédentariser de plus en plus, et qui doivent faire face à des populations glossiniennes de plus en plus locales (groupe *palpalis*), compte tenu du fait que les espèces peuplant de vastes étendues (groupe *morsitans*) ont fortement régressé en Afrique Occidentale.

La gestion du contrôle de cette endémie, qui doit prendre en considération tout un ensemble de préoccupations économiques, politiques et écologiques, est aussi tributaire de l'évolution technologique nécessaire pour mieux appréhender la composition et l'évolution des systèmes écologiques. Les progrès dans l'identification moléculaire des trypanosomes circulant dans la nature, en relation avec la caractérisation moléculaire et génétique des populations glossiniennes grâce aux marqueurs les plus récents (microsatellites), devraient contribuer, dans un proche avenir, à une connaissance encore accrue des interrelations complexes associant les trypanosomes et leurs différents hôtes. Ainsi, une meilleure compréhension de l'épidémiologie des trypanosomoses facilitera le meilleur contrôle d'une endémie qui demeure une des premières préoccupations de l'élevage en Afrique sub-saharienne.



dessin glossine : adapté de F. D'Amico, 1991

Figure 29 : Relations d'affinité entre les taxons "savane" et "forêt" de *T. congolense* et les espèces de glossines en fonction de leur habitat : schéma représentant les tendances qui se dégagent d'après les observations sur le terrain. Les glossines de zones sèches transmettent préférentiellement *T. congolense* "savane" (à gauche), les glossines de zones humides transmettent préférentiellement *T. congolense* "forêt" (à droite), les glossines ni strictement savanicoles, ni strictement ripicoles peuvent transmettre les deux taxons (au centre).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AERTS, D., TRUC, P., PENCHENIER, L., CLAES, Y. & LE RAY, D. (1992). A kit for *in vitro* isolation of trypanosomes in the field: first trial with sleeping sickness patients in the Congo Republic. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**, 394-395.

AGU, W.E. (1984). Comparative study of the susceptibility to infection with *Trypanosoma simiae* of *Glossina morsitans* and *G. tachinoides*. *Acta Trop.* **41**, 131-134.

ALLSOPP, B.A. & NEWTON, S.D. (1985). Characterization of *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* by isoenzyme analysis. *Int. J. Parasitol.***15**, 265-270.

AMSLER, S. & FILLEDIER, J. (1994). Attractivité pour les Tabanidae de l'association méta-crésol/octénol: Résultats obtenus au Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **47**, 93-96.

AMSLER, S., FILLEDIER, J. & MILLOGO, R. (1994). Attractivité pour les tabanides de différents pièges à glossines avec ou sans attractifs olfactifs. Résultats préliminaires obtenus au Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **47**, 63-68.

ARGIRO, L. (1993). Rapport d'activités. *Unité d'Epidémiologie et de Biotechnologie appliquée du CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 29 p.*

ARTAMA, W.T., AGEY, M.W & DONELSON, J.E. (1992). DNA comparisons of *Trypanosoma evansi* (Indonesia) and *Trypanosoma brucei* spp. *Parasitol.* **104**, 67-74.

ASHCROFT, M.T. (1959). The importance of African wild animals as reservoirs of trypanosomiasis. *E. Afr. Med. J.* **36**, 289-297.

ASHRAFI, S.H. (1964). The cultivation and nutritional requirement of *Stomoxys calcitrans. Bull. World Health Organ.* **3**, 519-520.

AUTHIE, E. (1984). Mise en évidence d'une résistance aux trypanocides parmi des souches de *Trypanosoma congolense* récemment isolées au Burkina. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **37**, 219-235.

BAILEY, J.W. & SMITH, D.H. (1992). The use of the acridine orange QBC technique in the diagnosis of african trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**, 630.

BAJYANA SONGA, E., HAMERS-CASTERMAN, C., PHOLPARK, M., PHOLPARK, S., LEIDL, K., TANGCHAITRONG, S., CHAICHANOPOONPOL, I., VITOORAKOOL, C. & THIRAPATSAKUM, T. (1987). The use of the card agglutination test (Test tryp CATT) for use in detection of *T. evansi* infection: a comparison with other trypanosomiasis diagnostic tests under field conditions in Thailand. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* **67**, 137-148.

BALDRY, D.A.T (1964). Observations on a close association between *Glossina tachinoides* and domestic pigs near Nsukka, Eastern Nigeria II- Ecology and trypanosome infection rates in *G. tachinoides*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **58**, 32-44.

BALDRY, D.A.T. (1969). The epidemiological significance of recent observations in Nigeria on the ecology of *Glossina tachinoides* Westwood (Diptera: Muscidae). *Bull. Entomol. Soc. Niger.* **2**, 34-38.

BALDRY, D.A.T. (1969). Variations in the ecology of *Glossina* spp. with special reference to Nigerian populations of *Glossina tachinoides*. *Bull. World Health Organ.* **40**, 859-869.

BALDRY, D.A.T. (1980). Local distribution and ecology of *Glossina palpalis* and *G. tachinoides* in forest foci of west african human trypanosomiasis, with special reference to associations between peri-domestic tsetse and their hosts. *Insect Sci. Appl.* **1**, 85-93.

BARKER, R.H., SUEBSAENG, H., ROONEY, W., ALECRIM, G., DOURADO, H.V. & WIRTH, D.F. (1986). Specific DNA probe for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Science* **231**, 434-436.

BARKER, R.H., BANCHONGAKSORN, T., COURVAL, J.M., SUWONKERD, W., RIMWUNGTRAGOON, K. & WIRTH, D.F. (1992). A simple method to detect *plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46**, 416-426.

BAUER, B. (1993). Enquêtes entomologiques et épidémiologiques dans la zone pastorale de Yallé (Sissili). *Série de 6 rapports de missions, CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 25 p.*

BENGALY, Z., GAUTHIER, J., ARGIRO, L., DELAFOSSE, A. & DUVALLET, G. (1994). Evaluation of antigen detection ELISA for the diagnosis of trypanosomosis in experimentally and naturally infected livestock. In : *First Research Coordination Meeting on "use of immunoassay methods for improved diagnosis of trypanosomiasis and monitoring tsetse and trypanosomiasis control programmes", Nairobi, Kenya, ILRAD, 7-11 février 1994.*

BOCQUENTIN, R. & DUVALLET, G. (1990). Amélioration de la reproductibilité du test ELISA adapté à la détection d'anticorps anti-*Trypanosoma congolense* chez les bovins. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.* **43**, 179-186.

BONE, G. & CHARLIER, J. (1975). L'hémagglutination indirecte en tube capillaire: une méthode de diagnostic de la trypanosomiase appliquable sur le terrain. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* **55**, 559-569.

BOREHAM, P.F.L. & GILL, G.S. (1973). Serological identification of reptile feeds of *Glossina*. *Acta Trop.* **30**, 356-365.

BOSOMPEM, K.M., MOLOO, S.K., ASSOKU, R.K.G. & NANTULYA, V.M. (1995). Detection and differenciation between trypanosome species in experimentally infected tsetse flies (*Glossina* spp.) using dot-ELISA. *Acta Trop.* **60**, 81-96.

BOSOMPEM, K.M., ASSOKU, R.K.G. & NANTULYA, V.M. (1995). Production and characterization of a monoclonal antibody specific for *Trypanosoma simiae*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **89**, 611-620.

BOSOMPEM, K.M., ASSOKU, R.K.G. & NANTULYA, V.M. (1996). Differentiation between culture-derived insect stages of *T. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense* and *T. simiae* using a monoclonal antibody-based dot-ELISA. *Parasitol.* **112**, 59-66.

BOUET, G. & ROUBAUD, E. (1912). Expériences de transmission des trypanosomiases animales de l'Afrique Occidentale française par les stomoxes. *Bull. Soc. Pathol. exot.* **5**, 544-550.

BOURZAT, D. & GOUTEUX, J.P. (1990). Données préliminaires sur le contact glossines-petits ruminants dans le massif forestier du Mayombe, Congo. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **43**, 199-206.

BOYT, W.P., McKENZIE, P.K.I. & ROSS, C. (1970). An attempt to demonstrate the natural transmission of bovine trypanosomiasis by agents other than *Glossina* in the Sabi Valley of Rhodesia. *Rhod. Vet. J.* **1**, 7-16.

BROMIDGE, T., GIBSON, W., HUDSON, K. & DUKES, P. (1993). Identification of *Trypanosoma brucei gambiense* by PCR amplification of variant surface glycoprotein genes. *Acta Trop.* **53**, 107-119.

BRUMPT, E. (1914). Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la trypanosomose de Chagas. *Bull. Soc. Path. exot.* 7, 706-710.

BURTT, E. (1946). Salivation by *Glossina morsitans* on to glass slides: a technique for isolating infected flies. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **40**, 141-144.

BUXTON, P.A. (1955). The Natural History of Tsetse Flies. *London School of Hygiene and Tropical Medecine, Mémoire 10, London, Lewis.*

CAMPAU, E.J., BAKER, G.J. & MORRISON, F.D. (1953). Rearing stable fly for laboratory tests. *J. Econ. Entomol.* **46**, 546.

CHALLIER, A. & LAVEISSIERE, C. (1973). Un nouveau piège pour la capture des glossines (*Glossina*: Diptera, Muscidae), description et essais sur le terrain. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasit.* **11**, 251-262.

CLARKE, J.E. (1969). Trypanosome infection rates in the mouthparts of Zambian tsetse flies. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **63**, 15-34.

CLAUSEN, P.H., SIDIBE, I., KABORE, I. & BAUER, B. (1992). Development of multiple drug resistance of *Trypanosoma congolense* in Zebu cattle under high natural tsetse fly challenge in the pastoral zone of Samorogouan, Burkina Faso. *Acta Trop.* **51**, 229-236.

CLAXTON, J.R., FAYE, J.A. & RAWLINGS, P. (1992). Trypanosome infections in warthogs (*Phacochoerus aethiopicus*) in The Gambia. *Vet. Parasitol.* **41**, 179-187.

CLENDENNEN, T.E., LONG, G.W. & BAIRD, J.K. (1995). QBC and Giemsa-stained thick blood films: diagnosis performance of laboratory technologists. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**, 183-184.

COMBES, C. (1995). Interactions durables. *Ecologie et évolution du parasitisme. Editions Masson, Paris, 524 p.*

COOPER, L., COOPER, R.D. & BURKOT, T.R. (1991). The *Anopheles punctulatus* complex: DNA probes for identifying the australian species using isotopic, chromogenic, and chemiluminescence detection systems. *Exp. Parasitol.* **73**, 27-35.

CUISANCE, D. (1994). Etude de la trypanosomose animale sans glossines dans le Nord-Cameroun. Evaluation technique du projet. *Rapport CIRAD-EMVT, Montpellier, France, 20 p.*

CUISANCE, D., BARRE, N. & DE DEKEN, R. (1994). Ectoparasites des animaux : méthodes de lutte écologique, biologique, génétique et mécanique. *Rev. sci. tech. Off. int. Epizoot.* **13**, 1305-1356.

