

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
UFR DE SCIENCES**

N° Attribué par la bibliothèque

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Sciences biologiques

Formation doctorale : Parasitologie

Ecole doctorale : Biologie intégrative

Titre :

Caractérisation génétique de *Trypanosoma brucei* ssp. et évolution clinique de la Trypanosomose Humaine Africaine en Côte d'Ivoire

Présentée et soutenue publiquement
par

Vincent Jamonneau

le 15 novembre 2000

JURY

M. Bernard GODELLE, Professeur, Université Montpellier II
M. Jean-Louis FREZIL, Directeur de Recherche, IRD Montpellier
M. Philippe BUSCHER, Professeur, IMT Anvers
M. Philippe VINCENDEAU, Professeur, Université Bordeaux
M. Gérard DUVALLET, Professeur, Université Montpellier
M. Philippe TRUC, Chargé de Recherche, IRD Montpellier

Examineur
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Remerciements

Ce travail a été réalisé en Côte d'Ivoire dans le cadre du Grand Programme Mobilisateur « Trypanosomiasés » financé par le Fonds d'Aide à la Coopération du Ministère français des Affaires étrangères. Il est le fruit d'une collaboration IPR-OCCGE/IRD. Je tiens à remercier Messieurs les Président et Directeur de l'IRD, Monsieur le Secrétaire Général de l'OCCGE, Messieurs les Directeurs de L'Institut Pierre Richet, François Rivière et Pierre Carnevale, Monsieur le Représentant de l'IRD en Côte d'Ivoire, Alain Morlière et Monsieur le Directeur du centre IRD de Bouaké, Louis Tito de Morais, pour avoir autorisé la réalisation de ce projet. Je tiens aussi à remercier tout le personnel administratif et financier de ces différentes institutions pour sa disponibilité. Je remercie le Ministre de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour m'avoir octroyé une allocation de Recherche pendant 3 ans. Je remercie aussi le Docteur Jean-Paul Louis du Ministère français des Affaires étrangères ainsi que le Docteur Pierre Brika et le Professeur Diarra du Ministère ivoirien de la Santé Publique.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude, pour leur présence à ce Jury, à Messieurs les Professeurs Philippe Büscher, Gérard Duvallat, Bernard Godelle et Philippe Vincendeau.

Je remercie particulièrement :

Jean-Louis Frezil, vous avez dirigé ce travail avec compétence grâce non seulement à vos connaissances scientifiques, mais aussi à votre sens de la pédagogie. J'apprécie beaucoup votre façon d'aborder la recherche, et je vous exprime ma profonde gratitude pour m'avoir accordé votre confiance depuis le DEA de Parasitologie.

Philippe Truc, tu m'as tout simplement tout appris, techniquement et scientifiquement, depuis mon premier stage (mai 1994) dans ton laboratoire à l'IPR de Bouaké que tu as créé en 1993 et dirigé pendant 6 ans. Tu as su me transmettre durant toutes ces années ta volonté de voir un jour disparaître la THA, qui fait de toi un excellent chercheur. Je te dois beaucoup pour cette thèse qui sans toi n'aurait jamais abouti. Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Je te félicite une fois de plus pour ton recrutement à l'IRD, et te souhaite une longue et brillante carrière professionnelle.

André Garcia, que d'heures passées ensemble, intra et extra-professionnelles. Je crois que je ne saurais jamais assez te remercier pour tout ce que tu m'as apporté, scientifiquement mais surtout humainement. Tu as dirigé l'URL « Trypano » de l'IPR avec succès, mais quoi de plus

normal étant données tes compétences, ta disponibilité et ta gentillesse. Je te souhaite autant de succès dans ta nouvelle affectation à Dakar. Merci à ta petite famille qui te soutient (derrière un grand homme, il y a toujours une grande femme).

Gérard Cuny, Sophie Ravel, Valérie Dumas et Pascal Grébaut, la bonne humeur quotidienne qui fait la force de votre équipe, ainsi que votre disponibilité à mon égard m'ont été d'un grand soutien lors de mon retour en France. Merci pour avoir mis à ma disposition tout ce dont j'avais besoin pour la rédaction et la soutenance de ce travail. Gérard, courage et réussites dans tes nouvelles fonctions de chef de l'UMR « Trypanosomoses » de l'IRD dans laquelle je suis fier de travailler, même à court terme...

Michel Tibayrenc, Bruno Oury et toute l'équipe du CEPM, merci pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire et pour m'avoir enseigné la technique dite des RAPD.

L'équipe Trypano de l'IPR de Bouaké, Claude Laveissière (ancien chef), Florence Fournet, Philippe Solano (nouveau chef), Bocar Sane, André Koné, Sanon, Paul, Louis, Alain, Alexis de Sinfra, Tiéba, Fabien, Guess, Gboko, Jeannot, Oumar, Soumaïla et les ASC de Sinfra, ce travail, c'est en grande partie vous qui l'avez effectué et je vous en suis plus que reconnaissant. Votre sympathie et votre hospitalité n'ont d'égale que votre connaissance du terrain et votre acharnement à lutter contre la trypano. Rappelez-vous bien ces paroles: « L'équipe Trypano, toujours copiée, jamais égalée ». Philippe Solano a bien de la chance de trouver une équipe comme la votre, et je suis sûr qu'ensemble, vous allez fournir de l'excellent travail et Je vous souhaite longue vie à tous et un avenir durable à l'IPR et j'espère vivement que nous aurons l'occasion de retravailler ensemble.

Je remercie aussi l'équipe du PRCT: Docteur Felix Doua, Docteur Djé N'goran Norbert, Benjamin Miezán, Alexandre, Gabin et Dion, ainsi que Fabien et Laurent de Bouaflé pour leur apport technique et leur gentillesse lors des prospections médicales.

Merci aux « sacamoles » Paul, Sanon, Alain, Raphaël et Jeannot et autres moines de l'Awanda, Louis et Fabien pour m'avoir fait découvrir la Côte d'Ivoire sous toutes ses facettes. J'ai une pensée émue pour Tiemoko qui nous a quitté trop tôt, en laissant un vide dans l'équipe que nous ne saurons combler.

Je remercie vivement mes professeurs d'Université, d'Orléans et de Montpellier, qui ont su me faire aimer la Parasitologie et qui sont pour beaucoup dans l'orientation que j'ai prise.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien, la participation et les conseils de plusieurs personnes qu'il m'est agréable de remercier vivement: Christian Bellec, Directeur du LEMV à l'IRD, Veerle Lejon et Edy Magnus de l'IMT d'Anvers, institut incontournable dans la recherche et la lutte contre la maladie du sommeil; Téo Baltz, Professeur à l'Université de

Bordeaux; Dominique Cuisance, du CIRAD/EMVT, Sylvie Hart de l'IRD et sa patience pour régler mes petites tracasseries d'ordre administratif (inscriptions à la Fac).

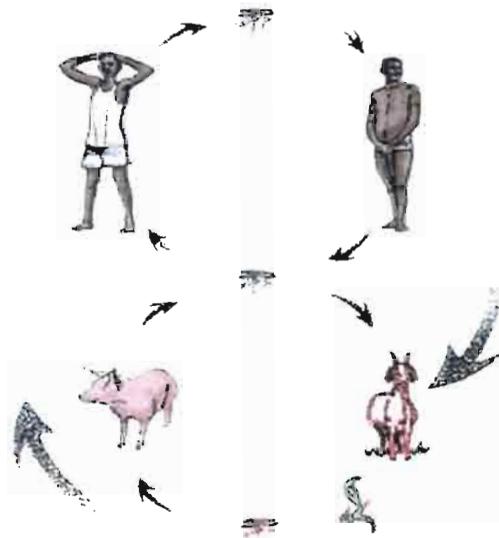
J'ai une pensée émue pour tous les malades qui ont accepté de participer à cette étude et je les en remercie. Je leur souhaite à tous une bonne santé.

Merci à tous ceux qui m'ont hébergé ou accueilli pendant ces 4 années de thèse, je pense particulièrement à Gérard et Nadette Courtin qui ont été d'une gentillesse et d'une patience exemplaire ainsi qu'à Jean-Michel Vassal, à Mathieu et à Hubert et Dominique Charpentier pour leur sens de l'hospitalité.

Merci aussi à tous mes amis, de Côte d'Ivoire et de France pour leur soutien, et c'est avec plaisir que je les cite dans cet ouvrage auquel ils ont contribué malgré eux: Brice, Mathieu, Stéphane, Thierry et Christelle, Manu, Kathy et Achille, Phiphi, Brigitte Bop, Maylis, David et Fabrice (et les truites de la Vis), les « Cousins », Serge et Marouchka, Dabiré, Pascal, Ibrahim, Oumar et ses mécanos, Abou et ses djembefolas, Youle, Roger, Romain et Léo, Laurent, les Solano, les Martin, les Nicot, Philippe et Florence, Alexina, Agnès et Philippe, Taïna et Stéphane, Audrey, Manou et tous les autres...

A mon épouse Isabelle et mon fils Tom,

A mes parents, à mon frère Baptiste et ma soeur Stéphanie.



Source photo: OMS, CDrom THA

Table des matières

Remerciements.....	2
Table des matières.....	6
Introduction	9
Première partie: rappel historique	11
1. Les premières descriptions de la maladie.....	11
2. Identification de l'agent pathogène.....	11
3. Evolution de la maladie au cours du 20 ^{ème} siècle.....	12
4. Situation actuelle de la THA.....	16
Deuxième partie: Etat des connaissances	20
1. L'agent pathogène: <u>Trypanosoma brucei</u> ssp.	20
1.1. Taxonomie.....	20
1.2. Morphologie et cycle évolutif.....	23
1.3. Organisation du génome.....	29
1.3.1. L'ADN nucléaire.....	29
1.3.2. L'ADN kinétoplastique.....	30
1.4. Reproduction de <i>T. brucei</i> ssp.....	30
1.5. Caractéristiques biologiques de <i>T. brucei</i> ssp.: Polymorphisme et variation antigénique, description et principe.....	31
2. La maladie: la Trypanosomose Humaine Africaine.....	34
2.1. Présentation clinique.....	34
2.2. Pathogénie et immunologie.....	38
2.2.1. Trypanosomes pathogènes pour l'homme.....	38
2.2.2. Evolution chez l'homme.....	38
2.3. Diagnostic et traitement.....	42
2.3.1 Diagnostic de la THA.....	42
2.3.1.1. Diagnostic indirect.....	42
2.3.1.1. Diagnostic direct.....	43
2.3.2 Diagnostic de phase et traitement.....	44
Troisième partie: Problématique	46
1. Subdivision de <u>T. brucei</u> ssp., problèmes rencontrés.....	46
2. Diversité d'évolutions cliniques.....	49
Quatrième partie: Matériel et Méthodes	51
1. Zones d'études communes aux deux enquêtes.....	53
1.1 Historique et situation actuelle des foyers d'étude.....	53
1.2. Situation géoclimatique des foyers.....	54
1.2.1. Foyers du Centre-ouest.....	54
1.2.2. Foyers du Sud-est.....	55
1.3. Populations.....	55
1.3.1. Les ethnies.....	55
1.3.2. Densité de population.....	56
1.4. Les centres de santé spécialisés et lutte contre la THA en Côte d'Ivoire.....	57
2. Matériel et méthodes de la première enquête: Diversité des formes cliniques de THA et variants génétiques de <u>T. brucei</u> s.l.....	58
2.1. Inclusion des patients.....	58
2.2. Paramètres épidémiologiques.....	64
2.3. Bilan clinique.....	64
2.4. Paramètres sérologiques et parasitologiques.....	68
2.5. Bilan immunologique.....	68
2.6. Isolement des souches et mise en culture.....	70
2.6.1. Isolement.....	70
2.6.2. Culture in vitro des formes procycliques de <u>T. brucei</u> ssp.	72
2.6.2.1. Préparation du milieu de culture.....	72
2.6.2.2. Mise en culture.....	72
2.6.2.3. Culture de masse et récolte des trypanosomes.....	73
2.7 Identification des variants génétiques de <i>T. brucei</i> ssp.....	73

2.7.1. Electrophorèse d'isoenzymes en acétate de cellulose.....	73
2.7.1.1. Généralités, principe.....	73
2.7.1.2. Méthodes et systèmes enzymatiques.....	74
2.7.1.2.1. Extraction des enzymes.....	75
2.7.1.2.2. L'électrophorèse.....	75
2.7.1.2.3. La coloration.....	78
2.7.2. RAPD.....	84
2.7.2.1. Généralités, principe.....	84
2.7.2.2. Méthodes.....	84
2.7.2.2.1. Extraction de l'ADN.....	84
2.7.2.2.2. Amplification.....	85
2.7.2.2.3. Electrophorèse et lecture.....	85
2.7.2.3. Analyse des résultats.....	86
2.8. Méthodes statistiques.....	88
3. Matériel et Méthodes de la deuxième enquête : Suivi sérologique, parasitologique et clinique à long terme de trypanosomés refusant le traitement.....	89
3.1. Population suivie.....	89
3.2. Fréquence de nos visites.....	89
3.3. Suivi clinique.....	90
3.4. Suivi sérologique et parasitologique.....	90
3.5. Isolement et identification des souches.....	91
Cinquième partie : Résultats.....	92
1. Résultats de la première enquête : diversité des formes cliniques de THA et variants génétiques de <i>T. brucei</i> ssp.....	92
1.1. Description générale des patients.....	93
1.1.1. Dépistage, centre de traitement et origine géographique.....	93
1.1.2. Sexe, age, nationalité, groupe ethnique.....	95
1.1.3. Activités professionnelles.....	95
1.1.4. Antécédents familiaux.....	96
1.2. Isolement des souches et identification des souches isolées.....	96
1.2.1. Isolement des souches.....	96
1.2.2. Comparaison des 2 populations: " souches isolées " et " souches non isolées "	97
1.2.3. Identification des souches isolées.....	99
1.2.4. Un cas particulier: mise en évidence d'une infection mixte à <i>T. congolense</i> et <i>T. brucei</i> ssp.....	101
1.3. Résultats de l'étude clinique.....	102
1.3.1. Bilan sérologique et parasitologique à l'entrée.....	102
1.3.2. Bilan clinique à l'entrée.....	105
1.3.2.1. Date et mode d'apparition des symptômes.....	105
1.3.2.2. Bilan de l'examen clinique.....	106
1.3.3. Bilan des dosages biologiques.....	108
1.3.3.1. Altération de la barrière hémato-méningée (BHM).....	108
1.3.3.2. Atteinte du système nerveux central (SNC).....	109
1.4. Variabilité clinique de la THA et variabilité génétique de <i>T. brucei</i> ssp.....	111
1.4.1. Recherches de corrélations entre la variabilité clinique et la variabilité génétique observée.....	111
1.4.2. Comparaison clinique des populations de " souches isolées " et " non-isolées "	112
1.4.3. Caractérisation des souches isolées par RAPD/PCR.....	114
2. Résultats de la deuxième enquête : suivi sérologique, parasitologique et clinique de trypanosomés refusant le traitement.....	116
2.1. Description de la population d'étude.....	116
2.2. Devenir des 63 sujets entre leur date de dépistage et le début du suivi (06/97).....	116
2.3. Résultats sérologiques, parasitologiques et cliniques pour les sujets localisés dans la zone d'étude pendant les 3 ans de suivi.....	117
Sixième partie: Discussion.....	122
1. Isolement des souches.....	122

2. Identification des souches isolées	124
3. Etude clinique des sujets atteints de THA	127
4. Origine de la variabilité clinique: diversité génétique des trypanosomes ou susceptibilité individuelle à l'infection?	128
Conclusions et perspective.....	132
 Références bibliographiques	 134
Liste des annexes:	
ANNEXE 1. Dendrogramme résumant la taxonomie intraspécifique de <i>Trypanosoma brucei</i> ssp. (d'après Gibson et al., 1999)	156
ANNEXE 2. Foyers contemporains de THA en Côte d'Ivoire forestière.....	157
ANNEXE 3. Illustration du déroulement d'une prospection médicale.....	158
ANNEXE 4. Données générales relatives aux 139 sujets d'étude.....	162
ANNEXE 5. Prospection médicale à Aboisso (Juillet 1997), distribution des malades et des suspects	165
ANNEXE 6. Résultats de l'identification isoenzymatique des 64 souches isolées.....	166
ANNEXE 7. Résultats des tests sérologiques et parasitologiques et période de la maladie pour les 139 sujets d'étude.....	168
ANNEXE 8. Bilan clinique pour les 139 sujets d'étude.....	171
ANNEXE 9. Résultats des dosages biologiques effectués à l'IMT d'Anvers sur les serum et LCR des 139 sujets d'étude.....	174
ANNEXE 10. Résultats de l'identification de 50 souches de notre étude et de 7 souches de référence, par la technique des RAPD.....	177
ANNEXE 12. Article Truc <i>et al.</i>, 1998. <i>Trypanosoma brucei</i> ssp. and <i>T. congolense</i> : mixed human infection in Côte d'Ivoire	185
ANNEXE 13. Article Jamonneau <i>et al.</i>, sous presse. Exploration of the distribution of <i>Trypanosoma brucei</i> ssp. in West Africa, by multilocus enzymes electrophoresis	188
ANNEXE 14. Article Jamonneau <i>et al.</i>, sous presse. Clinical and biological evolution of Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire	196
ANNEXE 15. Liste des publications scientifiques de l'auteur.....	208

Introduction

La maladie du sommeil ou Trypanosomose Humaine Africaine (THA) est redevenue de nos jours un problème majeur de santé publique en Afrique Subsaharienne. Environ 60 millions de personnes sont exposées au risque de cette maladie. Le nombre actuel de personnes atteintes est estimé à 500 000 (OMS, 1998). L'agent pathogène est un trypanosome de l'espèce *Trypanosoma brucei*. Classiquement, cette espèce est subdivisée en 3 sous-espèces, *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) responsable de la forme chronique de THA en Afrique de l'Ouest et Centrale, *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*) agent de la forme aiguë de THA en Afrique de l'Est et *Trypanosoma brucei brucei* (*T. b. brucei*) parasite du bétail.

La THA évolue chez l'homme en deux phases: la première, lymphatico-sanguine (première période) durant laquelle le parasite se multiplie dans le sang et dans la lymphe, et la deuxième, méningo-encéphalitique (deuxième période) qui correspond au passage du parasite dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Au cours de la phase lymphatico-sanguine, le malade présente des signes cliniques non spécifiques tels que des accès de fièvre fréquents, des céphalées ou des signes cutanés (Jannin *et al.*, 1993; Dumas & Bouteille, 1996). La phase méningo-encéphalitique se caractérise habituellement par l'apparition de troubles neurologiques (troubles du comportement, de la conscience, de la motricité) et sans traitement, conduit à la mort du malade. Dans le cas de la forme chronique à *T. b. gambiense*, la première période peut durer plusieurs années, la parasitémie fluctuante reste faible et a tendance à décroître, les symptômes sont peu prononcés. L'apparition des troubles neurologiques lors de la deuxième période est souvent très progressive. Dans le cas de la forme aiguë à *T. b. rhodesiense*, la phase lymphatico-sanguine ne dure que quelques semaines à quelques mois, les symptômes sont plus marqués, l'atteinte du système nerveux est brutale et la mort peut survenir en quelques mois.

Concernant la forme gambienne, les tableaux cliniques sont en fait très divers. Des formes à caractère chronique très prononcé ainsi que des formes asymptomatiques ont été décrites, l'exemple le plus connu étant celui de Féo au Togo (Lapeyssonie, 1960), porteuse de trypanosomes (*T. b. gambiense*) pendant 21 ans sans atteinte neurologique (pas d'évolution en deuxième période). A l'inverse, des patients dépistés en Côte d'Ivoire ont présenté des tableaux cliniques plutôt caractéristiques d'une forme aiguë de la maladie (évolution rapide vers un état très altéré dès le passage en deuxième période, Truc *et al.* 1997a). L'origine de cette variabilité de présentations cliniques doit être recherchée à la fois chez le parasite (variabilité génétique) et l'hôte (susceptibilité individuelle à l'infection). L'existence de la variabilité génétique au sein de *T. brucei* spp. a été démontrée mais son influence sur les formes cliniques de la THA est imparfaitement connue. La susceptibilité individuelle à l'infection a été décrite pour de nombreuses maladies (infections bactériennes ou parasitaires) mais n'a jamais été démontrée

dans le domaine de la THA. Cependant, des arguments indirects permettent de suspecter son existence (concentration familiale de cas, existence de sujets asymptomatiques à long terme).

Dans cette étude, nous avons abordé ces deux aspects concernant l'origine de la diversité des formes cliniques de THA. Nous avons d'abord tenté d'étudier de façon précise les éventuelles corrélations entre la diversité génétique de *T. brucei* spp. et les manifestations cliniques chez l'homme. Ce travail a consisté d'une part en une étude clinique de la THA chez des patients dépistés en Côte d'Ivoire, et d'autre part en une étude génétique des trypanosomes responsables de ces infections. Des analyses sérologiques et immunologiques ont aussi été effectuées sur des échantillons de sérum et de LCR afin de compléter le bilan biologique. Ensuite, un suivi sérologique, parasitologique et clinique à long terme de trypanosomés refusant le traitement nous a permis de supposer l'existence d'une éventuelle susceptibilité individuelle à l'infection (Jamonneau *et al.*, sous presse, article en annexe 14).

Le plan suivi pour la présentation de ce travail est le suivant: dans la première partie, après un bref historique, nous décrivons la situation actuelle de la THA. La seconde partie sera consacrée à une présentation générale (état des connaissances) de la maladie et de l'agent pathogène. Nous développerons alors, dans la troisième partie, la problématique de cette étude. La quatrième partie détaillera les méthodes utilisées pour mener à bien nos recherches, et la cinquième partie exposera les résultats obtenus qui seront alors discutés dans la sixième et dernière partie de cette thèse.

Première partie: rappel historique

1. Les premières descriptions de la maladie

La maladie du sommeil semble être connue depuis plusieurs centaines d'années en Afrique et la première mention écrite d'un cas de THA remonte au 14^{ème} siècle (1375) quand l'historien Ibn Khaldoun rapporte la mort du sultan Maariy Djazaa, au Mali, aux environs du fleuve Niger, après une maladie se terminant dans un état de sommeil continu. Il faut attendre 1734 et l'ouvrage " The Navy Surgeon " de John Atkins pour trouver une description plus précise de l'affection que l'auteur nomme " sleeping distemper ". Par la suite et jusqu'au début du 19^{ème} siècle, la maladie est signalée dans diverses parties de l'Afrique de l'Ouest par des observateurs anglais, français et portugais. Winterbottom, en 1803, dans sa description du " lethargus " remarque l'importance de l'hypertrophie des ganglions du cou. Ce signe était non seulement connu des « négriers » qui refusaient d'acheter des esclaves porteurs d'adénopathies cervicales, mais aussi de plusieurs tribus africaines qui pratiquaient l'ablation systématique des ganglions cervicaux à des fins curatives. Dans le courant du 19^{ème} siècle, de nombreux cas sont signalés en Afrique de l'Ouest et Centrale, mais sans que l'on puisse quantifier l'importance de la maladie. Une première épidémie est alors décrite dans les années 1880-1890, notamment au Congo, en République Centrafricaine et en Ouganda. De nombreux villages sont décimés par la maladie (Martin *et al.*, 1909). Plusieurs milliers de morts du Sénégal au Zaïre sont aussi attribués à la " léthargie ". A ce moment, l'agent responsable de l'affection n'est toujours pas connu et beaucoup pensent que la maladie a une origine infectieuse et qu'elle est contagieuse. Les malades sont alors souvent exclus des villages pour éviter les contaminations.

2. Identification de l'agent pathogène

Pour Brault & Lapin (1898), " l'agent pathogène pourrait être un protozoaire sanguicole dans le genre du trypanosome ". Les trypanosomes étaient déjà connus puisque les premières descriptions remontent au début des années 1840 (Valentin, en 1841 le décrit chez la truite et Gruby, en 1843, l'observe chez la grenouille). En 1901, Forde voit des " vermicules mobiles " dans le sang d'un capitaine de bateau faisant du trafic fluvial depuis 6 ans en Gambie. Forde et Dutton identifient l'agent pathogène: c'est un trypanosome que Dutton décrit en 1902 sous le nom de *Trypanosoma gambiense* (découvert en Gambie). En 1903, Dutton et Todd retrouvent plusieurs fois le même trypanosome chez des Africains en Gambie (Dutton, 1903; Dutton & Todd, 1906), et la même année, Castellani trouve en Ouganda des

trypanosomes dans le LCR des malades atteints de THA. Il pense alors qu'il existe 2 espèces différentes de trypanosomes humains, l'une sanguicole, peu pathogène et l'autre se localisant dans les centres nerveux et responsable de la maladie du sommeil; il nomme cette dernière espèce: *Trypanosoma ugandense*. Mais toujours en 1903, Bruce et Nabarro constatent que les trypanosomes sanguicoles sont identiques à ceux du système nerveux et qu'ils constituent le premier stade de la maladie. Bruce confirme alors que *Trypanosoma gambiense* est l'agent étiologique de l'endémie sommeilleuse et fournit la preuve expérimentale que les glossines de l'espèce *Glossina palpalis* sont le vecteur de la maladie (Bruce *et al.*, 1909; 1911).

A partir de 1908, on rapporte d'Afrique de l'Est, des cas de maladie du sommeil remarquables par leur sévérité et leur courte durée. Stephens & Fantham (1910) étudient une souche isolée sur un des premiers cas reconnu de cette nouvelle forme de maladie et constatent qu'elle diffère de *T. gambiense* par sa grande virulence pour les animaux de laboratoire. Ils nomment ce nouvel agent pathogène *Trypanosoma rhodesiense* (découvert en Rhodésie). En 1912, Kinghorn et Yorke démontrent le rôle de *Glossina morsitans* dans la transmission de ce parasite.

3. Evolution de la maladie au cours du 20^{ème} siècle

Malgré ces importantes découvertes, la maladie du sommeil continue de sévir intensément en Afrique noire. Une épidémie est déclarée en Afrique de l'Ouest et Centrale au début des années 1920 et la situation devient dramatique dans les années 1924-1926, notamment au Cameroun où 45% des décès lui sont imputables. C'est en 1926, devant l'ampleur de la situation que le médecin militaire français Eugène Jamot (1879-1937) développe les premières équipes mobiles de dépistage et de traitement, qui vont sillonner toutes les zones touchées par l'épidémie entre 1926 et 1932 (Jamot, 1926; 1929; 1932). Ces campagnes d'éradication vont permettre de contenir l'affection et dans les années 1960, les enquêtes épidémiologiques menées dans la plupart des pays d'Afrique Noire ne décèlent plus que quelques rares cas de THA (figure 1). *La méthode proposée par Jamot pour combattre la maladie du sommeil reste le modèle de lutte contre une " grande endémie " en zone tropicale* (Gentilini, 1993).

Cependant, des années 1970 aux années 1990, la situation ne cesse de se dégrader faute de moyens humains et financiers mais aussi à cause de l'instabilité socio-politique qui touche alors plusieurs pays d'Afrique noire. La reprise de l'endémie se fait progressivement à partir de 1970 dans la plupart des foyers historiques. Certains pays réussissent à maintenir un contrôle sur la maladie mais de nombreux autres, ayant abandonné toute surveillance effective, doivent faire face à une situation redevenue épidémique et dramatique. C'est notamment le cas pour la République Démocratique du Congo (RDC, ex-Zaïre), l'Angola, l'Ouganda ou le Sud-Soudan (figure 2).

Figure 1. Evolution du nombre de cas de THA en Afrique Centrale de 1926 à 1995 (Source: OMS, 1996)

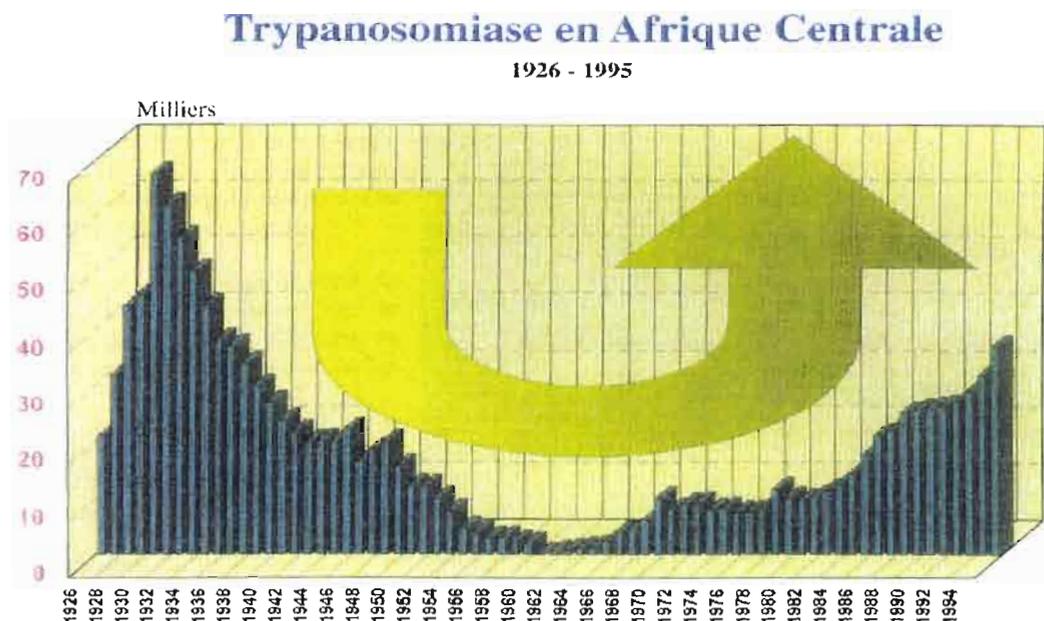


Figure 2. Situation actuelle de la THA : quelques chiffres

55 millions de personnes sont exposées au risque THA

300 000 à 500 000 sont actuellement infectées

25 000 cas sont rapportés annuellement

3 à 4 millions de personnes sont sous surveillance

Pays	Cas déclarés en 1995	Cas estimés en 1995
R. D. du Congo (ex-Zaire)	20000	250000
Angola	2478	100000
Ouganda	2000	5000
Soudan	?	5000
Congo	600	1500
Rép. Centrafricaine	537	1000
Tanzanie	500	1000
Tchad	311	800
Côte d'Ivoire	400	700
Cameroun	50	500
Guinée	50	500
Burkina-Faso	30	300
Gabon	80	200
Mali	5	150
Guinée Equatoriale	30	100
Bénin	5	100
Togo	3	100
Malawi	19	50
Ghana, Libéria, Kenya, Mozambique, Nigeria, Rwanda, Sierra-Leone, Guinée Bissau	?	?

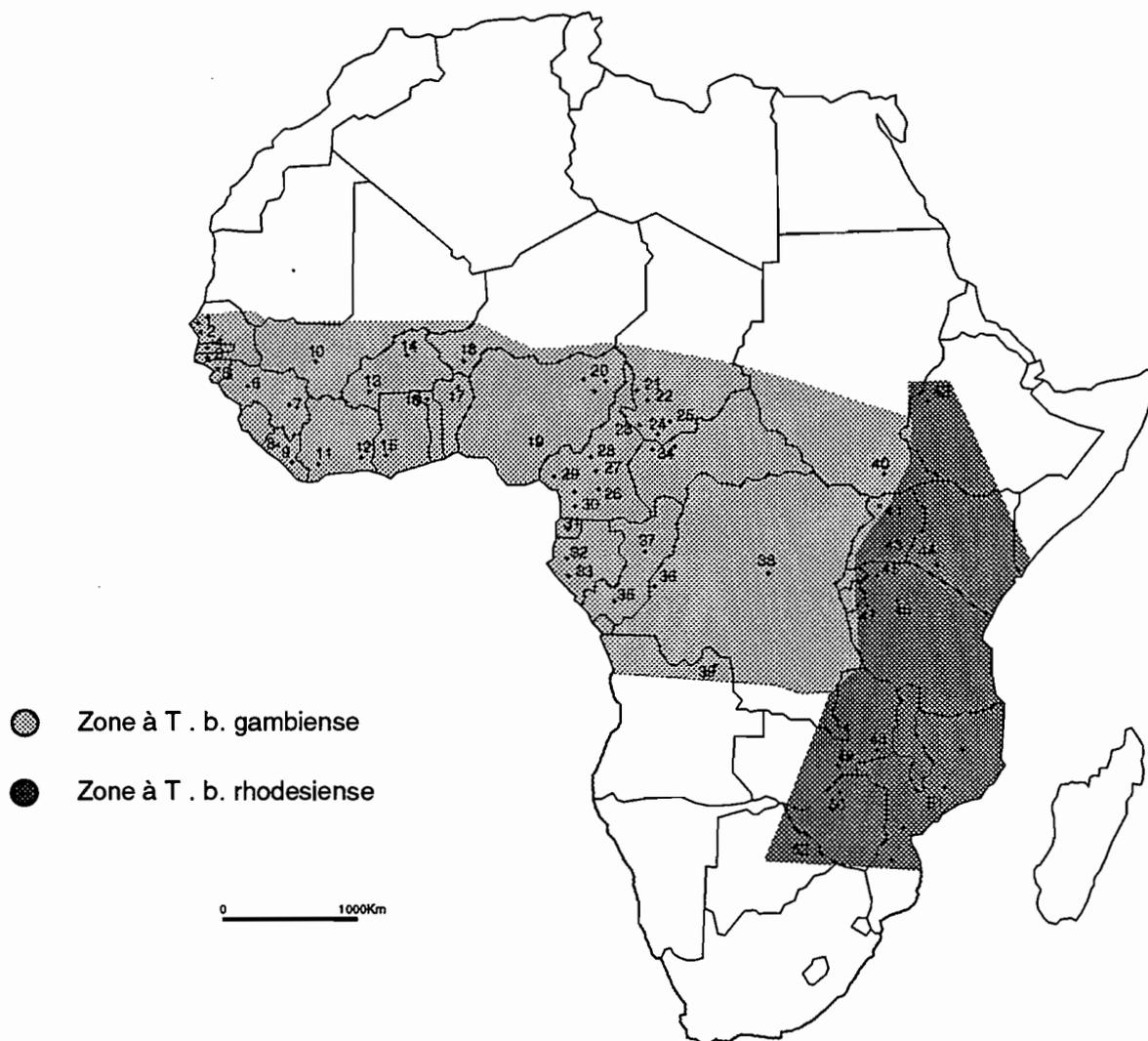
Nombre de cas déclarés et estimés en 1995 dans les pays concernés (source : OMS, 1996)

4. Situation actuelle de la THA

Actuellement, on estime que 60 millions de personnes sont exposées au risque de contracter la Trypanosomose, parmi lesquels moins de 4 millions sont sous surveillance régulière (OMS, 1998). Environ 25 000 cas sont rapportés annuellement mais ce nombre ne reflète sûrement pas la réalité du fait de l'absence ou l'insuffisance de dépistage dans de nombreux foyers. Le nombre réel de personnes actuellement infectées est estimé entre 300 000 et 500 000 par l'OMS. *On peut considérer que la situation épidémiologique réelle de la maladie est aujourd'hui comparable à celle qui prévalait entre 1925 et 1930* (OMS, 1996).

La maladie du sommeil ne se rencontre qu'en Afrique subsaharienne du 14^{ème} degré de latitude nord au 29^{ème} degré de latitude sud, dans les limites de la distribution géographique des glossines (OMS, 1998). Parmi les 36 pays de cette zone, 30 sont touchés par l'endémie sommeilleuse (voir carte répartition) mais de façon très hétérogène. Les foyers d'un pays sont généralement dispersés (figure 3) et le niveau d'endémicité peut varier considérablement d'un foyer à l'autre, et même au sein d'un foyer, d'une zone à l'autre. On distingue les foyers résiduels où le nombre de cas reste faible et constant pendant une longue période (situation endémique) et les foyers en activité où le nombre de cas augmente considérablement (situation épidémique). De nombreux foyers sont actuellement très actifs en Afrique de l'Est (Hide, 1999) et en Afrique Centrale (Smith & Bailey, 1997) où la situation est dramatique comme en RDC, en Angola, en Ouganda et au Soudan (figure 2). En Afrique de l'Ouest, la situation est moins sévère qu'en Afrique Centrale. Si de nombreux foyers historiques semblent actuellement « éteints » (Sénégal, Togo, Burkina-Faso), quelques cas ont été rapportés très récemment par les Programmes Nationaux de Lutte contre la THA du Bénin (13 cas dans le département de l'Atacora) et du Mali (17 cas à Kénieba) (données non-publiées). Deux pays sont certainement plus atteints: la Guinée et la Côte d'Ivoire. En Guinée, des récentes prospections médicales ont permis de dépister 115 malades sur 15517 personnes visitées entre 1997 et 1998 dans la préfecture de Dubreka. En 1999, 70 autres malades ont été dépistés passivement dans la même zone. L'histoire et la situation actuelle de la THA en Côte d'Ivoire sont abordées dans la partie Matériel et Méthodes (§ 1.1). La situation sur le continent, décrite par l'OMS en 1996 est représentée sur la figure 4.