CUISANCE, D. (1995). Les grandes endémies parasitaires à transmission vectorielle. Glossines et trypanosomes. *Cours de DEA de Parasitologie, Option B, Montpellier, France, 123 p.*

CUISANCE, D. (1996). Réactualisation de la situation des tsé-tsé et des trypanosomoses animales au Tchad. Phase II/zone du lac, Guéra, Salamat. *Rapport d'activité CIRAD-EMVT, Montpellier, France, 73 p.*

D'AMICO, F. (1993). Rôle de *Glossina fuscipes fuscipes* Newstead, 1910 dans la transmission des trypanosomoses bovines en Afrique Centrale. Cas de la zone d'élevage d'Ouro-Djafoun. *Thèse Doct. Sci., Univ. Montpellier II, France, 160 p.*

D'AMICO, F., GOUTEUX, J.P., LE GALL, F. & CUISANCE, D. (1996). Are stable flies (Diptera: Stomoxyinae) vectors of *Trypanosoma vivax* in the Central African Republic ? *Vet. Res.* **27**, 161-170.

DELAFOSSE, A., BENGALY, Z. & DUVALLET, G. (1995). Absence d'interaction des infections à *Trypanosoma theileri* avec le diagnostic des trypanosomoses animales par détection des antigènes circulants. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **48**, 18-20.

DELAFOSSE, A., BENGALY, Z. & DUVALLET, G. (1996). Utilisation du test ELISA de détection des antigènes circulants de trypanosomes dans la cadre d'un suivi épidémiologique dans la zone de Sidéradougou, Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.* **49**, 32-36.

DE LA ROCQUE, S. (1994). Contribution à l'étude de l'épidémiologie des trypanosomoses dans les guyanes. *Thèse doct. vét., ENV de Lyon, France, 63 p.*

DESQUESNES, M. & DE LA ROCQUE, S. (1993). Les taons de Guyane : biologie, importance vétérinaire et méthodes de lutte. *Rapport CIRAD-EMVT, Cayenne, Guyane française, 29 p.*

DESQUESNES, M. Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax*. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.* (soumis)

DIA, M.L. (1993). Capacité vectorielle de *Glossina fuscipes fuscipes* Newstead, 1910 au laboratoire. *Mémoire de DEA de Parasitologie, Université Montpellier II, France, 44 p.*

DIALLO, A. (1985). *Glossina morsitans submorsitans* Newstead, 1910 (Diptera, Glossinidae): son écologie et son rôle dans les trypanosomoses animales en zone de savane soudano-guinéenne du Mali (ranch de Madina-Diassa). *Thèse Doct. Sci., Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jérôme, Aix Marseille III, 144 p.*

DICKIN, S.K. & GIBSON, W.C. (1989). Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**, 135-142.

DIRIE, M.F., MURPHY, N.B. & GARDINER, P.R. (1993). DNA fingerprinting of *Trypanosoma vivax* isolates rapidly identifies intraspecific relationships. *J. Euk. Microbiol.* **40,** 132-134.

DISSANAYAKE, S. & PIESSENS, W.F. (1990). Cloning and characterization of a *Wuchereria bancrofti*-specific DNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**, 147-150.

DISSANAYAKE, S., MIN, X. & PIESSENS, W.F. (1991). Detection of amplified *Wuchereria bancrofti* DNA in mosquitoes with a non-radioactive probe. *Mol. Biochem. Parasitol.* **45**, 49-56.

DIXON, J.B., CULL, R.S., DUNBAR, I.F., GREENHILL, R.J., GRIMSHAW, C.G. & HILL, M.A. (1971). Non-cyclical transmission of trypanosomiasis in Uganda: Experimental assessment of the survival time of *Trypanosoma brucei* in *Stomoxys calcitrans*. *Vet. Rec.* **89**, 233-235.

DJITEYE, A. (1992). Aperçu sur l'efficacité comparative de différents pièges et odeurs contre les mouches piqueuses (Diptera: Tabanidae et Muscidae) d'importance vétérinaire en République du Mali. In : *1st International Seminar on non-tsetse transmitted animal trypanosomes (N.T.T.A.T.), Annecy, France, 14-16 Octobre 1992.*

DUVALLET, G., SALIOU, P. & REY, J.L. (1978). Fiabilité de la réaction d'immunofluorescence indirecte pour le diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine. *Med. Trop.* **38**, 513-518.

DUVALLET, G. (1987). Trypanosomoses humaines et animales en Afrique de l'Ouest. Recherches épidémiologiques et immunoparasitologiques. *Thèse Doct. Sci., Université de Paris-sud, Centre d'Orsay, 219 p.*

DUVALLET, G., BENGALY, Z., REIFENBERG, J.M. & ARGIRO, L. (1993). De nouveaux outils pour le diagnostic et l'épidémiologie de la trypanosomose animale africaine. *Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales, IIèmes Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Animales de l'UREF, 19-29.*

ENGSTLER, M. & SCHAUER, R. (1993). Sialidases from African trypanosomes. *Parasitol. Today* **9**, 222-225.

FAIRBAIRN H. & BURTT E. (1946). The infectivity to man of a strain of *Trypanosoma rhodesiense* transmitted cyclically by *Glossina morsitans* through sheep and antelope: evidence that man requires a minimum infective dose of metacyclic trypanosomes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **40**, 270.

FASOGBON, A. I., KNOWLES, G. & GARDINER, P. R. (1990). A comparison of the isoenzymes of *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* fron East and West Africa. *Int. J. Parasitol.* **20**, 389-394.

FOIL, L.D. (1989). Tabanids as vectors of diseases. *Parasitol. Today* **5**, 88-95.

FRASCH, A.C.C. (1994). Trans-sialidases in the insect-vector stages of African and American trypanosomes. *Parasitol. Today* **10**, 170-171.

FREZIL, J.L. (1971). Application du xénodiagnostic dans le dépistage de la trypanosomiase à *T. gambiense* chez des sujets immunologiquement suspects. *Bull. Soc. Pathol. exot.* **64**, 871-878.

FREZIL, J.L., CARRIE, J. & RIO, F. (1974). Application et valeur de la technique d'immunofluorescence indirecte au dépistage et à la surveillance épidémiologique de la trypanosomiase à *Trypanosoma gambiense*. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasit.* **12**, 111-126.

FREZIL, J.L. (1983). La trypanosomiase humaine en république populaire du Congo. *Travaux et documents de l'ORSTOM, n°155, Ed. ORSTOM, Paris, France, 165 p.*

GARSIDE, L., BAILEY, M. & GIBSON, W.C. (1994). DNA content and molecular karyotype of trypanosomes of the subgenus *Nannomonas*. *Acta Trop.* **57**, 21-28.

GARSIDE, L. & GIBSON, W.C. (1995). Molecular characterization of trypanosome species and subgroups within subgenus *Nannomonas*. *Parasitol.* **111**, 301-312.

GASHUMBA, J.K. (1986). Two enzymatically distinct stocks of *Trypanosoma congolense*. *Res. Vet. Sci.* **40**, 411-412.

GASHUMBA, J.K., GIBSON, W.C. & OPIYO, E.A. (1986). A preliminary comparison of *Trypanosoma simiae* and *T. congolense* by isoenzyme electrophoresis. *Acta Trop.* **43**, 15-19.

GASHUMBA, J.K., BAKER, R.D. & GODFREY, D.G. (1988). *Trypanosoma congolense* : the distribution of enzymatic variants in East and West Africa. *Parasitol.* **96**, 475-486.

GASHUMBA, J.K. (1990). Speciation and subspeciation in *Nannomonas* trypanosomes and their epidemiological significance. *Insect Sci. Applic.* **11**, 265-269.

GEIGY, R. & KAUFFMANN, M., STEIGER, R. & BRUN R. (1971). Influence of bloodmeals from donnors on the infection rates of *T. brucei* in *Glossina*. *Acta Trop.* **28**, 164-169.

GEIGY, R. & KAUFFMANN, M. (1973). Sleeping sickness survey in the Serengeti area (Tanzania) 1971. *Acta Trop.* **30 (1-2)**, 12-23.

GIBSON, W.C., MARSHALL, T.F. & GODFREY, D.G. (1980). Numerical analysis of enzyme polymophism: a new approach to the epidemiology and taxonomy of trypanosomes of the subgenus *Trypanozoon*. *Adv. Parasitol.* **18**, 175-246.

GIBSON, W.C., DUKES, P. & GASHUMBA, J.K. (1988). Species-specific DNA probes for the identification of African trypanosomes in tsetse flies. *Parasitol.* **97**, 63-73.

GIBSON, W. C. & FERRIS, V. (1992). Sequential infection of tsetse flies with *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei*. *Acta Trop.* **50**, 345-352.

GIBSON, W. C. & BAILEY, M. (1994). Genetic exchange in *Trypanosoma brucei* : evidence for meiosis from analysis of a cross between drug-resistant transformants. *Mol. Biochem. Parasitol.* **64**, 241-252.

GIDUDU, A., CUISANCE, D., REIFENBERG, J.M. & FREZIL, J.L. (1995). Amélioration de la technique de salivation des glossines pour la détection des métatrypanosomes infectants: étude de quelques facteurs biologiques et non biologiques sur le comportement de sondage des glossines. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **48**, 153-160.

GIDUDU, A., CUISANCE, D., REIFENBERG, J.M. & FREZIL, J.L. (1995). Contribution à l'étude de l'émission de *Trypanosoma congolense* par *Glossina morsitans morsitans* (Diptera : Glossinidae) au laboratoire. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **48**, 264-270.

GIDUDU, A., CUISANCE, D., REIFENBERG, J.M. & FREZIL, J.L. (1996). Emission de *Trypanosoma congolense* dans la salive et dans la goutte anale chez *Glossina morsitans morsitans et Glossina tachinoides* (Diptera : Glossinidae) au laboratoire. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **42**, 132-140.

GILL, B.S. (1964). A procedure for the indirect haemagglutination test for the study of experimental *Trypanosoma evansi* infections. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **58**, 473-480.

GILL, B.S. (1966). Indirect haemagglutination test using formalinized cells for detecting *Trypanosoma evansi* antibody in experimental sera. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **60**, 276-279.

GILL, B.S. (1970). Comparative efficiency of techniques of recovering trypanosomes (*Trypanosoma evansi*) from rat blood and methods of preparing antigen for use in the complement fixation test for surra. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* **50**, 635-640.

GINGRICH, J.B., ROBERTS, L.W. & MACKEN, L.M. (1983). *Trypanosoma brucei rhodesiense*: mechanical transmission by tsetse, *Glossina morsitans* (Diptera : Glossinidae), in the laboratory. *J. Med. Entomol.* **20,** 673-676.

GRUVEL, J. (1964). Contribution à l'étude écologique de *Glossina tachinoides* Westwood 1850 (Diptera, Muscidae) dans la réserve de Kalamalou, vallée du Bas-Chari. *Thèse Doct. Sci., Université Paris VI, 302 p.*

GRUVEL, J. (1980). Considérations générales sur la signification de la transmission mécanique des trypanosomoses chez le bétail. *Insect Sci. Appl.* **1**, 55-57.

HARLEY, J.M.B., CUNNINGHAM, M.P. & VAN HOEVE, K. (1966). The numbers of infective *Trypanosoma rhodesiense* extruded by *Glossina morsitans* during feeding. *Ann. Trop. Med. Parasitol* **60**, 455-460.

HARLEY, J.M.B. & WILSON, A.J. (1968). Comparison between *Glossina morsitans*, *G. pallidipes* and *G. fuscipes* as vectors of trypanosomes of the *Trypanosoma congolense* group: the proportions infected experimentally and the numbers of infective organisms extruded during feeding. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **62**, 178-187.

HERBERT, W.J. & LUMSDEN, W.H.R. (1976). *Trypanosoma brucei.* A rapid "Matching" method for estimating the host's parasitemia? *Exp. Parasitol.* **40**, 427-431.