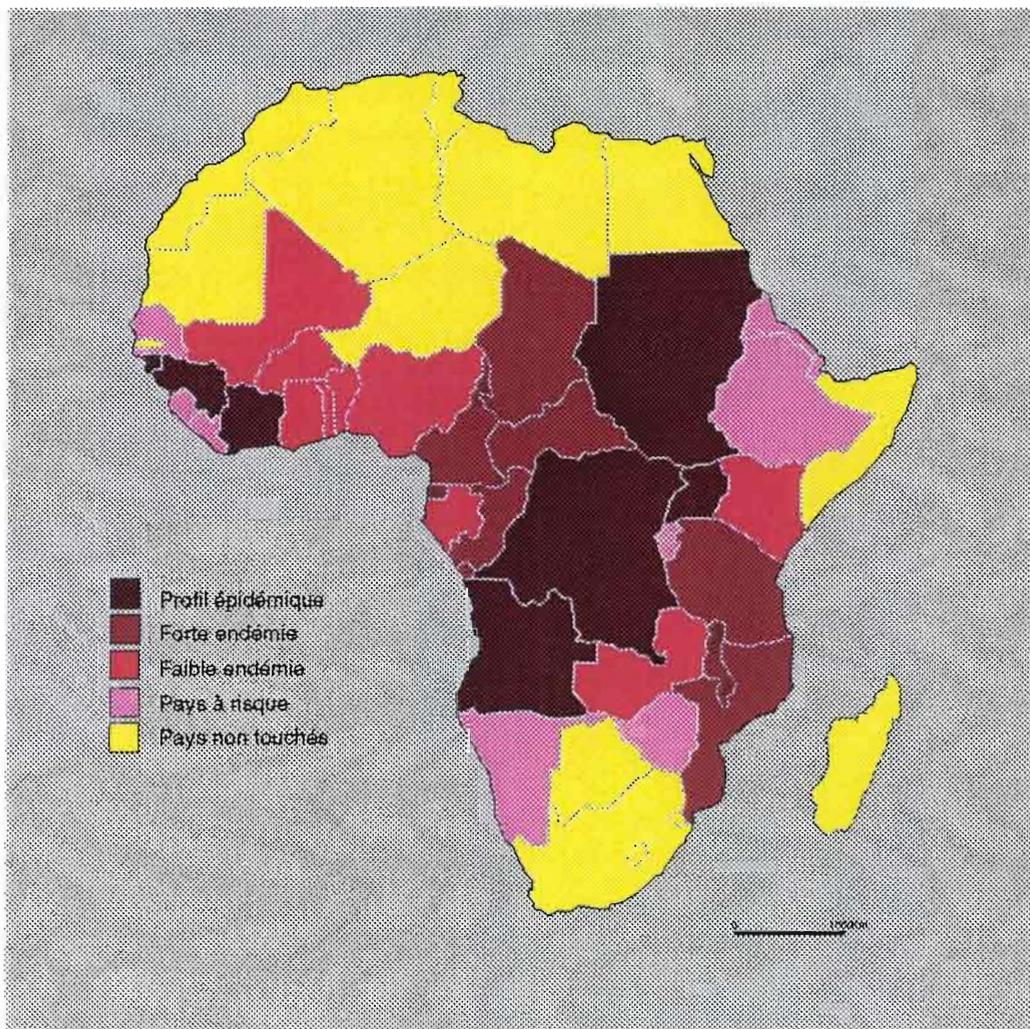
Figure 3. Répartition géographique des foyers de Trypanosomiase Humaine Africaine en activité ou éteints (source: Médecine tropicale, Gentilini, 1993)



Exemples*: 11. Foyer de Daloa-Bouaflé (Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire)
 12. Foyer d'Abengourou-Aboisso (Est de la Côte d'Ivoire)

* La liste complète des foyers peut être consultée: Médecine tropicale (Gentilini, 1993), p. 126. Ne sont cités sur ce document, que les foyers mentionnés dans ce travail.

Figure 4. Répartition géographique de la Trypanosomiase Humaine Africaine en fonction du niveau d'endémie (source: Rapport annuel OMS, 1996)



On distingue:

- les pays où la maladie prend un profil épidémique en raison d'une très forte prévalence cumulée et d'une forte transmission: ANGOLA, REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO, OUGANDA, SOUDAN;
- les pays de forte endémie, où la prévalence est moyenne, mais en augmentation: CAMEROUN, CONGO, CÔTE D'IVOIRE, CENTRAFRIQUE, GUINEE, MOZAMBIQUE, TANZANIE, TCHAD;
- les pays de faible endémie: BENIN, BURKINA-FASSO, GABON, GHANA, GUINÉE EQUATORIALE, KENYA, MALI, NIGIERA, TOGO, ZAMBIE;
- les pays dont le statut actuel est très mal connu: BURUNDI, BOSTWANA, ETHIOPIE, LIBERIA, NAMIBIE, RWANDA, SENEGAL, SIERRA-LEONNE.

Cette première partie vient de nous faire part des étapes importantes de l'histoire de la THA, des premières descriptions aux épidémies du 20^{ème} siècle. Même si les données récentes ne permettent pas d'établir un bilan précis de la situation actuelle de la maladie, elles montrent incontestablement une forte reprise de son activité ces 20 dernières années qui font de cette endémie l'une des priorités de l'OMS en Afrique en ce début de deuxième millénaire.

La prochaine partie fera le point sur les connaissances actuelles en matière de THA. Nous décrirons d'abord l'agent pathogène, le trypanosome: nous détaillerons la taxonomie, la morphologie, le cycle évolutif, l'organisation du génome et la reproduction de ce parasite. Une attention particulière sera portée sur l'une de ses caractéristiques biologiques, la variation antigénique. Nous ferons ensuite un bilan des connaissances de la maladie en détaillant les aspects suivants: clinique, diagnostic et traitement, pathogénie et immunologie.

Deuxième partie: Etat des connaissances

1. L'agent pathogène: *Trypanosoma brucei* ssp.

1. 1. Taxonomie

D'après la classification classique d'Hoare (1972) revue par Lévine *et al.* (1980) et Anez (1982) présentée en figure 5, l'agent pathogène est un Protozoaire du phylum *Sarcomastigophora* Hönigberg et Balamuth, 1963, de la classe *Zoomastigophorea* Calkins, 1909, de l'ordre *Kinetoplastida* Hönigberg, 1963, de la famille *Trypanosomatidae* Döfllein, 1991, du genre *Trypanosoma* Gruby, 1843. On distingue au sein du genre *Trypanosoma* (Hoare, 1972), deux sections selon les modalités de développement du trypanosome chez l'insecte vecteur: la section des *Stercoraria* et celle des *Salivaria* regroupant elles-mêmes plusieurs sous-genres.

La section des *Stercoraria* se caractérise par un cycle de développement du parasite se déroulant entièrement dans le tractus digestif de l'insecte vecteur et s'achevant dans l'intestin postérieur. Les formes infectantes sont alors transmises par les fécès du vecteur et pénètrent de façon active à travers la peau de l'hôte. On parle de cycle de développement à transmission postérograde. Cette section comprend 3 sous-genres, celui des *Schizotrypanum* (*Trypanosoma cruzi*, agent de la Maladie de Chagas), celui des *Herpetosoma* et celui des *Megatrypanum*.

La section des *Salivaria* se caractérise par un cycle de développement se déroulant dans l'intestin et/ou dans la région buccale du vecteur (insecte hématophage) et s'achevant dans les pièces buccales ou les glandes salivaires. La transmission se fait par inoculation des formes infectantes lors de la piqûre de l'insecte (transmission passive), on parle alors de cycle de développement à transmission antérograde. Cette section regroupe 5 sous-genres: *Tejeraia*, *Duttonella* (*Trypanosoma vivax*), *Nannomonas* (*Trypanosoma congolense*), *Pycnomonas* et *Trypanozoon*.

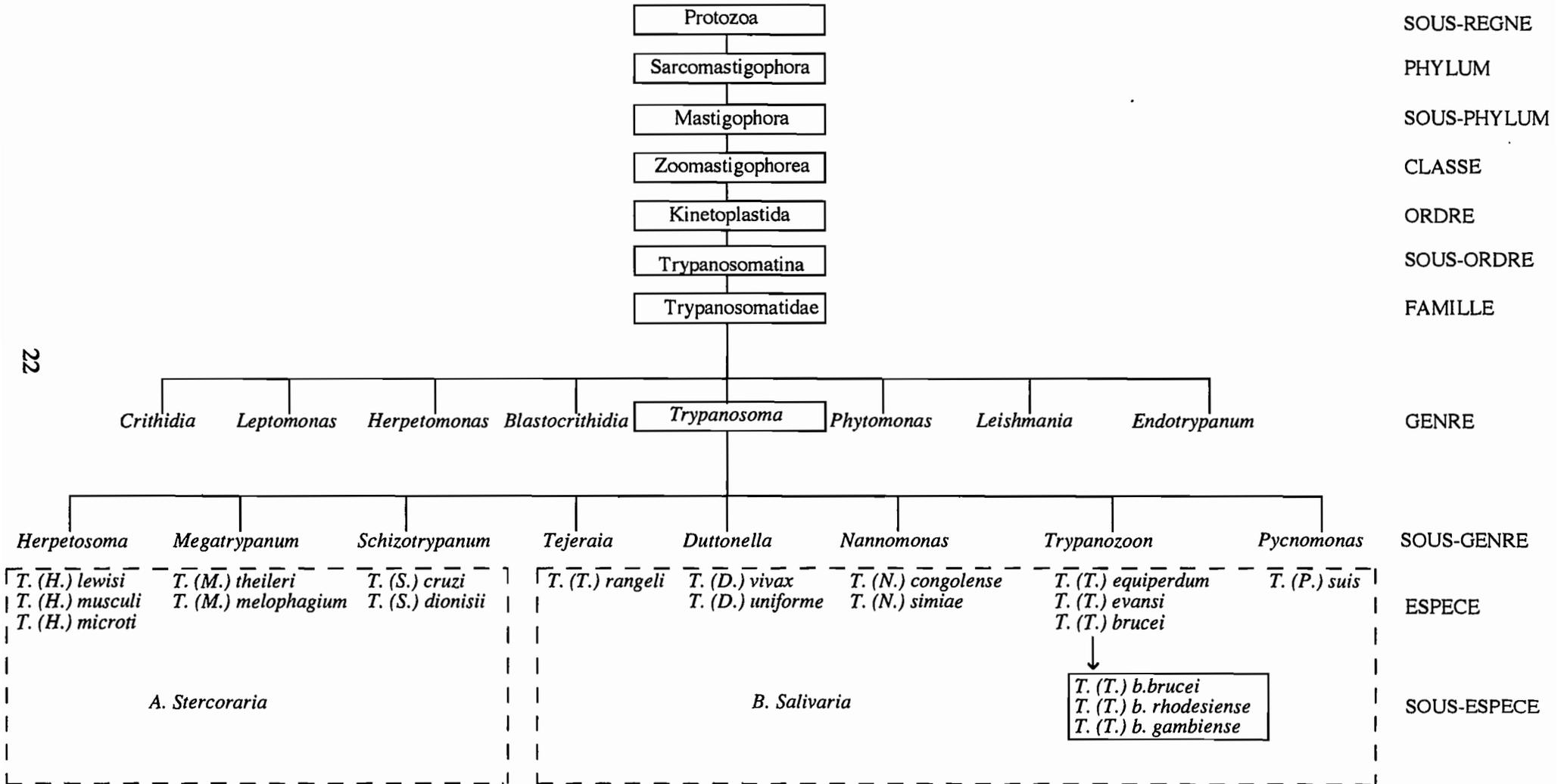
Le sous-genre *Trypanozoon* Lühe 1906 regroupe 3 espèces : *Trypanosoma brucei* s.l. Dutton, 1902, *Trypanosoma evansi* Balbiani, 1888, parasite d'équidés (agent du surra) et de camélidés (agent du débab) d'Afrique du Nord, d'Asie et d'Amérique latine, et *Trypanosoma equiperdum* Döfllein, 1901, responsable de la dourine des équidés d'Afrique du Nord, d'Asie et d'Europe. *Trypanosoma evansi* et *Trypanosoma equiperdum* ont longtemps été considérés comme des sous-espèces de *Trypanosoma brucei* s.l. parce qu'ils ne sont pas distinguables morphologiquement (Hoare, 1972). Plus récemment, une étude basée sur l'identification des isoenzymes de souches de *Trypanosoma evansi* et de *Trypanosoma brucei* s.l. n'a pas permis d'individualiser les deux entités, certains stocks de *Trypanosoma brucei* s.l. étant très proches

génétiquement de ceux de *Trypanosoma evansi* (Mathieu-Daudé, 1991). Cependant, *Trypanosoma evansi* et *Trypanosoma equiperdum* gardent leur statut spécifique de par leurs particularités épidémiologiques. *T. evansi* est transmis mécaniquement par des Tabanidae alors que *T. equiperdum* est transmis par voie sexuelle. Il est possible que *T. evansi* soit un variant de *T. brucei* qui après exportation hors des zones à glossines se serait adapté à son nouveau milieu en changeant son mode de transmission.

Trypanosoma brucei ssp. se subdivise classiquement en trois sous-espèces (Hoare, 1972): *Trypanosoma brucei gambiense* Dutton, 1902 et *Trypanosoma brucei rhodesiense* Stephens & Fantham, 1910, parasites de l'homme, agents responsables des THA, et *Trypanosoma brucei brucei* Plimmer & Bradford, 1899, parasite de mammifères en Afrique (agent de la nagana).

Figure 5. Classification des trypanosomes de mammifères

(d'après Hoare 1972, Levine et al. 1980, Anez, 1982). Source : O.M.S. (1986)



1. 2. Morphologie et cycle évolutif

Les trypanosomes sont des cellules fusiformes, leur taille varie selon l'espèce. *T. brucei* ssp. mesure de 12 à 42 μm de long sur 2 à 3 μm de large (Photo 1). Il se multiplie essentiellement par division binaire longitudinale.

En microscopie optique, outre les constituants fondamentaux de la cellule (noyau, cytoplasme et membrane), les trypanosomes se caractérisent par la présence d'un kinétoplaste (organite cytoplasmique) et d'un flagelle rattaché à la paroi du corps par une membrane ondulante (figure 6):

- le kinétoplaste est situé dans la partie postérieure de la cellule, près du corps basal du flagelle, à l'intérieur de la grande mitochondrie qui s'étend sur toute la longueur du corps cellulaire, il contient de l'ADN extra nucléaire (l'ADN kinétoplastique, voir § 1.5.).
- le flagelle, dirigé vers l'avant, est formé d'un axonème (avec 9 paires de microtubules périphériques entourant 2 microtubules centraux) et d'un bâtonnet paraxial, formé d'un réseau de filaments. Il naît d'un corps basal situé à l'intérieur de la poche flagellaire et assure la mobilité du trypanosome. Le niveau de développement du flagelle permet de distinguer les différents stades morphologiques du parasite au cours de son cycle évolutif (figure 7).

Photo 1. Trypomastigotes formes grèles (*Trypanosoma brucei*) dans le sang d 'un hôte mammifère (photo, J.L. Frezil, IRD)

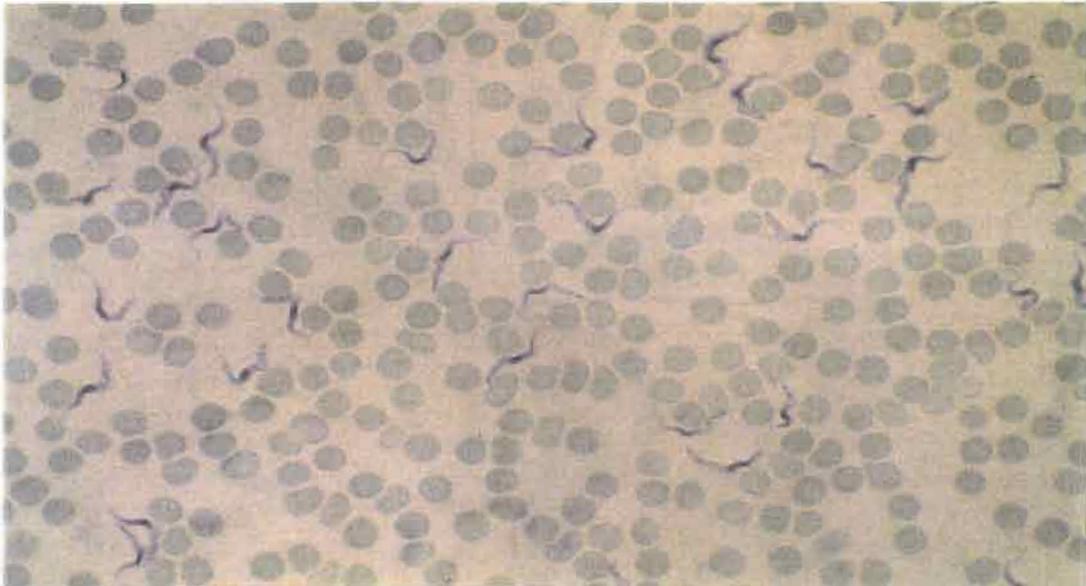
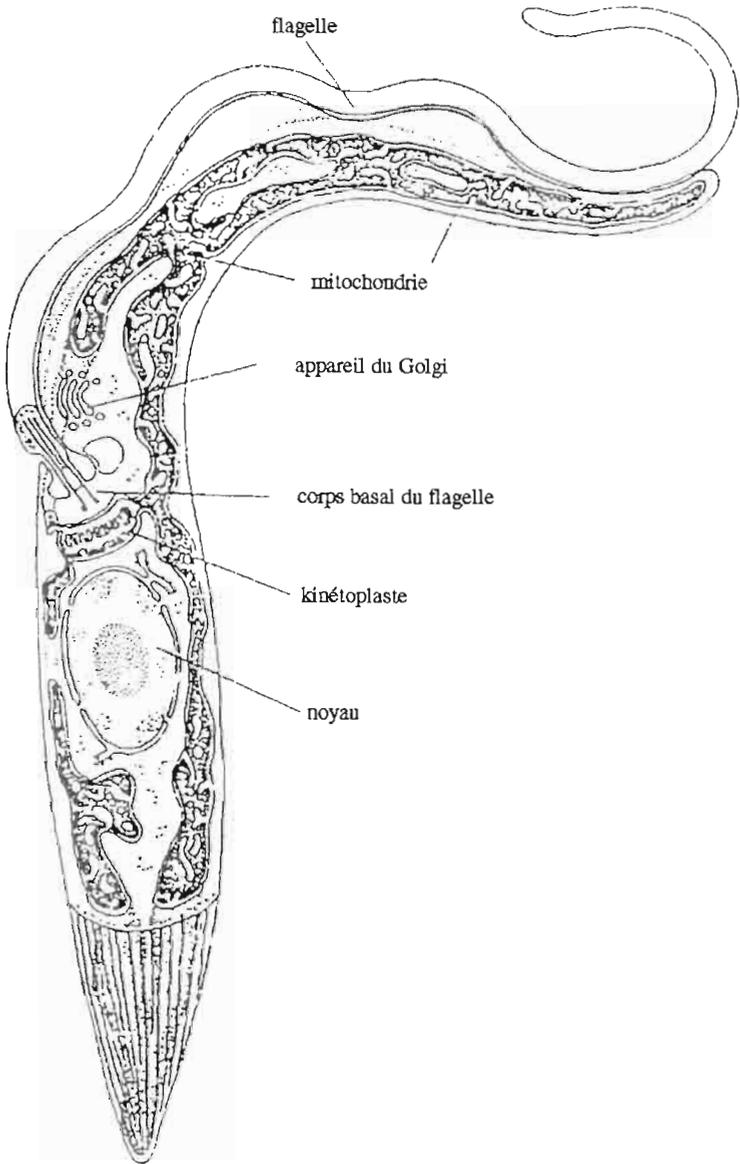


Figure 6. Ultrastructure d'une forme épimastigote de *Trypanosoma rhodesiense* (microscopie électronique, Vickerman, 1969)



Le cycle de vie de *T. brucei* ssp., parasite digène obligatoire, s'effectue chez un hôte définitif, un mammifère vertébré, et chez un hôte intermédiaire (hôte vecteur), un insecte hématophage du genre *Glossina*. Comme tous les trypanosomes du sous-genre *Trypanozoon*, *T. brucei* ssp. est caractérisé par un polymorphisme accusé selon les stades de développement. Chez l'hôte vertébré, le trypanosome se présente sous une forme dite trypomastigote sanguicole que l'on retrouve sous 3 formes distinctes dans les différents liquides biologiques (Hoare, 1972):

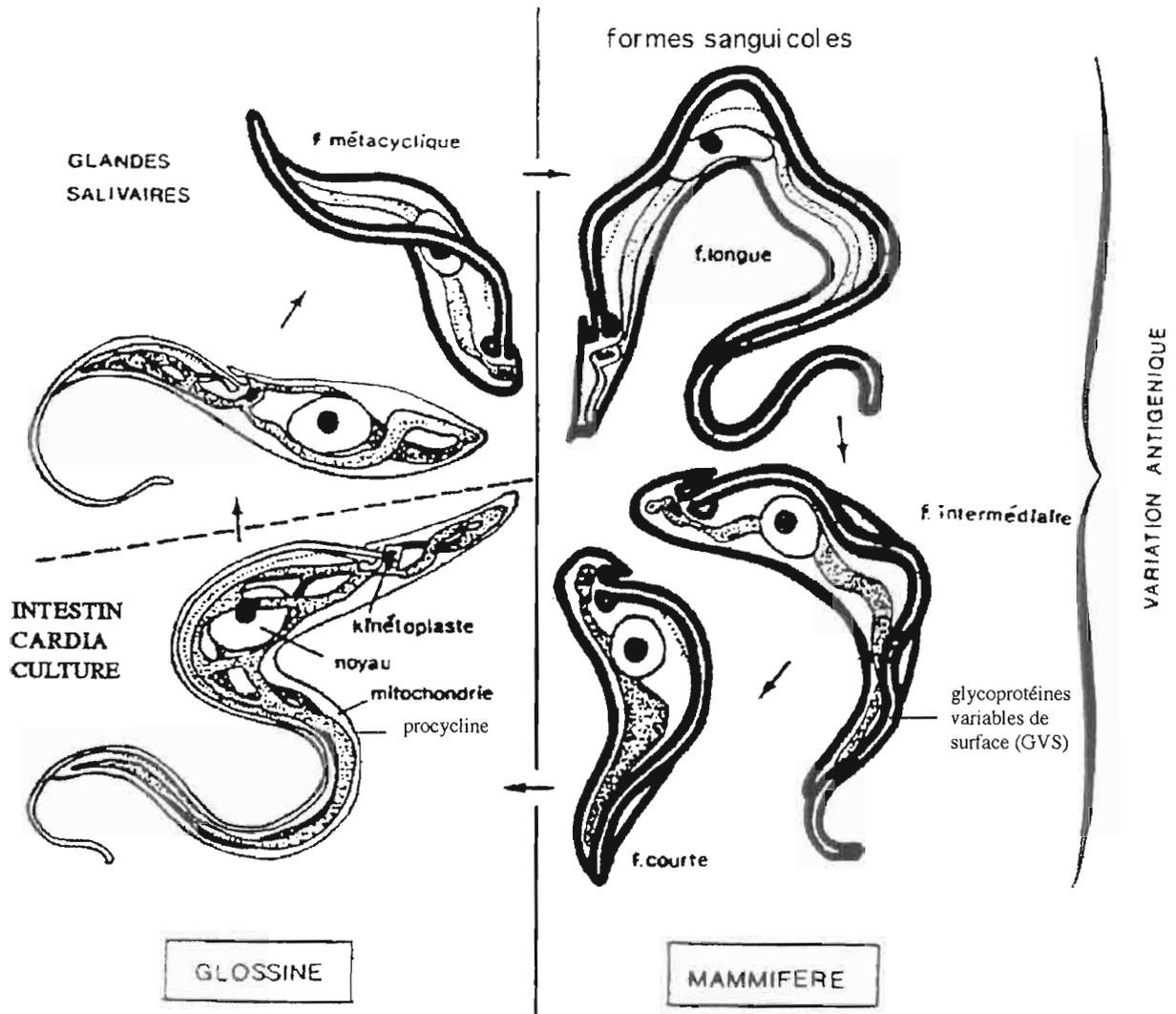
- une forme grêle (forme longue, type " slender "), à l'extrémité postérieure très allongée (Photo 1). Elle est pourvue d'une membrane ondulante bien développée se terminant par un long flagelle libre. Cette forme se multiplie très activement et permet l'envahissement des tissus de l'hôte.
- une forme trapue (forme courte, type " stumpy "), à l'extrémité postérieure arrondie. Elle est dépourvue de flagelle libre et ne se multiplie pas. C'est la seule forme capable de se développer chez la glossine après contamination lors d'un repas sanguin pris sur le mammifère. C'est la forme infestante pour le vecteur. Cette forme trapue peut donner naissance à une forme dite nucléopostérieure (le noyau se déplace vers l'extrémité postérieure de la cellule).
- une forme intermédiaire, qui se situe entre les 2 types morphologiques précédents marquant les passages successifs d'une forme à l'autre. Elle possède un court flagelle libre.

Chez le mammifère, après inoculation de formes trypomastigotes infestantes lors d'un repas sanguin de la glossine, les parasites se localisent pendant les premiers jours au niveau de la piqûre infestante. Ils se transforment progressivement en formes grêles et commencent à se multiplier. Ils envahissent alors le courant sanguin et le système lymphatique où ils se multiplient très activement. On observe ensuite une fluctuation importante de la parasitémie avec alternance des différentes formes décrites ci-dessus. Ce phénomène est directement lié aux processus immunitaires mis en place par l'hôte et à la propriété qu'ont les trypanosomes d'échapper à cette réaction immunitaire (voir § 1.7.). La période lymphatico-sanguine peut durer de plusieurs mois à plusieurs années. Ensuite, les trypanosomes envahissent le LCR (par des mécanismes encore méconnus) où ils se présentent sous la forme grêle. La parasitémie dans le LCR reste faible et à peu près stable.

La glossine se contamine lors de la prise d'un repas de sang. Les parasites absorbés suivent le même trajet que le sang: œsophage, jabot puis intestin à l'intérieur de la membrane péritrophique (espace endopéritrophique) (Roubaud, 1909; Bruce *et al.*, 1911). Les formes trapues se transforment en formes dites trypomastigotes procycliques qui se multiplient de façon très active dans l'intestin moyen du vecteur. Ces formes procycliques migrent alors vers l'extrémité postérieure de l'intestin pour contourner la membrane péritrophique et se retrouver dans l'espace ectopéritrophique. Apparaissent alors les formes dites épimastigotes chez

lesquelles le corps basal du flagelle a migré en avant du noyau. Ces formes épimastigotes vont alors migrer vers l'extrémité antérieure de l'intestin où ils traversent activement la membrane péritrophique au niveau du ventricule pour atteindre l'hypopharynx et enfin les glandes salivaires. Elles se fixent alors aux parois des glandes salivaires et se multiplient rapidement pour donner des formes dites trypanomastigotes métacycliques. Cette dernière forme est infectante (on parle de forme métacyclique infectante) pour l'hôte mammifère, elle est transmise avec la salive de l'insecte vecteur lors d'un nouveau repas sanguin.

Figure 7. Cycle évolutif de *Trypanosoma brucei* (Vickerman, 1969)



1. 3. Organisation du génome

L'ADN de *T. brucei* ssp. est en grande partie situé dans le noyau cellulaire (96%). Les 4% restant sont situés dans le kinétoplaste (Borst *et al.*, 1982).

1. 3. 1. L'ADN nucléaire

La ploïdie de *T. brucei* ssp. est longtemps restée inconnue. Les premiers profils isoenzymatiques obtenus ont fait état de stocks hétérozygotes pour des enzymes monomériques et dimériques (Tait, 1980). L'hypothèse de la diploïdie a été confirmée ultérieurement (Borst *et al.*, 1982; Gibson *et al.*, 1985a; Gibson, 1989; Kooy *et al.*, 1989).

La structure du génome des trypanosomes est particulièrement complexe et n'est toujours pas précisément connue. Les études de caryotypes ont montré que ce génome serait constitué:

- d'une vingtaine de " grands chromosomes ", leur taille varie selon les auteurs (plus de 2000 kb pour Vickerman (1989) et plus de 200 kb pour Hajduk *et al.* (1992));
- d'une centaine de minichromosomes (de 50 à 150 kb pour Vickerman (1989), de 50 à 100 pour Hajduk *et al.* (1992)).

Plusieurs auteurs décrivent aussi des chromosomes intermédiaires (de 150 à 700 kb pour Gibson & Borst (1986) et de 200 à 700 kb d'après Vickerman (1989)). Le nombre et la taille de ces chromosomes intermédiaires est très variable d'un stock à l'autre (Gibson & Borst, 1986). Plus récemment, El Sayed *et al.* (2000) ont obtenu des résultats très similaires quant à la constitution du génome (au moins 11 paires de méga-chromosomes de 1000 kb à plus de 6000 kb, plusieurs chromosomes intermédiaires de 200 à 900 et une centaine de minichromosomes de 50 à 150 kb), mais il semble que la ploïdie des chromosomes intermédiaires soit incertaine.

Environ la moitié de l'ADN des trypanosomes comporte des séquences codantes, dont la majorité concerne l'expression des GVS nécessaire à la variation antigénique (Dero *et al.*, 1987) mentionnée dans le paragraphe 1.5..

1. 3. 2. L'ADN kinétoplastique

Il est constitué d'un grand nombre de molécules d'ADN circulaires et enchaînés (plusieurs milliers). Selon la taille de ces molécules, on distingue les maxicercles (23 kb) et les minicercles (environ 1 kb). Les maxicercles sont impliqués dans la transcription des ARN ribosomiaux, ils présentent une certaine homogénéité de par leur nombre dans chaque cellule (50) et de par leur séquence nucléotidique. Cette homogénéité lui a valu d'être utilisé pour la recherche de marqueurs phylogéniques (Gibson *et al.*, 1985b; Truc, 1991). Ces ADN maxicercles, absents chez *T. evansi* (non-transmis par les glossines), pourraient jouer un rôle particulier lors du passage du parasite chez le vecteur (Lun & Desser, 1995). A la différence de ces derniers, les ADN minicercles sont très variables (plusieurs centaines de séquences différentes dans chaque cellule) et seraient impliqués dans l'édition de certains ARN.

1. 4. Reproduction de *T. brucei* ssp.

Jusqu'en 1980, on considérait que le trypanosome, asexué, ne se reproduisait que par division binaire longitudinale. Cette multiplication était fréquemment observée en microscopie. Cependant, depuis la découverte de la diploïdie, plusieurs auteurs se sont interrogés sur une éventuelle reproduction sexuée des trypanosomes. Des échanges génétiques ont été mis en évidence au cours du cycle chez le vecteur par des expériences de croisement en laboratoire (Jenni *et al.*, 1986; Sternberg *et al.*, 1988; Gibson, 1989; Degen *et al.*, 1995; Tait *et al.*, 1996). Ces échanges, non-obligatoires, auraient lieu dans l'intestin postérieur (Schweizer & Jenni, 1991) et dans les glandes salivaires de la glossine (Gibson & Whittington, 1993). Il fallait alors déterminer l'importance de ce phénomène dans les populations naturelles.

Tait (1983) propose un modèle panmictique (ségrégation allélique mendélienne et équilibre d'Hardy-Weinberg respecté). Par contre, Cibulskis (1988) observe un déséquilibre de liaison entre certains loci ainsi que l'absence ou la déficience de certains génotypes dans les populations naturelles de *T. brucei* ssp.. Il évoque ainsi la présence d'un processus de multiplication asexuée au sein de ces populations. Dans le cadre de la théorie de la clonalité des protozoaires parasites, Tibayrenc *et al.* (1990) et Tibayrenc & Ayala (1991) proposent un modèle de reproduction essentiellement clonal. Les différents variants génétiques observés (zymodèmes dans le cas d'une identification isoenzymatique, schizodèmes dans le cas d'une identification par les RFLP) sont alors considérés comme des clones naturels stables dans l'espace et dans le temps. La diversité génétique observée est alors attribuée à des échanges génétiques rares dans les cycles naturels, mais insuffisants pour " brouiller le tableau " d'une structure clonale (Mathieu-Daudé, 1991; Mathieu-Daudé *et al.*, 1995; Gibson, 1995; Hide *et al.*, 1996).

1.5. Caractéristiques biologiques de *T. brucei* ssp.: Polymorphisme et variation antigénique, description et principe

Les parasites extra-cellulaires (intra-vasculaires) effectuent la majeure partie de leur développement en étant exposés aux défenses de l'hôte et développent des mécanismes d'échappement sophistiqués. Chez l'homme, le trypanosome est doté d'un moyen très efficace pour échapper à la réponse immunitaire: il possède la propriété de changer sa couverture antigénique. Sous sa forme sanguine, il est recouvert d'une enveloppe de Glycoprotéine Variable de Surface (GVS), qui comprend 10^7 molécules avec une épaisseur de 15 nm et apparaît au stade métacyclique infestant dans les glandes salivaires de la glossine vectrice. Quand le trypanosome est inoculé à un hôte vertébré, il se transforme rapidement en forme grêle et se multiplie très activement. Une réaction immunitaire à médiation humorale se met en place en 4 à 5 jours pour combattre cette première agression (figure 8). Une grande partie des trypanosomes est alors détruite, mais certains d'entre eux survivent grâce à un changement d'enveloppe de GVS sous une forme trapue (qui ne se multiplie plus) avant de se retransformer en forme grêle de division et recommencer ce processus (Donelson & Turner, 1985). Il y aurait plus de 1000 couvertures antigéniques possibles. On parle de "Variant Antigen Type" (VAT) pour une population de trypanosomes recouvert de la même GVS.

Chez le vecteur, les formes trapues ingérées perdent leur manteau de GVS au cours de l'évolution en forme procyclique, qui est remplacé par une enveloppe de procycline ou "Procyclic Acidic Repetitive Protein" (PARP) (Mowatt & Clayton, 1988; Roditi *et al.*, 1989) dont le rôle est encore inconnu. Cette enveloppe, comme la précédente, est solidaire de la membrane plasmique par l'intermédiaire de Glycosyl Phosphatidylinositol.

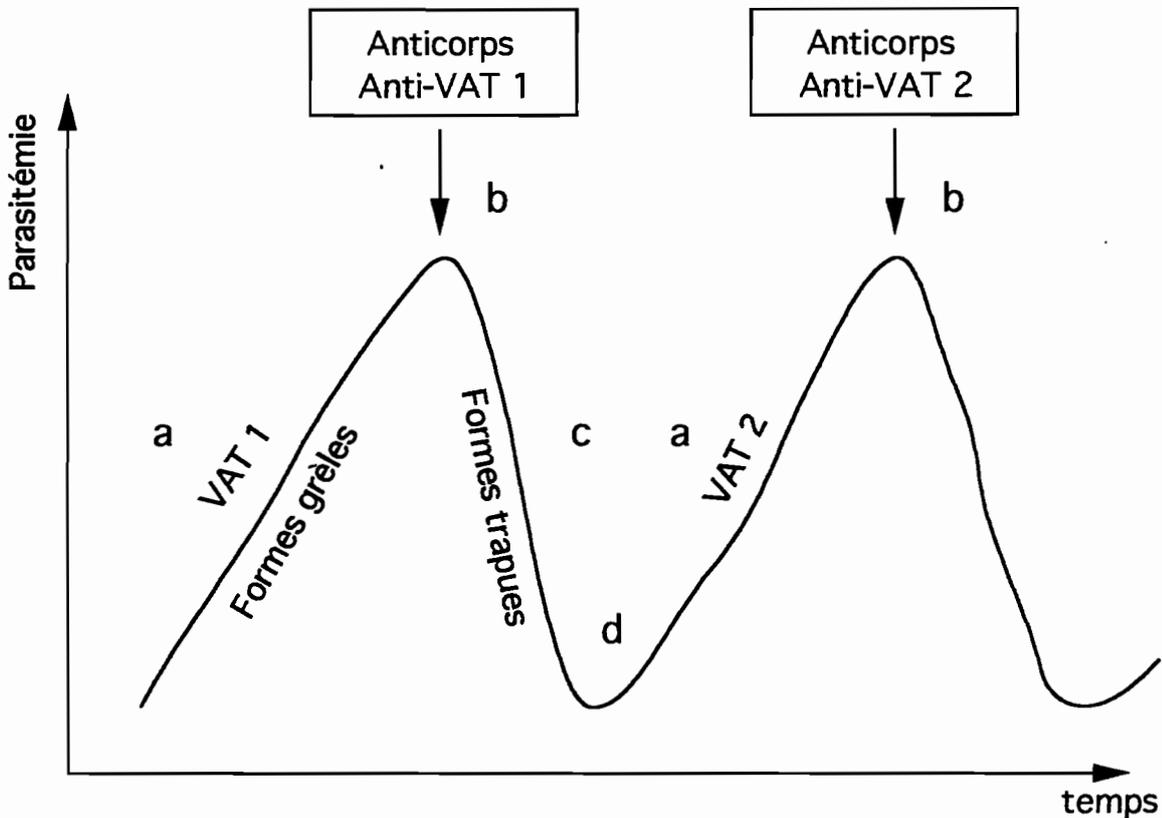
Ainsi, les gènes GVS ne s'expriment plus pendant le passage du parasite chez la glossine et cette expression ne reprend chez l'hôte vertébré qu'au stade métacyclique infestant. D'après Hajduk & Vickerman (1981) et Pays (1989), le premier gène GVS à s'exprimer est le même qui s'exprimait au moment de l'ingestion par l'insecte, comme s'il était resté sur le même site d'expression, mais tout en restant muet sous l'action de facteurs et de mécanismes à ce jour inconnus, de même que sont inconnus aussi les facteurs qui, à ce stade, permettent la reprise de l'expression. Les trypanosomes inoculés par la glossine sont recouverts d'une première enveloppe de GVS, on parle de premier VAT ou VAT1 à l'origine du premier pic de parasitémie. La répétition de ce phénomène est alors responsable d'une succession de pics à intervalles de temps réguliers (4-5 jours).

D'après Vickerman (1989), un pic de parasitémie est caractérisé par le surnombre d'un VAT majeur dit homotype. Pendant que la réaction à médiation humorale se met en place, un changement de GVS est à l'origine de populations minoritaires ou hétérotypes, mises en évidence par réaction d'immunofluorescence (Van Merveinne *et al.*, 1975). Le sacrifice de

l'homotype permet alors une forte croissance de l'un des hétérotypes qui pourra se multiplier à son tour sans pression immune et être à l'origine d'un second pic de parasitémie. Ce nouvel homotype sera sacrifié aux dépens de nouveaux hétérotypes et ainsi de suite. Les facteurs qui déterminent le type de l'homotype ainsi que les facteurs qui favorisent la croissance d'un hétérotype aux dépens des autres sont toujours méconnus. Cependant, il a été montré qu'à un pic de parasitémie, ne correspond qu'un seul et unique homotype (Seed, 1978).

Quoi qu'il en soit, ce mécanisme de la variation antigénique perturbe l'homéostasie de l'hôte et freine l'acquisition d'une véritable immunité protectrice. Cette variabilité et ce phénomène d'échappement représentent des obstacles importants dans la mise au point d'un vaccin. Par contre, la connaissance détaillée des mécanismes de synthèse des GVS permettra peut-être d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques qui pourront être atteintes par des molécules actives.

Figure 8. Evolution de la parasitémie dans le sang de l'hôte en fonction du temps (représentation schématique)



Les trypanosomes inoculés, revêtant tous la même couverture antigénique (VAT 1) se transforment rapidement en formes grèles et se multiplient activement dans le système lymphatico-sanguin de l'hôte pour former une population VAT 1 (a). Une réaction immunitaire à médiation humorale (fabrication d'anticorps anti-VAT 1) combat rapidement cette première invasion (b). La plupart des trypanosomes sont détruits (c). Les survivants évoluent en formes trapue, sous laquelle ils peuvent changer leur couverture antigénique pour former une nouvelle population VAT-2 (d). Les trypanosomes reprennent leur formes grèles de division et sont à l'origine d'un deuxième pic de parasitémie responsable d'une nouvelle réaction immunitaire (fabrication d'anticorps anti-VAT 2).

L'ensemble des éléments que nous venons brièvement de décrire, et particulièrement la variation antigénique, ont des conséquences importantes à la fois sur la présentation clinique de la maladie et sur la mise au point et la fiabilité des outils de diagnostic. Dans le chapitre suivant nous aborderons successivement l'aspect clinique de la maladie et les modifications immunologiques rencontrées lors de l'infection. Les méthodes de diagnostic seront ensuite décrites et nous présenterons les principaux tests disponibles.