HIDE, G., BUCHANAN, N, WELBURN, S., MAUDLIN, I., BARY, J.D. & TAIT, A. (1991). *Trypanosoma brucei rhodesiense*: characterization of stocks from Zambia, Kenya, and Uganda using repetitive DNA probes. *Exp. Parasitol.* **72**, 430-439.

HIGUCHI, R. (1989). Simple and rapid preparation of samples for PCR. In : *H. E. Erlich (Ed.), PCR technology: principles and applications for DNA amplification. Stocktom Press, New York.*, 31-38.

HILL, S.M., URWIN, R. & CRAMPTON, J.M. (1991). A comparison of non-radioactive labelling and detection systems with synthetic oligonucleotide probes for the species identification of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**, 609-622.

HOARE, C.A. (1972). The trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph. *Oxford : Blackwell Scientific Publications, 749 p.*

HOLLOWAY, M.T.P. & PHELPS, R.J. (1991). The responses of *Stomoxys* spp. (Diptera : Muscidae) to traps and artificial host odours in the field. *Bull. Ent. Res.* **81**, 51-55.

HOLTKE, H.J., SAGNER, G., KESSLER, C. & SCHMITZ, G. (1992). Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acids: A fast and simple protocol and its applications. *BioTechniques* **12**, 104-113.

INGRAM, G.A. & MOLYNEUX, D.H. (1990). Lectins (haemagglutinins) in the haemolymph of *Glossina fuscipes fuscipes* : isolation, partial characterization, selected physico-chemical properties and carbohydrate-binding specificities. *Insect Biochem.* **20**, 13-27.

ITARD, J. (1981). Les trypanosomoses animales africaines. In : *Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Paris, Ministère de la Coopération et du Développement. p. 303-370. (Manuels et Précis d'élevage n°10).*

ITARD, J. & BAUER, B. (1984). Elevage de glossines. Synthèse. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **37**, 143-175.

IZRAELI, S., PFLEIDERER, C. & LION, T. (1991). Simple procedure of DNA isolation from human serum. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5792.

JACKSON, C.H.N. (1946). An artificially isolated generation of tsetse flies. *Bull. Ent. Res.* **37**, 291-299.

JAMONEAU, P. (1996). Evaluation préliminaire d'une nouvelle technique de dépistage de la trypanosomiase humaine africaine en Côte d'Ivoire: le testrypcatt sur latex. *DEA de Parasitologie, Université Montpellier II, 25 p.*

JEFFERIES, D., HELFRICH, M.P. & MOLYNEUX, D.H. (1987). Cibarial infections of *Trypanosoma vivax* and *T. congolense* in *Glossina*. *Parasitol. Res.* **7**, 289-292.

JENNI, L., MOLYNEUX, D.H., LIVESEY, J.L. & GALUN, R. (1980). Feeding behaviour of tsetse flies infected with salivarian trypanosomes. *Nature* **283**, 383-385.

JENNI, L. (1990). Sexual stages in trypanosomes and implications. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **65**, 19-21.

JORDAN, A.M., LEE-JONES, F., & WEITZ, B. (1962). The natural hosts of tsetse flies in Northern Nigeria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **56**, 430-442.

JORDAN, A.M. (1964). Trypanosome infection rates in *Glossina morsitans submorsitans* Newst. in northern Nigeria. *Bull. Ent. Res.* **55**, 423-431.

JORDAN, A.M. (1986). Trypanosomiasis control and African rural development. *Longman ed., London, UK, 357 p.*

KANWE, A. B., BENGALY, Z., SAULNIER, D. & DUVALLET, G. (1992). Evaluation du test de détection des antigènes circulants de trypanosomes à l'aide d'anticorps monoclonaux. Infections expérimentales et naturelles. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **45**, 265-271.

KASSAI, T., CORDERO DEL CAMPILLO, M., EUZEBY, J., GAAFAR, S., HIEPE, T. & HIMONAS, C.A. (1988). Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD). *Vet. Parasitol.* **29**, 299-326.

KASSAI, T. (1996). On the reception of SNOPAD as move for consistency in the nomenclature of parasitic diseases. In : *Parassitologia* **38 (1-2)**, p. 451.

KAZADI , J.M., ELSEN, P., JOCHEMS, M., VAN HEES, J., VAN DEN ABBEELE, C. & KAGERUKA, P. (1994). Amélioration de la technique de dissection du tractus digestif et des glandes salivaires des glossines pour la mise en évidence des divers stades de développement des trypanosomes. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **44**, 437-442.

KAZADI, J.M., JOCHEM, M., KABORE, H., MBENG, C., VAN HEES, J. & KAGERUKA, P. (1995). Standardisation et évaluation de la technique de salivation manuelle pour le dépistage des infections par trypanosomes chez la glossine (Diptera : Glossinidae). *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **48**, 171-175.

KILLICK-KENDRICK R. & GODFREY, D.G. (1963). Observations on a close association between *Glossina tachinoides* and domestic pigs near Nsukka, eastern Nigeria. I. *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* infections in the pigs. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **57**, 225-231.

KIMMEL, B.E., ONESMO, K., OLE-MOIYOI, 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.

KIRMSE, P & TAYLOR-LEWIS, G. (1978). Ticks as possible vectors of trypanosomes. In: *Wilde, J.K.H. - Tick-borne diseases and their vectors, Edinburgh, University Press, 177-180.*

KNOWLES, G., BETSCHART, B., KUKLA, B.A., SCOTT, J.R. & MAJIWA, P.A.O. (1988). Genetically discrete populations of *Trypanosoma congolense* from livestock on the Kenyan coast. *Parasitol.* **96**, 461-474.

KOUNDA GBOUMBI, J.C. (1991). Les glossines de la région de Nola. Espèces et répartition. Relation avec la trypanosomiase humaine et possibilité de lutte. *Mémoire d'Etat de technicien supérieur en santé publique, CIESPAC, filière entomologie médicale, Université Marien N'Gouabi, Brazzaville, République du congo, 58 p.*

KRATZER, R. D. & ONDIEK, F. O. (1989). The buffy-coat centrifugation technique, an improved method for the diagnosis of African trypanosomiasis. In : *20ème réunion CSIRTC, Monbasa, Kenya, 10-14 avril 1989.*

KRINSKY, W.L. (1976). Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *J. Med. Entomol.* **13**, 225-275.

KUKLA, B.A., MAJIWA, P.A.O., YOUNG, J.R., MOLOO, S.K. & OLE-MOIYOI, O.K. (1987). Use of species-specific DNA probes for the identification of trypanosome infection in tsetse flies. *Parasitol.* **95**, 1-16.

KÜPPER, W., STAAK, C. & SPÄTH, J. (1990). Natural hosts of *Glossina tachinoides* (Diptera: Glossinidae) in northern Côte d'Ivoire. *Trop. Med. Parasitol.* **41**, 217-218.

KUZOE, F.A.S. (1993). Current situation of African trypanosomiasis. *Acta Trop.* **54**, 153-162.

LANCELOT, R. (1988). La trypanosomose bovine à *Trypanosoma vivax* en Guyane Française. Contribution à l'étude clinique et épidémiologique. *Thèse Doct. Vét., Ecole Nationale Vétérinaire, Maisons-Alfort, France, 116 p.*

LANHAM, S.M. & GODFREY, D.G. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* **28**, 521-534.

LAVEISSIERE, C. & BOREHAM, P.F.L (1976). Ecologie de *Glossina tachinoides* Westwood, 1850, en savane humide d'Afrique de l'Ouest. I. Préférences trophiques. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasit.* **16**, 187-200.

LAVEISSIERE, C. (1986). Epidémiologie et contrôle de la trypanosomiase humaine en Afrique de l'Ouest. *Thèse Doct. sci., Université de Paris-Sud Centre d'Orsay.*

LAVEISSIERE, C. & GREBAUT, P. (1990). Recherches sur les pièges à glossines (Diptera: Glossinidae). Mise au point d'un modèle économique: le piège "Vavoua". *Trop. Med. Parasitol.* **41**, 185-192.

LE RAY, D. (1989). Vector susceptibility to african trypanosomes. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* **69**, 165-171.

LEAK, S.G.A. (1996). A contribution to the epidemiology and understanding of tsetse-transmitted trypanosomiasis. *PhD-thesis, University Academic Building of Utrecht, Domplein 29, Utrecht, Pays Bas, 233 p.*

LEEFLANG, P., BUYS, J.. & BLOTKAMP, C. (1976). Studies on *Trypanosoma vivax*: infectivity and serial maintenance of natural bovine isolates in mice. *Int. J. Parasitol.* **6**, 413-417.

LEMESRE, J.L., NOIREAU, F., MAKOUNDOU, M.L., LOUEMBET, M.T., FREZIL, J.L., NGAMBO, S. & JANNIN, J. (1990). Contribution of serological tests in the diagnosis of sleeping sickness in Congo. *Bull. Soc. fr. Parasitol.* **28**, 967-971.

LEVINE, R.A., 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.

LEVINE, R.A., WARDLAW, S.C. & PATTON, C.L. (1989). Detection of haematoparasites using quantitative buffy coat analysis tubes. *Parasitol. Today* **5**, 132-133.

LYNDHURST, H.D. (1936). On the power of *Glossina morsitans* and *Glossina palpalis* to transmit the trypanosomes of the *brucei* group. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **30**, 37-38.

LLOYD, L.L. & JONHSON, W.B. (1924). The trypanosome infections of tsetse flies in Northern Nigeria and a method of estimation. *Bull. Ent. Res.* **14**, 219-288.

LUCAS, J.M.S. (1955). Transmission of *Trypanosoma congolense* in cattle under field conditions in the absence of tsetse flies. *Vet. Rec.* **67**, 403-408.

LUCKINS, A. G., GRAY, A. R. & RAE, O. (1978). Comparison of the diagnostic value of serum immunoglobulin levels, an enzyme-linked immunosorbent assay and a fluorescent antibody test in experimental infections with *Trypanosoma evansi* in rabbits. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72**, 429-441.

LUCKINS, A. G., BOID, R., RAE, P., MAHMOUD, M. M., EL MALIK, K. H. & GRAY, A. R. (1979). Serodiagnosis of infection with *Trypanosoma evansi* in camels in the Sudan. *Trop. Anim. Health Prod.* **11**, 1-12.

LUCKINS, A.G. (1988). *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol. Today* **4**, 137-142.

LUMSDEN, W.H.R., KIMBER, C., EVANS, D.A. & DOIG, S.J. (1979). *Trypanosoma brucei* : miniature anion-exchange/centrifugation technique for detection of low parasitemias : adaptation for field use. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **73**, 312-317.

LUN, Z., BRUN, R. & GIBSON, W.C. (1992). Kinetoplast DNA and molecular karyotypes of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdun* from China. *Mol. Biochem. Parasitol.* **50**, 189-196.

McARTHUR, R.H. & WILSON, E.O. (1967). The theory of island biogeography. Princeton University Press.

McNAMARA, J.J., DUKES, P., SNOW, W.F. & GIBSON, W.C. (1989). Use of DNA probes to identify *Trypanosoma congolense* and *T. simiae* in tsetse flies from The Gambia. *Acta Trop.* **46**, 55-61.

McNAMARA, J.J. & SNOW, W.F. (1991). Improved identification of *Nannomonas* infections in tsetse flies from The Gambia. *Acta Trop.* **48**, 127-136.

McNAMARA, J.J., MOHAMMED, G. & GIBSON, W.C. (1994). *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *godfreyi* sp. nov. from tsetse flies in The Gambia : biological and biochemical characterization. *Parasitol.* **109**, 497-709.