2. La maladie: la Trypanosomose Humaine Africaine

Il existe classiquement 2 formes de THA, une forme chronique qui sévit en Afrique de l'Ouest et Centrale dont l'agent pathogène est *T. b. gambiense*, et une forme aiguë qui sévit en Afrique de l'Est dont l'agent pathogène est *T. b. rhodesiense* (Hoare, 1972) (cf § 1.2. et 1.3.). On parle aussi de forme gambienne ou de forme rhodésienne.

Dans le cas de la forme gambienne, le cycle de transmission homme-mouche-homme semble prédominer et concerne principalement des glossines ripicoles du groupe *Glossina palpalis*. On a longtemps considéré *T. b. gambiense* comme un parasite spécifiquement humain mais l'existence d'un réservoir animal domestique ou sauvage dans les zones à risque a été mise en évidence (Melhitz, 1986; Noireau *et al.*, 1986b, 1991; Truc *et al.*, 1991). L'importance épidémiologique de ce réservoir animal dans la transmission et le maintien de la maladie est encore mal connue.

La forme rhodésienne est une zoonose typique transmise principalement par les glossines savaniques du groupe *Glossina morsitans* et les glossines de l'espèce *Glossina f. fuscipes*. Une vaste gamme d'animaux domestiques et sauvages constitue un réservoir très important de la maladie. La transmission à l'homme (souvent considéré comme hôte accidentel) se fait suivant le cycle animal sauvage ou domestique-mouche-homme.

2.1. Présentation clinique

Les signes et symptômes qui caractérisent la maladie du sommeil sont en général les mêmes pour la forme chronique gambienne et pour la forme aiguë rhodésienne, la différence étant l'évolution plus ou moins rapide vers l'atteinte neurologique puis la mort. Classiquement, la maladie évolue chez l'homme en deux phases ou périodes: la première période (phase lymphatico-sanguine) durant laquelle le parasite se multiplie dans le sang et dans la lymphe, et la deuxième période (phase méningo-encéphalitique) qui correspond au passage du parasite dans le LCR puis à l'envahissement du système nerveux central (SNC). La classification

actuelle (OMS, 1986) du stade de la maladie repose sur les modifications des résultats de l'examen du LCR (voir § diagnostic et traitement).

Chez l'homme, l'inoculation du trypanosome se caractérise cliniquement par l'apparition d'une lésion cutanée (chancre d'inoculation), rougeâtre et douloureuse (furoncle non-purulent) au niveau de la piqûre infestante. Cette lésion est le témoin de la multiplication du trypanosome *in situ*, qui envahit alors le système lymphatique puis sanguin. Elle est fréquemment observée dans l'infection à *T. b. rhodesiense* mais rare dans l'infection à *T. b. gambiense*. Ensuite, au cours de la première période, les symptômes les plus couramment rapportés sont la fièvre, les céphalées, l'asthénie et des douleurs musculaires et articulaires. Ces symptômes apparaissent de façon cyclique (on parle de pics fébriles) et sont témoins de la production de vagues successives de parasites et de réponses immunitaires (Donelson & Turner, 1985). Des signes plus spécifiques traduisent l'envahissement des différents viscères tels que le foie, la rate et le cœur, et l'hépatosplénomégalie ainsi que des troubles cardio-vasculaires sont rencontrés. Des signes cutanés, spécifiques ou non, sont très fréquents (prurit, éruptions cutanées et trypanides). Les adénopathies cervicales (signes de Winterbottom) apparaissent pendant cette période, en réponse à l'envahissement ganglionnaire, et témoignent de l'activité intense du système immunitaire. Il semble que l'apparition de ces adénopathies soit souvent tardive et qu'elle marque le début de l'envahissement du SNC, précédant donc le début de la seconde période (Ginoux & Frezil, 1981). D'autres signes cliniques comme des oedèmes (des membres ou de la face) ou des troubles endocriniens (aménorrhée, impuissance) apparaissent aussi en cours de première période et s'aggravent au cours de la deuxième période.

La plupart des signes cliniques décrits pour la première phase persistent lors de la deuxième phase: certains signes ont tendance à s'effacer tels que les adénopathies, l'hépatosplénomégalie ou les signes cutanés. Les troubles du sommeil (insomnies nocturnes, somnolences diurnes, hypersomnie permanente), les troubles moteurs, les troubles sensitifs (hyperesthésie, paresthésie), les troubles du tonus (hypertonie, hypotonie), les troubles de la coordination, les réflexes anormaux (réflexes ostéo-tendineux, archaïques et cutanés), les troubles neuro-endocriniens (stérilité et perte de libido, trouble de la soif) et l'altération de l'état mental (conscience ralentie, confusion mentale, désorientation, coma, agressivité, indifférence, euphorie, dépression) sont autant de signes fréquemment rencontrés et qui caractérisent l'atteinte neurologique spécifique de la deuxième période. Cette énumération n'est pas exhaustive et tout signe neurologique insolite doit faire évoquer la Trypanosomose jusqu'à preuve du contraire (Gentilini, 1993). En l'absence de traitement, l'état général du malade se dégrade et il s'achemine plus ou moins rapidement vers la cachexie sommeilleuse terminale (état grabataire) puis sombre dans le coma et meurt d'encéphalopathie. La figure 9 rappelle l'ensemble des signes cliniques (spécifiques ou non) rencontrés chez les cas de THA.

Dans le cas de la forme chronique classique de THA, la première période peut durer de plusieurs mois à plusieurs années, la parasitémie fluctuante restant souvent faible et ayant tendance à décroître. Au cours de cette période, les symptômes sont peu prononcés et le malade

n'éprouve pas souvent le besoin de consulter un médecin. L'apparition des troubles neurologiques lors de la deuxième période est souvent très progressive. Dans le cas de la forme aiguë rhodésienne, la première période ne dure que quelques semaines à quelques mois, les symptômes sont plus marqués, l'atteinte du système nerveux est brutale et la mort peut survenir en quelques mois.

Les signes cliniques manquent de spécificité et leur fréquence est variable selon les individus et les foyers. Ils peuvent orienter le diagnostic, mais ne permettent pas de l'établir (Jannin *et al.*, 1993). On utilise alors des tests pour rechercher le parasite dans les différents liquides biologiques de l'homme (voir § 2.4). Cette étape est très importante puisqu'elle conditionne comme nous le verrons, le traitement (OMS, 1986).

Dumas et Bouteille (1996) ont décrit une évolution plus fine en 4 stades apparemment distincts, mais qui s'intriquent étroitement au point qu'il est souvent difficile de les séparer. Le premier stade est celui qui suit l'inoculation du trypanosome (apparition de la lésion cutanée) et dure environ 15 jours. Apparaît alors le deuxième stade dit lymphatico-sanguin qui est celui où le parasite poursuit sa multiplication et envahit l'ensemble de l'organisme. Ces 2 premiers stades correspondent à la première période précédemment décrite. L'affection évolue alors progressivement vers le troisième stade, essentiellement neurologique, puis vers le quatrième dit de démyélinisation des tissus. Ces 2 derniers stades correspondent à la deuxième période. Dans la différenciation de ces stades, les auteurs ont aussi considéré des critères pathologiques et immunologiques.

Comme tout processus infectieux, la THA va provoquer une réponse immunitaire de l'hôte particulièrement complexe du fait des particularités du trypanosome et notamment de sa variabilité antigénique. Dans la prochaine section, nous présenterons certains aspects de cette réponse, notre objectif n'étant pas son étude exhaustive mais de souligner l'importance des interactions entre l'hôte et le parasite.

Figure 9. Principaux signes cliniques et symptômes dans la maladie du sommeil

Première période (stade lymphatico-sanguin)	Deuxième période (stade méningo-encéphalitique)
Chancre d'inoculation	Troubles du sommeil
Adénopathies cervicales	Altération de l'état mental
Fièvres	Réflexes anormaux
Céphalées	Troubles du tonus
Prurit (lésions de grattage)	Mouvements anormaux
Hépatomégalie	Troubles sensitifs
Splénomégalie	Troubles de la coordination
Hyperpathie (douleurs musculaires et articulaires)	Troubles de la conscience
Anémie	
Œdème	
Troubles cardio-vasculaires	
Troubles endocriniens	
Atteinte rénale	
Infections intercurrentes	

2.2. Pathogénie et immunologie

2.2.1. Trypanosomes pathogènes pour l'homme

Classiquement, seuls *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* sont pathogènes pour l'homme en Afrique. Les autres trypanosomes, comme ceux qui sont responsables des Trypanosomoses animales, sont en principe lysés dès leur pénétration dans le sang humain par des facteurs lytiques appelés Trypanosome Lytic Factors ou TLF (Rifkin, 1978). Le TLF est une haptoglobine (Smith *et al.*, 1995) qui se lie à l'hémoglobine avant d'être captée et internalisée par le trypanosome. Plus récemment, un autre TLF, le TLF2, a été mis en évidence (Tomlinson & Raper, 1996). C'est une molécule instable et de poids moléculaire élevé.

A l'aide de clones de *T. b. gambiense* rendus sensibles au sérum humain par passages répétés chez des souris immunodéprimées, des étapes du mécanisme de lyse ont été démontrées (Hajduk *et al.*, 1992; Ortiz-Ordonez *et al.*, 1994b; Ortiz-Ordonez & Seed, 1995): les TLFs se fixent au parasite par l'intermédiaire des GVS, le complexe TLF-récepteur migre le long de la poche flagellaire avant d'être internalisé. Le facteur alors activé dans des vacuoles lysosomiques, favoriserait la libération d'H₂O₂ qui, du fait de l'absence de catalase endogène, provoquerait une autolyse de la cellule. L'activité du TLF1 serait inhibée chez le trypanosome du fait de la présence d'haptoglobines endogènes. Le TLF2 serait en grande partie responsable du mécanisme de sensibilité au sérum humain (résistance naturelle à l'infection).

Dans le cas de *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* classiquement résistants au sérum humain, les mécanismes de résistance sont méconnus. Il semblerait que pour *T. b. gambiense*, cette résistance est directement liée à l'expression de certains VAT (Ortiz-Ordonez *et al.*, 1994b). Le mécanisme semble différent pour *T. b. rhodesiense* car 2 clones de même VAT ne montrent pas la même résistance au sérum humain (De Greef *et al.*, 1989). Il semblerait alors dans ce cas, qu'une protéine (non-identifiée), liée aux GVS et impliquée dans les mécanismes d'endocytose, soit impliquée dans le mécanisme de résistance en inhibant l'internalisation du TLF (De Greef & Hamers, 1994; Hager & Hajduk, 1997)

2.2.2. Evolution chez l'homme

A la suite de la piqûre infestante, les adénopathies satellites de la piqûre constituent une première barrière à l'évolution des trypanosomes, mais elles sont rapidement débordées et les trypanosomes inoculés envahissent rapidement le système lymphatico-sanguin (Dumas & Bouteille, 1996). On assiste alors, à une activation polyclonale des lymphocytes B avec

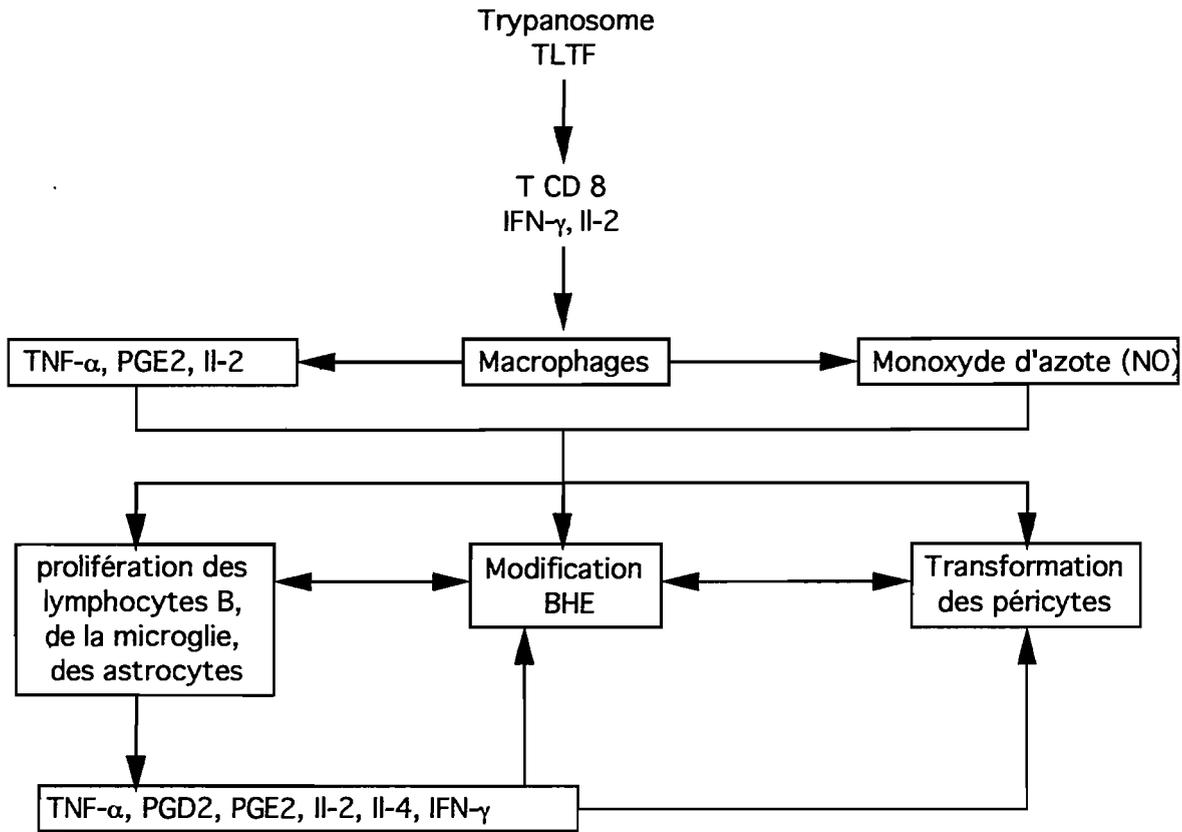
hypergammaglobulinémie, à l'apparition de complexes immuns circulants et à une immunosuppression. Le parasite doit alors rechercher des sites protecteurs qui le mettent à l'abri des systèmes immunocompétents comme le SNC (Poltera *et al.*, 1980). La complexité des mécanismes permettant la modification de la barrière méningée commence à être cernée. Ces mécanismes font intervenir des produits de sécrétion et de dégradation du trypanosome, comme le Trypanosome-released Lymphocyte Triggering Factor (TLTF), qui interagissent directement ou par l'intermédiaire de cytokines (IL-2, IFN-gamma, TNF-alpha, prostaglandines etc.) avec les cellules du système immunitaire (macrophages, lymphocytes T CD8). Les mécanismes sont détaillés dans la figure 10.

Parmi les médiateurs intervenant dans les mécanismes qui modifient la barrière hémato-méningée (BHM), certains favorisent le développement des trypanosomes (IFN-gamma) mais d'autres ont un effet inhibiteur (TNF-alpha et monoxyde d'azote, NO). Le TNF-alpha joue un rôle particulièrement important, son taux étant d'autant plus élevé que l'affection a davantage évolué (Okomo-Assoumou *et al.*, 1995a). Il a un effet trypanostatique en agissant directement sur les membranes des trypanosomes et favorise aussi la production de NO. Ce dernier semble aussi être un inhibiteur important de la croissance des trypanosomes (Vincendeau *et al.*, 1992; Boullerne *et al.*, 1995). Le mécanisme est détaillé dans la figure 10.

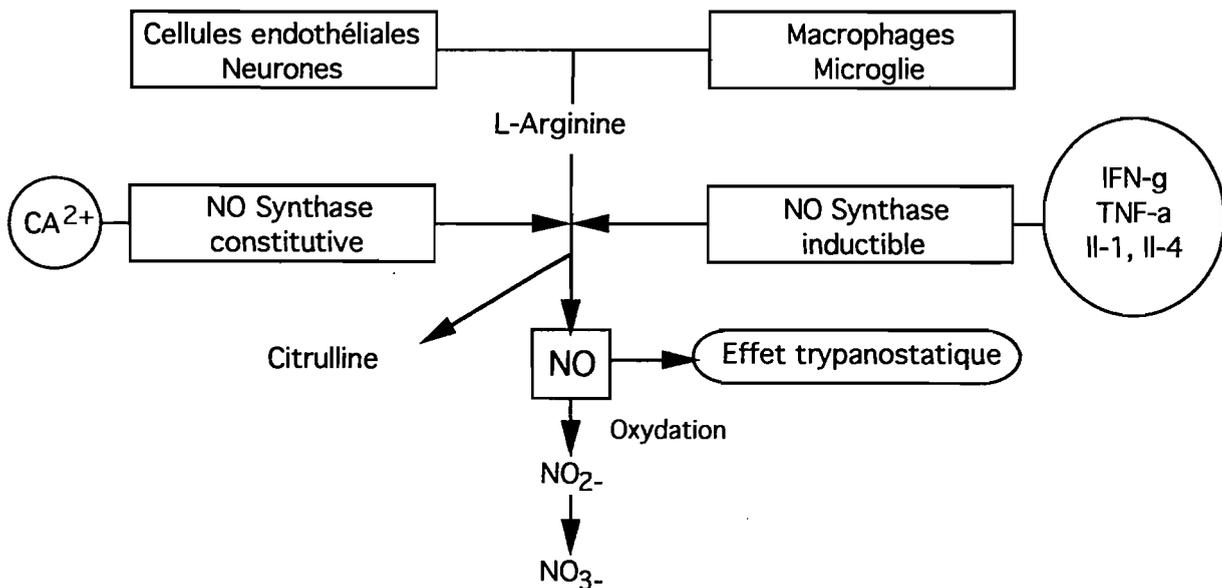
Les modifications de la BHM permettent la pénétration des trypanosomes dans le SNC. Celle-ci se produit d'abord au niveau des zones les plus fragiles et les moins protégées tels les plexus choroïdes, le thalamus, l'area postrema, l'éminence médiane et la région pinéale (Schultzberg, 1988) d'où l'apparition des premiers signes d'atteinte neurologique (troubles du sommeil par atteinte des noyaux supra-optiques, troubles des fonctions endocriniennes par atteinte de la région hypophysaire sous-thalamique etc.). On ne sait pas exactement à quel moment les trypanosomes franchissent la BHE car ils peuvent provoquer un début d'inflammation méningée sans pénétrer le SNC. L'augmentation du nombre de leucocytes (essentiellement des lymphocytes) dans le LCR peut n'être que la traduction de cette inflammation avant toute pénétration du trypanosome (Dumas & Bouteille, 1996), ce qui pose un problème concernant le diagnostic de phase de la maladie qui conditionne le traitement (voir § 2.4). Quoi qu'il en soit, l'inflammation méningée s'aggrave progressivement avec l'évolution de l'affection, et la pénétration des trypanosomes dans le SNC va provoquer de nombreuses lésions qui atteignent progressivement les méninges, le cortex cérébral et la substance blanche sous-corticale (cervelet et moelle). On observe alors une importante infiltration périvasculaire principalement autour des vaisseaux sanguins de fin et moyen calibre. Il se forme d'épais manchons périvasculaires autour de ces vaisseaux, constitués essentiellement de lymphocytes et plasmocytes. Débute alors un processus important de destruction myélinique dans la substance blanche. Ainsi, aux lésions d'ordre inflammatoire, s'ajoutent des lésions de démyélinisation. Le processus de démyélinisation de la substance blanche se généralise et marque la phase finale de la maladie. De plus, des processus autoimmuns interviennent: les trypanosomes provoquent directement ou indirectement la production d'auto-anticorps anti-galactocébroside (Bisser *et*

al., 2000), un constituant de la myéline (Jauberteau *et al.*, 1994), d'auto-anticorps antineurofilaments (Ayed *et al.*, 1996; Lejon *et al.*, sous presse) et d'anticorps anti-tryptophane-like (Okomo-Assoumou *et al.*, 1995b). Ces anticorps responsables de réactions autoimmunes peuvent être de bons marqueurs de l'atteinte neurologique (voir 2.4).

Figure 10. Immunopathologie (A) et implication du monoxyde d'azote (NO) dans la THA (B)
(d'après Dumas & Bouteille, 1996)



A. Immunopathologie dans la THA



B. Implication du monoxyde d'azote dans la THA

2.3. Diagnostic et traitement

2.3.1 Diagnostic de la THA

De nombreuses méthodes de diagnostic direct ou indirect existent pour confirmer le diagnostic de la THA. Nous ne décrivons que les méthodes actuellement utilisées en pratique courante et notamment celles qui l'ont été dans cette thèse. Les méthodes de diagnostic direct cherchent à mettre en évidence la présence du parasite dans les liquides biologiques (sang, lymphes et LCR) alors que les méthodes de diagnostic indirect recherchent des traces de passage ou de présence du parasite par la mise en évidence d'anticorps ou d'antigènes spécifiques lors d'une réaction sérologique. En pratique le diagnostic indirect est utilisé préalablement pour déterminer les sujets sur lesquels porteront les examens du diagnostic direct. La stratégie utilisée en dépistage de masse sur le terrain sera clairement présentée dans la partie Matériel et méthodes.

2.3.1.1. Diagnostic indirect

Les méthodes de diagnostic indirect se basent sur:

- la détection d'anticorps comme le Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT *T. b. gambiense*, Magnus *et al.*, 1978), le Latex *T. b. gambiense* (Büscher *et al.*, 1991 ; 1999) ou le test d'ImmunoFluorescence Indirecte (IFI, Sadun, 1963; Bailey *et al.*, 1967, Frézil *et al.*, 1974),
- la détection d'antigènes (test ELISA).

La plupart de ces méthodes indirectes sont généralement peu onéreuses et faciles à mettre en place sur le terrain. Cependant, en cas de positivité de l'un de ces tests, le parasite devra être mis en évidence par une méthode directe pour décider du traitement. Duvallat *et al.* (1978) rapportent que les méthodes indirectes ne doivent être considérées que comme un complément nécessaire aux méthodes directes pour un dépistage plus exhaustif.

2.3.1.1. Diagnostic direct

Le traitement nécessite au préalable la mise en évidence directe du parasite dans la lymphe, le sang ou le LCR du patient (OMS, 1986). La recherche du parasite dans la lymphe se fait, en cas de présence d'adénopathies cervicales, par examen direct du suc ganglionnaire entre lame et lamelle au microscope optique. La recherche du parasite dans le sang peut se faire par l'examen au microscope optique du frottis sanguin ou de la goutte épaisse. Cependant, dans le cas de la THA, la parasitémie est souvent très faible et pour obtenir une meilleure sensibilité, on utilise souvent des méthodes de concentration comme la centrifugation en tubes capillaires (CTC, Woo, 1970), la filtration sur colonne échangeuse d'ions (miniature Anion Exchange Centrifugation Technique, mAECT, Lanham & Godfrey 1970; Lumsden *et al.*, 1977) et le Quantitative Buffy Coat (QBC, Bailey & Smith 1992). Des techniques d'inoculation *in vivo* (rongeurs) ou *in vitro* (KIVI, Aerst *et al.*, 1992; Truc *et al.*, 1992) sont aussi utilisées en diagnostic différenciel, elles permettent aussi l'isolement des trypanosomes. Des techniques plus récentes sont basées sur la détection d'ADN de trypanosomes par PCR (Moser *et al.*, 1989; Penchenier *et al.*, 1996). Ces techniques sont souvent lourdes à mettre en place et onéreuses.

Chaque méthode de diagnostic est évaluée en fonction de sa sensibilité et de sa spécificité. Sur le terrain, dans le cadre des dépistages de masse, la rapidité du test et la facilité d'emploi est un facteur important à prendre en compte. Concernant la forme gambienne, parmi les méthodes directes, la mAECT semble offrir les meilleurs résultats (Frezil *et al.*, 1974; Lumsden *et al.*, 1979; Dukes *et al.*, 1984; Truc *et al.*, 1998a) au laboratoire comme sur le terrain. Elle a été mise au point par Lanham & Godfrey (1970) et miniaturisée par Lumsden *et al.* (1979) et consiste à filtrer du sang prélevé (300µl) mélangé à du tampon PBS sur de la DEAE cellulose (placée dans le corps d'une seringue) dont la propriété est de retenir tous les éléments figurés du sang tout en laissant passer les parasites. L'éluat recueilli dans une pipette Pasteur sureffilée est centrifugé. La recherche des parasites se fait au microscope ordinaire, en examinant la sureffilure avec un objectif à grande focale. Les trypanosomes restent vivants dans le tampon ce qui facilite leur recherche. Une méthode simplifiée et moins onéreuse a été récemment mise au point par Truc *et al.* (1998c).

Parmi les méthodes indirectes, le CATT est actuellement le plus utilisé en matière de dépistage de masse. Il répond à toutes les exigences d'un test de terrain: très simple d'emploi, bon marché et de lecture immédiate (Noireau *et al.*, 1986a; Jamonneau *et al.*, 2000). Pour détecter les anticorps anti-trypanosomes, Magnus *et al.* (1978) ont mis au point un réactif antigénique à base d'antigènes sélectionnés. Les études entreprises par Van Meirvenne *et al.* (1975), montrent qu'une population clonée de trypanosomes se compose d'un type majeur (VAT prédominant) et de plusieurs types mineurs. Par ailleurs, parmi le grand nombre de types antigéniques qui peuvent être engendrés par le phénomène de la variation antigénique, certains apparaissent beaucoup plus fréquemment que d'autres. Van Meirvenne *et al.* (1977) ont étudié

le phénomène de la variation antigénique de 8 souches de trypanosomes appartenant à différentes espèces et sous-espèces du sous-genre *Trypanozoon*. et ont constaté plusieurs similarités sérologiques entre variants de souches différentes. Un VAT prédominant commun à un grand nombre de souches de *T. b. gambiense* d'origine géographique variée (Afrique de l'Ouest et Centrale) a été sélectionné par Magnus *et al.* (1978) pour la fabrication du CATT: il s'agit du VAT LiTat1.3. La présence d'anticorps anti-LiTat1.3 est mise en évidence par une agglutination lors du mélange du réactif CATT avec du sang (du plasma, du sérum ou du LCR).

2.3.2 Diagnostic de phase et traitement

La recherche des trypanosomes dans le LCR contribue à déterminer le stade de la maladie (diagnostic de phase). Cette recherche peut se faire de façon directe par simple ou double centrifugation du LCR (Cattand *et al.*, 1988; Miezán *et al.*, 2000) ou de façon indirecte: protéinorachie, comptage des cellules (cytorachie). D'après l'OMS (1986, 1998), les critères de deuxième période sont une cytorachie supérieure à 5 éléments/ μ l et/ou une protéinorachie supérieure à 37 mg/100 ml. La présence de l'un ou l'autre de ces critères, avec ou sans mise en évidence de trypanosomes, signe le diagnostic de deuxième période.

Un malade en première période sera traité à la pentamidine surtout utilisée pour les infections à *T. b. gambiense* ou à la suramine sodique surtout utilisée pour les infections à *T. b. rhodesiense*. Un malade en seconde période sera traité au mélarsoprol quelle que soit la forme de THA. La forme gambienne peut être aussi traitée à l'éflornithine. Les thérapeutiques utilisées pour les malades en première période ne sont pas toxiques et ne provoquent quasiment pas d'effets secondaires. Le mélarsoprol est un dérivé arsenical hautement toxique, responsable d'environ 10% d'encéphalopathies réactives parmi les patients traités, dont la moitié sont mortelles. La fréquence et la gravité de ces effets secondaires témoignent de l'importance des tests biologiques permettant le diagnostic précis de phase de la THA. Le seuil de la cytorachie défini par l'OMS est actuellement très discuté car la présence de 5 cellules/ μ l de LCR ne traduit pas forcément la présence du parasite dans le SNC (voir § 2.3). Plusieurs auteurs proposent de passer ce seuil à 20 cellules/ μ l (Bisser *et al.*, 1997; Truc *et al.*, 1999, article en annexe 11). Le degré d'altération de la BHE, corrélé avec la gravité de l'atteinte, peut être évalué par plusieurs examens biochimiques (dosages d'immunoglobulines du LCR) et pourrait être un bon marqueur du stade P2 (Bisser *et al.*, 1997; Lejon *et al.*, 1999). Un protocole permettant la recherche d'ADN de trypanosomes dans le LCR a été mis au point dans le cadre de notre travail (Truc *et al.*, 1999, article en annexe 11).

Il faut ajouter que les traitements de la THA sont très onéreux, ce qui limite leur distribution, et que les cas d'échec aux médicaments couramment utilisés (mélarsoprol) se

multiplient (OMS, 1998). Ainsi, des études sont en cours pour mettre au point des nouvelles stratégies thérapeutiques, principalement en République Démocratique du Congo (Médecin Sans Frontière) et en Ouganda (Epicentre). Ces nouvelles stratégies visent à utiliser des nouvelles molécules (Mégazole, Bouteille *et al.*, 1995), et à tester des bithérapies (Enanga *et al.*, 1998). La conception d'un vaccin serait, bien entendu la solution idéale, mais elle se heurte entre autre à la variation antigénique.

La description qui vient d'être faite de la THA et de son agent pathogène, dans les 2 premières parties de cette thèse, est une description classique. Depuis les premières descriptions du parasite, de nombreux progrès ont été réalisés à la fois dans la connaissance des trypanosomes et dans la compréhension des processus physiopathologiques responsables des atteintes cliniques, mais ces différents points sont encore très discutés. La mise au point d'outils nouveaux notamment de biologie moléculaire permet actuellement une description de plus en plus fine de l'agent pathogène. Parallèlement, les observations cliniques détaillées et les données de pathologie expérimentale sur modèles animaux semblent montrer que la dichotomie classique forme gambienne chronique *vs.* forme rhodésienne aiguë n'est pas univoque. Le rôle respectif du parasite et de l'hôte dans la variabilité de formes cliniques reste à déterminer. Notre thèse tentera d'apporter quelques éléments de réponse à ces questions.

Troisième partie: Problématique

Dans cette partie, nous nous intéresserons successivement au parasite et à l'hôte. Dans un premier chapitre, nous exposerons les problèmes rencontrés dans la subdivision de *T. brucei* ssp., puis un second chapitre sera consacré à la diversité des tableaux cliniques rencontrés. Ces deux aspects de la problématique sont très liés et des interactions entre l'hôte et le parasite pourraient exister ce que nous nous attacherons à souligner.

1. Subdivision de *T. brucei* ssp., problèmes rencontrés

La caractérisation subsppécifique de *T. brucei* ssp. a toujours été très discutée. Dès le début du siècle, Bruce *et al.* (1911) considéraient que *T. brucei* et *T. rhodesiense* étaient le même parasite alors que Taute (1913) en faisait deux entités différentes en se basant sur des critères épidémiologiques. Ces discussions viennent du fait que ces différents parasites ne sont pas morphologiquement différents. Hoare (1972) distingue 3 sous-espèces en se basant sur des caractères extrinsèques des trypanosomes (aspects cliniques, hôtes, répartition géographique et vecteurs):

**Trypanosoma brucei gambiense*,

- responsable de la forme chronique de la THA
- en Afrique de l'Ouest et Centrale,
- transmis principalement par les glossines du groupe *Glossina palpalis*,

**Trypanosoma brucei rhodesiense*,

- responsable de la forme aiguë de la THA
- en Afrique de l'Est,
- transmis principalement par les glossines du groupe *Glossina morsitans*,

**Trypanosoma brucei brucei*,

- parasite de mammifères, non pathogène pour l'homme et responsable de la nagana
- en Afrique subsaharienne,
- transmis principalement par les glossines des groupes *Glossina palpalis* et *Glossina morsitans*.

Cette classification, qui est la plus répandue, est celle retenue par l'OMS (1986). Cependant, cette différenciation subsppécifique basée sur les caractères extrinsèques semble insuffisante puisque des formes de THA aiguës sont suspectées en Afrique de l'Ouest (Truc *et al.*, 1997a) et des formes de THA chroniques ont été décrites en Afrique de l'Est (Foulkes, 1970; Bajyana-Songa *et al.*, 1991).

Si on se réfère cette fois à des caractères plus intrinsèques des trypanosomes, les mêmes difficultés apparaissent. Plusieurs auteurs ont observé que *T. b. rhodesiense* et *T. b. brucei* étaient plus virulents que *T. b. gambiense* après inoculation chez le rongeur de laboratoire (Wery *et al.*, 1977; Frezil *et al.*, 1979) mais des souches de *T. b. brucei* se sont avérées faiblement virulentes chez ces même animaux (Mehlitz, 1986). D'autres auteurs ont tenté de distinguer *T. b. gambiense* de *T. b. brucei* en fonction de leur résistance au sérum humain (Rickman et Robson, 1970). En principe, *T. b. brucei* est sensible au sérum humain et *T. b. gambiense* est résistant mais certains clones de *T. b. gambiense* se sont avérés sensibles (Van Meirvenne *et al.*, 1975; Ortiz-Ordonez *et al.*, 1994a).

La mise au point d'outils de biologie moléculaire et l'utilisation de nouvelles techniques d'identification génétique ont permis des avancées importantes sans toutefois résoudre totalement la question. L'individualisation des différentes sous-espèces en tant qu'entités génétiques distinctes reste douteuse (Gibson *et al.*, 1980; Gibson, 1986; Mathieu-Daudé & Tibayrenc, 1994). La technique d'électrophorèse des isoenzymes (Godfrey & Kilgour, 1976) utilisée en génétique des populations, a permis d'individualiser un groupe génétiquement homogène, correspondant à 80 % des isolats humains d'Afrique de l'Ouest et Centrale. Ce groupe est communément appelé le "groupe 1" de *T. b. gambiense* (Gibson, 1986). Les 20% restants ont été étiquetés par les auteurs comme "gambiense groupe 2", "non gambiense" ou encore groupe "bouaflé", ce groupe étant génétiquement très hétérogène (Godfrey *et al.*, 1990; Baker, 1995; Stevens & Tibayrenc, 1996; Truc *et al.*, 1997a; 1997b). En Afrique de l'Est, l'analyse électrophorétique des isoenzymes n'a pas permis de distinguer clairement les stocks de *T. b. rhodesiense* et de *T. b. brucei* (Godfrey *et al.*, 1990; Mathieu-Daudé, 1991). Cependant, des subdivisions homogènes ont été mises en évidence: 3 groupes ont été identifiés au sein de *T. b. brucei* (Sindo, Kakumbi et Kiboko, Tait *et al.*, 1985; Godfrey *et al.*, 1990) et 2 groupes au sein de *T. b. rhodesiense* (Busoga et Zambezi (Stevens *et al.*, 1992)). Certaines souches caractéristiques du groupe Busoga, isolées en Afrique Centrale et principalement chez des animaux, ont formé un nouveau groupe: le groupe Bouaflé/Busoga (Stevens & Godfrey, 1992). Une revue de ces différents travaux est présentée par Gibson *et al.* (1999) (voir annexe 1).

D'autres résultats ont été obtenus par la technique dite de "Restriction Fragment of Length Polymorphism" (RFLP, Gibson *et al.*, 1985b) et diverses techniques d'hybridation avec des sondes génomiques (Hide *et al.*, 1990; Mathieu-Daudé *et al.*, 1994), ont confirmé ceux obtenus par l'identification isoenzymatique. Ceci conforte l'hypothèse qui décrit *T. b. rhodesiense* comme étant un variant de *T. b. brucei* (Tait *et al.*, 1985) qui s'adapte à l'homme. Cependant, Hide *et al.* (1994), par analyse RFLP de séquence répétées d'ADN (Hide *et al.*, 1990; 1996), semblent pouvoir distinguer les souches de *T. b. rhodesiense* (isolées sur homme) et celles de *T. b. brucei* (isolées chez l'animal), en provenance d'Afrique de l'Est.

D'autres méthodes d'identification moléculaire portant sur l'ADN sont actuellement utilisées afin de trouver des marqueurs génétiques spécifiques des entités déjà mises en

évidence (groupe 1 et 2 de *T. b. gambiense*) ou spécifiques de celles qui seront identifiées par ces mêmes techniques. La technique d'amplification de séquences d'ADN microsatellites (Tautz & Renz, 1984;) a déjà donné des résultats prometteurs. Les microsatellites sont des séquences répétées en tandem encore appelées SRS (Simple Repeat Sequences) ou STR (Short Tandem Repeats) (Tautz, 1989; Tautz & Schlötterer, 1994). Une séquence microsatellite est constituée d'un nombre variable ($n > 6$) de répétitions en tandem d'un court motif (2 à 5 nucléotides), dont la taille totale n'excède pas en général 200 paires de bases. Les microsatellites sont localisés majoritairement entre les gènes, dans les régions 5'-3' non-transcrites, et dans les introns des gènes. Chaque zone de répétition est un locus et chaque nombre de répétition est un allèle. On peut amplifier par PCR la séquence microsatellite dont la longueur peut-être visualisée sur un gel polyacrylamide. Des individus différents auront un nombre de répétition du motif différent, et donc des tailles (allèles) différentes. Ces allèles sont transmis de manière mendélienne chez la plupart des organismes, la transmission se fait de manière codominante (on peut observer les hétérozygotes) et les séquences correspondantes présentent un haut degré de polymorphisme et d'hétérozygotie. Ainsi, les marqueurs microsatellites sont de plus en plus utilisés en génétique des populations. En THA, des marqueurs spécifiques du " groupe 1 " de *T. b. gambiense* ont déjà été découverts (Biteau *et al.*, 2000).

La technique Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD, Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990) est aussi actuellement très utilisée en génétique des populations. Le principe consiste à amplifier (au hasard) par Polymerase Chain Reaction (PCR), des séquences d'ADN avec des amorces choisies arbitrairement. Les produits d'amplification sont alors séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose et déterminent un profil génétique. Il s'agit alors de comparer les profils obtenus, les individus différents montreront des profils différents représentant des allèles différents. Ces allèles sont transmis de manière mendélienne chez la plupart des organismes, mais la transmission ne se fait pas de manière codominante. La technique des RAPD adaptée à la caractérisation des trypanosomes africains (Tibayrenc *et al.*, 1993; Kanmogne *et al.*, 1996) est plus discriminative que l'électrophorèse d'isoenzymes et permet de mettre en évidence une diversité génétique plus fine au sein d'un même échantillon de souches. Dans l'état actuel de nos connaissances, il semble que les isoenzymes restent des marqueurs de choix pour l'étude épidémiologique de la THA (Truc & Cuny, sous presse; Jamonneau *et al.*, sous presse, article en annexe 13).

2. Diversité d'évolutions cliniques

Concernant la forme gambienne, les tableaux cliniques sont en fait très divers. Certains auteurs ont rapporté l'existence de formes à caractère chronique très prononcé (Sartory *et al.*, 1915; Sicé, 1937; Marding *et al.*, 1948; Gallais *et al.*, 1953; Péliissier, 1958) l'exemple le plus connu étant celui de Féo au Congo (Lapeyssonie, 1960), porteuse de trypanosomes (*T. b. gambiense*) pendant 21 ans sans atteinte neurologique (pas d'évolution en deuxième période). D'autres auteurs parlent de formes asymptomatiques (Wery & Burke, 1972; Ginoux & Frezil, 1981; Woodruff *et al.*, 1982). A l'inverse, des patients dépistés en Côte d'Ivoire ont présenté des tableaux cliniques plutôt caractéristiques d'une forme aiguë de la maladie (évolution rapide vers un état très altéré dès le passage en deuxième période) (Truc *et al.*, 1997a). En Afrique de l'Est, on remarque aussi une diversité d'évolutions cliniques de THA à *T. b. rhodesiense*, des cas de formes chroniques ayant été observées (MacKichan, 1942; Foulkes, 1970; Bajyana-Songa *et al.*, 1991).

L'origine de cette variabilité de tableaux cliniques doit être recherchée à la fois chez le parasite (variabilité génétique) et l'hôte (susceptibilité individuelle à l'infection). Seed *et al.* (1993), ont montré que la résistance des trypanosomes au sérum humain dépend d'une part, de l'information génétique du trypanosome, et d'autre part de l'hôte duquel le sérum utilisé a été prélevé.

On peut penser que la diversité génétique des souches de trypanosomes est à l'origine de la diversité des tableaux cliniques observés. L'influence de la diversité génétique de *T. brucei* ssp. sur les formes cliniques de la THA est imparfaitement connue. Pierre Richet et coll. écrivaient déjà en 1961: " il existe une différence de virulence des trypanosomes chez l'homme en Côte d'Ivoire qui peut être attribuée à des différences au sein des souches de parasites en fonction de leur origine géographique dans le pays ". La caractérisation isoenzymatique de souches de trypanosomes isolées durant les récentes épidémies de THA dans le sud-est de l'Ouganda a montré que certains " types de tableaux cliniques " peuvent être liés à un zymodème particulier (Smith & Bailey, 1997). Les souches du zymodème B17 du groupe " busoga " semblent responsables de formes cliniques plutôt sévères à évolution rapide avec présence dans 92% des cas d'un chancre d'inoculation. A l'inverse, les souches des zymodèmes du groupe " Zambezi " occasionnent des formes cliniques plus chroniques à évolution lente, avec atteinte progressive du système nerveux, et une absence fréquente de chancre d'inoculation (dans 25 à 44% des cas suivant les zymodèmes).

La variabilité clinique observée pourrait aussi être due à une susceptibilité individuelle à lutter contre l'agent pathogène. Ce phénomène a déjà été décrit chez l'homme dans le cas d'infections bactériennes (Abel & Demenais, 1988) et dans le cas d'infections parasitaires, dans le domaine du paludisme (Hill *et al.*, 1991; Garcia *et al.*, 1998a, 1998b) ou de la

schistosomiase (Abel *et al.*, 1991; Marquet *et al.*, 1996). En Trypanosomose animale, certaines races de bétail résistent mieux à l'infection, on parle de trypanotolérance (Murray *et al.*, 1990; Authié, 1994; Trail *et al.*, 1994). Des études expérimentales ont permis de localiser chez la souris, des gènes de contrôle de la résistance à la Trypanosomose à *T. congolense* (Kemp *et al.*, 1997). En Trypanosomose humaine, outre les observations faites quant à la diversité des présentations cliniques, des arguments indirects sont en faveur d'une susceptibilité individuelle à l'infection. Okia *et al.* (1994) ont montré qu'un sujet ayant un apparenté atteint de THA (forme rhodesienne) possédait un excès de risque de développer la maladie. Dans le cas de la forme gambienne, Khonde *et al.* (1997) ont mis en évidence des concentrations familiales de cas. Dans ces études, même si le comportement ou l'environnement commun aux cas étudiés est souligné, on peut aussi s'interroger sur l'existence éventuelle d'un déterminisme génétique chez l'homme dans les infections dues aux trypanosomes.

Dans cette étude, nous avons développé ces deux aspects de l'origine de la diversité des formes cliniques de THA. Nous avons d'abord tenté d'étudier de façon précise les éventuelles corrélations entre la diversité génétique de *T. brucei* s. l. et les manifestations cliniques chez l'homme. Ce travail a consisté, d'une part en une étude clinique de la THA chez des patients dépistés en Côte d'Ivoire, en collaboration avec le Projet National de Lutte contre la THA (PNLTHA) et l'Institut de Médecine Tropicale (IMT) d'Anvers, et d'autre part en une étude génétique des populations de trypanosomes responsables de ces infections en collaboration avec le Centre d'Etude du Polymorphisme Moléculaire (CEPM) de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD Montpellier). Enfin, un suivi sérologique, parasitologique et clinique à long terme de trypanosomés refusant le traitement nous a permis d'étudier indirectement l'existence d'une éventuelle susceptibilité individuelle à l'infection (Jamonneau *et al.*, sous presse, article en annexe 14).

Quatrième partie: Matériel et Méthodes

Cette thèse s'est inscrite dans le cadre d'un vaste programme de recherche intitulé: " Pathogénicité chez l'Homme et variants génétiques de *T. brucei* ssp. en Côte d'Ivoire " mené à l'Institut Pierre Richet/OCCGE de Bouaké de 1996 à 1998. Ce programme prévu sur 3 années avait pour objectifs:

- une meilleure définition clinique de la forme chronique classique de THA à *T. b. gambiense* chez l'homme (avec évolution de la sérologie et de la parasitémie dans le temps pendant le traitement et post-curem);
- la caractérisation des tableaux cliniques de la THA dans les cas d'infections à *T. brucei* « non gambiense groupe 1 » chez l'homme;
- l'étude des caractéristiques génétiques des souches de trypanosomes;
- la recherche d'éventuelles corrélations entre les types génétiques des souches et les paramètres cliniques et épidémiologiques;
- la recherche de marqueurs génétiques (isoenzymes ou primers spécifiques) des groupes mis en évidence, permettant de les caractériser quel que soit l'hôte (homme, animal ou glossine);
- la délimitation des zones géographiques en fonction de la pathogénicité des souches;
- l'isolement et identification des souches éventuellement résistantes au traitement (Lomidine, Arsobal).

Le travail a été effectué au laboratoire de Génétique des Parasites et Vecteurs de l'Institut Pierre Richet, récemment rénové et équipé grâce au soutien financier du " Fonds d'aide à la Coopération " (FAC). Le laboratoire a travaillé en collaboration avec le PNLTHA en Côte d'Ivoire, les centres de traitements de la THA (le Projet de Recherche Contre les Trypanosomoses (PRCT) et les Bases de Santé rurale (BSR) de Bouaflé et d'Aboisso), l'Unité Mixte de Recherche 9926 CNRS/ORSTOM de Montpellier (France), l'Université de Bordeaux II (France), l'Institut d'Epidémiologie et de Neurologie Tropicale (IENT) de Limoges (France) et l'Institut de Médecine Tropicale Prince Leopold (IMT) d'Anvers (Belgique). Ce projet a été financé par le FAC du Ministère Français des Affaires Etrangères, Direction de la Coopération et du Développement.

Ce programme de recherche multidisciplinaire comportait 5 grands volets: génétique, sérologique, parasitologique, immunologique et clinique. Pour chaque patient inclus dans ce programme, un suivi post-curem a été effectué: des contrôles ont eu lieu en fin de traitement, puis 1, 3 et 6 mois après traitement. L'objectif principal de notre thèse étant d'étudier l'existence d'éventuelles corrélations entre la variabilité génétique des souches de trypanosomes et la diversité des formes cliniques de THA, nous avons essentiellement utilisé les données génétiques, sérologiques, parasitologiques et cliniques à l'inclusion, préalablement à tout

traitement. Toutefois, des données immunologiques (notamment concernant la recherche de marqueurs de sévérité de la THA) ainsi que des données de contrôle post-curem seront en partie utilisées pour argumenter nos hypothèses.

Le suivi à long terme des patients refusant le traitement a été réalisé parallèlement à ce projet. Les résultats obtenus lors de ce suivi qui n'avait d'autres objectifs que de convaincre les patients d'accepter le traitement nous ont permis d'aborder la deuxième partie de notre problématique concernant l'existence d'une éventuelle susceptibilité individuelle à l'infection. Cette enquête est beaucoup moins développée que la précédente notamment concernant les méthodes mises en œuvre, mais sera décrite à part entière.

Ainsi, les 2 aspects de notre problématique seront abordés séparément à l'aide de 2 enquêtes que nous intitulerons:

- " Diversité des formes cliniques de THA et variants génétiques de *T. brucei* s.l. " qui étudiera l'existence d'éventuelles corrélations entre la variabilité génétique des souches de trypanosomes et la diversité des formes cliniques de THA; et
- " Suivi sérologique, parasitologique et clinique à long terme de trypanosomés refusant le traitement ", dont le but sera de rechercher des arguments indirects en faveur d'une éventuelle susceptibilité individuelle à l'infection.

Les 2 enquêtes ayant été menées dans les mêmes zones, nous ferons tout d'abord, dans cette partie, une présentation générale des caractéristiques géoclimatiques et humaines de ces zones ainsi qu'une description précise des foyers où s'est déroulé notre travail. Ensuite, nous décrirons successivement les 2 enquêtes selon le même plan suivant: nous détaillerons d'abord le mode d'inclusion des sujets puis le recueil des données épidémiologiques, cliniques, sérologiques, parasitologiques et immunologiques prises en compte. Les méthodes d'isolement et d'identification génétique des souches seront ensuite détaillées, puis nous décrirons la stratégie générale d'analyse ainsi que les outils statistiques utilisés.

1. Zones d'études communes aux deux enquêtes

Notre travail s'est déroulé dans les deux zones de THA actuellement actives en Côte d'Ivoire: la zone du centre-ouest (Zoukougbeu, Daloa, Vavoua, Bouaflé, Sinfra, Bonon) et celle du sud-est (Abengourou, Aboisso) (voir annexe 2).

Ces deux zones sont très hétérogènes quant à la répartition des cas de THA, elles sont constituées de plusieurs foyers. Nous nous intéresserons uniquement à ceux où des patients sont encore actuellement recensés (tableau 1). On peut distinguer:

- les foyers contrôlés (historiques), qui ont été très actifs mais dans lesquels des campagnes de lutte ont été menées et où la situation est restée endémique ces dix dernières années (quelques patients dépistés par an),
- les foyers résurgents qui sont devenus très actifs ces dix dernières années: plusieurs dizaines à plusieurs centaines de nouveaux cas dépistés par an.

Zone	Foyer	Profil
Centre-ouest	Zoukougbeu	endémique
	Daloa	endémique
	Vavoua	endémique
	Bouaflé	endémique
	Sinfra	actif
	Bonon	actif
Sud-est	Aboisso	endémique
	Abengourou	endémique

Tableau 1. Les principaux foyers de THA de Côte d'Ivoire et leur activité ces 10 dernières années.

1.1 Historique et situation actuelle des foyers d'étude

Dans la zone du Centre-ouest, les foyers de Zoukougbeu (foyer Niaboua), de Daloa (Daloa-ville, canton Gbaloan), de Vavoua et de Bouaflé (Koudougou) sont des foyers historiques. L'activité de la THA y était intense entre 1970 et 1990 (exemple: 60 patients traités par an dans le foyer niaboua entre 1981 et 1990, entre 50 et 100 patients traités par an dans le canton Gbaloan dans les années 1980). A l'heure actuelle, suite aux campagnes de lutte du PNLTHA et de l'Institut Pierre Richet (IPR) de Bouaké menées dans les foyers de Zoukougbeu, Bouaflé, Daloa et Vavoua, seulement quelques nouveaux cas provenant de ces localités sont actuellement traités annuellement (exemple: 8 patients du foyer Niaboua traités en 1997, 1 seul patient du canton Gbaloan soigné la même année).

Les foyers de Sinfra et de Bonon sont des foyers en expansion. A Sinfra, de 1950 à 1985, le nombre de patients dépistés passivement et annuellement est resté inférieur à 10 et en 1989, il passe à 25 pour atteindre 40 en 1992. Une campagne de lutte menée par le PNLTHA appuyée par l'IPR (Laveissière, communication personnelle) a permis d'y traiter 132 patients en 1992 et 154 en 1993. Un programme de lutte a été mené entre 1995 et 1996 pendant lequel 588 patients ont été dépistés (Laveissière, communication personnelle). A Bonon, la situation est en train d'évoluer: 9 patients ont été traités entre 1956 et 1959, 57 de 1976 à 1985, 102 de 1986 à 1996 et 16 en 1997. Ces patients sont uniquement ceux qui se sont présentés spontanément dans les centres de traitement. Trois prospections médicales menées dans la région de Bonon en 1998 et 1999 permettent de penser que ce foyer devient de plus en plus actif avec probablement plusieurs centaines de patients (§ 1.1.1 partie 5). Un projet visant à prospecter la totalité de la région touchée est actuellement en cours. A ce jour, 16000 personnes ont été visitées et 77 patients ont été dépistés.

Dans le sud-est du pays, le foyer d'Abengourou a connu une flambée épidémique dans les années 1950, rapidement endiguée. Depuis, seuls quelques cas isolés provenant de cette localité sont décrits chaque année, mais ils ne reflètent probablement pas la réalité puisque aucune mission de dépistage n'a été menée dans le foyer depuis les années 1960, et le centre de traitement le plus proche (la BSR d'Aboisso) est à 180 km d'Abengourou.

La foyer d'Aboisso-Ayamé est un foyer à évolution lente qui se développe depuis les années 1960, probablement dans le sillage de celui d'Abengourou. Peu de données sont disponibles sur la situation de la THA ces dernières années. Entre 10 et 20 patients sont dépistés par an, mais ce chiffre est loin de la réalité étant donné qu'aucune surveillance n'est établie dans cette région très vaste et difficile d'accès. Nous avons organisé deux prospections médicales (1997 et 1998) dans le cadre de cette étude entre Aboisso et Ayamé (voir partie Résultats) qui montrent que le foyer est encore actif.

1.2. Situation géoclimatique des foyers

1.2.1. Foyers du Centre-ouest

Les foyers de Zoukougbeu, Daloa, Vavoua, Bouaflé, Sinfra et Bonon sont répartis dans le grand foyer du Centre-ouest (annexe 2). Cette vaste zone se caractérise par une grande saison des pluies d'avril à octobre avec une nette diminution des précipitations en juillet-août (insuffisante pour pouvoir qualifier cette période de saison sèche). Cette saison des pluies laisse place à la grande saison sèche de novembre à février. La pluviométrie annuelle est d'environ 1300 à 1500 mm suivant les régions. Le réseau hydrographique est dense avec une alternance d'interfluves et de bas-fonds, mais sans relief important.

La forêt mesophile qui s'étendait sur toute la zone jusque dans les années 1950 a été en grande partie dégradée (recherche de bois précieux, défrichements abusifs). Par exemple, dans le foyer de Vavoua, entre 1955 et 1972, 69% de la forêt mesophile ont été défrichés (Laveissière & Hervouët, 1991). Dans les zones défrichées se sont installés progressivement des cultures de rentes (café et cacao) et quelques champs de plantes vivrières. Actuellement, le paysage est très complexe avec une alternance d'îlots forestiers, de galeries forestières peu ou prou dégradées, de savanes incluses (zones défrichées non-cultivées) et de plantations (café, cacao, plantes vivrières, jachères).

1.2.2. Foyers du Sud-est

Il est composé des foyers d'Abengourou au nord et d'Aboisso au sud (annexes 2 et 3) distants de 180 km. Avec en moyenne 1400 mm de pluie par an à Abengourou et quasiment 2000 mm à Aboisso, la pluviométrie dans cette zone est importante toute l'année et dépasse largement les moyennes annuelles du Centre-ouest. On distingue une grande saison des pluies de mars à mi-juillet, une petite saison sèche de mi-juillet à mi-septembre, une petite saison des pluies de mi-septembre à novembre et une grande saison sèche de décembre à février. Le réseau hydrographique est très dense entre la Bia (et le barrage d'Ayamé), le Comoé, l'Eholié et tous leurs nombreux affluents. Le relief est légèrement montagneux et très accidenté rendant la circulation difficile.

Dans cette vaste zone, la forêt ombrophile et mesophile a été beaucoup moins touchée que dans le Centre-ouest et de grandes zones forestières s'étendent encore du Comoé à la frontière Côte d'Ivoire - Ghana. Autour des villes et entre les zones forestières, les zones défrichées ont été remplacées par des cultures de rentes (café, cacao, palmiers à huile, bananes et ananas) et quelques champs de plantes vivrières. Les cultures de café et cacao sont dispersées alors que celles de palmiers à huile, bananes et ananas s'étendent sur des grands domaines.

1.3. Populations

1.3.1. Les ethnies

Jusque dans les années 1920, la zone forestière ivoirienne n'était peuplée que d'ethnies autochtones. Pour ne citer que les principales:

- le Centre était peuplé de Baoulés,

- le Centre-ouest, de Gouros (Bouaflé, Sinfra), de Bétés (Daloa, Gagnoa) et de Niabouas (Zoukougbeu),
- l'Ouest, de Yacoubas et de Guérés,
- le Sud-ouest, de Krous
- l'Est et le Sud-est, d'Agnis,
- enfin, le Sud, d'Athiés, d'Abès et de Godiès.

Ensuite, une forte demande en main d'œuvre pendant la période coloniale, est à l'origine des premières vagues d'immigration forcée. Le phénomène s'accroît au début des années 1950 pour rentabiliser la forêt. Après l'indépendance de la Côte d'Ivoire en 1960, l'immigration forcée est remplacée par une immigration volontaire découlant de plusieurs phénomènes parmi lesquels on peut citer la surpopulation et l'appauvrissement des diverses régions septentrionales ainsi que le besoin de main d'œuvre dans la zone forestière (exploitation du bois et surtout mise en culture des zones défrichées). Les populations immigrées (allogènes) sont principalement originaires des zones soudaniennes et sahéliennes (nord de la Côte d'Ivoire, Burkina Faso et Mali). Les principaux groupes ethniques représentés sont les Mossis, les Sénoufos et les Malinkés.

On retrouve donc dans chacune des zones d'étude (Centre-ouest et Sud-est), une population autochtone et une population allogène à peu près également représentées. Par contre, on observe des différences au niveau de la distribution géographique des ethnies surtout en milieu rural. En effet, les autochtones vivent souvent regroupés en villages ou en grands hameaux alors que les allogènes vivent plutôt dans de nombreux petits campements isolés les uns des autres au milieu des plantations.

1.3.2. Densité de population

En 1920, la Côte d'Ivoire comptait 2 millions d'habitants, mais sous l'effet des différentes vagues d'immigration et avec un taux de progression annuelle de 3,5 à 4%, la population en 1975 était d'environ 7 millions d'habitants et actuellement, elle est estimée à 13-14 millions d'habitants. C'est surtout la zone forestière qui a subi les plus importantes augmentations de densité de population grâce à la construction de routes et de chemins d'exploitations dans des zones où le milieu naturel est riche. Ainsi les zones du Centre-ouest et du Sud-est sont parmi les plus peuplées du pays avec des densités supérieures à 50 hab/km².

1.4. Les centres de santé spécialisés et lutte contre la THA en Côte d'Ivoire

Dans le Sud-est, une seule Base de Santé Rurale (BSR), la BSR d'Aboisso, est spécialisée dans le dépistage et le traitement de la THA. Dans le Centre-ouest, 2 centres ont le même statut: la BSR de Bouaflé et le Projet de Recherche Clinique sur les Trypanosomoses (PRCT) de Daloa. La BSR de Bouaflé, au même titre que la BSR d'Aboisso, est une structure nationale à part entière. Ces 2 bases fonctionnent sur des budgets de l'état (personnels, équipements, matériels et médicaments). Le PRCT a été fondé en 1978 par l'OMS pour en faire un centre de recherche. Il est devenu le centre de traitement le mieux équipé et le plus fréquenté en Côte d'Ivoire. En 1984, l'OMS a fait don de cet institut à l'état ivoirien (actuellement sous la direction de l'Institut National de Santé Publique), mais tout en continuant à le financer jusqu'en 1991. Il reste depuis un centre de traitement et de dépistage très actif, mieux équipé que les BSR et avec une équipe de prospection médicale performante.

L'Unité de Recherche sur la THA de l'IPR intervient aussi dans la lutte contre la THA en Côte d'Ivoire. En effet, dans le cadre de programmes de lutte et de projets de recherche, plusieurs prospections médicales ont été menées, le plus souvent en collaboration avec le PNLTHA (Laveissière *et al.*, 1994). Certaines de ces prospections médicales ont permis de collecter des données qui seront utilisées dans cette thèse. Un programme de lutte mené à Sinfra revêt un caractère particulier car il a permis la formation d'une centaine d'Agents de Santé Communautaire (ASC) qui ont effectué un recensement précis des lieux d'habitation (villages et campements) et de la population. Ce recensement nous a été très utile en particulier dans le cadre de notre deuxième enquête. De plus, lors de ce programme, 2 centres de santé ont été équipés (à Sinfra et Bayota) pour le dépistage de la THA. Au total, 588 patients ont été dépistés entre 1995 (333) et 1996 (255), dont 344 dépistés activement et 244 passivement.

2. Matériel et méthodes de la première enquête: Diversité des formes cliniques de THA et variants génétiques de T. brucei s.l.

2.1. Inclusion des patients

Dans le foyer du Centre-ouest, ont été intégrés :

- les trypanosomés qui ont été traités au PRCT de Daloa entre fin décembre 1996 et fin décembre 1997
- les trypanosomés qui ont été traités à la BSR de Bouaflé entre avril 1997 et mai 1998.

Ces patients ont été dépistés soit passivement dans l'un des 2 centres de traitement ou au Centre de Santé de Sinfra, soit activement au cours de 3 prospections médicales:

- à Sinfra entre la fin décembre 1996 et le début janvier 1997
- à Bonon en décembre 1997 et en mai 1998.

Dans le foyer du Sud-est, ont été intégrés tous les trypanosomés traités à la BSR d'Aboisso dépistés lors de 2 prospections médicales organisées dans la région d'Aboisso-Ayamé en juillet et en novembre 1997. Aucun patient n'a été dépisté passivement dans ce centre pendant la durée de l'étude.

Le dépistage actif en prospection médicale est détaillé dans les figures 11 et 13, une illustration est présentée en annexe 3. Le dépistage passif au niveau des centres de traitement ou de santé est détaillé dans les figures 12 et 13. Les patients dépistés ont été intégrés dans l'étude au moment de leur prise en charge pour le traitement. Etant donné le nombre de prélèvements (figures 14 et 15) à effectuer dans le cadre de l'étude, les patients ayant moins de 8 ans n'ont pas été intégrés.

Figure 11. Protocole des prospections médicales menées dans le cadre de l'étude (dépistage actif)

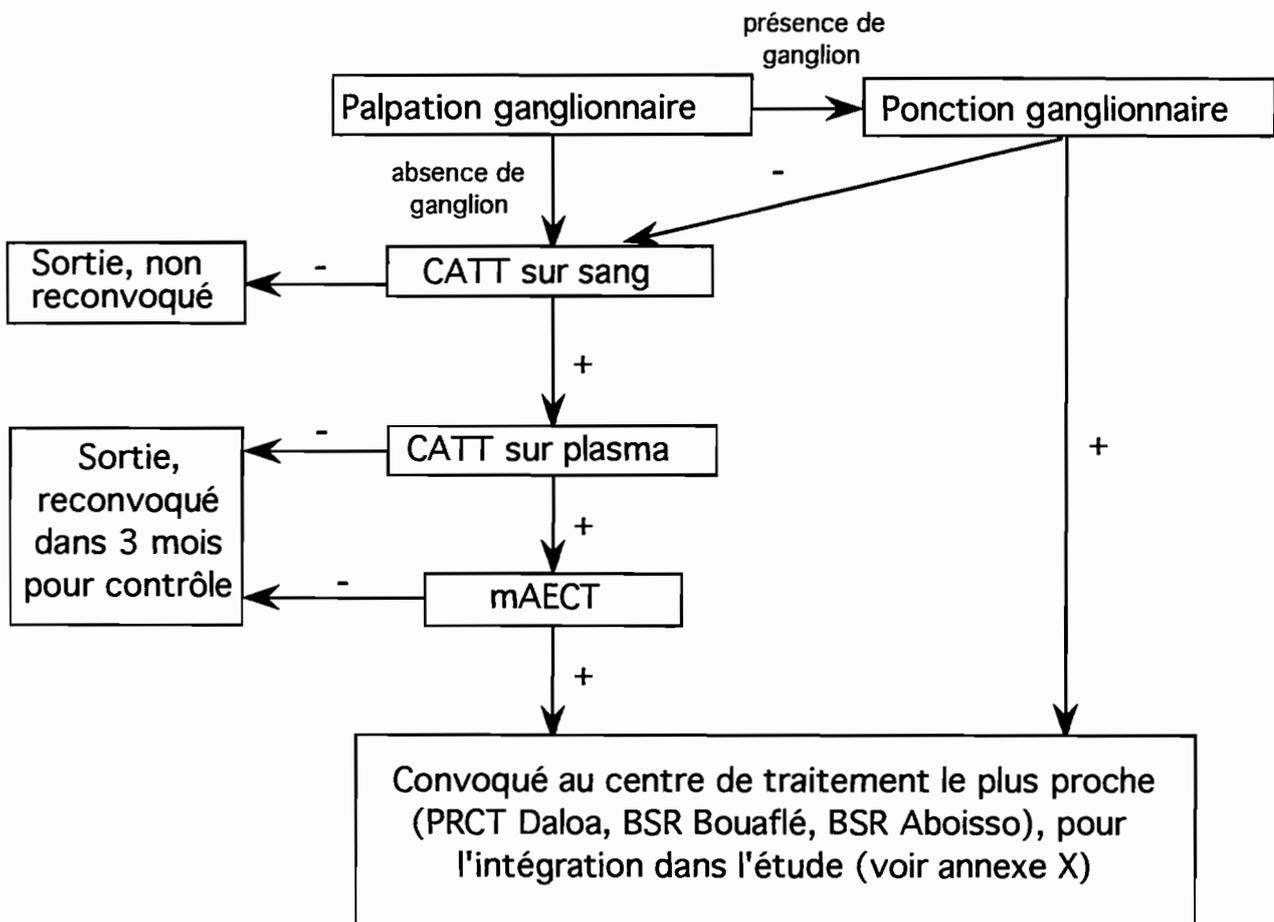
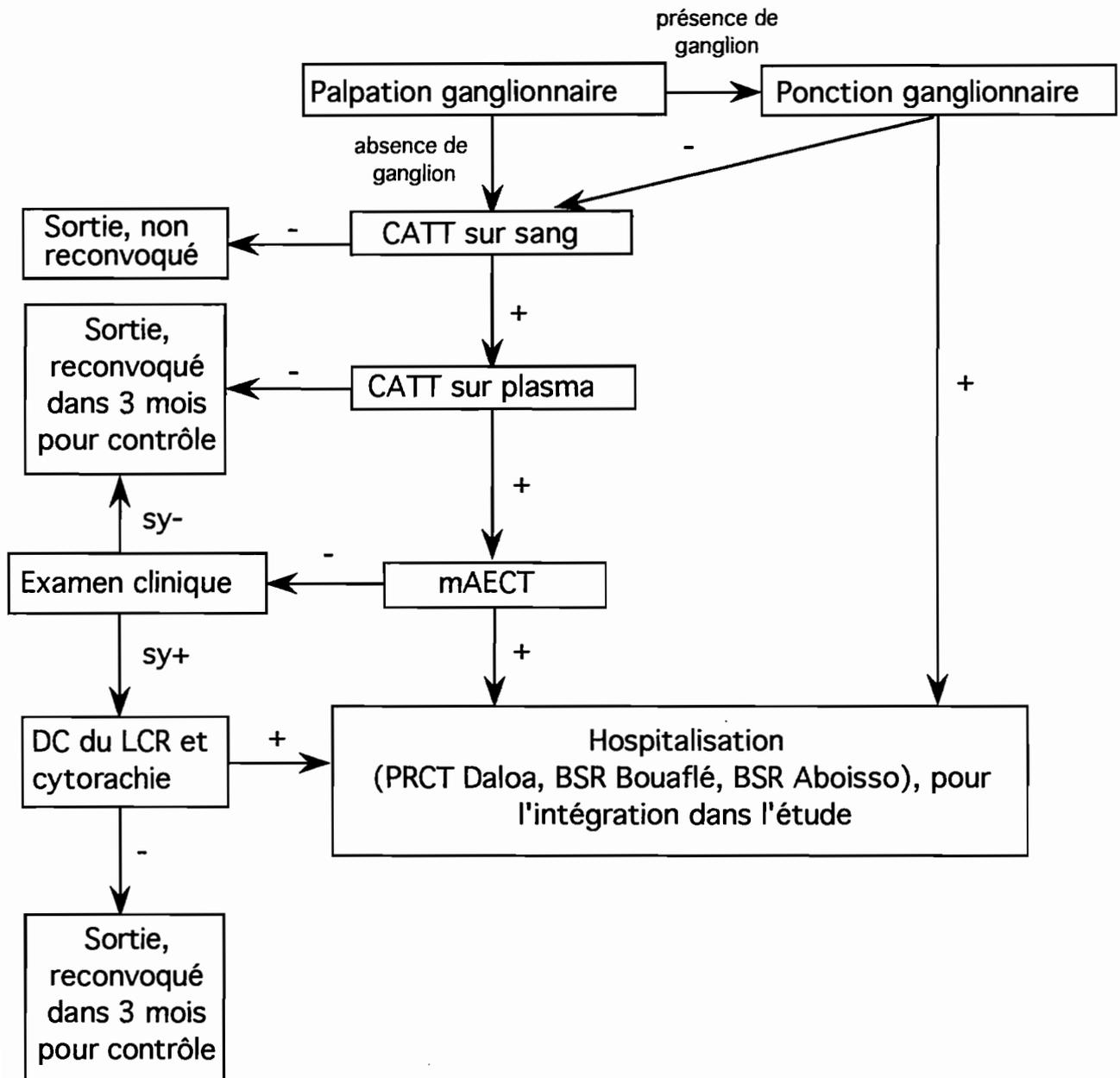
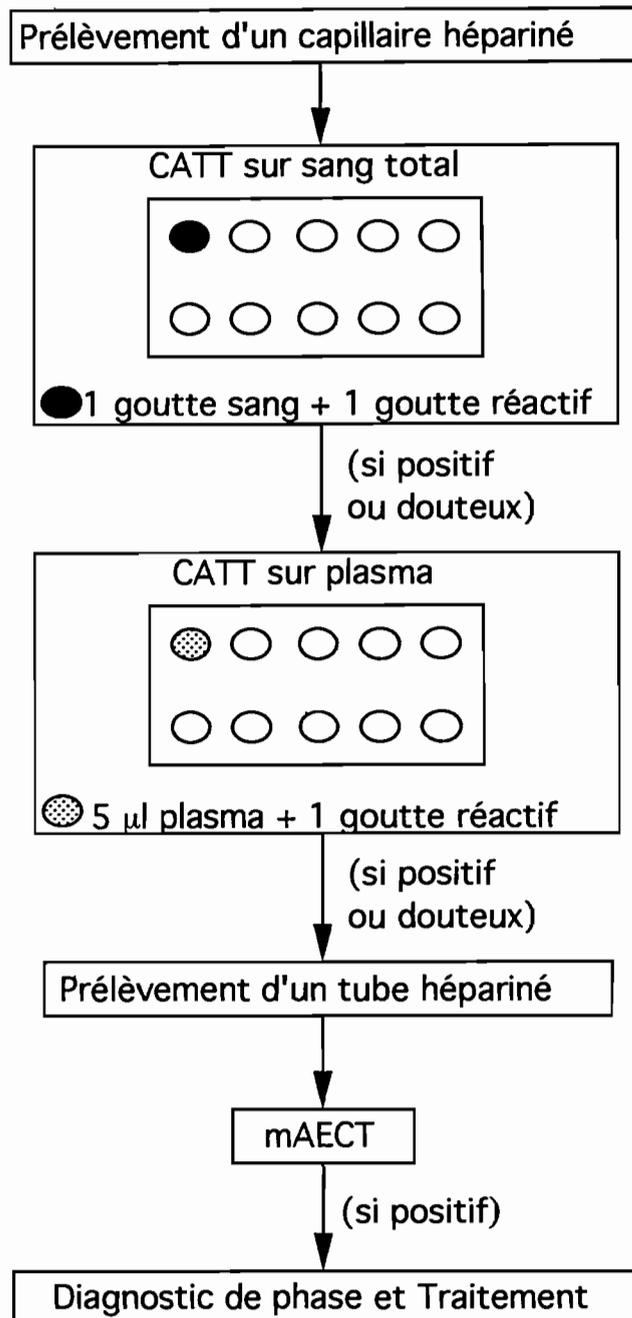


Figure 12. Protocole du dépistage passif mené dans les centres de traitement de la THA en Côte d'Ivoire



sy- = absence de signes d'atteinte neurologique
 sy+ = présence de signes d'atteinte neurologique

Figure 13. Schéma de dépistage actif ou passif (prélèvements et tests) pour un individu



NB: avant le prélèvement du capillaire hépariné, une ponction ganglionnaire est effectuée chez tous les sujets présentant des adénopathies cervicales

Figure 14. Prélèvements et tests effectués sur sang à l'intégration des malades (avant traitement)

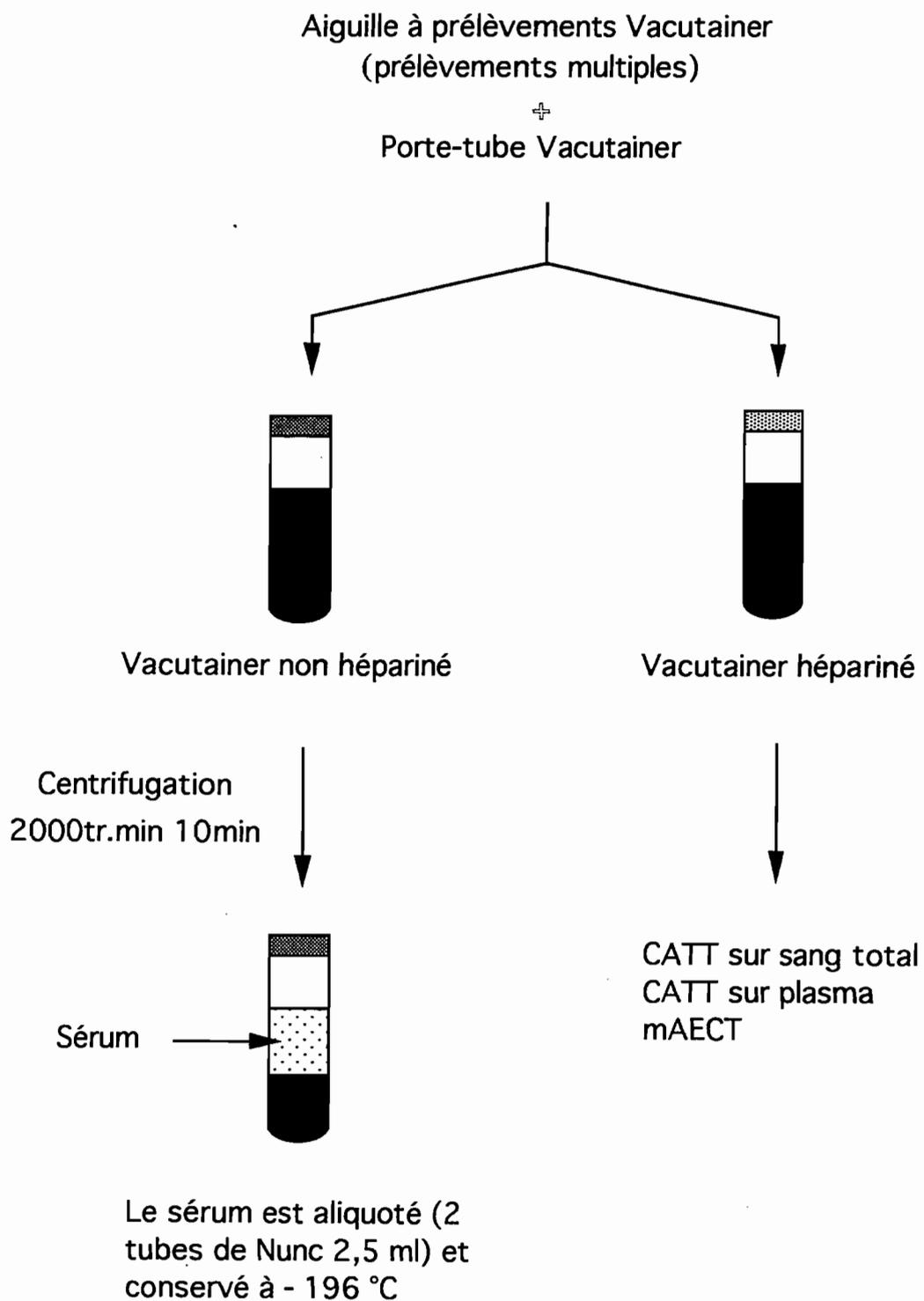
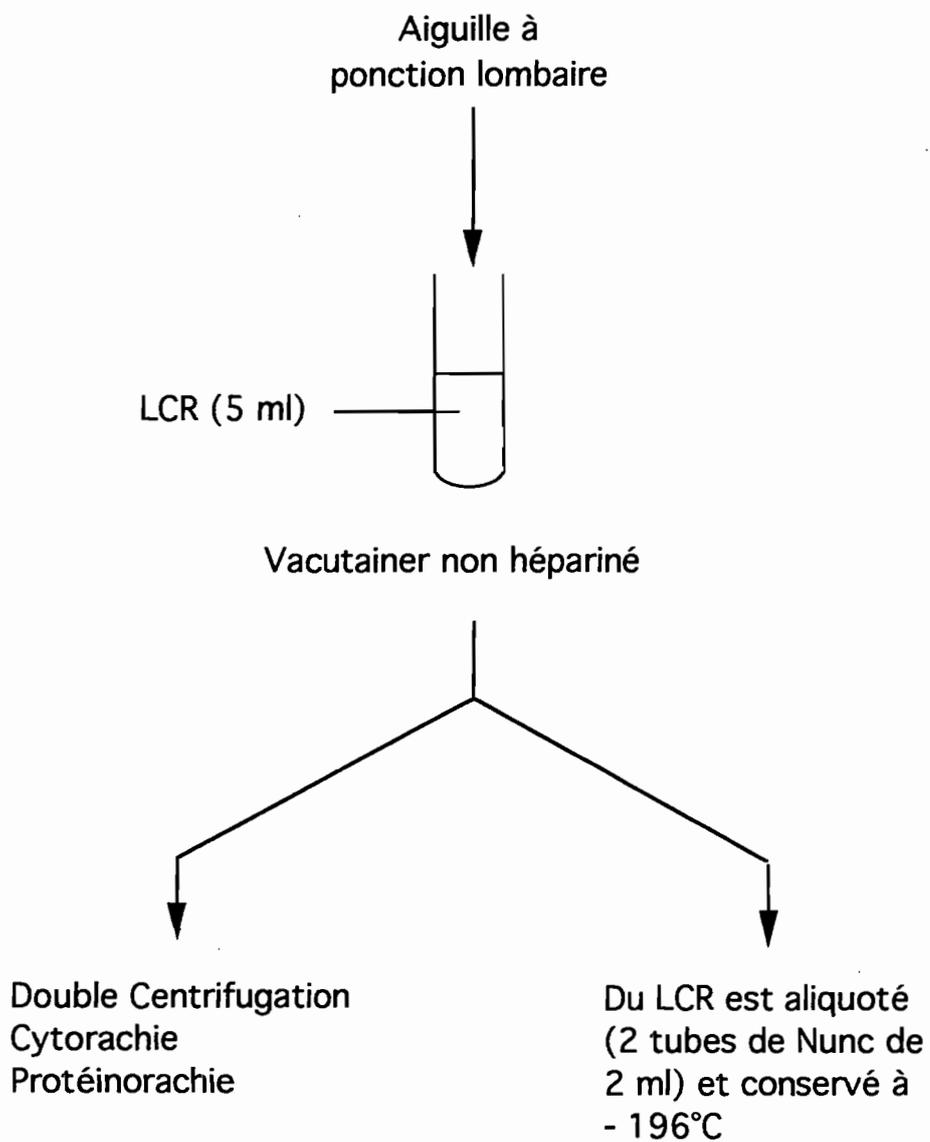