McNAMARA, J.J., BAILEY, J.W., SMITH, D.H., WAKHOOLI, S. & GODFREY, D.G. (1995). Isolation of *Trypanosoma brucei gambiense* from northern Uganda: evaluation of the kit for in vitro isolation (KIVI) in an epidemic focus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**, 388-389.

McNAMARA, J.J., LAVEISSIERE, C. & MASIGA, D.K. (1995). Multiple trypanosome infections in wild tsetse in Côte d'Ivoire detected by PCR analysis and DNA probes. *Acta Trop.* **59**, 85-92.

MAGNUS, E., VERVOORT, T. & VAN MEIRVENNE, N. (1978). A card aggutination testwith stained trypanosomes (CATT) for serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Ann. Soc. belge. Méd. trop.* **58**, 169-176.

MAILLOT, L. (1973). Possibilités d'un "xénodiagnostic" dans la maladie du sommeil. *Bull. Soc. Pathol. exot.* **66**, 291-296.

MAJIWA, P.A.O., MASAKE, R.A., NANTULYA, V.M., HAMERS, R. & MATTHYSSENS, G. (1985). *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* : identification of two karyotypic groups. *EMBO J.* **4**, 3307-3313.

MAJIWA, P.A.O., HAMERS, R., VAN MEIRVENNE, N. & MATTHYSSENS, G. (1986). Evidence for genetic diversity in *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*. *Parasitol.* **93**, 291-304.

MAJIWA, P.A.O. & WEBSTER, P. (1987). A repetitive deoxyribonucleic acid sequence distinguishes *Trypanosoma simiae* from *T. congolense*. *Parasitol.* **95**, 543-598.

MAJIWA, P.A.O. & OTIENO, L.H. (1990). Recombinant DNA probes reveal simultaneous infection of tsetse flies with different trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **40**, 245-254.

MAJIWA, P.A.O., MAINA, M., WAITUMBI, J.N., MIHOK, S. & ZWEYGART, E. (1993). *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense* : molecular characterisation of a new genotype from Tsavo, Kenya. *Parasitol.* **106**, 151-162.

MAJIWA, P.A.O., THATTHI, R., MOLOO, S.K., NYEKO, J.H.P., OTIENO, L.H. & MALOO, S. (1994). Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy-coat samples from antigenaemic but aparasitaemic cattle. *Parasitol.* **108**, 312-322.

MASAKE R., MAJIWA P.A.O., DUVALLET G, MAKAU, J., ADEMA, A. & GATHUO, H. (1993). Application of *Trypanosoma congolense*-specific DNA probes to the characterization of parasite populations obtained from Burkina Faso. In : *ILRAD Annual Scientific Report, 50-51.*

MASAKE R., MAJIWA P.A.O., DUVALLET G. & ADEMA, A. (1994). Characterization of trypanosome isolates from Burkina Faso. In : *ILRAD Annual Scientific Report, 46-47.*

MASIGA, D.K. & GIBSON, W.C. (1990). Specific probes for *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *evansi* based on kinetoplast DNA minicircles. *Mol. Exp. Parasitol.* **40**, 279-284.

MASIGA, D.K., SMYTH, A.J., HAYES, P., BROMIDGE, T.J. & GIBSON, W.C. (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasitol.* **22,** 909-918.

MASIGA, D.K., McNAMARA, J.J. & GIBSON, W.C. (1996). A repetitive DNA sequence specific for *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *godfreyi*. *Vet. Parasitol.* **62**, 27-33.

MASIGA, D.K., Mc NAMARA, J.J., LAVEISSIERE, C., TRUC, P. & GIBSON, W.C. (1996). A high prevalence of mixed trypanosome infections in tsetse flies in Sinfra, Côte d'Ivoire, detected by DNA amplification. *Parasitol.* **112**, 75-80.

MASSAMBA, N.N. & WILLIAMS, R.O. (1984). Distinction of african trypanosomes species using nucleic acid hybridization. *Parasitol.* **88**, 55-65.

MATHIEU-DAUDET, F., BICART-SEE, A., BOSSENO, M.F., BRENIERE, S.F. & TIBAYRENC, M. (1994). Identification of *Trypanosoma brucei gambiense* group I by a specific kinetoplast DNA probe. *Am. J. Trop. Med. Hyg* **50**, 13-19.

MATTIOLI, R.C., JEAN, O. & BELEM, A.M.G. (1990). Incidence de la trypanosomose sur la faune sauvage d'un ranch de gibier au Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **43**, 459-465.

MATTIOLI, R.C. (1991). Fréquence des trypanosomes dans les populations de glossines du ranch de gibier de Nazinga (Burkina Faso). *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **44,** 165-168.

MAUDLIN, I. & WELBURN, S.C. (1987). Lectin mediated establishment of midgut infections of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* in *Glossina morsitans*. *Trop. Med. Parasitol.* **38**, 167-170.

MAUDLIN, I. & WELBURN, S.C. (1988). Tsetse immunity and the transmission of trypanosomiasis. *Parasitol. Today* **4**, 109-111.

MAUDLIN, I. & WELBURN, S.C. (1989). A single trypanosome is sufficient to infect a tsetse fly. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **83,** 431-433.

MAUDLIN, I., WELBURN, S.C. & MELHLITZ, D. (1990). The relationship between rickettsia-like-organisms and trypanosome infections in natural populations of tsetse in Liberia. *Trop. Med. Parasitol.* **41**, 265-267.

MAUDLIN, I., WELBURN, S.C. & MILLIGAN, P. (1991). Salivary gland infections: a sex linked recessive character in tsetse ? *Acta Trop.* **48**, 9-15.

MAUDLIN, I. & WELBURN, S.C. (1994). Maturation of trypanosomes infections in tsetse. *Exp. Parasitol.* **79**, 202-205.

MAWUENA, K., DOUMEY, K. & AKAKPO, K. (1984). Nombre probable de *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* transmis par *Glossina morsitans*. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **37**, 186-191.

MAYR, E. (1974). Populations, espèces et évolution. *Ed. Hermann, Paris, 496 p.*

MEREDITH, S.E.O., UNNASCH, T.R., KARAM, M. PIESSENS, W.F., & WIRTH, D.F. (1989). Cloning and characterisation of an *Onchocerca volvulus* specific DNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* **36**, 1-10.

MIHOK, S., OLUBAYO, R.O. & WESONGA, D.F. (1991). Infection rates in *Glossina morsitans morsitans* fed on waterbuck and Boran cattle infected with *Trypanosoma congolense*. *Acta Trop.* **49**, 185-191.

MIHOK, S., OTIENO, L.H. & TARIMO, C.S. (1992). Trypanosome infection rates in tsetse flies (Diptera : Glossinidae) and cattle during tsetse control operations in the Kagera River region of Rwanda. *Bull. Ent. Res.* **82**, 361-367.

MIHOK, S., OLUBAYO, R.O., DARJI, N. & ZWEYGART, E. (1993). The influence of host blood on infection rates in *Glossina morsitans* spp. infected with *Trypanosoma congolense*, *T. brucei* and *T. simiae*. *Parasitol.* **107**, 41-48.

MIHOK, S., MARAMBA, O., MUNYOKI, E. & KAGOIYA, J. (1995). Mechanical transmission of *Trypanosoma* spp. by African Stomoxyinae (Diptera : Muscidae). *Trop. Med. Parasitol.* **46**,

MIHOK, S., KANG'ETHE, E. & KAMAU, G.K. (1995). Trials of traps and attractants for *Stomoxys* spp. (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.* **32**, 283-289.

MILLIGAN, J.M., MAUDLIN, I. & WELBURN, S.C. (1995). *Trypanozoon* : Infectivity to humans is linked to reduced transmissibility in tsetse. II. Genetic mechanisms. *Exp. Parasitol.* **81**, 409-415.

MINTER-GOEBDLOED, E., LEAKE, C.J., MINTER, D.M., McNAMARA, J., KIMBER, C., BASTIEN, P., EVANS, D.A. & LE RAY, D. (1993). *Trypanosoma varani* and *T. grayi*-like trypanosomes: development in vitro and in insect hosts. *Parasitol. Res.* **79**, 329-333.

MITCHELL, B.K. & VAN HAGA-KELLER H.A.R. (1976). A comparison of feeding behaviour in teneral and post-teneral *Glossina morsitans morsitans* (Diptera : Glossinidae) using an artificial membrane. *Entomol. Exp. Applic.* **20**, 105-112.

MOLOO, S.K. (1981). Effects of maintaining *Glossina morsitans morsitans* on different hosts upon the vector's subsequent infection rates with pathogenic trypanosomes. *Acta Trop.* **38**, 125-136.

MOLOO, S.K. & KUTUZA, S.B. (1988). Comparative study on the infection rates of different laboratory strains of *Glossina* species by *Trypanosoma congolense*. *Med. Vet. Entomol.* **2**, 253-257.

MOLOO, S.K. & GRAY, M.A. (1989). New observations on the cyclical development of *Trypanosoma vivax* in *Glossina*. *Acta Trop.* **4**, 167-172.

MOLOO, S.K. (1992). A comparison of colony performance of *Glossina pallidipes* originating from two allopatric populations in Kenya. *Med. Vet. Entomol.* **6**, 399-400.

MOLOO, S.K., OLUBAYO, R.O., KABATA, J.M. & OKUMU, I.O. (1992). A comparison of African buffalo, N'Dama and Boran cattle as reservoirs of *Trypanosoma congolense* for different *Glossina* species. *Med. Vet. Entomol.* **6**, 225-230.

MOLOO, S.K. (1993). The distribution of *Glossina* species in Africa and their natural hosts. *Insect Sci. Applic.* **14**, 511-527.

MOLOO, S.K., ZWEYGARTH, E. & SABWA, C.L. (1994). Comparative study on the susceptibility of different laboratory strains of *Glossina* species to *Trypanosoma simiae*. *Med. Vet. Entomol.* **8**, 225-230.

MOLOO, S. K. & GOODING, R. H. (1995). A comparison of *Glossina morsitans centralis* originating from Tanzania and Zambia, with respect to vectorial competence for pathogenic *Trypanosoma* species, genetic variation and inter-colony fertility. *Med. Vet. Entomol.* **9**, 365-371.

MOSER, D.R., COOK, G.A., DIANE, E.O., CHERYL, P.B., MELISSA, R.M. & DONELSON, J.E. (1989). Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitol.* **99**, 57-66.

MULLIGAN, H.W. (1970). The African trypanosomiases. *London, U.K., G. Allen and Unwin Ltd., 950 p.*

MURRAY, A. K. (1982). Characterization of stocks of *Trypanosoma vivax*. I. Isoenzyme studies. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **76**, 275-282.

MURRAY, M., MURRAY, P.K. & McINTRYRE, W.I.M. (1977). An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **71**, 325-326.

MUTERO, C.M. & MUTINGA, M.J. (1993). Defecation by *Anopheles arabiensis* mosquitoes of host blood infected with live *Trypanosoma congolense*. *Trop. Med. Parasitol.* **44**, 23-26.

NANTULYA, V.M., MUSOKE, A. J., RURANGIRWA, F. R., SAIGAR, N. & MINJA, S. H. (1987). Monoclonal antibodies that distinguish *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. brucei*. *Parasit. Immunol.* **9**, 421-431.

NANTULYA, V.M., SONGA, E.B. & HAMERS, R. (1989). Detection of circulating trypanosomal antigens in *Trypanosoma evansi*-infected animals using a *T. brucei* group-specific monoclonal antibody. *Trop. Med. Parasitol.* **40**, 263-266.

NANTULYA, V.M. (1990). Trypanosomiasis in domestic animals : the problem of diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epizoot.* **9**, 357-367.