Figure 15. Prélèvement et tests effectués sur LCR à l'intégration des malades (avant traitement)



2.2. Paramètres épidémiologiques

Un questionnaire épidémiologique établi pour chaque patient intégré a pris en compte les variables suivantes :

- N° de traitement et N° de dépistage du sujet
- nom et prénom du sujet et nom du père et de la mère
- sexe, age, nationalité et groupe ethnique du sujet
- zone d'origine (Sud-est ou Centre-ouest)
- foyer d'origine (Sinfra, Bonon, Daloa (foyer niaboua, Vavoua), Bouaflé et Aboisso)
- activité professionnelle (planteur, ménagère, élève, autres)
- antécédents familiaux
- date et mode de dépistage (passif, actif)
- centre de traitement (PRCT Daloa, BSR Bouaflé, BSR Aboisso)
- date du début du traitement

2.3. Bilan clinique

Un bilan clinique a été établi par un infirmier spécialiste de la THA pour chaque sujet d'étude juste avant le début du traitement. La recherche de signes cliniques objectifs a été effectuée lors de l'examen clinique d'entrée par l'infirmier. Cet examen comportait:

- la prise du poids et de la taille
- la prise de température,
- la recherche d'adénopathies cervicales et d'oedèmes
- un examen de l'appareil digestif à la recherche d'une hépatomégalie ou d'une splénomégalie (détectable par simple palpation),
- un examen cardiovasculaire avec analyse du rythme cardiaque par auscultation, mesure de la fréquence cardiaque et de la tension artérielle,
- un examen dermatologique pour rechercher la présence d'un chancre d'inoculation, de trypanides et d'oedèmes et enfin,

- un examen neurologique complet étudiant les paramètres suivants:

- la conscience: tous les degrés d'atteinte sont observables d'une conscience ralentie au coma en passant par un état de confusion mentale
- le comportement: le sujet peut être agité ou indifférent
- l'humeur et le caractère: le sujet peut montrer une certaine euphorie, de la tristesse ou de l'agressivité
- la station debout, la marche ainsi que la motricité des membres supérieurs peuvent être perturbées ou impossibles
- la coordination des mouvements: on peut observer une dysmétrie (incoordination) des membres
- le tonus des membres supérieurs et inférieurs: on peut observer une hypertonie ou une hypotonie des membres
- les réflexes archaïques (palmo - mentonnier, pollico - mentonnier et péri - oraux): ils peuvent être absents ou présents
- les réflexes ostéo-tendineux (rotulien et achilléen): ils peuvent être exagérés ou abolis
- les réflexes cutanés-plantaires: ils peuvent être exagérés ou abolis
- la sensibilité aux piqûres: on peut observer une insensibilité ou une hyperpathie

Un questionnaire permettait de rechercher l'existence de signes cliniques subjectifs (non appréciables par l'infirmier):

- asthénie (sensation de fatigue générale)
- anorexie et/ou amaigrissement
- fièvres ressenties et céphalées fréquentes
- nausées et/ou vomissements
- signes subjectifs cardiaques
- prurit et/ou éruption cutanée
- troubles sexuels (aménorrhée, dysménorrhée ou impuissance)
- troubles du sommeil (insomnie nocturne, somnolence diurne, hypersomnie permanente)
- troubles de la fonction alimentaire (inappétence ou hyperphagie)
- troubles de la soif
- troubles de la fonction sexuelle (libido diminuée ou abolie)
- troubles de la sensibilité (douleurs, hyperpathie)

Ce questionnaire permettait également d'apprécier l'historique de la maladie. Des questions ont été posées:

- quant à la date d'apparition des premiers symptômes (0 à 3 mois, 3 à 6 mois, 6 à 9 mois, 9 à 12 mois et > 12 mois) et
- quant au mode d'installation de la maladie (progressif ou brutal)

L'analyse de l'ensemble des signes cliniques a permis de classer le sujet comme porteur ou non de l'un ou de plusieurs des syndromes suivants (tableau 2):

- syndrome infectieux ou inflammatoire (absent, présent, lourd)
- syndrome cardio-vasculaire (absent, présent, lourd)
- syndrome digestif (absent, présent, lourd)
- syndrome dermatologique (absent, présent, lourd)
- syndrome neuro-psychiatrique central (absent, présent, lourd, très lourd)

Syndromes	Signes cliniques recherchés	Types de réponse attendue
Syndrome infectieux/inflammatoire	Température à l'inclusion Asthénie Anorexie Amaigrissements Fièvres ressenties Céphalées fréquentes	quantitative absent / présent absent / présent absent / présent absent / présent absent / présent
Syndrome digestif	Nausées Vomissements Hépatomégalie Splénomégalie	absent / présent absent / présent absent / présent absent / présent
Syndrome cardiaque	Rythme cardiaque Fréquence cardiaque Tension artérielle Signes subjectifs cardiaques	normal / anormal normal / anormal normal / anormal absent / présent
Syndrome dermatologique	Chancre Trypanides Oedèmes Prurit Eruption cutanée	absent / présent absent / présent absent / présent absent / présent absent / présent
Syndrome neuropsychiatrique central	Troubles du sommeil Troubles sexuels Troubles de la fonction alimentaire Troubles de la soif Troubles de la fonction sexuelle Troubles de la sensibilité Troubles de la conscience Troubles du comportement Troubles de l'humeur et/ou du caractère Troubles de la motricité (station debout et marche) Troubles de la coordination des membres Troubles du tonus des membres Réflexes archaïques Réflexes ostéo-tendineux Réflexes cutané-plantaires Sensibilité objective	absent / somnolence diurne / insomnie nocturne absent / aménorrhées / dysménorrhée / impuissance absent / inapétence / hyperphagie absent / polydipsie absent / libido diminuée / libido abolie absent / hyperpathie absent / conscience ralentie / confusion mentale / coma absent / agitation / indifférence absent / euphorie / tristesse / agressivité absent / motricité perturbée / motricité impossible absent / dysmétrie absent / hypertonie / hypotonie absent / altéré normal / exagéré / abolis normal / exagéré / abolis normal / insensibilité

Tableau 2. Signes cliniques recherchés et syndromes correspondants.

2.4. Paramètres sérologiques et parasitologiques

Un bilan sérologique et parasitologique a été établi pour chaque sujet d'étude juste avant le début du traitement. Les tests effectués ont été les suivants:

- tests sérologiques:

- CATT/*T.b.gambiense* (CATT, Magnus *et al.*, 1978). Le test a été effectué sur sang total (CATT sg) et sur plasma (CATT pl) d'après les instructions fournies avec le KIT.

- tests parasitologiques:

- Palpation et ponction ganglionnaire: en cas de présence d'adénopathies cervicales, le ganglion est ponctionné. La recherche des trypanosomes est faite par examen direct au microscope optique du suc ganglionnaire étalé entre lame et lamelle.
- La recherche des trypanosomes dans le sang veineux a été faite par la minicolonne (mAECT, Lumsden *et al.*, 1979).

Pour le diagnostic de phase (première ou deuxième période), les tests effectués sur le LCR ont été:

- la recherche des trypanosomes par la technique de la double centrifugation (DC, Cattand *et al.*, 1988), et
- la cytorachie (comptage des leucocytes grâce à une cellule de Nageotte).

2.5. Bilan immunologique

Du sérum (2 tubes de Nunc de 1,5 ml) et du LCR (2 tubes de Nunc de 1,5 ml) ont été collectés pour chaque sujet juste avant le début du traitement. Ces tubes ont été conservés dans l'azote (-196°C) avant d'être expédiés à l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (colis carboglacé, -40°C) pour effectuer les dosages suivants:

- Titration du sérum avec le CATT/*T.b.gambiense*: on note la dernière dilution qui donne un résultat positif au test (titre final = Tf). Si Tf est supérieur ou égal à 4, le test est positif (Magnus *et al.*, 1978).
- Titration du sérum avec le Latex/*T.b.gambiense* (Büscher *et al.*, 1991): Si Tf est supérieur ou égal à 16, le test est positif.
- Titration du LCR avec le Latex/*T.b.gambiense*. Si Tf est supérieur ou égal à 1, le test est positif (Büscher *et al.*, 1994; 1999).

- Titration d'IgM spécifiques du LCR avec le test Latex/IgM (Lejon *et al.*, 1998). Si Tf est supérieur ou égal à 32, le test est positif.
- Dosage de la protéinorachie du LCR mesurée par le Kit BCA (Pierce). Il n'y a pas de seuil prescrit par l'OMS concernant ce dosage, néanmoins, d'après Lejon *et al.* (sous presse), un taux supérieur à 750 mg/l est un signe d'atteinte neurologique. Nous utiliserons cette valeur comme seuil de positivité.
- Dosage de l'albumine du sérum et du LCR par néphélogéométrie (Bisser *et al.*, 1997). On détermine le rapport Q (albumine) (Q (alb)) :

$$Q \text{ (alb)} = \frac{\text{concentration d'albumine dans le LCR (mg/l)}}{\text{concentration d'albumine dans le sérum (g/l)}}$$

La barrière hémato-méningée (BHM) est composée de capillaires sanguins très fins qui sont le seul lien entre le système lymphatico-sanguin et le SNC. Ces capillaires empêchent le passage de nombreuses molécules, telle que l'albumine, du sang vers le LCR. En cas d'altération de ces capillaires (manchons périvasculaires, lésions), ces molécules pénètrent dans le LCR. Ainsi, un Q (alb) supérieur ou égal à 7,4 est le signe d'une altération de la BHM (Reiber, 1980; Reiber & Felgenhauer, 1987).

- Dosage des IgM et IgG totaux dans le sérum et le LCR par néphélogéométrie (Bisser *et al.*, 1997; Lejon *et al.*, 1998). Le principe est de déterminer les concentrations en IgM et IgG dans le sérum (g/l) et dans le LCR (mg/l).
- Dosage des IgM et IgG spécifiques (IgM sp et IgG sp) par ELISA (Lejon *et al.*, 1998). Il s'agit de déterminer les concentrations en IgM et IgG dirigés contre 3 différentes GVS spécifiques des trypanosomes de l'espèce *T. b. gambiense* (LiTat 1.3, 1.5 et 1.6) dans le sérum (en unités U) et dans le LCR (en milliunités mU).

Ces 2 derniers dosages permettent de calculer l' « Organism Specific Antibody Index » pour l'IgM et l'IgG (OSAI IgM et IgG) :

$$\text{OSAI IgM} = \frac{\text{IgM sp LCR} / \text{IgM sp sérum}}{\text{IgM LCR} / \text{IgM sérum}}$$

$$\text{OSAI IgG} = \frac{\text{IgG sp LCR} / \text{IgG sp sérum}}{\text{IgG LCR} / \text{IgG sérum}}$$

En cas de non-atteinte du système nerveux, les anticorps produits dans le sang sont aussi présents (en moindre quantité) dans le LCR du fait des échanges entre le système lymphatico-sanguin et le SNC. La présence de ces anticorps (spécifiques ou non des trypanosomes) ne reflète pas la présence des parasites dans le LCR. Les OSAI IgM et IgG

sont alors proches de 1. Par contre, quand les trypanosomes pénètrent dans le SNC, ils provoquent une synthèse intrathécale d'anticorps qui s'ajoutent à ceux déjà présents dans le LCR, les concentrations en IgM et IgG spécifiques augmentent ainsi que les OSAI. Ainsi, des OSAI IgM ou IgG supérieurs ou égaux à 1,5 indiquent une infection du SNC (Peter, 1991; Felgenhauer & Reiber, 1992; Tumani *et al.*, 1995; Reiber, 1998). Dans notre étude, nous considérerons une infection du SNC en cas de positivité de l'un et/ou de l'autres des OSAI.

L'ensemble des dosages effectués permet d'apprécier d'une part l'importance de la réponse immunitaire (synthèse d'anticorps spécifiques des trypanosomes) de l'hôte et d'autre part, le degré d'atteinte du système nerveux (altération de la BHM et infection du SNC).

2.6. Isolement des souches et mise en culture

2.6.1. Isolement

Compte-tenu de la faible virulence des souches de *T. brucei gambiense* chez le rongeur de laboratoire, l'isolement des souches sur rongeurs (in vivo) ne semblait pas souhaitable, il s'est fait selon la méthode KIVI (Kit for *In Vitro* Isolation of trypanosomes, Aerts *et al.*, 1992, Truc *et al.*, 1992). Le milieu d'isolement (GLSH-DCA) est composé d'un mélange à volume égal, de GLSH (glucose, lactalbumine, serum et hémoglobine, Le Ray, 1975) et de solution de Hanks (Hanks & Wallace, 1949; Le Ray *et al.*, 1970) auquel on ajoute du cisaconitate 3 mM (Brun & Schöenberger, 1981). La technique consiste alors à inoculer directement dans un flacon contenant 10 ml de ce milieu, 5 ml de sang prélevés dans une seringue contenant 0,5 ml d'anticoagulant anticomplémentaire (Liquoïde® 5%, polyanetholesulphonate de sodium, Le Ray *et al.*, 1970). Une illustration du protocole est donnée sur la figure 16.

Les flacons récoltés sur le terrain ont été conservés à l'étuve (29°C). Les premiers contrôles ont été faits 8 jours après l'inoculation puis tous les 2 jours jusqu'à détection d'un parasite. Si aucun trypanosome n'a été détecté au bout de 45 jours de contrôle, le KIVI a été considéré négatif. Le milieu d'isolement (KIVI) permet la transformation des formes sanguines en formes procycliques (Aerts *et al.*, 1992). En cas de positivité, les trypanosomes ont été mis en culture sur milieu axénique (Cunningham, 1977) d'après le protocole décrit par Truc *et al.* (1992), détaillé ci-après.

En cours d'étude, des résultats préliminaires ont montré un faible taux d'isolement. Pour pallier ce problème, l'important étant pour nous de récolter le maximum de souches, nous avons effectué 2 KIVI pour certains patients. Le premier KIVI a été ensemencé au moment du dépistage et le deuxième, juste avant le début du traitement.

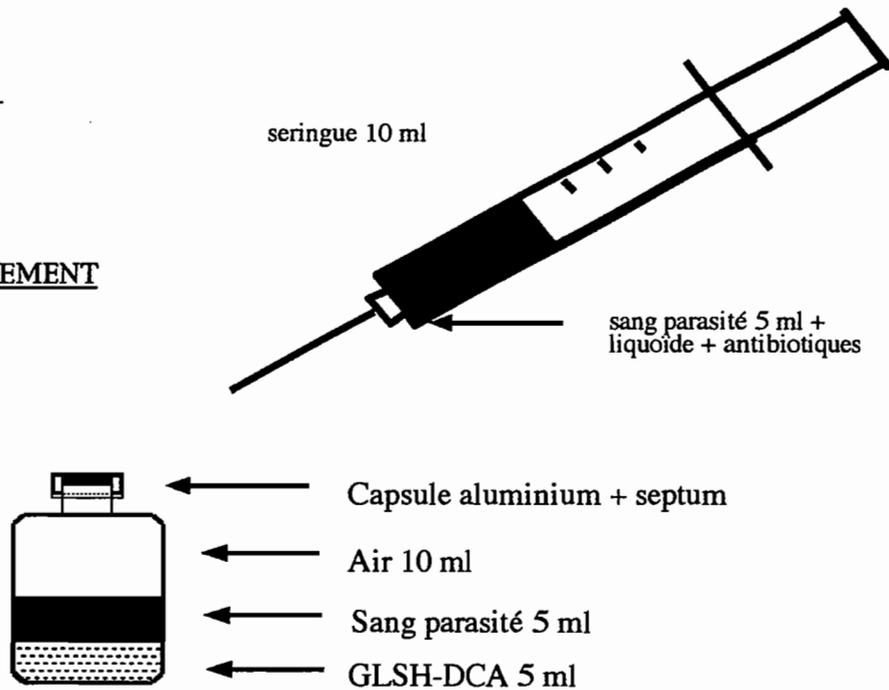
Figure 16. Protocole du KIVI pour l'isolement des trypanosomes

KIVI = K it for *In Vitro* Isolation of trypanosomes

1) PONCTION

seringue 10 ml

2) ENSEMENCEMENT



FLACON TYPE PENICILLINE 20 ml

3) INCUBATION 25/27°C

(transformation des formes sanguicoles en procycliques) 5 à 36 jours

2.6.2. Culture in vitro des formes procycliques de *T. brucei* ssp.

Pour éviter toutes contaminations (bactéries ou champignons), toutes les étapes décrites ci-dessous sont réalisées en conditions stériles, sous une hôte à flux laminaire et à proximité de la flamme d'un bec Bunsen. Tout le matériel consommable utilisé est stérile (pipettes pasteur, pipettes et flacons de culture). Les flacons de cultureensemencés sont conservés dans une étuve à 30°C. Tous les produits chimiques sont des produits Sigma®.

2.6.2.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu de Cunningham (1977) est préparé dans notre laboratoire. Il consiste en un milieu nutritif (mélange d'acides aminés, de glucides, d'acides organiques, de vitamines et de sels inorganiques). Le milieu de culture (MC) est composé de 80% de milieu de Cunningham, de 20% de Sérum Foetal de Veau (SFV) et de 20 µg/ml de gentamicine (antibiotique).

2.6.2.2. Mise en culture

2 ml de MC sont déposés dans un flacon de culture 25 cm² (flacon P1), auxquels on ajoute 3 à 4 gouttes du flacon KIVI dans lequel des trypanosomes ont été mis en évidence. Le flacon est observé au microscope inversé tous les 2 jours, on note la parasitémie selon la méthode décrite par Herbert & Lumsden (1976) Quand la parasitémie atteint 16 à 32x10⁶ parasites par ml, on prépare un deuxième flacon 25 cm² dans lequel on dépose 2 ml de MC et on y ajoute 3 à 5 gouttes du flacon P1. De la même façon, à partir du P2, on obtient un flacon P3. Dans les flacons P2 et P3, il ne reste quasiment plus d'éléments sanguins, les trypanosomes ont une croissance très rapide, on atteint rapidement des parasitémies de 500 à 1000x10⁶ parasites par ml. Il faut ajouter quotidiennement du MC.

Avant de lancer la culture de masse, 2 stabilats sont préparés à partir du flacon P2 ou P3, afin de pouvoir à tout moment, relancer une culture. Le milieu de congélation, composé de 67% de milieu de Cunningham, de 25% de SFV, de 4% de glycérol et de 20 µg/ml de gentamicine est préparé au laboratoire. Dans 2 tubes de Nunc 2,5 ml, on dépose 1 ml de ce milieu auquel on ajoute 0,5 ml du milieu de P2 ou P3. Les tubes ainsi obtenus sont alors cryoconservés à -196°C (azote liquide). Pour relancer une culture, il suffit de ressortir un des stabilats et de le laisser décongeler progressivement à température ambiante avant de faire un repiquage dans un flacon P1.

2.6.2.3. Culture de masse et récolte des trypanosomes

10 ml de MC sont déposés dans un flacon de culture 150 cm² (P4) dans lequel on transvase les contenus de P2 et P3. La parasitémie augmente rapidement, et au bout d'une dizaine de jours, après addition progressive de MC, on obtient une culture de masse avec 100 ml de milieu et une parasitémie de 10⁹ parasites par ml.

Les 100 ml de culture de masse sont centrifugés à 2500 tr/min pendant 15 min dans 2 tubes de centrifugation de 50 ml. Les 2 culots obtenus sont remis en suspension dans un unique tube de Nunc 2,5 ml que l'on centrifuge à 15000 tr/min à 4°C pendant 25 min. Le surnageant est éliminé, on détermine le poids du culot qui est alors inscrit sur le tube de Nunc. Les culots de trypanosomes ainsi obtenus sont cryoconservés à -196°C avant leur utilisation. Pour chaque souche, une deuxième récolte a été effectuée en relançant la culture de masse à partir du flacon P4.

On obtient ainsi 2 culots de trypanosomes de 50 à 100 mg par souche qui vont être utilisés pour l'identification génétique.

2.7 Identification des variants génétiques de *T. brucei* ssp.

L'un des 2 culots récoltés par souche a permis une première identification à l'IPR par la technique d'électrophorèse des isoenzymes sur acétate de cellulose. Le deuxième culot a été expédié l'IRD Montpellier (colis carboglacé, -40°C) pour une identification par la technique des RAPD.

2.7.1. *Electrophorèse d'isoenzymes en acétate de cellulose*

2.7.1.1. Généralités, principe

Les isoenzymes sont des protéines qui ont la même fonction enzymatique mais qui migrent différemment à l'électrophorèse. Ces différences de migration reflètent les différences de charge électrique globale de la molécule, lesquelles dépendent avant tout des variations de la structure primaire de la protéine (enchaînement des acides aminés). Ces variations de la structure primaire sont commandées directement par la séquence nucléotidique du gène codant pour cette protéine. Les isoenzymes sont donc considérés comme des marqueurs génétiques puisqu'elles permettent indirectement de mettre en évidence des variations dans la structure du génome. Les protéines étudiées sont des enzymes classiques du métabolisme (glycolyse). Les

gènes codant pour ces protéines sont souvent polymorphes (ils existent sous la forme de 2 ou plusieurs allèles). Certaines protéines résultent de l'expression de gènes distincts, chacun d'eux pouvant aussi exister sous plusieurs formes alléliques. A un locus donné, les différents allèles pouvant s'exprimer seront visualisés après électrophorèse, par des bandes distinctes. Ces allèles subissent une ségrégation mendélienne au sein des populations. Les profils électrophorétiques (zymogrammes) sont interprétés dans la mesure du possible en terme allélique. Les allèles étant généralement codominants, chacun d'entre eux s'exprime chez les hétérozygotes et sont révélés sur les zymogrammes. Les phénotypes observés sont alors associés à des génotypes alléliques.

2.7.1.2. Méthodes et systèmes enzymatiques

Les protocoles relatifs aux systèmes enzymatiques permettant d'identifier les trypanosomes africains ont été progressivement mis au point en adaptant les protocoles appliqués à d'autres organismes comme par exemple, l'homme, certains insectes (moustiques) ou d'autres kinétoplastidés (Shaw & Prasad, 1969; Kreutzer & Sousa, 1981; Lanham *et al.*, 1981; Tibayrenc *et al.*, 1985; Kaukas *et al.*, 1990). Il existe actuellement environ 30 systèmes enzymatiques adaptés à la caractérisation des trypanosomes. Ces systèmes utilisent des enzymes plus ou moins polymorphes au sein des trypanosomes infectant l'homme. Pour une bonne identification des trypanosomes et pour la reproductibilité des résultats, il faut étudier entre 10 et 20 systèmes enzymatiques selon le degré de polymorphisme des enzymes utilisées (Stevens & Godfrey, 1992; Mathieu-Daudé *et al.*, 1994). Dans notre étude, nous avons étudié 11 systèmes enzymatiques sélectionnés sur la base de résultats obtenus lors d'études ultérieures (enzymes polymorphes): ALAT, GOT, Nhi, Nhd, ME, PEP-2, MDH, IDH, TDH, PGM, effectuées d'après les protocoles décrits par Truc *et al.* (1991) et Truc et Tibayrenc (1993) et SOD effectué d'après le protocole décrit par Stevens *et al.* (1989). Certains protocoles ont été légèrement modifiés pour l'adaptation des protocoles au Laboratoire de l'IPR. Les noms et les codes de ces enzymes sont donnés dans le tableau 3. Quel que soit le système étudié, trois grandes étapes sont nécessaires pour aboutir aux profils enzymatiques (l'extraction des enzymes, l'électrophorèse des enzymes et la coloration des produits de migration).

Sigle	Nom	Code EC
ALAT	Alanine aminotransférase	EC 2.6.1.2
GOT	Glutamate oxaloacétate transaminase	EC 2.6.1.1
NHi	Nucléoside hydrolase (substrat = Inosine)	EC 3.2.2.1
NHd	Nucléoside hydrolase (substrat = Déoxyinosine)	EC 3.2.2.1
ME	Enzyme malique	EC 1.1.1.40
PEP-2	Peptidase (substrat = L-Leucyl-L-Alanine)	EC 3.4.11 ou 13
MDH	Malate déshydrogénase	EC 1.1.1.37
IDH	Isocitrate déshydrogénase	EC 1.1.1.42
TDH	Thréonine déshydrogénase	EC 1.1.1.103
PGM	Phosphoglucomutase	EC 2.7.5.1
SOD	Super oxyde dysmutase	EC 1.15.1.1

Tableau 3. Sigles, noms et codes d'identification (EC = Enzyme Commission) des 11 systèmes enzymatiques étudiés

2.7.1.2.1. Extraction des enzymes

Les culots parasitaires sont décongelés à température ambiante. Pour lyser les trypanosomes sans dénaturer les enzymes, on ajoute un volume égal à celui du culot d'une solution hypotonique contenant un stabilisateur d'enzyme (Godfrey & Kilgour, 1976): Dithiothreitol 0,2 M, acide amino-n-caproïque 0,2 M et EDTA (acide Ethylène-Diamine-Tetra-Acétique) 0,2M. Le mélange est vortexé puis laissé 15 minutes sur de la glace avant d'être centrifugé à 15000 tr/min à 4°C pendant 20 min. Le surnageant récupéré (extrait enzymatique) est ensuite conservé à -196°C sous forme de perles (de 5 à 10 selon le poids des culots récoltés) de 10 µl chacune formées dans un récipient contenant de l'azote liquide.

2.7.1.2.2. L'électrophorèse

Tout le matériel utilisé pour l'électrophorèse (gels, cuves, générateurs et peignes) provient des laboratoires Helena® et tous les produits chimiques proviennent des laboratoires Sigma®. Les tampons de migration, de révélation ainsi que les conditions d'électrophorèse et de révélation des enzymes sont détaillés dans les tableaux 4, 5 et 6.

Les gels d'acétate (ou plaques) sont imbibés dans le tampon de migration (pur ou dilué) pendant 15 minutes avant d'y déposer les extraits à l'aide d'un peigne "super-Z, 12 applications". Le nombre d'applications sur la plaque varie de 1 à 4 selon les systèmes (voir tableau 5). Les gels sont alors disposés face plastifiée vers le haut dans la cuve, dont chaque compartiment a été rempli au préalable de 50 ml de tampon de migration (pur ou dilué). Les

compartiments centraux sont soit remplis d'eau soit garnis d'un système réfrigérant selon les systèmes. Une plaque en verre déposée sur le gel assure un meilleur contact électrique. La durée et le voltage de la migration varient selon le tampon utilisé. Pour certains systèmes, un bloc de glace est déposé sur le couvercle pour refroidir la plaque (voir tableau 5).

Sigle	Tampon	Dilution d'imbibition	Dilution de migration
ALAT	2-Lanham	1/15	75/25
GOT	III-Shaw	25/75	pur
NHi	T.T.NaCl + 10% sucrose	pur	pur
NHd	HR + 10% sucrose	pur	pur
ME	III-Shaw + 5% MgCl ₂	20/80	80/20
PEP-2	III-Shaw	pur	pur
MDH	HR	80/20	pur
IDH	III-Shaw	50/50	pur
TDH	T.T.KCl	50/50	80/20
PGM	3-Kreutzer	1/15	pur
SOD	Tris-borate + 10% sucrose	pur	pur

La composition des tampons électrophorétiques est détaillée dans le tableau 6. Les dilutions d'imbibition et de migration sont faites avec de l'eau distillée.

Tableau 4. Conditions électrophorétiques pour les 11 systèmes étudiés

Sigle	Voltage (en V)	Temps (en min)	Mode de refroidissement*	Nombre d'applications
ALAT	200	45	Boudin/Glace	2
GOT	160	35	Eau	2
NHi	200	20	Eau/Glace	1
NHd	200	40	Eau	1
ME	160	40	Boudin/Glace	2
PEP-2	200	30	Eau	1
MDH	160	40	Eau	2
IDH	160	30	Eau/Glace	1
TDH	160	35	Boudin/Glace	2
PGM	200	15	Boudin/Glace	2
SOD	400	20	Boudin/Glace	4 (dépôt central)

*Eau = eau dans la cuve ; Boudin = éponge réfrigérée dans la cuve ; Glace = glace déposée sur le couvercle de la cuve

Les applications (dépôts des enzymes sur la plaque d'acétate de cellulose) se font avec un peigne d'application Super Z 12 dépôts (Helena laboratoire)

Tableau 5. Conditions électrophorétiques pour les 11 systèmes étudiés (suite)

Tampons d'électrophorèse	Composition
2-Lanham (Tris-Citrate)	Tris 0,66 M, Acide citrique anhydre 0,083 M, PH=8,6
III-Shaw	Tris-Versene-Borate 0,5 M, PH=8
HR (Helena)	Tris-barbital-Sodium Barbital (i=0,075), PH=8,6 à 9
T.T.NaCl	Tris 0,1 M, Tricine 0,2 M, NaCl 0,05 M, PH=7,9
T.T.KCl	Tris 0,02 M, Tricine 0,025 M, KCl 0,01 M, PH=8
3-Kreutzer	Tris 0,1 M, Maléate 0,1 M, EDTA 0,01 M, MgCl ₂ , 0,01 M, PH=7,4
Tris-borate	Tris 0,1 M, Acide borique 0,3 M, PH=7,6

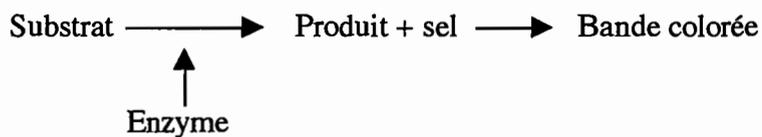
Tableau 6. Composition des tampons d'électrophorèse

2.7.1.2.3. La coloration

La visualisation des protéines (produits de migration) sur le gel utilise les propriétés catalytiques spécifiques de chacune de ces protéines. La plaque d'acétate de cellulose est traitée par une solution contenant:

- le substrat spécifique de l'enzyme à analyser,
- des cofacteurs nécessaires à l'activité de cette enzyme (coenzymes, ions, ...),
- un sel coloré susceptible de réagir avec le produit de la réaction catalysée.

A l'endroit de la plaque où l'enzyme spécifique a migré, aura lieu une réaction pouvant se schématiser ainsi:



Les solutions de coloration spécifiques (tableaux 7 et 8) sont mélangées à 10 ml d'agarose à 1,2% préalablement portés à ébullition puis refroidis et maintenus à 60°C au bain Marie. Le mélange est coulé dans une boîte de Pétri en plastique de 14 cm de diamètre où il se refroidit en moins d'une minute pour former un gel solide. Les plaques sont déposées (face acétate) sur les gels correspondants puis les boîtes sont disposées dans une étuve à 37°C (à l'obscurité) pour la révélation enzymatique. Dans le cas du système SOD, la boîte est conservée à température ambiante et dans l'obscurité totale pendant 10 minutes avant d'être déposée sur un transilluminateur. Dès que les bandes sont suffisamment révélées, les plaques d'acétate sont plongées quelques secondes dans de l'acide acétique glacial pour la fixation, puis rincées à l'eau avant d'être séchées. Dans le cas du système ALAT, le mélange agarose - solution de coloration est coulé sur une table de lecture aux rayons Ultra Violets (UV). La plaque d'acétate est appliquée pendant 1 minute sur le gel refroidi. La révélation se fait progressivement, les bandes sont visualisables aux UV. A la différence des autres systèmes pour lesquels les plaques peuvent être conservées sans traitement particulier, la lecture doit être instantanée car le gel n'est pas conservable.

Sigle	Tampon de réaction	Dilution	Substrats
ALAT	NaH ₂ PO ₄ 0,025 M, Na ₂ HPO ₄ 0,08 M, PH=7,4	pur	Acide alpha-kétoglutarique, 10 mg L-alanine, 10 mg
GOT	Tris-HCl 0,1 M, PH=8	pur	L-acide aspartique, 30 mg Acide alpha-kétoglutarique, 25 mg
NHi	Tris-HCl 0,1 M, PH=8	pur	Inosine, 20 mg
NHd	Tris-HCl 0,1 M, PH=8	pur	2'-Deoxyinosine, 20 mg
ME	Tris-HCl 1 M, PH=7	1/4	Acide malique 1 M, PH=7, 0,6 ml
PEP-2	Tris-HCl 0,1 M, PH=8	pur	L-leucyl-L-alanine, 10 mg
MDH	Tris-HCl 1 M, PH=8	1/4	Acide malique 1 M, PH=7, 0,9 ml
IDH	Tris-HCl 0,1 M, PH=8	pur	DL-acide isocitrique, 10 mg
TDH	Tris-HCl 0,1 M, PH=8	pur	L-thréonine, 100 mg
PGM	Tris-HCl 1 M, PH=8	1/4	Glucose 1-phosphate, 230mg
SOD	Phosphate de sodium, PH=7,5	pur	Riboflavine, 0,0032%

Les autres éléments (enzymes de liaison, activateurs, coenzymes) nécessaires à ces réactions ainsi que les recettes de coloration sont décrites dans le tableau 8.

Tableau 7. Tampons et substrats permettant les réactions enzymatiques spécifiques de chacun des systèmes étudiés.

Sigle	Enzyme de liaison	Activateur	Coenzyme	Colorant
ALAT	LDH, 15 UI		NADH, 2 mg	
GOT			Pyridoxal 5'-phosphate, 3 mg	Fast Blue BB, 20 mg
NHi	Xanthine oxydase, 0,6 UI			MIT 12 mg/ml, 0,1 ml PMS 30 mg/ml, 0,1 ml
NHd	Xanthine oxydase, 0,6 UI			MIT 12 mg/ml, 0,1 ml PMS 30 mg/ml, 0,1 ml
ME		MgCl ₂ 1 M, 0,25 ml	NADP 50 mg/ml, 0,1 ml	MIT 12 mg/ml, 0,2 ml PMS 30 mg/ml, 0,1 ml
PEP-2	L-aminoacide oxydase, 1 mg	MgCl ₂ 1 M, 0,15 ml, MnCl ₂ 0,1 M, 0,15 ml		3-amino-9-éthylcarbazole 10 mg (dilués dans 0,5 ml d'éthanol)
MDH			NAD 40 mg/ml, 0,1 ml	MIT 12 mg/ml, 0,1 ml PMS 30 mg/ml, 0,1 ml
IDH		MgCl ₂ 1 M, 0,25 ml	NADP 50 mg/ml, 0,1 ml	MIT 12 mg/ml, 0,1 ml PMS 30 mg/ml, 0,1 ml
TDH		KCL 1 M, 1 ml	NAD 40 mg/ml, 0,1 ml	MIT 12 mg/ml, 0,1 ml PMS 30 mg/ml, 0,1 ml
PGM	Glucose 6-phosphate déshydrogénase 8 UI	MgCl ₂ 1 M, 0,25 ml	NADP 50 mg/ml, 0,1 ml	MIT 12 mg/ml, 0,1 ml PMS 30 mg/ml, 0,1 ml
SOD			EDTA 0,2 M 0,1 ml	INT 5 mg/ml, 0,5 ml

NAD = Nicotinamide Adénine Dinucléotide, NADH = Nicotinamide Adénine Dinucléotide forme réduite, NADP = Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, EDTA = acide Ethylène-Diamine-Tetra-Acétique , MIT = 4,5-Diméthylthiazolyl Blue, PMS = Phénazine Méthosulphate, INT =

Tableau 8. Enzymes de liaison, activateurs et coenzymes nécessaires à chacune des réactions enzymatiques et colorants permettant de visualiser les réactions sur le gel d'agarose

2.7.1.3. Interprétation des résultats

Pour chacun des systèmes Nhi, ME et SOD, 2 loci sont mis en jeu (un seul locus pour les autres systèmes). Ainsi, 14 loci ont été étudiés. Chaque souche est caractérisée par un ensemble de génotypes unilocus, constitués des différents zymogrammes observés aux différents loci, formant un profil enzymatique. Les stocks présentant le même profil enzymatique sont regroupés sous le terme de zymodème. Le zymodème est donc assimilable à un génotype multilocus dont le statut biologique doit être étudié par l'analyse de génétique des populations

Au cours de notre étude, à chaque stock à été attribué un zymodème prédéfini (Truc *et al.* 1991; 1992; 1997a et b). L'interprétation taxonomique s'est faite en comparaison à des souches de référence (voir tableau 9). La souche SIQUE appartient au Z3, le zymodème le plus fréquemment rencontré en Côte d'Ivoire (Truc *et al.* 1997a). Les souches DAL072, TRAZIE, SINF1, SINF5 1972 et Bub6 appartiennent respectivement aux zymodèmes 1, 2, 11, 12, 38 et 40 qui comme le Z3, font partie du groupe *T. b. gambiense* group 1. Les stocks SH017, SH196, SH276, TH2, TSW53, 132, KK39 et AB14 appartiennent respectivement aux zymodèmes 6, 7, 10, 14, 15, 30, 33 et 37 du groupe *T. b. gambiense* group 2. Une souche de *T. congolense* (TSW103, Gashumba *et al.*, 1988) a aussi été intégrée à titre comparatif. Les phénotypes correspondant aux zymodèmes des souches de référence sont détaillés dans le tableau 10.

Un dendrogramme a été construit selon la méthode de Jacquard (1973) dont le principe est de calculer la distance (Dj) entre tous les zymodèmes selon la méthode décrite par Sneath & Sokal (1973). Cette distance permet de quantifier la ressemblance phénétique entre 2 zymodèmes :

$D_j = 1 - C/(2N - C)$ où C = nombre de bandes communes aux 2 zymodèmes et N = nombre total de bandes révélées

Souche	Hôte	Année d'isolement	Pays d'isolement	Foyer de provenance	Zymodème	Sous-espèce	Référence
DAL072	Homme	1978	CI	Vavoua	1	T. b. g 1	1
Trazie	Homme	1991	CI	Sinfra	2	T. b. g 1	2
Sique	Homme	1991	CI	Sinfra	3	T. b. g 1	2
SH017	Homme	1989	CI	Aboisso	6	T. b. bfl	2
SH196	Homme	1990	CI	Daloa	7	T. b. bfl	2
SH276	Homme	1992	CI	Daloa	10	T. b. bfl	2
SINF1	Homme	1992	CI	Sinfra	11	T. b. g 1	2
SINF5	Homme	1992	CI	Sinfra	12	T. b. g 1	2
TH2	Homme	1978	CI	Daloa	14	T. b. bfl	3
TSW53	Porc	1982	CI	Bouaflé	15	T. b. bfl	1
TSW103	Porc	1977	Libéria	Sanniquelle	27	T. congo	4
132	Kob	1993	CI	Comoé	30	T. b. bfl	5
KK39	Kob	1980	CI	Comoé	33	T. b. bfl	6
AB14	Bubale	1980	CI	Comoé	37	T. b. bfl	1
1972	Homme	1993	CI	Sinfra	38	T. b. g 1	2
Bub6	Bubale	1994	CI	Marahoué	40	T. b. g 1	2

CI = Côte d'Ivoire

T. b. g 1 = *Trypanosoma brucei gambiense* groupe 1, T. b. bfl = *Trypanosoma brucei* groupe bouaflé, T. congo = *Trypanosoma congolense*

Références: 1 = Stevens *et al.*, 1992; 2 = Truc *et al.*, 1997a; 3 = Melhitz *et al.*, 1982; 4 = Gashumba *et al.*, 1988; 5 = Truc *et al.*, 1997b et 6 = Young & Godfrey, 1983

Tableau 9. Description des souches de référence

Tableau 10. Phénotypes isoenzymatiques des souches de référence

Souches.Loci	ALAT	GAPD	GOT	GPI	IDH	MDH	ME1	ME2	NHi1	NHi2	NHd	PEP2	PGD	PGM	SODa	SODb	TDH
Z1/DAL072	6-7-8	4	8	7	5	5-6	2	1-2-3	3	3-4	9	4	7	11-12	3-6-7-12-14	3-5	3
Z2/TRAZIE	6-7-8	4	5-7-8	7	5	5-6	2	1-2-3	3	3-4	9	1-2-4	7	11-12	3-6-7-12-14	3-5	3
Z3/SIQUE	6-7-8	4	5-7-8	7	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	7	11-12	3-6-7-12-14	3-5	3
Z6/SH017	4-5-6	4	8	7	5	5-6	2	99	3	3	8-9	1-4	7	11-12	1-2-5-11-13	3-7	3
Z7/SH196	4	4	8	7	5	5-6	2	99	3	3	9	1-4	7	11-12	1-2-5-11-13	3-7	3
Z10/SH276	4-5-6	4	8	7	5	5-6	2	3	3	3	8-9	1-4	7	11-12	1-2-5-11-13	3-7	3
Z11/SINF1	6-7-8	4	5-7-8	7	5	5-6	2	3	3	3	9	1-2-4	7	11-12	3-6-7-10-11	3-7	3
Z12/SINF5	6-7-8	4	5-7-8	7	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1	7	11-12	3-6-7-12-14	3-7	3
Z14/TH2	6	4	5-7-8	7	5	5-6	2	3	3	3	9	1-2	7	11-12	1-2-5-11-13	3-7	3
Z15/TSW53	4-5-6	4	8	7	5	5-6	2	3	3	3	9	1-4	7	11-12	1-2-5-11-13	3-7	3
Z27/TSW103	3	3	4	1	5	4-7	3-4-5	99	3	1	2-3-4	7-9	4	6-9	4-12	1-4	2
Z30/132	6	4	7	7	5	5-6-8	2	3	3	3	1-12	1-4	7	11-12	1-2-5-11-13	3-7	3
Z33/KK39	5-6	4	8	7	5	5-6	2	3	3	3	9-11	1-4	7	11-12	1-2-5-11-13	3-7	3
Z37/AB14	5-6	4	5-7-8	7	5	5-6	2	3	3	3	9-11	1-2-4	7	11-12	1-2-5-11-13	3-7	3
Z38/1972	6-7-8	4	5-7-8	7	5	5-6	2	3	3	3	9	1-2-4	7	11-12	3-6-7-12-14	3-5	3
Z40/Bub6	4	4	5-7-8	7	5	5-6	2	1	3	3	9	1-2-4	7	11-12	3-6-7-12-14	3-5	3

2.7.2. RAPD

2.7.2.1. Généralités, principe

La technique RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) a été développée par Welsh & McClelland (1990) et Williams *et al.* (1990). Le principe consiste à amplifier l'ADN génomique avec des amorces décarnériques choisies arbitrairement. Les amorces permettent l'amplification de fragments d'ADN (de 100 à 3000 paires de bases) qui sont alors séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments amplifiés et révélés déterminent un profil génétique. Il s'agit alors de comparer les profils obtenus.

La technique des RAPD appliquée à la caractérisation des protozoaires parasites (Tibayrenc *et al.*, 1993) semble être plus discriminative que l'électrophorèse d'isoenzymes et devrait mettre en évidence une plus grande diversité génétique au sein d'un même échantillon de souches.

2.7.2.2. Méthodes

Trois grandes étapes sont nécessaires pour obtenir les profils électrophorétiques qui seront analysés: l'extraction de l'ADN, l'amplification des extraits d'ADN obtenus, et l'électrophorèses des produits d'amplification.

2.7.2.2.1. Extraction de l'ADN

On utilise la technique d'extraction au phénol-chloroforme. L'ADN est purifié à partir du culot parasitaire. Cette étape comprend quatre phases:

- la lyse des cellules: le culot est remis en suspension dans un tampon de lyse (Tris-HCL 100mM pH 8, EDTA 50 mM, Sodium Dodecyl Sulfate 1%). On y ajoute successivement 200 µg/ml de Rnase (2 heures à 37°C) et 200 µg/µl de Protéinase K (une nuit à 55°C). Les ARNs et protéines sont dégradés.
- l'extraction des protéines: les protéines sont éliminées par 2 extractions au phénol puis 2 extractions au chloroforme/alcool isoamylique (24Vol./1Vol.). Le chloroforme est éliminé par 3 extractions à l'éther saturé en eau, lui-même éliminé par évaporation sous vide (10 min dans un évaporateur-concentrateur).

- précipitation de l'ADN: l'ADN est précipité en présence de NaCl 0,1 M et d'éthanol 70% froid, à -20°C pendant une nuit. Après centrifugation à 12000 x g pendant 30 min, le culot est lavé 2 fois dans de l'éthanol 70% pour éliminer le sel. Il est alors séché et dissous dans de l'eau stérile pure.

- dosage de l'ADN: la concentration de l'ADN est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm. On vérifie la qualité et la pureté de l'ADN par simple électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7%.

Les ADN sont alors stockés à une concentration comprise entre 500 ng/μl et 1 μg/ μl.

2.7.2.2.2. Amplification

Pour éviter les contaminations (amplification d'ADN étrangers), le milieu d'amplification (Tris-HCL 10mM pH 8,3; MgCl₂(6H₂O) 1,5 mM; KCl 50 mM; dNTP 100 μM chacun; amorce 200 μM; Taq DNA Polymérase 1,5 U) est préparé sous une hotte protégée (préalablement stérilisée aux UV et à l'eau de javel) dans un laboratoire où aucun ADN n'est manipulé. L'ADN matrice (20 ng) est ajouté dans un autre laboratoire et l'amplification est effectuée dans un troisième laboratoire. Un témoin négatif (milieu réactionnel sans ADN) est inclus dans chaque série d'amplifications pour révéler les éventuelles contaminations. L'amplification est effectuée dans un thermocycleur (Programmable Thermal Controller 100 de MJ Research).

Le programme comporte 45 cycles composés de trois étapes: la dénaturation (1 min à 94°C), l'hybridation (1 min à 36°C) et l'élongation (2 min à 72°C). Un dernier cycle de 7 min à 72°C permet aux synthèses en cours de se terminer.

2.7.2.2.3. Electrophorèse et lecture

Les fragments d'ADN amplifiés sont séparés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose (20 cm x 24 cm, 60 puits) à 1,6% en tampon TAE (Tris acétate 40 mM, EDTA 1mM). On dépose dans chacun des puits 20 μl de l'échantillon amplifié mélangé à 2 μl de tampon de charge (Bleu de bromophénol 0,25%; Ficoll 400 (Amersham Pharmacia Biotech) 15%). Le tampon de charge facilite le dépôt en augmentant la densité du mélange et indique le front de migration. Un marqueur de poids moléculaire est déposé dans 4 puits et après 5 à 6 heures de migration à 65 Volts, le gel est immergé (45 min) dans un bain de tampon TAE

contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (BET). Le BET se fixe sur les fragments d'ADN et permet de visualiser les différents fragments par fluorescence sous exposition aux ultraviolets.

Les bandes sont codées : la bande 1 correspond au fragment amplifié le plus lourd (fragment présentant la plus faible mobilité électrophorétique). La lecture ne prend pas en compte les bandes dont la luminosité est insuffisante et dont la présence est potentiellement artificielle. Certaines manipulations ont été répétées 2 ou 3 fois en utilisant le même protocole pour s'assurer de la reproductibilité de certains niveaux de bandes.

2.7.2.3. Analyse des résultats

Sept amorces définies par Operon Technologie (tableau 11) ont été sélectionnées par Bruno Oury au Centre d'Etude sur le Polymorphisme des Microorganismes au centre IRD de Montpellier, pour la caractérisation génétique de nos souches. Sept souches de référence ont été incluses dans l'étude (tableau 12): Jua et Peya représentant le groupe 1 de *T. b. gambiense*, KP465 et TSW65 représentant le groupe *T. b. bouaflé*, 058clA3 représentant la sous-espèce *T. b. rhodesiense*, Eatro 1125 représentant la sous-espèce *T. b. brucei* et TRPZ105 représentant l'espèce *T. congolense*.

Amorce	Séquence 5'-3'
A2	TGCCGAGCTG
A4	AATCGGGCTG
A7	GAAACGGGTG
A8	GTGACGTAGG
A10	GTGATCGCAG
A11	CAATCGCCGT
A18	AGGTGACCGT

Tableau 11. Amorces utilisées et séquences nucléotidiques correspondantes

Souche	Hôte	Année d'isolement	Pays d'isolement	Sous-espèce	Référence
Jua	homme	1979	Cameroun	T. b. g 1	1
Peya	homme	1980	Congo	T. b. g 1	1
KP465	porc	1991	Côte d'Ivoire	T. b. bfl	2
TSW65	porc	1982	Côte d'Ivoire	T. b. bfl	3
058clA3	homme	1974	Zambie	T. b. rh	4
Eatro 1125	m. s.	1966	Ouganda	T. b. b	5
TRPZ105	chien	1981	Zambie	T. congo.	6

m. s. = mammifère sauvage

T. b. g 1 = *Trypanosoma brucei gambiense* groupe 1 et T. b. bfl = *Trypanosoma brucei* groupe bouaflé, T. b. rh = *Trypanosoma brucei rhodesiense*, T. b. b = *Trypanosoma brucei brucei*, T. congo. = *Trypanosoma congolense*

Références: 1 = Truc, 1991; 2 = Truc *et al.*, 1997a; 3 = Stevens *et al.*, 1992; 4 = Gibson *et al.*, 1980; Hide *et al.*, 1990; 6 = Gashumba *et al.*, 1988

Tableau 12. Description des souches de référence

Chaque souche est représentée par un ensemble de profils obtenus avec les différentes amorces. A partir de la matrice des distances de Jaccard (Jaccard, 1973), un dendrogramme UPGMA a été construit. Cette méthode agglomérative permet une classification par hiérarchie ascendante des souches.

Distance de Jaccard: cette distance phénétique permet de quantifier les degrés de dissemblance génétique entre les souches à partir du nombre de bandes communes. Elle est calculée pour chaque paire de souches selon la formule suivante:

$$D_{ij} = 1 - (a/a+b+c)$$

a = nombre de bandes communes aux stocks i et j

b = nombre de bandes présentes chez le stock i et absentes chez le stock j

c = nombre de bandes présentes chez le stock j et absentes chez le stock i

2.8. Méthodes statistiques

La comparaison entre 2 variables qualitatives sera effectuée au moyen du test de CHI 2 de Pearson. Lorsque les conditions d'utilisation du CHI 2 ne seront pas réunies, nous utiliserons le test exact de Fisher. La comparaison de moyennes dans le cas des variables quantitatives sera exécutée au moyen d'une analyse de variance après avoir vérifié la validité des conditions d'application de ce test. Enfin, une régression logistique sera effectuée pour l'analyse multivariée. Le seuil de signification retenu pour les tests sera de 5%.

L'ensemble de ces analyses sera réalisé par le logiciel BMDP (BMDP statistical Software, University of California, Los Angeles, California).

3. Matériel et Méthodes de la deuxième enquête : Suivi sérologique, parasitologique et clinique à long terme de trypanosomés refusant le traitement

3.1. Population suivie

Notre suivi a été effectué dans le foyer de Sinfra (annexe 2). L'organisation actuelle (réseau d'ASC) nous a permis de connaître le lieu de résidence de chacun des 588 patients dépistés pendant la campagne de lutte de 1995 et 1996, et de connaître leur devenir après le dépistage. La plupart des patients ont été traités au PRCT de Daloa et à la BSR de Bouaflé immédiatement après le dépistage, mais 63 d'entre eux, pour des raisons diverses (refus du traitement, méconnaissance de la maladie) n'étaient toujours pas traités au début de l'année 1997. Notre population d'étude a été composée de ces 63 sujets.

3.2. Fréquence de nos visites

Ces sujets ont été régulièrement suivis afin de tenter avant tout de les convaincre de se faire traiter. Outre une stimulation auprès des patients eux-mêmes, de leur famille ou de la communauté villageoise, des contrôles biologiques ont été réalisés à 3 reprises (juin 97, janvier 98 et mars 99), afin de confirmer l'existence de la maladie et de connaître son évolution (sérologique, parasitologique et clinique). Pour certains sujets, des données (biologiques et cliniques) ont été recueillies lors de prospections médicales organisées dans le foyer.

Au cours de la première visite en juin 1997, nous avons d'abord, avec l'aide des ASC, rassemblé les informations nécessaires pour savoir ce qu'étaient devenu les 63 sujets entre leur date de dépistage et juin 97. Les patients localisés ont été convoqués au centre de santé de Sinfra. Lors des deuxième et troisième visites, seuls les sujets toujours non-traités ont été reconvoqués. Un fort taux d'absentéisme a été enregistré à chaque visite. Notre équipe s'est souvent déplacée jusque sur les lieux de résidence des patients pour les convaincre de se rendre au centre pour un bilan de santé ou pour le cas échéant, effectuer les prélèvements au domicile du patient.

3.3. Suivi clinique

Pour pouvoir évaluer l'évolution clinique, un questionnaire a été établi pour chaque patient à chacune de nos rencontres. L'interrogatoire a permis de recueillir des informations subjectives (ressenties) telles que fièvres, céphalées, asthénie, amaigrissement, appétit, boulimie, anorexie, insomnies nocturnes, somnolence diurne, activité sexuelle, troubles cutanés (prurit, éruption cutanées). D'autres part, certains signes objectifs concernant le comportement, l'humeur, le caractère et la motricité (station debout, marche) ont été recherchés.

On distingue alors:

- les sujets ne présentant aucun signes cliniques (sy -),
- les sujets présentant des signes cliniques tels que fièvres, céphalées, asthénie, amaigrissement, troubles digestifs ou cutanés, mais sans atteinte neuro-psychiatrique (sy +),
- les sujets présentant une atteinte neuro-psychiatrique: troubles de la fonction sexuelle, troubles du sommeil, du comportement ou de la motricité (sy ++).

3.4. Suivi sérologique et parasitologique

Pour le suivi sérologique, nous avons effectué le CATT sur plasma (CATT pl, Magnus *et al.*, 1978). Pour le suivi parasitologique, la recherche des trypanosomes dans le sang veineux a été faite par la mAECT. Les ganglions hypertrophiés (adénopathies cervicales) ont été ponctionnés, et la recherche des trypanosomes a été faite par examen direct du suc ganglionnaire étalé entre lame et lamelle.

En accord avec le PNLTHA, nous avons proposé lors de la troisième visite, de faire une ponction lombaire à tous les sujets restés positifs en sérologie et/ou en parasitologie pendant le suivi, ainsi qu'à tous les sujets présentant des signes cliniques (seuls les patients ayant donné leur accord ont été prélevés). La recherche des trypanosomes dans le LCR a été faite par la technique dite de la simple centrifugation (SC). Du LCR de chacun des patients ponctionnés a été conservé à -196°C pour effectuer ultérieurement au laboratoire:

- le test d'agglutination au Latex pour la détection d'IgM dans le LCR humain (Latex/IgM, Lejon *et al.*, 1998). Le test est d'abord effectué avec du LCR non dilué et en cas de positivité, des dilutions successives de LCR sont testées. On note alors la dernière dilution pour laquelle le résultat du test est positif (présence d'agglutinations bien visibles). On considère une atteinte du système nerveux si cette dernière dilution est supérieure ou égale à 1/32.
- la technique de détection des trypanosomes par PCR (PCR/LCR) selon le protocole décrit par Truc *et al.* (1999, article en annexe 11). Les amorces utilisées, TBR1 et TBR2 sont spécifiques de *T. brucei* s.l. (Moser *et al.*, 1989). Cette technique a été élaborée lors de cette thèse, sur des échantillons de LCR prélevés dans le cadre de la première enquête. A titre de comparaison, trois LCR provenant de témoins positifs à la SC ont été utilisés lors de la lecture de ces 2

derniers tests. Les résultats seront présentés pour chacune des visites (juin 97, janvier 98 et mars 99) pour suivre l'évolution de la sérologie et de la parasitologie ainsi que l'évolution clinique.

3.5. Isolement et identification des souches

Un KIVI a été ensemencé pour l'isolement in vitro des souches chez tous les sujets positifs en parasitologie lors du suivi. En cas de positivité du KIVI, les trypanosomes ont été mis en culture d'après le protocole décrit par Truc *et al.* (1992). Les souches récoltées ont été conservées à -196°C avant d'être identifiées par la technique d'électrophorèse des isoenzymes sur acétate de cellulose. Onze systèmes enzymatiques (14 loci) ont été étudiés: ALAT, GOT, Nhi, Nhd, ME, PEP-2, MDH, IDH, TDH, PGM, effectués d'après les protocoles décrits par Truc *et al.* (1991) et Truc et Tibayrenc (1993) et SOD effectué d'après le protocole décrit par Stevens *et al.* (1989). Tous les protocoles techniques sont détaillés dans les paragraphes 2.6 et 2.7.1. Les souches ont été testées en parallèle avec un témoin zymodème 3, le zymodème le plus fréquemment rencontré en Côte d'Ivoire. Ce zymodème appartient au groupe 1 de *T. b. gambiense* (Gibson, 1986).

Nous venons de détailler le matériel et les méthodes utilisées lors de nos 2 enquêtes visant à étudier l'origine de la variabilité clinique observée en matière de THA. Les résultats obtenus sont présentés dans la cinquième partie de cette thèse.

Cinquième partie : Résultats

Les populations étudiées ainsi que les objectifs et les méthodes utilisées sont différents d'une enquête à l'autre. Les résultats seront donc présentés séparément. La première partie détaillera les résultats de la première enquête: isolement des souches, identification génétique des souches isolées, bilan clinique des sujets intégrés et recherche de corrélations entre la variabilité génétique et la variabilité clinique. La deuxième partie détaillera les résultats de la deuxième enquête: résultats du suivi sérologique, parasitologique et clinique, à long terme, de sujets refusant le traitement. A la fin de cette cinquième partie, le tableau 37, résumant notre stratégie d'analyse, permet au lecteur d'avoir d'une part une vision globale de l'ensemble de nos résultats et d'autre part, les questions que nous nous sommes posées à chaque étape de cette partie.

1. Résultats de la première enquête : diversité des formes cliniques de THA et variants génétiques de *T. brucei* ssp.

Dans cette étude, l'objet principal est la recherche d'associations entre la présentation clinique des patients et le caractère génétique des souches isolées de ces patients. Pour des raisons qui seront discutées, de nombreuses souches n'ont pu être isolées et notre population d'étude peut être divisée en 2 groupes :

- Un groupe de sujets pour lesquels la souche a été isolée et que nous appellerons groupe " souches isolées ";
- Un groupe de sujets pour lesquels l'isolement a échoué et que nous nommerons groupe " souches non-isolées ".

Dans un premier temps, nous décrirons la population dans sa totalité (description épidémiologique). On abordera alors les résultats de l'isolement et de la caractérisation isoenzymatique des souches de ces patients. Lors de cette étape, une comparaison des groupes " souches isolées " et " souches non-isolées " sera effectuée. Cette comparaison portera sur les variables suivantes: mode de dépistage, centre de traitement, foyer d'origine, sexe, âge, nationalité, ethnie, profession et présence d'antécédents familiaux et son objectif est de savoir si ces variables influencent ou non l'isolement in vitro des souches. En effet, l'existence de différences entre les populations " souches isolées " et " souches non-isolées " devra

nécessairement être prise en compte au moment de l'analyse de nos résultats. Nous détaillerons ensuite les résultats de l'analyse clinique. Enfin, la recherche d'éventuelles corrélations entre la diversité génétique des souches et une possible diversité clinique se limitera aux sujets " souches isolées ".

1.1. Description générale des patients

Les données relatives à la description générale des patients sont présentées en annexe 4.

1.1.1. Dépistage, centre de traitement et origine géographique

Au total, 139 trypanosomés ont été pris en charge dans le cadre de notre étude, parmi lesquels:

➤ 68 ont été dépistés de façon passive au PRCT de Daloa, à la BSR de Bouaflé ainsi qu'au centre de Santé de Sinfra (tableau 13);

➤ 71 ont été dépistés de façon active lors de prospections médicales (tableau 14) :

- la prospection menée dans le foyer de Sinfra (12/96 à 01/97) a permis de dépister 86 patients parmi lesquels 42 ont pu être intégrés. Les 44 autres sujets ont refusé le traitement ou été traités à la BSR de Bouaflé avant le début de l'étude dans ce centre.

- les 2 prospections menées dans le foyer d'Aboisso ont permis de dépister 10 patients sur 8000 personnes visitées. Neuf patients ont pu être inclus (le dixième avait moins de 8 ans).

- les 2 prospections menées dans le foyer de Bonon (05/98 et 12/97) ont révélé 33 patients parmi lesquels 20 seulement ont été intégrés. En effet, après la prospection de 05/98, 13 patients sur les 21 dépistés n'ont pas pu faire partie de notre population d'étude car 3 avaient moins de 8 ans et 10 ont été traités au PRCT après cessation de l'étude dans ce centre (décembre 1997).

Des cartes de répartition des patients et séropositifs dépistés lors de ces prospections ont été établies par le Laboratoire des Sciences Humaines de l'IPR. L'une de ces cartes (Aboisso 07/97) est donnée en annexe 5.

Centres de dépistage	PRCT Daloa	BSR Bouaflé	BSR Aboisso	CS Sinfra	Total
Nombre de patients dépistés passivement	17	21	0	30	68

Tableau 13. Lieux de dépistage des 68 patients dépistés passivement et intégrés dans l'étude

Prospections médicales	Sinfra 12/96-01/97	Aboisso 07/97	Aboisso 11/97	Bonon 12/97	Bonon 05/98	Total
Personnes visitées	16000	4187	2941	2700	5124	30952
Nombre de séropositifs	125	22	17	17	30	208
Patients dépistés	86	7	3	12	21	129
Prévalences (pour 1000)	5,37	1,67	1,02	4,44	4,1	4,1
Patients intégrés	42	6	3	12	8	71

Tableau 14. Bilan des prospections médicales menées dans le cadre de l'étude

Centres de traitement	PRCT Daloa	BSR Bouaflé	BSR Aboisso	Total
Nombre de patients traités	66	64	9	139

Tableau 15. Centre de traitement des 139 patients intégrés dans l'étude

Parmi les 139 patients composant notre population d'étude, 64 ont été traités à la BSR de Bouaflé, 66 au PRCT de Daloa et 9 à la BSR d'Aboisso. Ainsi, 9 patients proviennent de l'est du pays et 130 du centre-ouest (Daloa, Bouaflé, Sinfra et Bonon) (tableau 15).

Zone d'origine	Sud-est	Centre-ouest			
Nombre de patients	9	130			
Foyer d'origine	Aboisso-Ayamé	Daloa	Bouaflé	Sinfra	Bonon
Nombre de patients	9 (actifs)	8 (passifs)	13 (passifs)	82 (42 actifs, 40 passifs)	27 (20 actifs, 7 passifs)

Tableau 16. Provenance et mode de dépistage des 139 patients intégrés

Sur les 130 patients dépistés dans le Centre-ouest, 82 résidaient dans le foyer de Sinfra, 27 dans celui de Bonon, 13 dans celui de Bouaflé et 8 dans celui de Daloa (tableau 16). Selon les foyers, les proportions de patients dépistés activement et passivement sont très variables. Aucun patient n'a été dépisté de façon passive à la BSR d'Aboisso. Par contre, aucun patient n'a été dépisté de façon active dans les foyers de Bouaflé et Daloa du fait de l'absence de prospections médicales dans ces foyers pendant la durée de l'étude.

1.1.2. Sexe, age, nationalité, groupe ethnique

Notre population d'étude se composait de 78 hommes et 61 femmes, soit un sex-ratio (homme/femme) de 1,28. La moyenne d'âge à l'intégration était d'environ 32 ans (8 ans à 74 ans).

Parmi les 139 sujets d'étude, 82 avaient la nationalité ivoirienne, 36 la nationalité burkinabée, 17 étaient maliens, 3 guinéens et 1 nigérian. Ils se répartissent en 14 ethnies. Pour simplifier l'interprétation des résultats, nous avons procédé au regroupement suivant:

- 24 Gouros, 11 Baoulés, 2 Niabouas, 1 Agni et 1 Athié = 39 autochtones

- 29 Dioulas, 28 Mossis, 15 Sénoufos, 11 Malinkés, 3 Tagbanas, 3 Gourounsis, 3 Bobos, 2 Peuls, 1 Samoko, 1 Djimini, 1 Dogon, 1 Bambara, 1 Lobi et 1 Yoruba = 100 allogènes.

On désigne par autochtones, les individus qui résident dans la zone forestière ivoirienne depuis plusieurs générations et on désigne par allogènes ceux qui se sont installés récemment dans cette même zone, qui viennent des régions de savane du nord de la Côte d'Ivoire, du Mali, du Burkina-Faso et du nord de la Guinée ou du Nigeria.

1.1.3. Activités professionnelles

Professions	Planteur	Ménagère	Commerçant	Elève	Sans-prof.	Total
Nb de sujet	67	42	9	14	7	139

Tableau 17. Répartition des 139 sujets selon leur profession.

Le terme ménagère est utilisé pour les épouses ou filles de planteurs. Ces femmes vivent dans les campements à proximité des plantations et participent aux travaux agricoles. On peut donc regrouper ménagères et planteurs, soit 109 individus sur 139, sous le même terme: individus en contact permanent avec les plantations et la forêt (tableau 17).

1.1.4. Antécédents familiaux

Nous avons regroupé tous les sujets ayant au moins un apparenté atteint de THA avant la date d'inclusion dans l'étude. De cette façon, 30 patients sur 139 ont déclaré avoir un antécédent familial de THA.

Ainsi, 139 sujets ont composé la population d'étude de notre première enquête. Le chapitre suivant décrit les résultats obtenus lors de l'isolement des souches et de l'identification génétique par électrophorèse des isoenzymes des souches isolées.

1.2. Isolement des souches et identification des souches isolées

1.2.1. Isolement des souches

Un premier KIVI (KIVI 1) a été inoculé pour chacun des 139 patients intégrés. Seuls 62 KIVI 1 (44%) ont donné un résultat positif et les souches isolées ont été mises en culture. L'un d'eux a été positif très tardivement (après 40 jours de lecture) au moment où le milieu d'isolement commençait à être contaminé par des bactéries. La souche n'a pas pu se multiplier sur milieu de culture malgré des ensemencements accompagnés de doses croissantes d'antibiotiques. Du fait du faible taux d'isolement observé au début de l'étude, un deuxième KIVI (KIVI 2) a été inoculé pour 46 sujets. Vingt KIVI 2 seulement (43%) ont été positifs parmi lesquels 17 étaient déjà positifs au KIVI 1.

Ainsi, 64 souches (46%) ont été récoltées et stockées pour identification. L'étude d'éventuelles corrélations entre variants génétiques de *T. brucei* ssp. et formes cliniques de THA a porté sur les 64 sujets pour lesquels la souche a été isolée. Les 17 souches isolées à 2 reprises (KIVI 1 et 2) ont été récoltées et identifiées séparément.

Il faut ajouter ici que nous avons utilisé 2 lots différents de KIVI (fabriqués à l'IMT d'Anvers selon la même procédure) un lot pendant la première année et un lot pendant la deuxième. Sur les variables suivantes: le mode de dépistage, le centre de traitement, le sexe, l'âge, la nationalité, la profession et la présence d'antécédents familiaux de THA, nous n'avons pas observé de différence significative entre les populations de patients pour lesquels nous avons utilisé l'un ou l'autre de ces lots. Les taux d'isolement des 2 lots ont été les mêmes (44%). Ainsi, cette différence de lot ne sera pas prise en compte pour l'interprétation de nos résultats.

Nous avons donc observé un fort taux d'échec à l'isolement (54%). Ce taux d'échec est inhabituel et afin de savoir si des caractéristiques liées ou non à l'hôte ont des conséquences sur

le taux d'isolement, nous avons comparés les 2 populations " souches isolées " et " souches non-isolées ".

1.2.2. Comparaison des 2 populations: " souches isolées " et " souches non isolées "

L'analyse univariée montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les 2 populations (tableau 18) concernant les paramètres suivants: le mode de dépistage, le centre de traitement, le sexe, l'âge, la nationalité, la profession et la présence d'antécédents familiaux de THA. Si le taux d'échecs à l'isolement semble plus important pour les allogènes (66,7%) que pour les autochtones (49%) (tableau 19), cette différence n'est pas significative ($p = 0,0605$). Cependant, si l'on considère le groupe ethnique individuel (et non le regroupement en deux groupes allogènes/autochtones), cette différence devient significative ($p = 0,0317$). Dans ce cas, le taux d'échec le plus élevé se retrouve avec les baoulés (92,3%) et le plus faible avec les sénoufos (33,3%).

Paramètres	p
Mode de dépistage	0,2599
Centre de traitement	0,3197
Foyer d'origine	0,0002 *
Sexe	0,5117
Age	0,1279
Nationalité	0,6619
Ethnie	0,0605
Profession	0,3277
Antécédents familiaux	0,9383

* différence significative

Tableau 18. Résultats des tests statistiques (CHI-2 Pearson) effectués pour étudier l'influence de 9 paramètres épidémiologiques sur le taux d'isolement

Le foyer d'origine du patient a une influence très significative sur le taux d'isolement ($p = 0,0002$). Le détail des résultats (tableau 20) montre un faible taux de succès à l'isolement parmi les patients dépistés à Sinfra de 33,3% alors que le taux de succès parmi les patients dépistés à Bonon est de 85,2%. Les taux de succès observés parmi les patients dépistés à Daloa, Bouaflé et Aboisso sont intermédiaires (respectivement 37,5%, 41,7% et 55,6%).

Une analyse multivariée incluant les deux variables précédentes (foyer d'origine et groupe ethnique, allogènes/autochtones) a été réalisée à l'aide d'un modèle logistique. Dans cette analyse, les deux variables sont significativement liées au taux de succès à l'isolement, indiquant qu'elles agissent indépendamment l'une de l'autre.

Ethnies	Isolement		Total
	Echec	Succès	
Autochtone	26 (66,7%)	13 (33,3%)	39
Allogène	49 (49%)	51 (51%)	100
Total	75 (54%)	64 (46%)	139

Tableau 19. Résultats de l'isolement en fonction de l'ethnie du patient

Origine géographique	Isolement		Total
	Echec	Succès	
Sinfra	55 (66,3%)	28 (33,7%)	83
Bonon	4 (14,8%)	23 (85,2%)	27
Daloa	5 (62,5%)	3 (37,5%)	8
Bouaflé	7 (58,3%)	5 (41,7%)	12
Aboisso	4 (44,4%)	5 (55,6%)	9
Total	75 (54%)	64 (46%)	139

Tableau 20. Résultats de l'isolement en fonction du foyer d'origine du patient

Ainsi, le taux de réussite à l'isolement semble être en partie dépendant de 2 variables dont l'une, le groupe ethnique, est directement liée à l'hôte et l'autre, le foyer d'origine, serait plutôt lié au parasite. Cette observation devra être prise en considération lors de la généralisation des résultats de l'identification génétique des souches isolées détaillés ci-dessous.

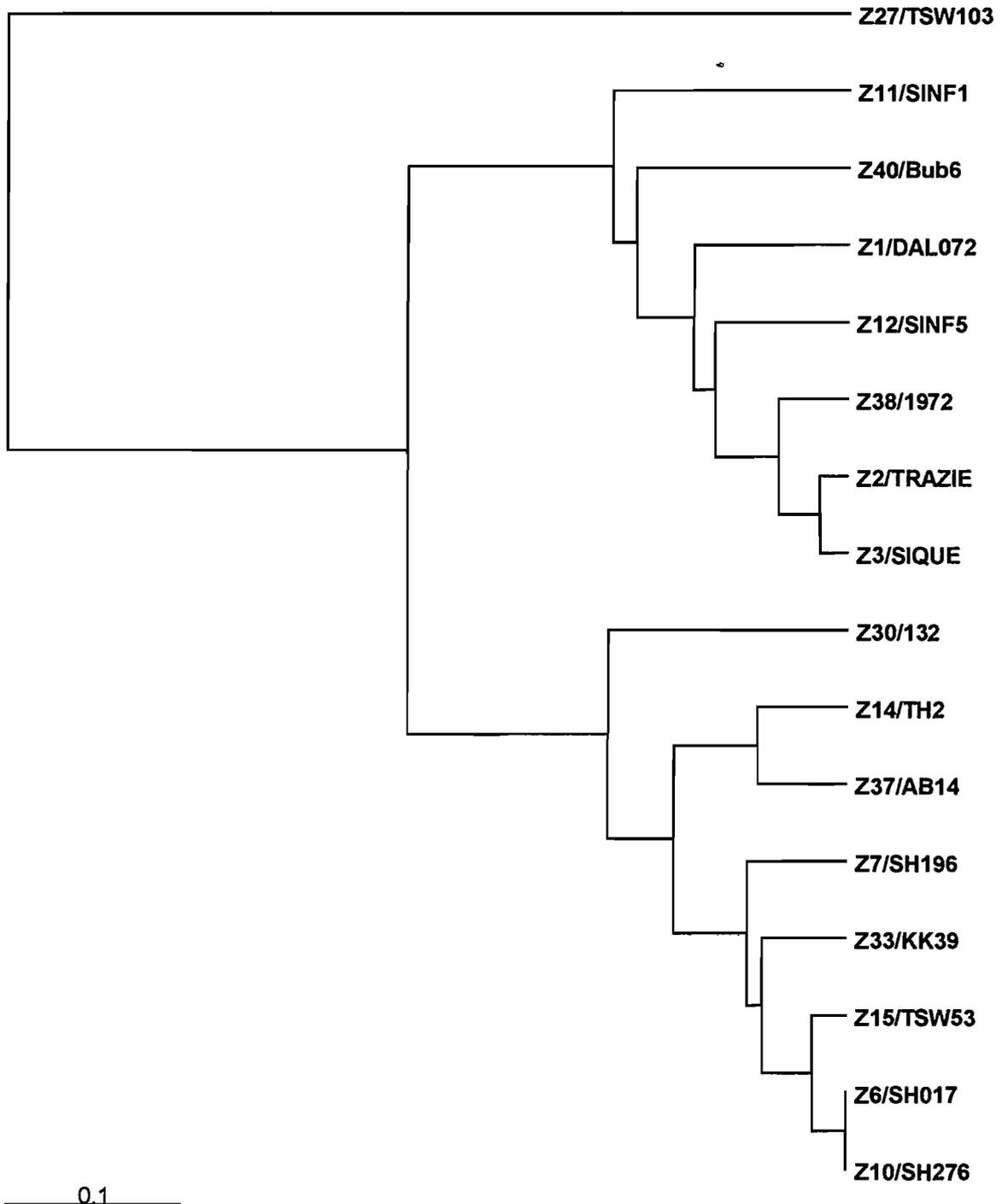
1.2.3. Identification des souches isolées

Les résultats de la lecture des gels d'électrophorèse sont présentés en annexe 6. Sur le dendrogramme (figure 17), on retrouve les résultats classiquement obtenus par l'électrophorèse des isoenzymes. Les 16 zymodèmes identifiés sont distincts les uns des autres. La souche *T. congolense* (TSW103, Z27) est très différente ($d = 0,95$) de toutes les souches de l'espèce *T. brucei* ssp. Les 2 groupes classiques de *T. brucei* ssp., le groupe 1 de *T. b. gambiense* avec les zymodèmes Z1, 2, 3, 11, 12, 38, 39 et 40 et le groupe *T. b.* bouaflé avec les zymodèmes Z6, 7, 10, 14, 15, 30, 33 et 37, sont bien distincts ($d = 0,5$) l'un de l'autre. La variabilité génétique à l'intérieur de ces 2 groupes est faible ($d < 0,3$).

Sur les 64 souches étudiées, 61 ont été identifiées comme appartenant au zymodème 3 (le zymodème de référence utilisé). Les 3 autres souches appartiennent au zymodème 38. Ces deux zymodèmes ne diffèrent qu'au niveau du locus ME 2 du système ME. Les souches du zymodème 3 sont hétérozygotes à ce locus alors que celles du zymodème 38 sont homozygotes. Ainsi les souches appartenant aux zymodèmes 3 et 38 sont génétiquement très proches ($d < 0,1$). Elles font partie du groupe 1 de *T. b. gambiense*.

Les 17 souches qui ont été isolées à 2 reprises ont été identifiées comme appartenant au zymodème 3. Aucune différence n'a été décelée entre les deux isolats provenant du même patient par l'électrophorèse des isoenzymes.