NANTULYA, V.M. (1994). Suratex : A simple latex agglutination antigen test for diagnosis of *Trypanosoma evansi* infections (Surra). *Trop. Med. Parasitol.* **45**, 9-12.

NASH, T.A.M. (1948). Tsetse flies in British West Africa. *O.B.E., D. Sc. (London), published for the colonial office by his majesty's stationery office, 78 p.*

NGERANWA, J.J.N. & KILALO, D.C. (1994). The ability of *Stomoxys calcitrans* and mechanical means to transmit *Trypanosoma* (*brucei*) *evansi* from goats to camels in Kenya. *Vet. Res.* **18**, 307-312.

NITCHMAN, S. & JACQUIET, P. (1990). Utilisation de souriceaux pour la mise en évidence de l'infectivité des glossines. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **43**, 219-223.

NYEKO, J.H.P., OLE-MOIYOI, O.K., MAJIWA, P.A.O., OTIENO, L.H. & OCIBA, P.M. (1990). Characterisation of trypanosome isolates from cattle in Uganda using species-specific DNA probes reveals predominance of mixed infections. *Insect Sci. Applic.* **11**, 271-280.

NZILA, M. (1995). Détection et identification des trypanosomes africains par les techniques d'hybridation moléculaires et d'amplification génique (PCR). *Thèse Doct. Sci., Université Montpellier II, France, 185 p.*

OMS (1986). La trypanosomiase africaine: épidémiologie et lutte. *Rapport d'un comité d'experts. Série de rapports techniques 739, Genève, 144 p.*

OTTE, M.J. & ABUABARA, J.Y. (1991). Transmission of South American *Trypanosoma vivax* by the neotropical horsefly *Tabanus nebulosus*. *Acta Trop.* **49**, 73-76.

OU, Y.C., GIROUD, C. & BALTZ, T. (1991). Kinetoplast DNA analysis of four *Trypanosoma evansi* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**, 97-102.

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. *Parasitol.* **92**, 31-50.

PANYIM, S., VISESHAKUL, N., LUXANANIL, P., WUYTS, N. & CHOKESAJJAWATEE, N. (1992). A PCR method for highly sensitive detection of *Trypanosoma evansi* in blood samples. Resistance or tolerance of animals to disease and veterinary epidemiology and diagnostic methods. In : *Proceedings of EEC Contractant Workshops 2-6 november 1992, Rthymno, Crete (Greece).*

PARIS, J., MURRAY, M. & Mc ODIMBA, F. (1982). A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Trop.* **39**, 307-316.

PARR, H.C.M. (1959). Studies on *Stomoxys calcitrans* (L.) in Uganda, East Africa. A method of rearing large numbers of *Stomoxys calcitrans*. *Bull. Ent. Res.* **50**, 165-169.

PAYS, E. & STEINERT, M. (1988). Control of antigen gene expression in African trypanosomes. *Ann. Rev. Genet.* **22**, 107-126.

PENCHENIER, L. & ITARD, J. (1981). Une nouvelle technique de dissection rapide des glandes salivaires et de l'intestin des glossines. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasit.* **19**, 55-57.

PENCHENIER, L., DUMAS, V., GREBAUT, P., REIFENBERG, J.M. & CUNY, G. (1996). Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomosis. *Parasite* (sous presse).

RAE, P. F. & LUCKINS, A.G. (1984). Detection of circulating trypanosomal antigens by enzyme immunoassay. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **78**, 587-596.

RAYMOND, H.L. (1990). *Tabanus importunus*, vecteur mécanique expérimental de *Trypanosoma vivax* en Guyane française. *Ann. Parasitol. hum. comp.* **65**, 44-46.

REIFENBERG, J.M. (1992). Rapport d'activités. *Unité d'Epidémiologie du CRTA/CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 40 p.*

REIFENBERG, J.M. (1994). Report on activities. *ILRAD, Nairobi, Kenya, 13 p.*

REIFENBERG, J.M. (1994). Rapport d'activités. *Unité d'Epidémiologie et de Biotechnologie appliquée du CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 18 p.*

REIFENBERG, J.M. (1995). Rapport d'activités. *Unité d'Epidémiologie et de Biotechnologie appliquée du CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 37 p.*

REISEN, W.K. (1988). Estimation of vectorial capacity: introduction. *Bull. Soc. Vector Ecol.* **14**, 39-40.

RICHNER, D., SCHWEIZER, J., BETSCHART, B. & JENNI, L. (1989). Characterization of West Africa *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *brucei* isolates from man and animals using isoenzyme analysis and DNA hybridization. *Parasitol. Res.* **76**, 80-85.

RIORDAN, K. (1972). Feeding behavior of *Stomoxys* (Diptera Muscidae) in relation to the possible non-cyclical transmission of trypanosomes. *Entomol.*, 118-124.

ROBERTS, C.J. (1971). The lack of infectivity to cattle of a strain of *Trypanosoma simiae* transmitted by *Glossina morsitans* and *G. tachinoides*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **65**, 319-326.

ROBERTS, C.J. & GRAY, A.R. (1972). A comparison of *Glossina morsitans submorsitans* Newst. and *G. tachinoides* West., collected and maintained under similar conditions, as vectors of *Trypanosoma (Nannomonas) congolense, T. (N.) simiae* and *T. (Duttonella) vivax*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **66**, 41-53.

ROBERT, L.W. (1981). Probing by *Glossina morsitans morsitans* and transmission of *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**, 948-951;

ROBERT, L.W., WELLDE, B.T., REARDON, M.J. & ONYANGO, F.K. (1989). Mechanical transmission of *Trypanosoma brucei rhodesiense* by *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **83**, 127-131.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. (1987). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

SAIKI, R., GELFAND, D., STOFFEI, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

SAUNDERS, D.S. (1961). Studies on ovarian development in tsetse flies (*Glossina*, Diptera). *Parasitol.* **51**, 545-564.

SCHARES, G. & MEHLITZ, D. (1996). Sleeping sickness in Zaïre: a nested polymerase chain reaction improves the identification of *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *brucei gambiense* by specific kinetoplast DNA probes. *Trop. Med. Int. Health* **1**, 59-70.

SCHRIEFER, M.E., SACCI, , J.B., WIRTZ, R.A. & AZAD, A.F. (1991). Detection of Polymerase Chain Reaction-Amplified malarial DNA in infected blood and individual mosquitoes. *Exp. Parasitol.* **73**, 311-316.

SCHWEIZER, J., POSPICHAL, H. & JENNI, L. (1991). Hybrid formation between African trypanosomes in vitro. *Acta Trop.* **49**, 237-240.

SLOOF, P., BOS, J.L., KONINGS, F.J.M., MENKE, H.H., BORST, P., GUTTERIDGE, W.E. & LEON, W. (1983). Characterisation of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *J. Mol. Biol.* **167**, 1-21.

SLOOF, P., MENKE, H.H., CASPERS, M.P.M. & BORST, P. (1983). Size fractionation of *Trypanosoma brucei* DNA : localization of the 177-bp repeat satellite DNA and a variant surface glycoprotein gene in a mini-chromosomal DNA fraction. *Nucleic Acid Res.* **11**, 3889-3901.

SNOW, W.F. & BOREHAM, P.F.L. (1979). The feeding habits and ecology of the tsetse fly *Glossina morsitans submorsitans* Newstead in relation to nagana transmission in The Gambia. *Acta Trop.* **36**, 47-51.

SOLANO, P. & AMSLER-DELAFOSSE, S. (1995). *Trypanosoma congolense* chez différentes espèces de taons (Diptera: Tananidae) au Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **48**, 145-146.

SOLANO, P., ARGIRO, L., REIFENBERG, J.M., YAO, Y. & DUVALLET, G. (1995). Field app
lication of the polymerase chain reaction (PCR) to the detection and characterization of trypanosomes in *Glossina longipalpis* (Diptera: Glossinidae) in Côte d'Ivoire. *Mol. Ecol.* **4**, 781-785.

SOLANO, P., REIFENBERG, J.M., AMSLER-DELAFOSSE, S., KABORE, I., CUISANCE, D. & DUVALLET, G. (1996). Trypanosome characterization by polymerase chain reaction in *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina tachinoides* from Burkina Faso. *Med. Vet. Entomol.* **10**, (sous presse)

SOLTYS, M.A. (1954). Transmission de *T. congolense* par d'autres vecteurs que les mouches tsé-tsés. *Comité Scientifique International de Recherches sur les Trypanosomiases, 5ème réunion, Prétoria, Afrique du sud, 3-17 septembre 1954.*

SPIELMAN, A., PERRONE, J., TEKLEHAIMANOT, A., BALCHA, F., WARDLAW, S. & LEVIN, R. (1988). Malaria diagnosis by direct observation of centrifuged samples of blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39**, 337-342.

SRIDHAR, KUMAR, R. & SHARMA, R.D. (1988). A note on an attempt to transmit *Trypanosoma evansi* infection through ticks (*Hyaloma anatolicum anatolicum*) in rabbits. *Indian J. Anim. Health* **30**, 173-174.

STEPHEN, L.E. (1962). Some observations on the behaviour of trypanosomes occurring in cattle previously treated with prophylactic drugs. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **56**, 415-421.

STEVENS, J.R., MATHIEU-DAUDET, F., Mc NAMARA, J.J., MIZEN, V.H. & NZILA, A. (1994). Mixed populations of *Trypanosoma brucei* in wild *Glossina palpalis palpalis. Trop. Med. Parasitol.* **45**, 313-318.

STONE, T. & DURRANT, I. (1991). Enhanced chemiluminescence for the detection of membrane-bound nucleic acid sequences : Advantages of the Amersham System. *GATA* **8**, 230-237.

STRAIF, S., MAIER, W. & SEITZ, H.M. (1990). Regurgitation as a potential mechanism of pathogen transmission in the biting fly *Stomoxys calcitrans. Z. für Ang. Zool.* 77, 357-366.

TACHER, G. , JAHNKE, H.E., ROJAT, d. & KEIL, P. (1988). Livestock development and economic productivity in tsetse infested Africa. *In : Livestock Production in tsetse affected areas of Africa. Proceedings of a meeting held in Nairobi, Kenya, 23-27 November 1987. Nairobi,Kenya, ILCA/ILRAD.*

TARIMO, S.A., OTIENO, L.H. & ONYANGO, P. (1987). Mixed trypanosome infection in wild *Glossina pallidipes* Aust. *Insect Sci. Applic.* **8**, 25-27.

TOMAS, B., BENET, J.J., DUFOUR, B., ELOIT, M., MOUTOU, F & SANAA, M. (1991). Glossaire d'épidémiologie animale. *Editions du Point Vétérinaire, collection Médecine vétérinaire, Paris, 363 p.*

TORR, S.J. (1994). Responses of tsetse flies (Diptera : Glossinidae) to warthog (*Phacochoerus aethiopicus* Pallas). *Bull. Ent. Res.* **84**, 411-419.

TRUC, P., AERTS, D., McNAMARA, J. J., CLAES, Y., ALLINGHAM, R., LE RAY D. & GODFREY, D. G. (1992). Direct isolation *in vitro* of *Trypanosoma brucei* from man and other animals, and its potential value for the diagnosis of gambian trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**, 627-629.

TRUC, P. & TIBAYRENC, M. (1993). Population genetics of *Trypanosoma brucei* in Central Africa : taxonomic and epidemiological significance. *Parasitol.* **106**, 137-149.

TRUC, P., BAILEY, J.W., DOUA, F., LAVEISSIERE, C. & GODFREY, D.G. (1994). A comparizon of parasitological methods for the diagnosis of gambian trypanosomiasis in an area of low endemicity in Côte d'Ivoire. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**, 419-421.

UILENBERG, G., MAILLOT, L. & GIRET, M. (1973). Etudes immunologiques sur les trypanosomoses. II - Observations nouvelles sur le type antigénique de base d'une souche de *Trypanosoma congolense*. *Revue d'Elev. Méd. vét. Pays trop.* **26**, 27-35.

VAN MEIRVENNE, N., JANSSENS, P.G., MAGNUS, E. & MOORS, A. (1972). Column separation and membrane filtration: a routine method for the detection of African trypanosomes in human blood. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* **53**, 109-112.

VAN MEIRVENNE, N. & LE RAY, D. (1985). Diagnosis of African and American trypanosomiases. *Br. Med. Bull.*, **41**, 156.

VERY, P., BOCQUENTIN, R. & DUVALLET, G. (1990). Sensibilité de la double centrifugation pour la recherche des trypanosomes. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **43**, 325-329.

VOLLER, A., BIDWELL, D. E. & BARTLETT, A. (1970). A serological study on human *Trypanosoma rhodesiense* infections using a microscale enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop. Med. Parasitol.* **26**, 147-249.

WAITUMBI, J.N. & MURPHY, N.B. (1993). Inter- and intra-species differentiation of trypanosomes by genomic fingerprinting with arbitrary primers. *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**, 181-186.

WALSH, P.S., METZGER, D.A. & HIGUCHI, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10**, 506-513.

WEITZ, B. (1952). The antigenicity of sera of man and animals in relation to the preparation of specific precipitating antisera. *J. Hyg.* **50**, 275-294.

WELBURN, S.C. & MAUDLIN, I. (1989). Lectin signalling of maturation of *T. congolense* infections in tsetse. *Med. Vet. Entomol.* **3**, 141-145.

WELBURN, S.C., MAUDLIN, I. & ELLIS, D.S. (1989). Rate of trypanosome killing by lectins in midguts of different species and strains of *Glossina*. *Med. Vet. Entomol.* **3**, 77-82.

WELBURN, S.C. & MAUDLIN, I. (1990). Haemolymph lectin and the maturation of trypanosome infections in tsetse. *Med. Vet. Entomol.* **4**, 43-48.

WELBURN, S.C., MAUDLIN, I. & MOLYNEUX, D.H. (1994). Midgut lectin activity and sugar specificity in teneral and fed tsetse. *Med. Vet. Entomol.* **8**, 81-87.

WELLS, E.A. (1972). The importance of mechanical transmission in the epidemiology of Nagana : a review. *Trop. Anim. Health Prod.* **4**, 74-88.

WERY, M., WERY-PASKOFF, S. & VAN WETTERE, P. (1970). The diagnosis of Human African Trypanosomiasis (*T. gambiense)* by the use of fluorescent antibody test: I- Standardization of an easy technique to be used in mass surveys. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* **50**, 613-614.

WERY, M. (1995). Protozoologie médicale. *Agence francophone pour l'enseignement et la recherche. Ed. De Boeck & Larcier, Bruxelle, Belgique, p. 29-31.*

WILLETT, K.C., McMAHON, J.P., ASHCROFT, M.T. & BAKER, J.R. (1964). Trypanosomes isolated from *Glossina palpalis* and *G. pallidipes* in Sakwa, Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.***58**, 391-396.

WINROCK (1992). Assessment of animal agriculture in Sub-saharian Africa. *Winrock Int. Inst. for Agric. Develt, Morrilton, USA, 125 p.*

WOO, P.T.K. (1969). The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Can. J. Zool.* **47**, 921-923.

WOO, P.T.K. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop.* **27**, 384-386.

WOODEN, J., GOULD, E.E., PAULL, A.T. & SIBLEY, C.O. (1992). *Plasmodium falciparum* : A simple polymerase chain reaction method for differentiating strains. *Exp. Parasitol.* **75**, 207-212.

WOOLHOUSE, M.E.J., HARGROVE, J.W. & McNAMARA, J.J. (1993). Epidemiology of trypanosome infections of the tsetse fly *Glossina pallidipes* in the Zambezi Valley. *Parasitol.* **106**, 479-485.

WOOLHOUSE, M.E.J., BEALBY, K., McNAMARA, J.J. & SILUTONGWE, J. (1994). Trypanosome infections of the tsetse fly *Glossina pallidipes* in the Luangwa Valley, Zambia. *Int. J. Parasitol.* **24**, 987-993.

WOOLHOUSE, M.E.J., McNAMARA, J.J., HARGROVE, J.W. & BEALBY, K. (1996). Distribution and abundance of trypanosome (subgenus *Nannomonas*) infections of the tsetse fly *Glossina pallidipes* in Southern Africa. *Mol. Ecol.* **5**, 11-18.

WUYTS, N., CHOKESAJJAWATEE, N. & PANYIM, S (1994). A simplified and highly sensitive detection of *T. evansi* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Int. Health* **25**, 266-271.

WUYTS, N., CHOKESAJJAWATEE, N., SARATAPHAN, N. & PANYIM, S. (1995). PCR amplification of crude blood on microscope slides in the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in dairy cattle. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* **75**, 229-237.

YOUDEOWEI, A. (1975). A simple technique for observing and collecting the saliva of tsetse flies (Diptera, Glossinidae). *Bull. Ent. Res.* **65**, 65-67.

YOUNG, J.C. & GODFREY, D.G. (1983). Enzyme polymorphism and the distribution of *Trypanosoma congolense* isolates. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 77, 467-481.

ZHANG, Z.Q. & BALTZ, T. (1994). Identification of *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma brucei brucei* using repetitive DNA probes. *Vet. Parasitol.* **53**, 197-208.

ANNEXES

TABLEAUX

Tableau (A) I : Infections expérimentales par *T. congolense* type "savane" : résultats des dissections

		âge moyen (jours)	intestin moyen	labre	hypopharynx	infections immatures
	♂ (N=51)	47,4	21 (41,2%)	18 (35,3%)	18 (35,3%)	3 (14,3%)
G. m. morsitans	♀ (N=68)	55,5	40 (58,8%)	31 (45,6%)	27 (39,7%)	9 (22,5%)
	total (N=119)	**51,4**	**61 (51,2%)**	**49 (41,2%)**	**45 (37,8%)**	**12 (19,7%)**
	♂ (N=47)	41,5	43 (91,9%)	42 (89,2%)	38 (81,1%)	1 (2,3%)
G. m. submorsitans	♀ (N=84)	29,8	73 (86,9%)	64 (76,2%)	58 (69%)	9 (12,3%)
	total (N=131)	**35,6**	**116 (88,5%)**	**106 (80,9%)**	**96 (73,3%)**	**10 (8,6%)**
	♂ (N=64)	58,8	48 (75%)	16 (25%)	5 (7,8%)	32 (66,6%)
G. p. gambiensis	♀ (N=180)	55,8	141 (78,3%)	4 (2%)	0	137 (97,1%)
	total (N=244)	**57,3**	**189 (77,4%)**	**20 (8,2%)**	**5 (2%)**	**169 (89,4%)**
	♂ (N=36)	49,4	18 (50%)	6 (16,6%)	3 (8,3%)	12 (66,6%)
G. tachinoides	♀ (N=96)	41,6	72 (75%)	21 (21,9%)	7 (7,3%)	51 (70,8%)
	total (N=132)	**45,5**	**90 (68,2%)**	**27 (20,4%)**	**10 (7,6%)**	**63 (70%)**

Tableau (A) 2 : Infections expérimentales par *T. congolense* type "savane" : comparaisons des taux d'infection entre chaque espèce et sous-espèce de glossines

	intestin moyen		labre		infections immatures	
comparaisons	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
G. m. m./G. m. s.	41,93	<0,005 **HS**	41,79	<0,005 **HS**	3,39	>0,05 **NS**
G. m. m./G. p. g.	25,60	<0,005 **HS**	56,51	<0,005 **HS**	112,05	<0,005 **HS**
G. m. m./G. t.	13,04	<0,005 **HS**	12,72	<0,005 **HS**	42,32	<0,005 **HS**
G. m. s./G. p. g.	6,90	<0,01 **S**	202,03	<0,005 **HS**	129,76	<0,005 **HS**
G. m. s./G. t.	16,06	<0,005 **HS**	96,15	<0,005 **HS**	52,70	<0,005 **HS**
G. p. g./G. t.	3,85	<0,05 **S**	11,76	<0,005 **HS**	16,81	<0,005 **HS**

(test χ^2 au seuil de probabilité de 5%)
S : significatif
HS : hautement significatif
NS : non significatif

Tableau (A) 3 : Infections expérimentales par *T. congolense* type "savane" : indices de Compétence Vectorielle Intrinsèque (CVI)

espèce/sous-espèce	sexe	CVI
	♂ (N=51)	0,353
G. m. morsitans	♀ (N=68)	0,456
	total (N=119)	**0,411**
	♂ (N=47)	0,893
G. m. submorsitans	♀ (N=84)	0,762
	total (N=131)	**0,809**
	♂ (N=64)	0,250
G. p. gambiensis	♀ (N=180)	0,022
	total (N= 244)	**0,082**
	♂ (N=36)	0,166
G. tachinoides	♀ (N=96)	0,218
	total (N=132)	**0,204**

CVI (G.m.s.) > CVI (G.m.m.) > CVI (G.t.) > CVI (G.p.g.)

Tableau (A) 4 : Infections expérimentales par *T. congolense* type "forêt" : résultats des dissections

		âge moyen (jours)	intestin moyen	labre	hypopharynx	infections immatures
	♂ (N=74)	31,5	8 (10,8%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)	7 (87,5%)
G. m. morsitans	♀(N=144)	34,3	16 (11,1%)	3 (2,1%)	3 (2,1%)	13 (81,2%)
	total (N=218)	**32,9**	**24 (11%)**	**4 (1,8%)**	**4 (1,8%)**	**20 (83,3%)**
	♂(N=50)	30,5	25 (50%)	6 (12%)	5 (10%)	19 (76%)
G. m. submorsitans	♀(N=94)	29,6	37 (39,3%)	12 (16,4%)	12 (16,4%)	25 (67,5%)
	total (N=144)	**30**	**62 (43%)**	**18 (12,5%)**	**17 (11,8%)**	**44 (70,1%)**
	♂(N=99)	26,3	34 (34,3%)	5 (5%)	4 (4%)	29 (85,3%)
G. p. gambiensis	♀(N=99)	32,6	64 (64,6%)	3 (3%)	3 (3%)	61 (95,3%)
	total (N=198)	**29,4**	**98 (49,5%)**	**8 (4%)**	**7 (3,5%)**	**90 (91,8%)**
	♂(N=56)	32	9 (16%)	3 (5,3%)	1 (1,8%)	6 (66,6%)
G. tachinoides	♀(N=92)	31,6	22 (23,9%)	4 (4,3%)	1 (1,1%)	18 (81,8%)
	total (N=148)	**31,8**	**31 (20,9%)**	**7 (4,7%)**	**2 (1,3%)**	**24 (77,4%)**

Tableau (A) 5 : Infections expérimentales par *T. congolense* type "forêt" : comparaisons des taux d'infection entre chaque espèce et sous-espèce de glossines

	intestin moyen		labre		infections immatures	
comparaisons	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
G. m. m./G. m. s.	49,16	<0,005 **HS**	17,28	<0,005 **HS**	1,38	>0,05 **NS**
G. m. m./G. p. g.	74,14	<0,005 **HS**	1,80	>0,05 **NS**	1,57	>0,05 **NS**
G. m. m./G. t.	6,81	<0,01 **S**	2,53	>0,05 **NS**	0,29	>0,05 **NS**
G. m. s./G. p. g.	1,38	>0,05 **NS**	8,49	<0,005 **HS**	12,15	<0,005 **HS**
G. m. s./G. t.	16,43	<0,005 **HS**	5,46	<0,01 **S**	0,43	>0,05 **NS**
G. p. g./G. t.	29,52	<0,005 **HS**	0,09	>0,05 **NS**	4,76	<0,05 **S**

(test χ^2 au seuil de probabilité de 5%)
S : significatif
HS : hautement significatif
NS : non significatif

Tableau (A) 6 : Infections expérimentales par *T. congolense* type "forêt" : indices de Compétence Vectorielle Intrinsèque (CVI)

espèce/sous-espèce	sexe	CVI
	♂ (N=74)	0,013
G. m. morsitans	♀ (N=144)	0,021
	total (N=218)	**0,027**
	♂ (N=50)	0,120
G. m. submorsitans	♀ (N=94)	0,127
	total (N=144)	**0,125**
	♂ (N=99)	0,050
G. p. gambiensis	♀ (N=99)	0,030
	total (N= 198)	**0,040**
	♂ (N=56)	0,053
G. tachinoides	♀ (N=92)	0,043
	total (N=148)	**0,047**

CVI (G.m.s.) > CVI (G.t.) > CVI (G.p.g.) > CVI (G.m.m.)