Figure 17. Dendrogramme construit selon le mode d'agglomération en hiérarchie ascendante, UPGMA, utilisant la matrice des distances de Jaccard, pour les 16 zymodèmes mis en évidence par la caractérisation des isoenzymes des 64 souches de notre étude et des souches de référence



1.2.4. Un cas particulier: mise en évidence d'une infection mixte à *T. congolense* et *T. brucei* ssp.

Lors de la lecture de la minicolonne du sujet 381, dépisté à Aboisso au cours de la prospection médicale de 07/97, nous avons observé des trypanosomes peu mobiles, de petite taille, avec un flagelle très court et ne survivant pas plus de 20 minutes dans le tampon PBS glucosé. Nous avons alors suspecté un cas d'infection à *T. congolense*. Cette observation a été confirmée par des tests PCR effectués en double (IPR Bouaké et IRD Montpellier) sur le sang total du sujet (Truc *et al.*, 1998c, article en annexe 12) qui ont donné un résultat positif avec les amorces spécifiques de *T. congolense* groupe savana (Majiwa & Otieno, 1990) mais aussi avec les amorces spécifiques de *T. brucei* ssp. (Moser *et al.*, 1989). Il s'agit donc d'une infection mixte à *T. brucei* ssp. et à *T. congolense*. Ce sujet, douteux au CATT, s'est avéré négatif au Latex *T. b. gambiense* lors des analyses faites à Anvers, l'isolement sur KIVI a échoué ainsi que l'inoculation de rongeur qui avait été effectuée pour optimiser l'isolement. Les tests effectués sur LCR (parasitologie, cytorachie, immunologie) n'ont pas mis en évidence une atteinte du système nerveux, le sujet présentait pourtant un tableau clinique de seconde période. Le patient était HIV séronégatif (tests Murex 200A Ice pack et Innogenetics 1036).

Ainsi, nous avons observé un faible taux d'isolement des souches, lié de façon significative au groupe ethnique et à l'origine géographique des sujets inclus. L'électrophorèse des isoenzymes des 64 souches isolées a mis en évidence un important monomorphisme. L'étape suivante va détailler les résultats de l'analyse clinique à l'inclusion des sujets et va permettre d'étudier l'existence d'une éventuelle variabilité de présentations cliniques.

1.3. Résultats de l'étude clinique

Nous résumerons d'abord les résultats sérologiques et parasitologiques obtenus à l'inclusion et en fin de traitement; un accent particulier sera porté sur le diagnostic de phase. Les résultats des questionnaires cliniques (données recueillies par des infirmiers du PNLTHA) et des dosages biologiques (dosages effectués à l'IMT d'Anvers) seront alors détaillés.

1.3.1. Bilan sérologique et parasitologique à l'entrée

L'ensemble des résultats est présenté en annexe 7. Sur les 139 sujets intégrés 138 ont été positifs au CATT sur sang (C1) et confirmés au CATT sur plasma (C2). Un seul patient (381) faiblement positif au C1 s'est avéré négatif au C2. Ces résultats ont été confirmés à Anvers par les titrations effectuées sur 106 sérum: tous les CATT ont donné un résultat positif avec un titre final (Tf) compris entre 4 et 64. La plus faible valeur de Tf a été obtenu pour le sérum du sujet 381. Par contre, sur les mêmes sérum testés au Latex, 103 ont été positifs (Tf compris entre 16 et 512) et 3 (dont le sujet 381) ont été négatifs ($Tf \leq 8$). C'est chez le sujet 381 que nous avons mis en évidence le cas d'infection mixte décrit au paragraphe 1.2.4..

Toujours sur les 139 patients intégrés, 133 ont été classiquement confirmés parasitologiquement par la mAECT ou/et par l'examen du suc ganglionnaire. Les 6 autres patients (mAECT et examen du suc ganglionnaire négatifs) n'ont été confirmés qu'après examen du LCR (deuxième période). Le nombre de trypanosomes détectés à la mAECT varie entre 1 et 500.

Concernant le diagnostic de phase, un patients (622) a refusé la ponction lombaire. La présence de trypanosomes dans le LCR a été mise en évidence chez 54 sujets sur 138. La cytorachie du LCR a aussi été effectuée et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 21. Aucun sujet porteur de trypanosomes dans le LCR n'a été observé parmi les sujets ayant moins de 6 cellules/mm³ (0%). Ce taux augmente ensuite et passe de 17,6% à 29,4% puis à 76,7% pour les sujet ayant respectivement une cytorachie entre 6 et 20, 21 et 45 et supérieure à 45.

	Nombre de cellules/mm ³					Total
	0	1 à 5	6 à 20	21 à 45	> 45	
LCR T +	0	0	3	5	46	54
LCR T -	30	14	14	12	14	84
Total	30	14	17	17	60	138
% T + (T+/Total)	0	0	17,6	29,4	76,7	38,4

Tableau 21. Résultats de la recherche de trypanosomes par Double Centrifugation (DC) du LCR et de la cytorachie

D'après l'OMS (1986, 1998), les critères de l'infection en deuxième période sont une cytorachie supérieure à 5 cellules/mm³ ou une protéinorachie supérieure à 37 mg/100 ml. La présence de l'un ou l'autre de ces critères, avec ou sans mise en évidence de trypanosomes, confirme un diagnostic de deuxième période. Dans notre étude, étant donnée le manque de données de protéinorachie, nous ne déterminerons la période qu'en fonction de la cytorachie et de la présence de trypanosomes dans le LCR. Ceci nous donne un total de 44 patients en première phase (P1) et de 94 en seconde phase (P2). Le sujet ayant refusé la ponction lombaire sera considéré en P2 sur la base des résultats du bilan clinique: syndrome neuropsychiatrique central lourd (voir §) portant ainsi le nombre de secondes périodes à 95. Nous remarquons une importante discordance entre les résultats de la parasitologie et de la cellulorachie du LCR. En effet, il paraît entre autre étonnant que sur les 34 sujets ayant entre 6 et 45 cellules, seulement 8 ont été positifs en parasitologie. Durant ce travail et dans le but d'améliorer le diagnostic de phase de la THA, un protocole de détection par PCR des trypanosomes du LCR a été mis au point (Truc *et al.*, 1999, article en annexe 11) et 20 échantillons provenant de patients de notre étude (15 P2 et 5 P1) ont été testés. Les résultats obtenus (tableau 22) confirment nos précédentes conclusions puisque les 15 sujets diagnostiqués en P2 ont été positifs en PCR et les 5 sujets en P1 ont été négatifs. Cependant, la détection par PCR des trypanosomes du LCR semble plus sensible que la détection par DC, puisque parmi les 15 sujets en P2, 4 étaient négatifs à ce dernier test.

Patient	PCR	DC	Cytorachie	Période
2501	+	+	872	2
2555	+	+	274	2
2565	+	+	1044	2
2585	+	+	122	2
2591	+	+	930	2
2511	+	+	728	2
2552	+	+	132	2
2589	+	+	278	2
2592	+	+	228	2
637	+	+	36	2
649	+	+	30	2
2564	+	-	450	2
2567	+	-	260	2
2571	+	-	1152	2
2494	+	-	252	2
2520	-	-	0	1
2521	-	-	2	1
2522	-	-	4	1
2586	-	-	4	1
2543	-	-	0	1

Tableau 22. Résultats de la détection par PCR et DC des trypanosomes dans le LCR pour 20 sujets de l'étude (15 P2 et 5 P1).

Avant de détailler les résultats de l'analyse clinique à l'inclusion, certains résultats du bilan de sortie sont intéressants à mentionner. Deux patients sont décédés en cours de traitement (2507 et 2508), un patient (599) a quitté la clinique juste après la première injection de lomidine (avant le traitement à l'arsobal) et 11 autres ont quitté les centres avant le bilan de sortie. Ces 14 sujets étaient tous en P2 de la maladie. Les résultats des tests effectués en fin de traitement ne sont donc disponibles que pour 125 patients. Aucun parasite n'a été détecté dans le LCR mais par contre, la mAECT a révélé deux patients toujours porteurs de trypanosomes. L'un d'eux a été revu 1 mois et 3 mois après le traitement et les tests parasitologiques (mAECT et DC) ont été négatifs. L'autre sujet n'a pas été revu. Parmi les 11 patients qui ont quitté les centres de traitement avant le bilan de sortie, 2 ont été revus 1 mois après traitement et les tests parasitologiques (mAECT et DC) ont été négatifs. Les 9 autres patients ainsi que celui qui n'a pas été traité n'ont jamais été revus.

1.3.2. Bilan clinique à l'entrée

La totalité des résultats de l'étude clinique est présentée en annexe 8.

1.3.2.1. Date et mode d'apparition des symptômes

Période	Date d'apparition des premiers symptômes				Total
	0 à 6 mois	6 à 12 mois	>12 mois	ND	
1	8	20	12	4	44
2	22	15	50	8	95
Total	30	35	62	12	139

Tableau 23. Période de la maladie et date d'apparition des symptômes

Douze patients n'ont pas su répondre à la question " Date d'apparition des premiers symptômes ? " (voir tableau 23). Les résultats ne sont donc disponibles que pour 127 sujets. Le temps écoulé depuis la date d'apparition des symptômes est significativement plus long ($p = 0,0002$) pour les sujets en P2 que pour les sujets en P1. Parmi les 62 sujets se sentant malades depuis plus de 12 mois, 50 (81%) ont été diagnostiqués en P2. Cependant, 22 patients sur 30 (73%) pour lesquels les symptômes sont d'apparition récente (0 - 6 mois) étaient déjà en P2. Ainsi, si la présence de symptômes depuis plus de 12 mois semble en faveur d'un diagnostic de

P2, l'apparition récente de signes cliniques n'est pas nécessairement un critère de phase précoce de maladie.

Concernant le mode d'apparition de la maladie, 36 sujets n'ont pas su répondre à la question posée, 99 nous ont dit avoir été atteints progressivement et 4 brutalement. Les 2 paramètres « mode d'apparition de la maladie » et « période de la maladie » ne sont pas significativement liés ($p = 0,14$). On observe cependant que les 4 sujets atteints brutalement ont tous été diagnostiqués en P2 (présence de trypanosomes dans le LCR et cytorachie très élevée) et 2 d'entre eux font parties des sujets chez lesquels l'apparition des symptômes a été très récente (0 - 3 mois). Il semble exister une variabilité dans l'ancienneté des symptômes bien que cette notion d'interrogatoire reste très subjective.

1.3.2.2. Bilan de l'examen clinique

Les résultats sont présentés dans le tableau 24. Concernant le syndrome infectieux/inflammatoire, les deux signes cliniques les plus fréquemment rencontrés sont les céphalées, les fièvres et la présence d'adénopathies cervicales et d'oedème. On remarque que seulement 4 patients sur 139 n'ont pas présenté de symptômes caractéristiques de ce syndrome. L'importance du syndrome infectieux/inflammatoire n'est pas significativement liée à la période de la maladie ($p = 0,49$). Sur les 135 sujets atteints de ce symptôme (97%), on compte 43 P1 et 91 P2. Parmi les 4 sujets non-atteints, 3 étaient en P2 et 2 d'entre eux, patients depuis 0 à 3 mois.

Syndromes	absent	présent	lourd	très lourd	Total
infectieux/inflammatoire	4	62	73	ND	139
cardio-vasculaire	120	16	3	ND	139
digestif	89	47	3	ND	139
dermatologique	50	53	36	ND	139
neuropsychiatrique	32	66	29	12	139

ND = pas de données correspondantes

Tableau 24. Répartition des 139 sujets selon le degré d'atteinte aux différents syndromes recherchés.

L'existence d'un syndrome cardio-vasculaire a été mise en évidence dans 19 cas sur 139 soit 14% se traduisant souvent par des palpitations. Il n'existe pas de corrélations significatives entre l'importance de ce syndrome et la période de la maladie ($p = 0,6$).

Au total 50 sujets (36%) se sont plaints de troubles digestifs et principalement de nausées accompagnées ou non de vomissements (31 sujets). Dix-huit cas de splénomégalie et 3 d'hépatomégalie ont été enregistrés. L'importance du syndrome digestif n'est pas significativement liée à la période de la maladie ($p = 0,65$).

Les symptômes caractéristiques d'un syndrome dermatologique ont été décrits et observés (prurit, éruptions cutanées) chez 89 sujets soit dans 64% des cas (53 présents et 36 lourds). Concernant les symptômes spécifiques de THA, aucun chancre d'inoculation n'a été observé, mais 4 sujets ont présenté des trypanides. L'importance de ce syndrome et la période la maladie ne sont pas significativement liées ($p = 0,28$).

Les signes d'atteinte neurologique les plus fréquemment rencontrés (chez 104 sujets soit 74,8%) ont été les troubles du sommeil (insomnies nocturnes et/ou somnolences diurnes). Les troubles de la fonction sexuelle (51 cas de libido diminuée ou abolie soit 37%) et de la fonction alimentaire (49 cas soit 35%) ont été souvent observés. Des troubles du comportement et/ou de l'humeur/caractère (ces 2 signes sont associés dans la plupart des cas de la façon suivante: agitation/euphorie-agressivité et indifférence/tristesse) ont été décrits chez 42 sujets (30,2%) parmi lesquels, 24 (17% des cas) présentaient des troubles de la conscience (coma, confusion mentale et conscience ralentie). 31 sujets (22%) ont présenté des troubles moteurs (station debout perturbée ou impossible, marche perturbée ou impossible, motricité des membres supérieurs et inférieurs perturbée ou impossible, incoordination des mouvements, hypotonie ou hypertonie). Parmi les réflexes recherchés, les réflexes archaïques ont été altérés chez 43 sujets (31%), les réflexes ostéo-tendineux chez 17 sujets (12%), les réflexes cutané-plantaires chez 7 sujets (5%). Nous n'avons pas rencontré de cas d'altération des réflexes du tronc cérébral.

Syndrome neuropsychiatrique					
Période	absent	présent	lourd	t. lourd	Total
1	16	26	2	0	44
2	16 (50%)	40 (60,6%)	27 (93,1%)	12 (100%)	95
Total	32	66	29	12	139

Tableau 25: Période de la maladie et syndrome neuropsychiatrique central pour les 139 sujets d'étude

L'importance du syndrome neuropsychiatrique et la période de la maladie sont significativement très liés ($p < 10^{-4}$). Parmi les sujets présentant un syndrome neuropsychiatrique très lourd, tous ont été diagnostiqués en P2 (tableau 25). Lorsque ce syndrome est lourd ou présent, le pourcentage de sujets en P2 passe respectivement de 93,1% à 60,6%. Cependant, 50% des sujets sans atteinte neuropsychiatrique (16 sur 32) sont déjà en P2. On retrouve donc le même schéma de résultats que pour la date d'apparition des symptômes à savoir que la présence d'un syndrome neuropsychiatrique très lourd est très en faveur d'un diagnostic de P2 mais que son absence ne permet pas d'éliminer ce diagnostic

Nos résultats sont donc en faveur d'une grande variabilité de présentations et d'évolutions cliniques. Parmi les syndromes cliniques étudiés, seul le syndrome neuropsychiatrique est significativement lié à la période de la maladie selon les critères de l'OMS. Des dosages biologiques effectués à l'IMT d'Anvers dans le cadre de notre étude avaient pour but d'évaluer la sévérité de la maladie et notamment l'atteinte de la BHM et du SNC. Dans le prochain paragraphe, nous étudierons la répartition de ces marqueurs de sévérité en fonction de la présence ou non d'un syndrome neuropsychiatrique tel que nous l'avons défini.

1.3.3. Bilan des dosages biologiques

La totalité des résultats des dosages biologiques est donnée en annexe 9. Le but de cette étape n'est pas la comparaison des résultats obtenus par les différents dosages, mais de confirmer ou d'infirmer les observations faites lors de l'analyse clinique. Pour chaque dosage, des données sont manquantes pour plusieurs sujets du fait du manque de sérum et surtout de LCR. Plusieurs prélèvements de LCR ont été hémorragiques et n'ont pas pu être testés.

1.3.3.1. Altération de la barrière hématoméningée (BHM)

BHM	Syndrome neuropsychiatrique central				Total
	absent	présent	lourd	très lourd	
BHM non-altérée	23 (100%)	38 (79%)	8 (50%)	5 (56%)	74 (77%)
BHM altérée	0	10 (21%)	8 (50%)	4 (44%)	22 (23%)
Total	23 (100%)	48 (100%)	16 (100%)	9 (100%)	96 (100%)

Tableau 26. Altération de la BHM et syndrome neuropsychiatrique central

Les résultats sont disponibles pour 96 sujets (tableau 26). Une altération de la BHM ($Q(\text{alb}) > 7,4$) a été mise en évidence chez 22 patients (23%). Celle-ci est significativement liée à l'existence du syndrome neuropsychiatrique central ($p = 0,0012$). Les 22 cas d'altération ont été retrouvés chez les sujets où ce syndrome est présent, lourd ou très lourd. Cependant, on remarque l'absence d'altération pour 5 cas sur 9 chez lesquels le syndrome est très lourd et pour 8 cas sur 16 chez lesquels le syndrome est lourd.

1.3.3.2. Atteinte du système nerveux central (SNC)

Latex <i>T. b. gambiense</i>	Syndrome neuropsychiatrique central				Total
	absent	présent	lourd	très lourd	
Test négatif	22 (96%)	26 (53%)	4 (22%)	0	52 (53%)
Test positif	1 (4%)	23 (47%)	14 (78%)	9 (100%)	47 (47%)
Total	23 (100%)	49 (100%)	18 (100%)	9 (100%)	99 (100%)

Tableau 27. Résultats du Latex *T. b. gambiense* et syndrome neuropsychiatrique central

Le Latex *T. b. gambiense* a été effectué sur 99 prélèvements de LCR (tableau 27) et a été positif pour 47 d'entre eux (47%). La positivité du test est significativement liée à l'existence du syndrome neuropsychiatrique central ($p < 10^{-4}$). Le test a été positif pour les 9 individus qui ont présenté un syndrome très lourd, pour 14 sur 18 individus qui ont présenté un syndrome lourd et pour un seul individu sur 23 chez lesquels le syndrome était absent.

Latex IgM	Syndrome neuropsychiatrique central				Total
	absent	présent	lourd	très lourd	
Test négatif	21 (87%)	25 (52%)	2 (11%)	0	48 (49%)
Test positif	3 (13%)	23 (48%)	16 (89%)	9 (100%)	51 (51%)
Total	24 (100%)	48 (100%)	18 (100%)	9 (100%)	99 (100%)

Tableau 28. Résultats du Latex IgM et syndrome neuropsychiatrique central

Le Latex/IgM (tableau 28) a été positif pour 51 sujets sur 99 testés (51%). Là encore, la positivité du test est significativement liée ($p < 10^{-4}$) à l'existence du syndrome neuropsychiatrique central. En effet, le test est positif pour les 9 sujets présentant un syndrome très lourd et n'est positif que pour 3 sujets sur 23 ne présentant pas ce syndrome.

Synthèse intrathécale d'IgM et/ou d'IgG	Syndrome neuropsychiatrique central				Total
	absent	présent	lourd	très lourd	
absente	17 (77%)	29 (63%)	4 (29%)	0	50 (55%)
présente	5 (23%)	17 (37%)	10 (71%)	9 (100%)	41 (45%)
Total	22 (100%)	46 (100%)	14 (100%)	9 (100%)	91 (100%)

Tableau 29. Synthèse intrathécale d'IgM et/ou d'IgG et syndrome neuropsychiatrique central

Une synthèse intrathécale d'IgM et/ou d'IgG spécifiques (tableau 29) a été mise en évidence chez 41 sujets sur 91 (45%). Celle-ci est significativement liée à l'existence du syndrome neuropsychiatrique central ($p = 0,0001$) puisqu'elle est mise en évidence chez les 9 individus qui ont présenté un syndrome très lourd et seulement chez 5 individus sur 22 chez lesquels le syndrome était absent.

Protéïnorachie du LCR	Syndrome neuropsychiatrique central				Total
	absent	présent	lourd	très lourd	
Taux normal	17 (74%)	25 (51%)	2 (11%)	4 (44%)	48 (49%)
Taux anormal	6 (26%)	24 (49%)	16 (89%)	5 (56%)	51 (51%)
Total	23 (100%)	49 (100%)	18 (100%)	9 (100%)	99 (100%)

Tableau 30. Résultats de la protéïnorachie du LCR et syndrome neuropsychiatrique central

Le dosage des protéines du LCR a aussi été effectué pour 99 patients (tableau 30). Avec le seuil de positivité retenu (750 mg/l), 51 sujets (51%) ont un taux anormalement élevé de protéines dans le LCR. Le taux élevé de protéïnorachie est significativement lié à l'existence du syndrome neuropsychiatrique central ($p = 0,001$), bien que certains résultats contradictoires aient été constatés. Par exemple, le dosage est négatif pour 4 cas sur 9 chez lesquels le syndrome est très lourd et il est positif pour 6 sujets sur 23 chez lesquels le syndrome est absent.

Nous avons testé l'association entre les variables biologiques (marqueurs de sévérité de la THA) et la période de la maladie telle que nous l'avons définie. Il existe une association significative pour chacune d'elle avec la période de la maladie. Ces résultats ne sont pas présentés mais l'altération de la BHM et l'atteinte du SNC sont plus fréquemment rencontrées chez les patients en P2 que chez les patients en P1, quel que soit le dosage effectué, bien qu'ici aussi, des résultats contradictoires existent.

L'ensemble de ces résultats confirment donc la complexité de la maladie, les dosages biologiques étant très variable d'un individu à l'autre, comme le sont les tableaux cliniques observés. Il est alors important de savoir si cette diversité de présentations cliniques et biologique est liée à une éventuelle diversité génétique des souches de trypanosomes. Pour cela, nous allons comparer d'une part, les résultats obtenus pour les sujets porteurs de souches appartenant au Z3 ("sujets Z3") et ceux obtenus pour les sujets porteurs de souches appartenant au Z38 ("sujets Z38"). Etant donné le taux important d'échec à l'isolement, nous rechercherons d'autre part l'existence d'une éventuelle différence de présentations cliniques et biologiques, entre les groupes « souches isolées » et « souches non-isolées ». En effet, l'existence d'une telle différence pourrait être due à une variabilité génétique entre ces deux groupes, variabilité que nous ne pouvons pas déceler mais pouvant être aussi à l'origine de l'échec à l'isolement.

1.4. Variabilité clinique de la THA et variabilité génétique de *T. brucei* ssp.

1.4.1. Recherches de corrélations entre la variabilité clinique et la variabilité génétique observée

Nous avons comparé les bilans cliniques des sujets Z3 et ceux des sujets Z38. Compte-tenu du faible nombre de sujets Z38 (3), cette comparaison a été réalisée à l'aide d'un test non paramétrique. Quelle que soit la variable clinique considérée (mode d'apparition de la maladie, apparition des premiers symptômes et les différents syndromes) et le dosage biologique effectué (mesurant l'altération de la BHM ou l'atteinte du SNC) aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les 2 populations.

1.4.2. Comparaison clinique des populations de “ souches isolées ” et “ non-isolées ”

Période	Isolement		
	Souche non-isolée	Souche isolée	Total
P1	24	20	44
P2	51	44	95
Total	75	64	139

Tableau 31. Résultats de l'isolement des souches et période de la maladie

La période de la maladie n'a pas d'influence significative sur le taux de réussite de l'isolement ($p = 0,92$) (tableau 31). Les proportions de souches isolées parmi les sujets P1 et P2 sont respectivement 45,5% et 46,3%. Sur la base des variables cliniques tels que le mode d'apparition de la maladie, l'apparition des premiers symptômes et les différents syndromes, il n'y a pas de différence significative entre les 2 populations. Le taux d'isolement ne varie pas en fonction de l'existence ou de l'importance des syndromes recherchés. Le taux d'échec n'est pas lié à un tableau clinique particulier. Les résultats des tests statistiques sont donnés dans le tableau 32.

Paramètres	p
Mode d'apparition de la maladie	0,7018
Date d'apparition des premiers symptômes	0,5482
Syndrome infectieux/inflammatoire	0,4194
Syndrome cardio-vasculaire	0,6813
Syndrome digestif	0,2810
Syndrome dermatologique	0,8508
Syndrome neuropsychiatrique central	0,0834

Tableau 32. Résultats des tests statistiques effectués pour étudier l'influence des résultats cliniques sur le taux d'isolement

Concernant les dosages biologiques permettant d'apprécier le degré d'altération de la BHM et celui d'atteinte du SNC, il n'y a pas de différence significative entre les populations " souches isolées " et " souches non-isolées ". Le taux d'échec à l'isolement n'est pas lié à un résultat particulier de l'un des dosages effectués. Les résultats des tests statistiques sont données dans le tableau 33.

Paramètres	P
Altération de la BHM	0,5230
Latex <i>T. b. gambiense</i>	0,4582
Protéïnorachie	0,3531
Latex IgM	0,4938
Synthèse intrathécale d'IgM et/ou d'IgG	0,8747

Tableau 33. Résultats des tests statistiques effectués pour étudier l'influence des résultats des dosages biologiques sur le taux d'isolement

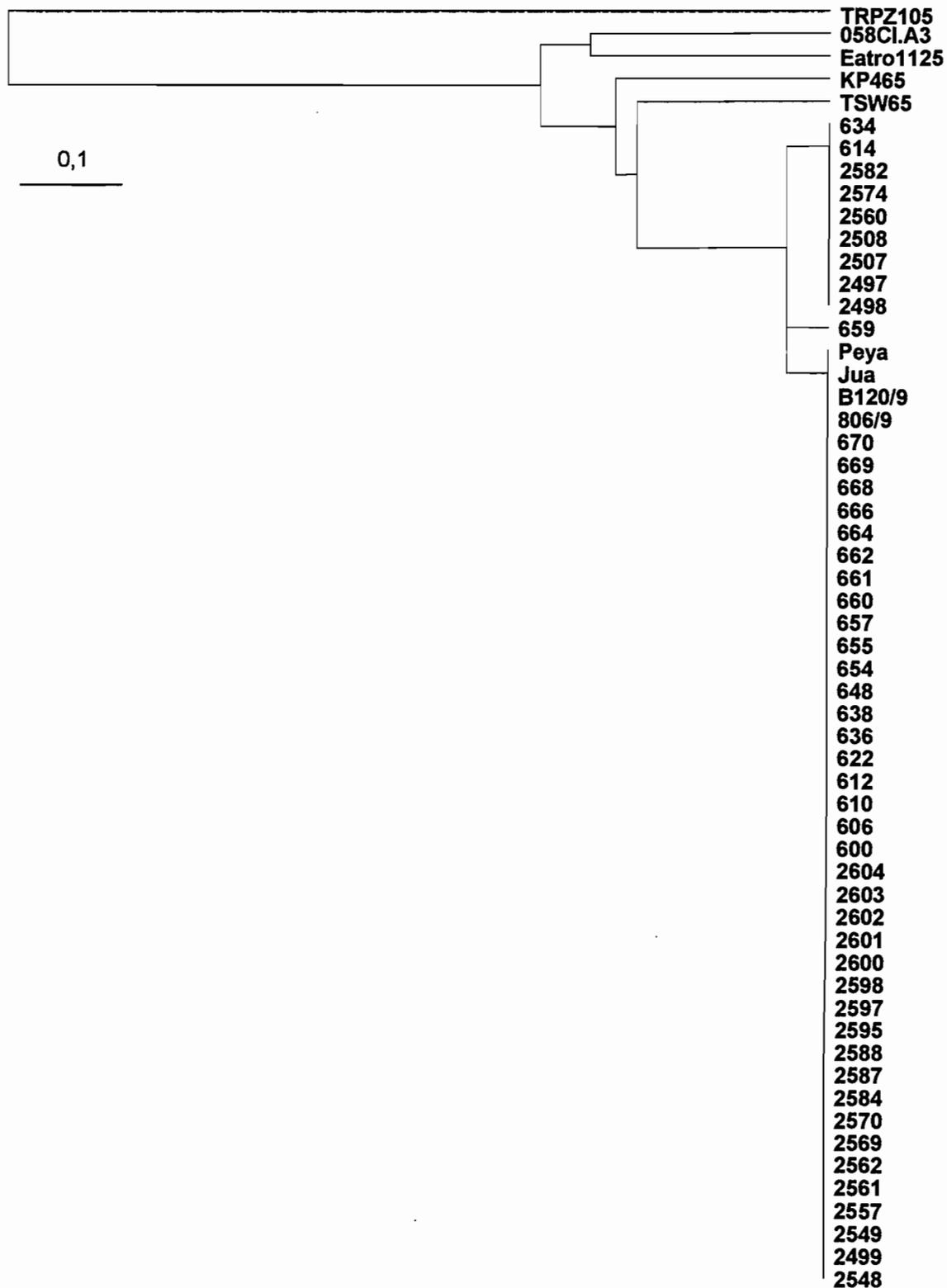
Ainsi, quel que soit le paramètre clinique ou biologique pris en compte, il n'y a pas de différence significative entre les populations " souches isolées " et " souches non-isolées ". En aucun cas, l'un de ces paramètres n'a d'influence sur le taux d'isolement. Ainsi, même s'il existe une variabilité génétique des souches de trypanosomes responsable de l'important taux d'échec à l'isolement (existence d'une différence génétique entre les souches isolées et les souches non-isolées), celle-ci ne semble pas engendrer la diversité de présentations cliniques observée. La variabilité clinique n'est apparemment pas liée à la faible variabilité génétique observée lors de notre étude. Il est malgré tout possible qu'une variabilité génétique existe au sein de nos souches mais qu'elle n'a pas pu être mise en évidence par la technique d'identification utilisée. Ainsi, nous avons identifié ces souches par la technique des RAPD, récemment adaptée à l'identification génétique des trypanosomes, plus discriminative que l'électrophorèse d'isoenzymes.

1.4.3. Caractérisation des souches isolées par RAPD/PCR

Cette caractérisation a porté sur 50 souches de notre étude. Les résultats de la lecture des gels d'électrophorèse sont présentés dans en annexe 10. Le dendrogramme est présenté en figure 18. Les RAPD confirment les résultats déjà obtenus en matière d'identification génétique des trypanosomes quant à la distinction très claire entre *T. congolense* et *T. brucei* ssp. et l'individualisation du groupe 1 de *T. b. gambiense* au sein du complexe *T. brucei* ssp.. Les 50 souches appartiennent toutes à ce groupe 1 et les résultats obtenus confirment ceux de l'identification par l'électrophorèse des isoenzymes puisque l'on observe un important monomorphisme. Sur les 7 amorces testées, seule l'amorce A2 présente une microvariabilité avec 3 profils qui ne diffèrent que d'une seule bande (annexe 10).

En résumé de cette partie détaillant les résultats de la première enquête, nous avons d'abord observé un fort et inhabituel taux d'échec à l'isolement. Celui-ci est significativement lié au foyer d'origine et au groupe ethnique des patients. Ensuite et parallèlement, un important monomorphisme génétique au sein des souches isolées et une diversité de présentations et d'évolutions cliniques au sein des patients intégrés ont été mis en évidence. Nous avons alors montré qu'il était peu probable qu'une éventuelle diversité génétique du parasite soit responsable de la diversité clinique. Le suivi à long terme de sujets refusant le traitement va nous permettre de confirmer la diversité de présentation cliniques observée lors de cette première enquête notamment concernant l'évolution de la maladie au cours du temps. Les résultats de cette deuxième enquête permettront d'apporter des éléments nouveaux quant à l'origine de la variabilité clinique mise en évidence.

Figure 18. Dendrogramme construit selon le mode d'agglomération en hiérarchie ascendante, UPGMA, utilisant la matrice des distances de Jaccard, pour les 50 souches de notre étude, caractérisées par RAPD



2. Résultats de la deuxième enquête : suivi sérologique, parasitologique et clinique de trypanosomés refusant le traitement

Cette enquête a été beaucoup moins développée que la précédente, mais permet néanmoins de connaître l'évolution de la maladie chez des sujets qui refusent d'être traités (Jamonneau et al., sous presse, article en annexe 14). Nous décrivons d'abord la population de ces sujets que nous avons suivis pendant 3 ans, puis nous nous intéresserons à leur évolution pendant toute cette période. Pour certains sujets, nous décrivons en détail l'évolution sérologique, parasitologique et clinique de leur maladie

2.1. Description de la population d'étude

La moyenne d'âge de la population d'étude en 1997 était de 20 ans (de 3 à 77) avec un sex-ratio (hommes/femmes) de 1,52 (38 hommes pour 25 femmes). Cette population était composée de 30 autochtones (19 de l'ethnie gouro, 10 baoulés et 1 bété) et de 33 allogènes, pour la plupart originaires du Nord de la Côte d'Ivoire, du Mali ou du Burkina-Fasso (15 dioulas, 12 sénoufos, 2 tagbanas, 1 mossi, 1 bobo, 1 malinké et 1 béninois).

2.2. Devenir des 63 sujets entre leur date de dépistage et le début du suivi (06/97)

En juin 1997, 50 des 63 sujets étaient toujours présents et localisés dans la zone d'étude. Parmi les 13 sujets manquants, 2 étaient décédés (causes inconnues) et 11 avaient quitté la zone de Sinfra (tableau 34). Nous n'avons pas eu d'informations concernant le devenir de ces patients.

	Décédés	Disparus	Traités	Non-traités	Total
Date de dépistage à juin 1997 (1)	2	11	0	50	63
Juin 1997 à mars 1999 (2)	2	0	29	19	50

Tableau 34: Devenir (1) des 63 sujets d'étude entre leur date de dépistage et la première visite (06/97) et (2) des 50 sujets localisés dans la zone d'étude en 06/97, suivis jusqu'en 03/99.

2.3. Résultats sérologiques, parasitologiques et cliniques pour les sujets localisés dans la zone d'étude pendant les 3 ans de suivi

Au total, 29 sujets confirmés parasitologiquement entre 06/97 et 03/99 ont été soignés pendant la durée du suivi. Deux autres sujets sont décédés, probablement des suites de leur maladie avec atteinte neuropsychiatrique sévère et brutale. Ainsi, au moment de la dernière visite en 03/99, il restait encore 19 personnes non-traitées dans la zone d'étude (tableau 34).

Parmi eux, 2 sujets ont refusé tous prélèvements et aucune donnée sérologique et parasitologique n'a pu être obtenue. Cependant, ils ont été revus à chacune de nos visites et n'ont présenté aucun signe clinique jusqu'à la fin du suivi. Deux autres sujets présentaient déjà des résultats négatifs en sérologie en 1997 et aucun test sérologique et parasitologique n'a été effectué lors des visites de 1998 et 1999. Aucun signe clinique n'a été détecté chez ces 2 sujets pendant toute la durée du suivi. Les résultats du suivi sérologique, parasitologique et clinique des 15 sujets restant sont détaillés dans le tableau 35.

Visites Examen Sujets	Programme de lutte			Suivi						
	1995-1996 T	Juin 1997 CATT pl T Sy			Janvier 1998 CATT pl T Sy			Mars 1999 CATT pl T Sy		
1	+	+	-	-	+	-	-	-	NF	-
2	+	+	-	-	+	-	-	-	NF	-
3	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
4	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
5	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
6	+	+	-	-	a	a	a	+	-	-
7	+	a	a	a	a	a	a	+	-	+
8	+	a	a	a	a	a	a	+	-	+
9	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
10	+	a	a	a	+	+	-	+	+	-
11	+	+	+	-	a	a	a	+	+	-
12	+	+	+	-	a	a	a	+	+	-
13	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
14	+	a	a	a	a	a	a	+	+	++
15	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-

Examen: CATT pl = CATT sur plasma

T = recherche des trypanosomes (examen du suc ganglionnaire ou mAECT): - = absence de trypanosomes, + = présence, NF = Non Fait)

Sy = symptôme : sy -, sy +, sy + (voir § 3.3 Matériel et Méthodes)

a = absence du sujet

Tableau 35. Suivi sérologique, parasitologique et clinique des 15 sujets non-traités entre la date de diagnostic et la fin du suivi.

Les sujets 1 à 8 sont restés négatifs en parasitologie pendant tout le suivi. Alors que les sujets 3 à 8 sont restés positifs au CATT pl lors des 3 visites, les sujets 1 et 2 sont devenus négatifs en mars 1999. Les sujets 1 à 6 n'ont pas présenté de signes cliniques pendant le suivi (sy -). Les sujets 7 et 8, seulement revus en mars 1999, ont présenté des signes cliniques sans atteinte neurologique apparente (sy +). En 1996, le sujet 7 a montré des troubles du comportement et de la conscience et une double centrifugation du LCR effectuée par le PNLTHA a mis en évidence des trypanosomes.

Les sujets 9 à 14 sont restés positifs en parasitologie et au CATT pl pendant tout le suivi. Parmi ces 6 sujets, seul le 14 a présenté des signes cliniques d'atteinte neurologique.

Le sujet 15 a été fortement positif au CATT pl et a été confirmé parasitologiquement lors des visites de juin 1997 et janvier 1998. Il s'est rendu au PRCT de Daloa pour se faire traiter en novembre 1998, mais aucun trypanosome n'a été mis en évidence ni dans le sang ni dans le LCR. Il a alors été reconvoqué en janvier 1999 au centre de traitement, mais là encore, les tests parasitologiques ont été négatifs tout comme lors de notre troisième visite en mars 1999. Entre novembre 1998 et mars 1999, parallèlement à la disparition des parasites, nous avons observé une rapide diminution du score d'agglutination au CATT pl.

Parmi les sujets restés positifs en sérologie et/ou en parasitologie pendant le suivi, et les sujets présentant des signes cliniques lors de la troisième visites (sujet 3 à 14), seuls les sujets 6, 7, 10, 11 et 13 ont accepté la ponction lombaire. Cependant, aucun trypanosome n'a été mis en évidence par SC du LCR et aucune trace d'ADN de *T. brucei* ssp. n'a été détectée par PCR/LCR (tableau 36). Le test Latex/IgM, négatif pour les sujets 6, 7 et 13 a été très faiblement positif pour les sujets 10 et 11, mais les scores obtenus (respectivement 2 et 1) ne permettent pas de suspecter une atteinte neurologique (Lejon *et al.*, 1998).

Sujets	6	7	10	11	13	C1	C2	C3
SC LCR	-	-	-	-	-	+	+	+
Latex/IgM	0	0	2	1	0	128	256	256
PCR/LCR	-	-	-	-	-	+	+	+

Tableau 36: résultats des test Latex/IgM et PCR/LCR pour 5 sujets de l'étude et pour 3 sujets positifs à la SC du LCR (C1, C2 et C3).

Les souches des sujets 9 à 15 ont pu être isolées. Aucune variabilité génétique n'a été observée parmi ces souches par la caractérisation isoenzymatique. Toutes les souches ont été identifiées comme appartenant au zymodème 3.

Les patients 3, 5 et 15 ont été suivis par un tradipraticien.

Ainsi, cette deuxième enquête confirme la diversité de présentations cliniques telle que celle mise en évidence lors de la première enquête. Elle confirme aussi, avec cette fois des arguments objectifs, la diversité d'évolutions cliniques suspectée lors de la première enquête sur la base de réponses subjectives. En effet, nous avons observé des cas de guérison spontanée, des formes asymptomatiques ainsi que des évolutions classiques vers une deuxième période de la maladie avec apparition progressive ou brutale de troubles neurologiques.