Tableau (A) 7 : Infections expérimentales mixtes par *T. congolense* types "savane" + "forêt" : résultats des dissections

		âge moyen (jours)	intestin moyen	labre	hypopharynx	infections immatures
	♂(N=35)	28,5	7 (20%)	7 (20%)	7 (20%)	0
G. m. morsitans	♀(N=43)	28,5	12 (27,9%)	12 (27,9%)	12 (27,9%)	0
	total (N=78)	**28,5**	**19 (24,3%)**	**19 (24,3%)**	**19 (24,3%)**	**0**
	♂(N=52)	26,6	36 (69,2%)	36 (69,2%)	36 (69,2%)	0
G. m. submorsitans	♀(N=47)	27,5	25 (53,2%)	25 (53,2%)	25 (53,2%)	0
	total (N=99)	**27**	**61 (61,6%)**	**61 (61,6%)**	**61 (61,6%)**	**0**
	♂(N=0)	-	-	-	-	-
G. p. gambiensis	♀(N=22)	26,6	4 (18,1%)	0	0	4 (100%)
	total (N= 22)	**26,6**	**4 (18,1%)**	**0**	**0**	**4 (100%)**
	♂(N=45)	26,6	18 (40%)	6 (13,3%)	4 (8,8%)	12 (66,6%)
G. tachinoides	♀(N=34)	27	20 (58,8%)	4 (11,7%)	3 (8,8%)	16 (80%)
	total (N=79)	**26,8**	**38 (48,1%)**	**10 (12,6%)**	**7 (8,8%)**	**28 (73,7%)**

Tableau (A) 8 : Infections expérimentales mixtes par *T. congolense* types "savane" + "forêt" : comparaisons des taux d'infection entre chaque espèce et sous-espèce de glossines

	intestin moyen		labre		infections immatures	
comparaisons	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
G. m. m./G. m. s.	80,17	<0,005 **HS**	80,17	<0,005 HS	-	-
G. m. m./G. p. g.	3,87	<0,05 **S**	6,61	<0,01 **S**	23	<0,005 **HS**
G. m. m./G. t.	25,23	<0,005 **HS**	2,14	>0,05 **NS**	27,51	<0,005 **HS**
G. m. s./G. p. g.	34,73	<0,005 **HS**	27,33	<0,005 **HS**	65	<0,005 **HS**
G. m. s./G. t.	3,25	>0,05 **NS**	43,92	<0,005 **HS**	62,67	<0,005 **HS**
G. p. g./G. t.	6,34	<0,01 **S**	3,09	>0,05 **NS**	1,38	>0,05 **NS**

(test χ^2 au seuil de probabilité de 5%)
S : significatif
HS : hautement significatif
NS : non significatif

Tableau (A) 9 : Infections expérimentales mixtes par *T. congolense* types "savane" + "forêt" : indices de Compétence Vectorielle Intrinsèque (CVI)

espèce/sous-espèce	sexe	CVI
	♂ (N=35)	0,200
G. m. morsitans	♀ (N=43)	0,270
	total (N=78)	**0,243**
	♂ (N=52)	0,692
G. m. submorsitans	♀ (N=47	0,531
	total (N=99)	**0,616**
	♂ (N=0)	-
G. p. gambiensis	♀ (N=22)	0,181
	total (N= 22)	**0,181**
	♂ (N=45)	0,133
G. tachinoides	♀ (N=34)	0,117
	total (N=79)	**0,126**

CVI (G.m.s.) > CVI (G.m.m.) > CVI (G.p.g.) > CVI (G.t.)

Tableau (A) 10 : Infections expérimentales mixtes par *T. congolense* type "savane"+ *T. vivax* "Afrique de l'Ouest" : résultats des dissections

		âge moyen (jours)	intestin moyen	labre	hypopharynx
	♂(N=17)	47	8 (47%)	8 (47%)	8 (47%)
G. m. morsitans	♀(N=44)	47	22 (50%)	21 (47,7%)	17 (38,6%)
	total (N=61)	**47**	**30 (49,1%)**	**29 (47,5%)**	**25 (40,9%)**
	♂ (N=24)	42	13 (54,1%)	7 (29,1%)	1 (4,1%)
G. tachinoides	♀((N=34)	42	28 (82,3%)	17 (50%)	6 (17,6%)
	total (N=58)	**42**	**41 (70,6%)**	**24 (41,3%)**	**7 (12%)**

Tableau (A) 11 : Infections expérimentales mixtes par *T. congolense* type "savane" + *T. vivax* "Afrique de l'Ouest" : comparaison des taux d'infection entre chaque espèce et sous-espèce de glossines

	intestin moyen		labre		hypopharynx	
comparaison	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
G. m. m./G.t.	5,71	<0,05 **S**	0,45	>0,05 **NS**	17,72	<0,005 **HS**

(test χ^2 au seuil de probabilité de 5%)
S : significatif
HS : hautement significatif
NS : non significatif

Tableau (A) 12 : Infections expérimentales mixtes par *T. congolense* type "savane" + *T. vivax* "Afrique de l'Ouest" : indices de Compétence Vectorielle Intrinsèque (CVI)

espèce/sous-espèce	sexe	CVI
	♂(N=17)	0,470
G. m. morsitans	♀ (N=44)	0,477
	total (N=61)	**0,475**
	♂((N=24)	0,291
G. tachinoides	♀ (N=34)	0,470
	total (N=61)	**0,396**

CVI (G.m.m.) > CVI (G.t.)

Tableau (A) 13 : Pourcentages des catégories de charges parasitaires (nombre de trypanosomes approximatif) observées dans les différents organes des glossines infectées par *T. congolense* type "savane" et type "forêt"

		intestin moyen			**labre**		
		(+)	**(++)**	**(+++)**	**(+)**	**(++)**	**(+++)**
type "savane"	gpe *morsitans*	10 (**5,64%**)	10 (**5,64%**)	157 (**88,70%**)	17 (**10,96%**)	32 (**20,64%**)	106 (**68,38%**)
	gpe *palpalis*	38 (**13,62%**)	72 (**25,80%**)	169 (**60,57%**)	21 (**44,68%**)	10 (**21,27%**)	16 (**34,04%**)
type "forêt"	gpe *morsitans*	23 (**26,74%**)	24 (**27,90%**)	39 (**45,34%**)	10 (**45,45%**)	2 (**9,09%**)	10 (**45,45%**)
	gpe *palpalis*	26 (**20,15%**)	35 (**27,13%**)	68 (**52,71%**)	2 (**13,33%**)	5 (**33,33%**)	8 (**53,33%**)

Tableau (A) 14 : Expérience de salivation de glossines infectées : nombre total et moyen de trypanosomes observés dans les salivats de *G. tachinoides* infectées par *T. congolense* E325 (type "savane") au cours de l'expérience

n° glossine	G2	G3	G4	G6	G7	G8	G9	G11	G13
nombre d'essais	17	22	13	15	13	26	22	25	19
total formes courtes	139	118	192	121	98	466	119	200	166
moy. formes courtes	8,17 (e.t.=14,4)	5,36 (e.t.=5,2)	14,76 (e.t.=12,7)	8,06 (e.t.=8,5)	7,53 (e.t.=6,0)	19,41 (e.t.=32,3)	5,66 (e.t.=5,8)	8,33 (e.t.=9,9	8,83 e.t.=15,0)
total formes longues	21	16	85	8	9	59	49	33	5
moy. formes longues	2,33 (e.t.=4,8)	0,72 (e.t.=1,3)	6,53 (e.t.=9,9)	0,53 (e.t.=1,0)	0,69 (e.t.=0,7)	2,45 (e.t.=2,8)	2,33 (e.t.=3,4)	1,37 (e.t.=3,3)	0,26 (e.t.=0,6)

moy. : nombre moyen de parasites par glossine et par essai, e.t. : écart type.

Tableau (A) 15 : Expérience de salivation de glossines infectées : pourcentages de cas positifs par PCR et xénodiagnostic inverse révélés au cours du suivi de chaque *G. tachinoides* infectée par *T. congolense* E 325 (type "savane")

n° glossine	G2	G3	G4	G6	G7	G8	G9	G11	G13
nombre d' essais	16	22	12	15	14	25	19	25	19
PCR+	12	19	12	14	11	20	16	21	19
% PCR+	75	86	100	93	78	80	84	84	100
nombre d' essais	15	34	11	14	13	31	31	33	18
souriceaux+	11	27	11	12	10	20	7	30	18
%souriceaux+	73	79	100	85	76	64	22	90	100

PCR+/%PCR+ : nombres/pourcentages de salivats répondant positivement à la PCR, souriceaux+/% souriceaux+ : nombre/pourcentages de souriceaux infectés

Tableau A16 : Recherche par PCR de trypanosomes ou de traces de trypanosomes sur des proboscis de glossines prélevés après repas interrompus des mouches sur des souris parasitées par *T. congolense* E325 (type "savane").

N° tube	prélèvement proboscis	résultat PCR
1	immédiatement après le repas	-
2	immédiatement après le repas	-
3	immédiatement après le repas	-
4	immédiatement après le repas	-
5	immédiatement après le repas	++
6	1 h après le repas	-
7	1 h après le repas	-
8	1 h après le repas	-
9	1 h après le repas	-
10	1 h après le repas	-
11	2 h après le repas	-
12	2 h après le repas	-
13	2 h après le repas	-
14	2 h après le repas	-
15	2 h après le repas	-
16	15 h après le repas	-
17	15 h après le repas	-
18	15 h après le repas	-
19	15 h après le repas	-
20	15 h après le repas	-
21	25 h après le repas	-
22	25 h après le repas	-
23	25 h après le repas	-
24	40h après le repas	-
25	40h après le repas	-
26	40h après le repas	-

ANNEXE 1

Hybridation moléculaire : protocole du kit Boehringer Mannheim

I- Marquage de la sonde

1- Dénaturer l'ADN en chauffant à 100°C pendant 10 min. et refroidir rapidement dans la glace.
2- Ajouter dans un microtube maintenu dans la glace:
- 1 µg d'ADN fraîchement dénaturé
- 2 µl d'hexanucléotides
- 2 µl du mélange d'NTP
- ajuster à 19 ml avec de l'eau distillée stérile
- 1 µl d'enzyme de Kleenow

3- Centrifuger brièvement et faire incuber au moins 60 min. à 37°C. Une incubation plus longue (jusqu'à 20 heures) peut augmenter la quantité d'ADN marqué.
4- Stopper la réaction en ajoutant 2 µl de solution d'EDTA 0,2 M, pH 8,0.
5- Précipiter l'ADN marqué avec 2,5 µl de LiCl 4M et 75 µl d'éthanol glacé.
6- Laisser au moins 30 min. à -70°C ou 2 heures à -20°C.
7- Centrifuger (12000 g). Laver le culot avec de l'éthanol froid 70% (v/v). Sécher sous vide et dissoudre dans 50 µl de tampon TEN.
8- La quantité d'ADN marqué peut être estimée par comparaison avec le contrôle ADN marqué soit par détection directe, soit par hybridation.

II- Dépôt des échantillons

Nous travaillons avec de l'ADN déja amplifié par PCR.

1- Après l'amplification et la révélation, diluer 10 à 15 µl d'ADN amplifié dans 60 µl de tampon TE.
2- Tremper la membrane de nylon 1 min. dans l'eau distillée et 5 min dans du SSC 20x.
3- Dénaturer l'ADN 10 min. à 95°C, puis déposer les échantillons dans la glace.
4- Installer la membrane dans l'hybrislot relié à la pompe à vide.
5- Déposer les échantillons sur la membrane.
6- Déposer ensuite 60 µl de TE dans tous les puits.
7- Mettre en marche la pompe à vide et surveiller l'écoulement dans les puits.
8- Démonter le slot avec la pompe toujours en marche.

9- Fixer l'ADN sur la membrane en déposant celle-ci sur du papier Whatmann saturé de NaOH 0,4M pendant 30 min.
10- Rincer 1 min. avec du SSC 5x.

La membrane peut alors soit être utilisée pour l'hybridation, soit conservée à -20°C dans du papier aluminium.

III- Hybridation

1- Préhybrider la membrane à 42°C avec 10 ml de tampon d'hybridation pendant au moins une heure (si possible 2 ou 3 heures).
2- Remplacer la solution par 3 ml de tampon d'hybridation contenant 30 ml de sonde marquée fraîchement dénaturée (10 min. à 95°C).
3- Incuber pendant au moins 6 heures à 42°C (mieux si toute la nuit).
4- Laver la membrane 2 x 5 min. à température ambiante avec du tampon de lavage A, et 2 x 15 min. à 68°C avec du tampon de lavage B.
La membrane peut être alors directement utilisée pour la détection ou alors séchée et stockée.

IV- Révélation

Toutes les étapes d'incubation sont réalisées à température ambiante et, à l'exception de l'étape de coloration, avec agitation.
Les volumes sont donnés pour 100 cm^2 de membrane.

1- Laver la membrane 1-5 min. dans le tampon de lavage.
2- Incuber pendant 30 min. avec 100 ml de tampon 2.
3- Diluer le conjugué a-DIG/AP au 1/10000 dans le tampon 2.
4- Incuber pendant 30 min. avec 20 ml de solution de conjugué dilué.
5- Laver 2 x 5 min. avec 100 ml de tampon de lavage.
6- Equilibrer 2 à 5 min. la membrane dans 20 ml de tampon 3.
7- Placer la membrane sur un film transparent et déposer directement sur la membrane, 1 à 2 ml de Lumi-Phos. 530/100 cm^2 .
8- Placer un autre film transparent sur la membrane pour faire diffuser le substrat. Incuber 1 min.
9- Pre-incuber la membrane à 37°C à 5 à 15 min.
10- Exposer 15 à 20 min. aux UV ou à un film Polaroïd.
Si les membranes sont conservées non desséchées, elles peuvent être réutilisées ou bien colorées par le protocole classique.

Composition des tampons

- tampon 1	Acide maléique	0,1 mol/l
	NaCl	0,15 mol/l
	Ajuster le pH à 7,5 (20°C) avec NaOH	
	Autoclaver	
- solution stock de bloquage	Agent bloquant	10%
	dans le tampon 1	
	Autoclaver et stocker à 4°C	
- tampon d'hybridation	formamide	50%
	SSC	5X
	Agent bloquant	2% (w/v)
	à partir de la solution stock 10% stérile	
	N-laurylsarcosine	0,1%
	SDS	0,02%
- tampon de lavage A	SSC	2X
	SDS	0,1% (w/v) stérile
- tampon de lavage B	SSC	0,1X
	SDS	0,1% (w/v) stérile
- tampon de lavage (de révélation)	Tween 20	0,3% (w/v) dans le tampon1
- tampon 2	solution stock de blocage diluée au 1/10 dans le tampon 1 (concentration finale d'agent bloquant = 1%)	
- tampon 3	Tris-HCl	100 mmol/l
	NaCl	100 mmol/l
	$MgCl_2$	50 mmol/l
	pH 9,5	
	Filtrer sur membrane 0,45 mm.	

ANNEXE 2

PCR : préparation des organes de glossines

(Kit utilisé : Ready AMP™ genomic purification kit, Madison, WI, USA)

I- Proboscis et glandes salivaires

Suspendre les organes dans un microtube Eppendorf contenant 50 µl d'eau distillée stérile et bien écraser, notamment le proboscis, à l'aide d"un embout de pipette stérile, afin de libérer les trypanosomes dans le liquide. Agiter énergiquement et utiliser 3 à 4 µl pour la PCR.

II- Intestins (adapté de Penchenier *et al.*, 1996)

1- Ajouter 500 µl d'eau stérile ("nuclease free" livrée avec le kit)
2- Laisser à température ambiante pendant 10 min. en agitant avec un vortex (5 à 10 secondes) toutes les 2 min.
3- Centrifuger à 15000 tpm pendant 2 min.
4- Retirer le surnageant et ajouter 50 à 100 µl de résine préalablement resuspendue par agitation magnétique.
5- Agiter le mélange énergiquement.
6- Incuber à 56°C pendant 20 min.
7- Agiter au vortex (5 à 10 secondes).
8- Placer à 100°C pendant 8 min.
9- Agiter au vortex (5 à 10 secondes)
10- Centrifuger à 15000 tpm pendant 2 min.
11- Utiliser 3 à 4 µl du surnageant pour la PCR ou stocker à -20°C en attendant l'utilisation.

ANNEXE 3

Composition du mélange réactionnel d'amplification (volume final 25 µl)

Tris-HCl pH 8,3	10 mM
KCl	50 mM
$MgCl_2$	1,5 mM
dNTPs	200 µM
amorces	100 ng/µl
Taq Polymerase	1,25 unités
échantillon	2 à 4 µl selon le cas

ARTICLES

* DUVALLET, G., BENGALY, Z., REIFENBERG, J.M. & ARGIRO, L. (1993).
De nouveaux outils pour le diagnostic et l'épidémiologie de la trypanosomose animale africaine. Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales, *IIèmes Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Animales de l'UREF*, 19-29.

* GIDUDU, A., CUISANCE, D., REIFENBERG, J.M. & FREZIL, J.L. (1995).
Contribution à l'étude de l'émission de *Trypanosoma congolense* par *Glossina morsitans morsitans* (Diptera : Glossinidae) au laboratoire.
Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux **48**, 264-270.

* GIDUDU, A., CUISANCE, D., REIFENBERG, J.M. & FREZIL, J.L. (1995).
Amélioration de la technique de salivation des glossines pour la détection des métatrypanosomes infectants : étude de quelques facteurs biologiques et non biologiques sur le comportement de sondage des glossines.
Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux **48**, 153-160.

* SOLANO, P., ARGIRO, L., REIFENBERG, J.M., YAO Y. & DUVALLET, G. (1995).
Field application of the polymerase chain reaction (PCR) to the detection and characterization of trypanosomes in *Glossina longipalpis* (Diptera: Glossinidae) in Côte d'Ivoire.
Molecular Ecology **4**, 781-785.

* GIDUDU, A., CUISANCE, D., REIFENBERG, J.M. & FREZIL, J.L. (1996).
Emission de *Trypanosoma congolense* dans la salive et dans la goutte anale chez *Glossina morsitans morsitans* et *Glossina tachinoides* (Diptera, Glossinidae) au laboratoire.
Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux **49 (2)**, 132-140.

* PENCHENIER, L., DUMAS, V., GREBAUT, P., REIFENBERG, J.M. & CUNY, G. (1996).
Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomosis.
Parasite **4,** 387-389.

* SOLANO, P., REIFENBERG, J.M., AMSLER-DELAFOSSE, S., KABORE, I., CUISANCE, D. & DUVALLET, G. (1996).
Trypanosome characterization by polymerase chain reaction in *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina tachinoides* from Burkina Faso.
Medical and Veterinary Entomology **10**, (sous presse).

* REIFENBERG, J.M., CUISANCE, D., GIDUDU, A. & FREZIL, J.L. (1996).
Evaluation de la compétence vectorielle de *Glossina tachinoides* (Diptera, Glossinidae) vis-à-vis de *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense* Broden 1904: implications épidémiologiques. *Parasite* **3**, 267-276.

* REIFENBERG, J.M., CUISANCE, D., FREZIL, J.L., CUNY G. & DUVALLET, G.
Comparison of the susceptibility of different *Glossina* species to simple and mixed infections with *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense* Savannah and Riverine-Forest types
(accepté pour publication dans *Medical and Veterinary Entomology*)

* REIFENBERG, J.M., SOLANO, P., DUVALLET, G., CUISANCE, D., SIMPORE, J. & CUNY, G.
Molecular characterization of trypanosome isolates from naturally infected domestic animals from Burkina Faso
(accepté pour publication dans *Veterinary Parasitology*)

Valorisation scientifique

* REIFENBERG, J.M., SOLANO, P., CUISANCE, D.& DUVALLET, G.(1995)
"Molecular characterization of animal trypanosomes in West Africa" (poster)
Colloque européen "Compared approaches for molecular typing and evolutionary genetics of pathogenic microorganisms", Centre ORSTOM de Montpellier, 30 novembre-1er décembre 1995.

* DUVALLET, G., SOLANO, P., REIFENBERG, J.M. & CUISANCE, D. (1995).
"Molecular epidemiology of animal trypanosomosis in Africa: first results at CIRDES" (poster)
- *Congrès Européen de Biotechnologie, Nice, 19-23 février 1995*
- *Journées de l'Ecole Doctorale "Biologie des Systèmes Intégrés, Agronomie, Environnement. Agropolis International, Montpellier, 19-20 octobre 1995.*

* REIFENBERG, J.M. (1996). (exposé)
4èmes Séminaires Laveran "Caractérisation génotypique et phénotypique des parasites et des micromycètes. Taxonomie. Systématique. Fondation Marcel Mérieux, Les Pensières, Annecy, 27-29 mars 1996.

* REIFENBERG, J.M., SOLANO, P., DUVALLET, G. & CUISANCE, D. (1996) (poster)
"Molecular characterization of trypanosomes in West Africa"
European Multicolloquium of Parasitology (EMOP VII), Parme, Italie, 2-6 septembre 1996

* SOLANO, P., REIFENBERG, J.M., CUISANCE, D., DUVALLET, G., CUNY, G. (1996) (exposé).
"Intérêt des outils moléculaires appliqués à l'épidémiologie des trypanosomoses africaines"
Journées Scientifiques du CIRAD-EMVT, Montpellier, 3-5 septembre 1996.