Les résultats de nos deux enquêtes ont été décrits et détaillés séparément mais ceux-ci seront discutés ensemble dans la sixième partie de cette thèse. Nous avons fait un résumé de la stratégie d'analyse suivie ainsi qu'un bilan des questions qui se sont posées à chacune des étapes de la présentation de nos résultats (tableau 37). Ces questions ainsi que les hypothèses qu'elles introduisent seront développées dans la partie suivante.

Il est important d'ajouter que des résultats issus de ce travail n'ayant pas un rapport direct avec notre problématique mais permettant d'approfondir nos connaissances en matière de diagnostic et d'épidémiologie de la THA ont été publiés (Truc et al., 1998a; Truc et al., 1998c; Jamonneau et al., 2000). Ces articles sont présentés en annexe 15.

Etapes	Résultats	Questions posées
Première enquête		
1 Population d'étude	139 sujets	
2 Isolement	64 souches isolées Faible taux d'isolement	Des paramètres liés à l'individu ou à l'hôte influencent l'isolement? voir Etape 3
3 Comparaison des populations souches isolées et non-isolées	Ethnie et foyer d'origine ont une influence sur l'isolement	
4 Caractérisation par l'électrophorèse des isoenzymes des souches isolées	61 Z3 et 3 Z38 Monomorphisme	Une différence entre les souches isolées et les souches non isolées n'a pas été mise en évidence? voir Etape 7
5 Etude clinique/biologique	Diversité de tableaux cliniques confirmée par les dosages biologiques	La diversité clinique est-elle liée à la faible diversité génétique mise en évidence (Z3 et Z38)? S'il existe une différence génétique entre les souches isolées et les souches non-isolées, celle-ci est-elle liée à la diversité clinique? voir Etapes 6 et 7
6 Corrélations Z3/Z38 et diversité clinique	Pas de corrélations	MLEE pas assez sensible? voir Etape 8
7 Corrélation souches isolées/souches non-isolées et diversité clinique	Pas de corrélations	MLEE pas assez sensible? voir Etape 8
8 Identification par RAPD	Confirme le monomorphisme isoenzymatique	
Deuxième enquête		
9 Suivi sérologique, parasitologique et clinique de sujets refusant le traitement	Diversité de tableaux cliniques confirmée. Mise en évidence d'une diversité d'évolutions cliniques. Monomorphisme génétique des souches isolées.	

Tableau 37. Stratégie d'analyse des résultats

Sixième partie: Discussion

Les résultats obtenus lors de nos deux enquêtes sont discutés dans cette sixième partie. Nous commencerons par l'examen des résultats de l'isolement des souches et une attention particulière sera portée à l'important taux d'échec observé. Nous discuterons alors les résultats de l'identification isoenzymatique des souches isolées et notamment de l'important monomorphisme génétique mis en évidence et confirmé par d'autres techniques d'identification. En suite, nous synthétiserons les résultats de l'analyse clinique qui mettent en évidence une importante diversité de présentations et d'évolutions cliniques. Nous discuterons les conséquences de ces résultats en matière d'épidémiologie. Enfin, nous concluerons par un résumé des résultats importants de cette étude et des perspectives de recherche qui en découlent. Ce résumé sera présenté sous forme de tableau (tableau 38).

1. Isolement des souches

Les taux d'isolement observés lors de notre étude sont globalement faibles (voir Partie 5, § 1.2.1) comparés à ceux déjà décrits dans la littérature: Aerts *et al.* (1992) et Truc *et al.* (1992) ont obtenu des taux allant de 80 à 90% notamment parmi des patients dépistés en Côte d'Ivoire. Il est possible que les lots de KIVI utilisés soient en partie responsable du faible taux d'isolement observé, par exemple si les conditions de stockage (température) n'ont pas été respectées lors du transport entre le fournisseur (IMT Anvers) et l'IPR, ce qui est malgré tout peu probable étant données les précautions d'envoi et de réception. De plus, les taux d'isolement sont restés constants quel que soit le lot utilisé. Il est aussi possible que l'un des deux constituants principaux du milieu d'isolement de ces 2 lots, le serum foetal de veau (SFV) et l'hémoglobine (Hb) soit, en cas d'altération ou de qualité de lot, à l'origine des nombreux échecs. Pour tester cette hypothèse, il faudrait comparer les taux d'isolement de lots de KIVI fabriqués avec différents lots de SFV ou d'Hb.

Nous observons dans notre étude que le taux d'isolement varie significativement selon le foyer d'origine et le groupe ethnique du patient (voir Partie 5, § 1.2.2). Or, d'après McNamara *et al.* (1995) l'échec ou le succès de l'isolement dépendrait essentiellement de la proportion de formes courtes (stumpy) et de formes longues (slender) dans le sang du patient au moment de l'inoculation. Plus il y a de formes courtes dans le sang inoculé et plus il y a de chances que le KIVI se positive car comme chez la glossine, seules ces formes peuvent se transformer en formes procycliques et se multiplier. On peut alors penser qu'un facteur, lié au parasite ou à l'hôte, est responsable de la présence en faible quantité de formes courtes dans le sang des patients dépistés dans les foyers où le taux d'isolement est faible:

- Concernant le parasite, la présence de souches particulières, par exemple caractérisées par une absence du stade “ formes courtes ”, pourrait expliquer les faibles taux d’isolement observés. Par ailleurs, on constate que les taux d’échecs à l’isolement sont plus faibles dans les foyers où de nombreuses campagnes de lutte ont été menées (la Côte d’Ivoire est restée un pays socialement stable ces 40 dernières années, dans lequel la lutte contre la THA a pu rester active et où toutes les flambées épidémiques ont systématiquement et rapidement été endiguées par des vastes programmes de lutte) et ont permis de contrôler la situation (Daloa, Bouaflé, Aboisso et Sinfra). Le seul foyer où le taux d’isolement est élevé est le foyer de Bonon dans lequel l’épidémie est très récente et n’a pas encore été endiguée. Ces campagnes de lutte pourraient exercer une sélection au sein des souches circulant dans les foyers. En effet, les individus infectés par des souches « virulentes » maintenant des fortes parasitémies seront plus facilement dépistés par les tests de dépistage direct qui manquent souvent de sensibilité (Truc *et al.*, 1998a). Il resterait alors dans les foyers contrôlés, une majorité de patients infectés par des souches « peu virulentes », occasionnant des faibles parasitémies et difficiles à isoler.
- Concernant l’hôte, nous avons remarqué que les échecs sont plus fréquents parmi les autochtones que parmi les allogènes et que le taux de réussite est plus élevé au sein d’une population au contact récent avec la THA (voir Partie 5, § 1.2.2). L’existence d’une éventuelle susceptibilité individuelle à l’infection pourrait être à l’origine des échecs à l’isolement parce qu’un sujet résistant à la THA ne montrera que des faibles parasitémies et par conséquent, une faible quantité de formes courtes responsable des nombreux échecs. L’existence d’un tel phénomène est largement discutée par la suite.

Ainsi, sur la base des résultats de McNamara *et al.* (1995), il serait intéressant d’étudier les proportions de formes stumpy et slender (morphométrie) au moment de l’inoculation de KIVI effectués dans différents foyers à partir d’individus allogènes et autochtones. Il paraît aussi indispensable d’étudier le réel pouvoir de sélection du KIVI, ainsi que de toutes les techniques d’isolement des trypanosomes. Les résultats obtenus en caractérisation génétique des trypanosomes sont probablement biaisés du fait de cette sélection. Il faut, à partir d’une cohorte de patients trypanosomés, tester au même moment, plusieurs techniques d’isolement: KIVI (culture *in vitro* de formes procycliques), sur souris et/ou rats (culture *in vivo* de formes sanguicoles) ou sur fibroblastes (culture *in vitro* de formes sanguicoles) et de comparer génétiquement, à l’aide de différentes méthodes d’identification, les souches isolées par ces différentes techniques. Ce type d’étude est actuellement en cours à l’IPR de Bouaké sur des souches récemment isolées dans le foyer de Bonon. Cependant, l’idéal serait d’identifier les trypanosomes directement dans les liquides biologiques de l’homme (sang, LCR et lymph), sans passer par les étapes d’isolement et de culture, à l’aide de marqueurs moléculaires spécifiques.

Concernant les problèmes rencontrés lors de l'isolement, il serait aussi intéressant de connaître les proportions de formes courtes et longues dans le sang au cours de l'évolution de la maladie. Il serait envisageable d'effectuer une étude morphométrique des trypanosomes collectés par minicolonnes à partir de sang de patients diagnostiqués en P1 et P2 et de comparer les résultats des KIVI prélevés au même moment.

2. Identification des souches isolées

Les souches isolées lors de notre étude ont été caractérisées à l'aide de deux techniques: l'électrophorèse des isoenzymes et les RAPD.

L'analyse isoenzymatique (voir Partie 5, § 1.2.3) permet de façon classique de distinguer *T. congolense* et *T. brucei* ssp., puis au sein de *T. brucei* ssp., de distinguer le groupe 1 de *T. b. gambiense* et le groupe *T. b.* bouaflé. Les souches isolées lors de cette étude ont été identifiées comme appartenant à seulement 2 zymodèmes (Z3 et Z38) du groupe 1 de *T. b. gambiense*, avec une nette prédominance du Z3.

L'analyse RAPD de 50 souches de notre étude (voir Partie 5, § 1.4.3) confirme les résultats obtenus par l'électrophorèse des isoenzymes. Elle permet de faire les mêmes distinctions interspécifiques (*T. congolense* et *T. brucei* ssp.) et intraspécifiques (groupe 1 de *T. b. gambiense* et *T. b.* bouaflé). Ces résultats confirment ceux de Waitumbi & Murphy (1993) et Kanmogne *et al.* (1996) qui ont comparé les RAPD aux RFLP et à l'électrophorèse des isoenzymes. D'après Gibson *et al.* (1999), les RAPD sont une technique de choix pour une analyse rapide et facile des souches de trypanosomes. De plus, les souches peuvent être caractérisées sur la base d'un grand nombre d'amorces, permettant d'amplifier des locus monomorphes ou polymorphes (Tibayrenc *et al.*, 1993). Cependant, les profils obtenus comportent souvent plusieurs bandes dont l'intensité est très variable, ce qui rend la lecture difficile (choix des bandes à prendre en compte). Lors de notre étude, cette technique a confirmé l'important monomorphisme de nos souches, mais elle a mis en évidence une microvariabilité génétique parmi les souches appartenant au Z3. Cette microvariabilité est reproductible mais son interprétation en terme de génétique est difficile (Truc & Cuny, sous presse).

Ainsi, toutes les souches isolées durant notre étude sont génétiquement similaires. Une étude récente de caractérisation de souches de trypanosomes d'origines géographiques diverses, par la technique d'amplification par PCR de séquences microsatellites, a aussi mis en évidence l'absence de variabilité génétique parmi 9 souches isolées en Côte d'Ivoire depuis 1993 (Biteau *et al.*, 2000). Ces 9 souches ont été identifiées comme appartenant au groupe 1 de *T. b. gambiense*, ce qui confirme les résultats de la caractérisation isoenzymatique qui avait préalablement classé ces souches dans le Z3.

Nous pouvons ainsi conclure que quelle que soit la technique de caractérisation utilisée (électrophorèse des isoenzymes, RAPD, microsattellites), il existe un important monomorphisme génétique au sein des souches actuellement isolées dans les foyers ivoiriens. Une seule entité génétique peut-être définie sur la base des résultats isoenzymatiques: le zymodème Z3.

Ce dernier était déjà fréquent en Côte d'Ivoire au début des années 1990 (Truc *et al.*, 1997a). L'identification de souches isolées dans les foyers ivoiriens de 1992 à 1999 (Jamonneau *et al.*, sous presse, article en annexe 13) montre que ce zymodème est de plus en plus majoritaire avec par exemple 81% des souches isolées en 1996 et 96% en 1998. Cette dernière étude a montré que plusieurs zymodèmes du groupe 1 de *T. b. gambiense* (Z1, 2, 11 et 12) identifiés entre 1978 et 1992 ont apparemment disparu et que depuis 1992, seulement 4 zymodèmes sont représentés en Côte d'Ivoire (Z3, 38, 39 et 41). Le zymodème 38 est présent depuis 1992 avec au moins 1 souche isolée chaque année. Par contre, le Z39 qui est apparu en 1994-1995 n'a plus été identifié après 1995. De même, le Z41 qui est apparu dans le foyer de Daloa en 1992 puis dans le foyer de Sinfra en 1995-1996, n'a plus été isolé depuis 1996. On observe donc une disparition apparente de certains zymodèmes dans les foyers ivoiriens.

Le Z3 semble s'étendre aux dépens des autres zymodèmes. Le même constat a été fait en Guinée dans le foyer de Dubreka: en 1997, sur 8 souches identifiées, 3 appartenaient au Z12 et 5 au Z3, et en 1998, sur 15 souches identifiées, 15 appartenaient au Z3 (Jamonneau *et al.*, sous presse, article en annexe 13). La distribution du Z3 dans tous les foyers ivoiriens (historiques ou récents) et en Guinée est probablement due à la circulation d'un foyer à l'autre de sujets atteints de THA. Ceci a déjà été observé en Afrique Centrale (Truc & Tibayrenc, 1993). En considérant l'hypothèse de l'apparition de la THA en Afrique Centrale, ainsi que l'ont suspectée Truc & Tibayrenc (1993), on peut penser que le Z3 a probablement été importé en Afrique de l'Ouest lors de mouvements de populations (ce zymodème est aussi présent en Guinée Equatoriale, Jamonneau *et al.*, sous presse, article en annexe 13).

Le Z3 a probablement été sélectionné aux dépens des autres zymodèmes, de façon naturelle ou non, ce qui lui a offert une certaine pérennité. On peut penser par exemple que les souches de ce zymodème sont peu pathogènes pour l'homme, ou qu'elles sont plus facilement transmises par les glossines, ou qu'elles ont été sélectionnées par les actions de lutte (voir Partie 6, § 1).

Lors de notre étude, aucune souche du groupe *T. b. bouaflé* n'a été isolée (voir Partie 5, § 1.2.3). Ce résultat confirme ceux obtenus par Jamonneau *et al.* (sous presse, article en annexe 13): aucune souche du groupe *T. b. bouaflé* n'a été isolée chez l'homme depuis 1992 en Côte d'Ivoire. Ceci est important en matière d'épidémiologie car on a plusieurs fois soupçonné l'existence en Côte d'Ivoire de souches de ce groupe, pathogènes pour l'homme, particulièrement virulentes et pour lesquelles un réservoir animal est suspecté (Truc *et al.*, 1997a).

Mais une fois de plus, la technique d'isolement classiquement utilisée depuis 1992, le KIVI, peut être à l'origine de cette éventuelle absence du groupe *T. b.* bouaflé car il est possible que les souches humaines de ce groupe se développent moins bien dans ce milieu d'isolement que les souches du zymodème Z3 par exemple. Cependant, des souches du groupe *T. b.* bouaflé ont plus récemment été isolées chez des animaux domestiques et sauvages (Truc et al., 1997a; 1997b). Un facteur lié à l'homme, présent dans le sang (l'hémoglobine par exemple), pourrait alors intervenir dans les échecs à l'isolement de ces souches. Ceci confirme la nécessité d'étudier le rôle sélectif des techniques d'isolement de trypanosomes.

Un cas d'infection mixte à *T. brucei* ssp. et à *T. congolense* a été mis en évidence lors de notre étude (voir Partie 5, § 1.2.4). La résistance de *T. congolense* au sérum humain a déjà été observée (Rickman & Robson, 1970; Joshua, 1989) et des infections passagères de *T. congolense* chez l'homme ont déjà été suspectées (Noireau *et al.*, 1986b), mais c'est la première fois que la présence de ce parasite est prouvée chez l'homme et qu'un tel cas d'infection mixte est observé. Il est possible que ce patient ait d'abord été infecté par *T. brucei* ssp., qui a pu provoquer une immunodéficience permettant à *T. congolense* de se développer, mais peut-être de façon provisoire. Cependant, il serait aussi possible que cette souche de *T. congolense* soit naturellement résistante au sérum humain et dans ce cas, il serait intéressant de connaître la réelle prévalence de ce type d'infection, et d'en connaître le pouvoir pathogène chez l'homme s'il existe.

Des infections multiples à *T. brucei gambiense*, observées chez la glossine, sont suspectées chez l'homme mais n'ont jamais été démontrées à notre connaissance. Si de telles infections existaient (en absence de compétition), celles-ci ne pourraient être mise en évidence avec les techniques classiques d'isolement et de culture. En effet, il a été montré que si deux souches sont inoculées chez la souris ou mises en culture sur milieu axénique, une souche se développe aux dépens de l'autre (Seed, 1978). Il serait intéressant de cloner des trypanosomes directement issus du sang humain (à partir par exemple des parasites observés dans une minicolonne) et de caractériser les clones obtenus avec différentes techniques d'identification. Ceci permettrait par exemple de mettre en évidence l'existence de nouveaux clones jusque là jamais identifiés et dont la pathogénicité serait à étudier. On peut aussi supposer dans notre étude, que les milieux d'isolement et/ou de culture sont particulièrement favorables au développement des souches Z3 qui en cas d'infections multiples ou mixtes masqueraient l'existence des autres souches.

Nous venons de discuter les résultats de l'isolement et de l'identification génétique des souches. Nous suspectons un important monomorphisme génétique au sein des souches circulant actuellement dans les foyers ivoiriens. Ce monomorphisme reste à démontrer sur un échantillonnage plus large et en utilisant d'autres techniques d'isolement, de culture et d'identification. Nous allons maintenant nous intéresser aux résultats de l'étude clinique réalisée parallèlement à l'étude génétique, auprès des patients intégrés dans nos deux enquêtes.

3. Etude clinique des sujets atteints de THA

Lors de la première enquête, nous avons mis en évidence une importante diversité de tableaux cliniques (voir Partie 5, § 1.3.2). En effet, tous les degrés d'atteinte ont été observés, des sujets cliniquement sains (aucun syndrome détecté) aux sujets décédés dans un état grabataire. Cette diversité a été confirmée par les dosages biologiques effectués à l'IMT d'Anvers (voir Partie 5, § 1.3.3). Différents types d'évolutions cliniques ont aussi été mis en évidence. Certains sujets se sentant malades depuis seulement quelques mois étaient déjà en P2 alors que des sujets malades depuis plus de 12 mois étaient encore en P1 (voir Partie 5, § 1.3.2). Il semble que certaines formes cliniques aient une évolution plus rapide que d'autres, se manifestant par une atteinte rapide du système nerveux. Cependant ces observations concernant la date d'apparition des symptômes ne sont basées que sur des réponses subjectives des patients.

La deuxième enquête a permis d'étudier en détail et à long terme, l'évolution sérologique, parasitologique et clinique de la maladie chez plusieurs sujets refusant le traitement, permettant de confirmer l'existence d'une importante diversité de tableaux cliniques (voir Partie 5, § 2.2 et 2.3). Nous avons pu observer des formes gambiennes « classiques » de THA dont la période asymptomatique est variable. Ensuite, 2 sujets sont décédés durant le suivi suite à une atteinte neurologique sévère et brutale. Enfin, chez certains sujets, les parasites ont apparemment disparu du sang et même du LCR. Cette disparition s'est accompagnée d'une diminution plus ou moins rapide du taux d'anticorps anti-trypanosomes dans le sang des patients.

Une infection passagère par d'autres trypanosomes tels que *T. congolense* (Truc *et al.*, 1998b, article en annexe 12) ou *T. b. brucei* pourrait expliquer les cas de diminution rapide de ce taux d'anticorps. Ces trypanosomes, étant sensibles au sérum humain, ont pu être rapidement éliminés mais leur présence passagère dans le sang a pu être, d'une part responsable de la positivité au CATT par réaction croisée (Noireau *et al.*, 1986a) et d'autre part, responsable de la positivité de la mAECT. Le taux d'anticorps a alors rapidement chuté après l'élimination des parasites. Cependant, nous avons observé qu'une rapide décroissance du taux d'anticorps ne reflète pas nécessairement une infection passagère à des trypanosomes se développant habituellement chez l'animal, puisque le même tableau de résultats a été observé pour le sujet 15 qui est resté porteurs de trypanosomes pendant 4 ans et qui est subitement devenu négatif en parasitologie et en sérologie. La souche isolée chez ce sujet a été identifiée comme appartenant au zymodème 3 du groupe 1 de *T. b. gambiense*.

Une disparition lente des anticorps est incompatible avec une infection passagère à d'autres trypanosomes. En effet, il est peu probable qu'un taux d'anticorps non spécifiques de

T. b. gambiense ai pu rester assez élevé pour maintenir des réactions croisées avec le CATT pendant 3 ou 4 ans. En fait, les sujets concernés ont plus probablement été en contact avec *T. b. gambiense* mais ils ont apparemment réussi à éliminer progressivement le parasite entraînant une diminution de la séropositivité. Si ces sujets étaient toujours porteurs de trypanosomes en fin de suivi, le CATT se serait maintenu positif. En effet, outre les GVS du type LiTat1.3 (base du réactif), le réactif du CATT (non purifié), contient de nombreux autres épitopes. Alors, un patient en première période, atteint de THA depuis plusieurs années et toujours porteurs de trypanosomes (même à très faible parasitémie), présentera des taux d'anticorps anti-trypanosomes assez élevés pour réagir avec les antigènes spécifiques ou non du réactif (Jamonneau *et al.*, 2000; Büscher, communication personnelle). Ainsi, en plus de la diversité de tableaux et d'évolutions cliniques, nous avons pu mettre en évidence des cas de guérison spontanées, souvent suspectés dans la littérature mais encore jamais démontrés.

4. Origine de la variabilité clinique: diversité génétique des trypanosomes ou susceptibilité individuelle à l'infection?

Quelque soit la parasitose considérée, l'existence d'une diversité clinique peut avoir deux origines: le parasite ou l'hôte. Dans le cas de la maladie de Chagas, Mile *et al.* (1981) suggéraient déjà que les différentes entités génétiques mises en évidence au sein de l'espèce *T. cruzi* (Mile *et al.*, 1978; Tibayrenc *et al.*, 1985; 1986) pouvaient être en partie responsables de la diversité d'évolutions cliniques observées (Apt *et al.*, 1987; Brenière *et al.*, 1989; Andrade *et al.*, 1992). Des corrélations entre types génétiques et évolutions cliniques ont été mises en évidence en pathologie expérimentale (Laurent *et al.*, 1997) puis chez l'homme, par Luqueti *et al.* (1986) ou Montamat *et al.* (1996) mais n'ont pas été observées par Brenière *et al.* (1985). Dans le domaine de la THA, dans le foyer du sud-est de l'Ouganda, Smith & Bailey (1997) ont montré sur la base de résultats isoenzymatiques, que les souches du groupe « Busoga » était plus pathogènes (responsables d'une forme aiguë) que les souches du groupe « Zambezi » (responsables d'une forme chronique). Dans le cadre de notre étude, nous n'avons pas observé une telle diversité génétique. Malgré la diversité des tableaux cliniques observée, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence.

Le rôle de l'hôte dans la variabilité clinique observée pourrait être envisagé. L'existence d'une susceptibilité individuelle à l'infection a déjà été évoquée (Ginoux & Frezil, 1981) et certains auteurs parlent de trypanotolérance. Dans certaines conditions, il est possible qu'un équilibre s'installe entre le parasite et le système immunitaire de l'hôte. Cependant, même si la phase de latence clinique est longue, ces patients peuvent brusquement évoluer en seconde

période de THA, comme si l'équilibre était rompu sous l'action de facteurs divers (par exemple: la malnutrition), entraînant l'apparition brutale de troubles nerveux (Truc *et al.*, 1997a). Ce phénomène est largement décrit en Trypanosomose animale (Murray *et al.*, 1990; Authié, 1994).

Il n'existe pas de données expérimentales sur la susceptibilité individuelle à la THA, mais des arguments indirects ont été mis en évidence. En Afrique Centrale, il a été observé une différence de tolérance à la THA entre les populations de Bantous et de Pygmées, liée à une différence d'activité trypanolytique du sérum humain entre les deux groupes ethniques (Authié *et al.*, 1991; Janssens *et al.*, 1992). Dans le cadre de notre travail, la répartition ethnique des patients intégrés pour la première enquête était classique (Laveissière & Hervouët, 1991; Laveissière *et al.*, 1994) avec 28% d'autochtones et 72% d'allogènes (voir Partie 5, § 1.1), alors que la répartition ethnique parmi les 63 sujets suivis lors de la deuxième enquête était inhabituelle: 48 et 52% (voir Partie 5, § 2.1). Ainsi, parmi les sujets dépistés, les allogènes semblent se rendre au centre de traitement plus spontanément et plus rapidement que les autochtones. Au cours de notre suivi, entre juin 1997 et mars 1999, 29 sujets se sont rendus aux centres de traitement à cause de l'évolution progressive de la maladie, et pour la plupart, à cause de l'apparition de troubles nerveux. Sur ces 29 sujets, 19 (66%) étaient des allogènes venant de zones indemnes de THA. Parmi les 19 sujets toujours non-traités à la fin du suivi, il ne restait plus que 2 allogènes et 17 autochtones. Il semblerait donc que les individus autochtones résistent mieux à la THA que les allogènes, l'atteinte neurologique est plus tardive, et dans certains cas, les parasites sont éliminés. Nous avons aussi déjà vu que le taux d'échecs à l'isolement (KIVI) était plus important parmi les sujets autochtones qui seraient alors porteurs de plus faibles parasitémies que les allogènes. De telles différences de présentations et d'évolutions cliniques entre allogènes et autochtones ont déjà été décrites pour d'autres infections parasitaires telle que la leishmaniose (Alcais *et al.*, 1997). On peut suspecter l'existence d'un phénomène « d'autoimmunisation » parmi les sujets autochtones en contact permanent avec la maladie. Ceci pose le problème de l'arrivée de populations non immunisées (venant de zones indemnes de THA) dans les foyers actifs. Ce problème est bien connu dans le domaine des trypanosomoses animales.

La susceptibilité individuelle et son support génétique ont été mis en évidence dans le cas d'infections virales (Michael *et al.*, 1997) et d'infections bactériennes (Abel & Demenais, 1988; Altare *et al.*, 1998). Dans le domaine des maladies parasitaires, plusieurs études ont montré le rôle de facteurs génétiques dans la susceptibilité et/ou la résistance aux infections comme le paludisme (Abel *et al.*, 1991; Garcia *et al.*, 1998a), la schistosomiase (Marquet *et al.*, 1996), la leishmaniose (Mary *et al.*, 1999) ou la loase (Garcia *et al.*, 1999). Dans le cas du paludisme ou de la schistosomiase, les régions 5q31 et 5q33 du chromosome 5 dans lesquelles il existe des gènes codant pour de nombreuses interleukines semblent particulièrement impliquées (Marquet *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1998b). Concernant les Trypanosomoses, des études expérimentales chez la souris ont permis d'identifier des gènes sur les chromosomes 5,

11 et 17 impliqués dans la résistance à *T. congolense* (Kemp *et al.*, 1997). Kaushik *et al.* (2000) soulignent le rôle de certaines cytokines (interleukines 6, 10 et 12 et TNF-alpha) du contrôle de l'activité macrophagique et de la sécrétion de NO par les macrophages, dans cette résistance.

En THA, les seuls arguments disponibles permettant d'évoquer un éventuel déterminisme génétique d'une susceptibilité individuelle à l'infection, sont à notre connaissance indirects. Okia *et al.* (1994) ont montré que pour *T. b. rhodesiense*, l'existence d'un antécédent familial de THA était un facteur de risque significatif pour un sujet vivant en zone d'endémie, alors que Khonde *et al.* (1997) ont mis en évidence des concentrations familiales de cas de maladie à *T. b. gambiense*. Ce phénomène a déjà été décrit au Congo (Frezil *et al.*, 1978). Dans les études précédentes, le comportement et l'environnement communs aux membres d'une même famille ont été soulignés (« effet case », Frezil *et al.*, 1978) et le support génétique de ces ressemblances n'a pas été étudié. A ce sujet, lors de notre première enquête, 30 patients sur 139 ont eu un antécédent familiale de THA (voir Partie 5, § 1.1).

Ainsi, malgré l'importance des facteurs de risques environnementaux et comportementaux dans l'épidémiologie de la THA, l'hypothèse d'une susceptibilité individuelle à l'infection non confirmée à notre connaissance doit être étudiée. En effet, les sujets trypanotolérants résidant en permanence dans les zones de transmission, pourraient constituer un réservoir humain de trypanosomes et favoriser le maintien de la maladie à l'état endémique que l'on attribue souvent à l'existence d'un réservoir animal à *T. b. gambiense* (Mehlitz *et al.*, 1982; Truc *et al.*, 1991). Ils pourraient être aussi à l'origine de la réapparition de la THA dans les foyers historiques apparemment éteints. De plus, l'existence d'une trypanotolérance chez l'homme pourrait en partie expliquer les cas des sujets séropositifs non confirmés parasitologiquement (Kabiri *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, sous presse). En effet, l'éventuel équilibre entre l'hôte et le parasite peut se traduire par une très faible parasitémie non-délectable par les tests parasitologiques qui manquent souvent de sensibilité (Truc *et al.*, 1998a). Par exemple, Jamonneau *et al.* (2000) ont mis en évidence l'existence de sujets positifs au test de trypanolyse, considéré comme étant 100% spécifique (Van Meirvenne *et al.*, 1995), mais négatifs aux tests parasitologiques. Garcia *et al.* (sous presse) ont montré par PCR, la présence d'ADN de *T. brucei* ssp. dans le sang de sujets séropositifs au CATT et négatifs en parasitologie (pour 14% d'entre eux). Si ces sujets sont réellement porteurs de trypanosomes, ils constituent un réservoir humain de la maladie. La question se pose alors de savoir s'il faut oui ou non traiter ses sujets sachant que d'après l'OMS, seuls les sujets chez lesquels le parasite a été mis en évidence par les tests de dépistage direct doivent être traités.

Ainsi, si l'hypothèse d'une susceptibilité individuelle à la THA devait se confirmer, son impact épidémiologique devra être évalué. Malheureusement, il est difficile d'apprécier l'importance de ce phénomène qui diffère probablement d'un foyer à l'autre, selon le niveau d'endémicité de la maladie et l'historique du foyer. Un indice de latence clinique et de trypanotolérance (ILT) a déjà été proposé par Ginoux & Frezil (1981) suite à une étude réalisée

au Congo. Lors de cette étude, les sujets étaient sérologiquement dépistés au test d'ImmunoFluorescence Indirecte (IFI) avant d'être confirmés parasitologiquement. Le calcul de l'ILT pouvait se faire de la façon suivante:

ILT = nombre total de sujets IFI + / nombre total de patients

D'après les mêmes auteurs, « l'ILT est proche de 1 dans les zones épidémiques (où la maladie a un cours rapide, avec une parasitémie importante et des signes cliniques accusés) et donne une valeur élevée dans les zones d'endémicité (caractérisées par un haut degré de trypanotolérance).

En Côte d'Ivoire, en calculant les ILT des prospections médicales de l'étude de la façon suivante: ILT = nombre total de sujets CATT + / nombre total de patients, on obtient à Aboisso: ILT (Aboisso 07/97) = 3,14 et ILT (Aboisso 11/97) = 5,67 alors qu'à Bonon, ILT (Bonon 12/97) = 1,4 et ILT (Bonon 05/98) = 1,43. Ces résultats semblent confirmer ceux obtenus par Ginoux & Frezil (1981) étant donné le statut épidémiologique des 2 foyers considérés. Il serait intéressant de calculer le même type d'indice en utilisant un test sérologique ayant une spécificité de 100% comme l'immunotrypanolyse (Van Meirvenne *et al.*, 1995).

Il est important d'ajouter que parmi les sujets chez lesquels on peut suspecter une guérison spontanée, 3 (sujets 3, 5 et 15) ont été suivis par un tradipraticien (utilisation de la médecine traditionnelle par les plantes). Au moment où il a été pris en charge (1995), le sujet 5 présentait déjà des signes cliniques caractéristiques d'une deuxième période de THA. Son état de santé s'est alors rapidement amélioré (voir Partie 5, § 2.3). Nous connaissons certaines plantes utilisées par ces divers tradipraticiens (*Fagara xantylloïdes*, *Deutarium microcarpum*) et il serait intéressant d'étudier leur éventuel effet trypanocide.

Conclusions et perspective

Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la diversité de tableaux et d'évolutions cliniques, souvent décrite en matière de THA pourrait avoir 2 origines : le parasite, du fait de sa variabilité génétique, et l'hôte, puisqu'une susceptibilité individuelle à l'infection est suspectée. Lors de notre étude, l'analyse génétique des souches isolées semble mettre en évidence un important monomorphisme au sein des trypanosomes circulant dans les foyers ivoiriens alors qu'une importante diversité clinique a été observée. La diversité génétique du parasite ne semble pas être responsable de cette diversité clinique. Par contre, plusieurs arguments indirects semblent en faveur de l'hypothèse de l'existence d'une susceptibilité individuelle à l'infection. Des études sont nécessaires pour infirmer ou confirmer cette hypothèse. Si celle-ci se confirme, par l'étude de son éventuel support génétique, il faudra mesurer l'importance de ce phénomène.

Les résultats de cette thèse nous ont amené à nous poser plusieurs questions et hypothèses qu'il serait intéressant de développer pour améliorer nos connaissances en matière d'épidémiologie. Pour en faciliter la lecture, ces résultats, ainsi que les hypothèses et les perspectives de recherche qui en sont issues et les produits attendus de ces perspectives sont présentés en figure 19.

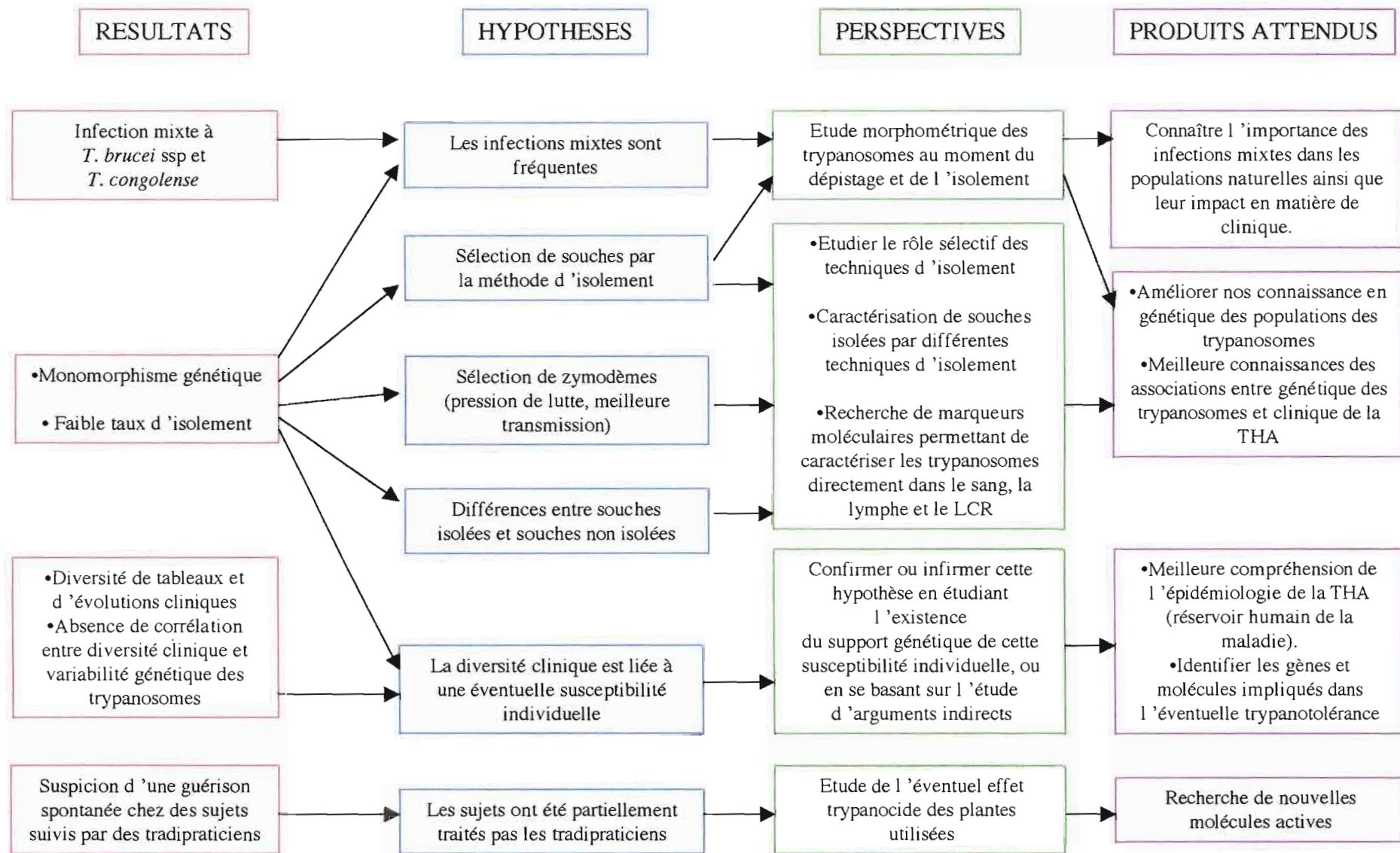


Figure 19. Synthèse des résultats de notre étude, bilan des hypothèses posées et des perspectives de recherche

Références bibliographiques

Abel L. & Demenais F. (1988). Detection of a major gene for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean Island: Desirade Island. *Am. J. Hum. Genet.*, **42**, 256-266.

Abel L., Demenais F., Prata F., Souza A.E. & Dessein A. (1991). Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility/resistance to infection by *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Hum. Genet.*, **48**, 959-970.

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. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**, 394-395.

Alcáis A., Abel L., David C., Torrez M.E., Flandre P. & Dedet J.P. (1997). Risk factors for onset of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.*, **57**, 79-84.

Altare F., Jouanguy E., Lamhamedi S., Doffinger R., Fischer A. & Casanova J.L. (1998). Mendelian susceptibility to mycobacterial infection in man. *Current Opinion in Immunology*, **10**, 413-417.

Andrade S.G., Rassi A., Magalhaes J.B., Ferriolli Filho F. & Luquetti A.O. (1992). Specific chemotherapy of Chagas disease. A comparison between the the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans. Roy. Soc Trop. Med. Hyg.*, **86**, 624-626.

Anez N. (1982). Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV-a. A reconsideration of its systematic position. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **77**, 405-415.

Apt W., Aguilera X., Arribada A., Gomez L., Miles M.A. & Widmer G. (1987). Epidemiology of Chagas' disease in northern Chile: Isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* from domestic and sylvatic transmission cycles and their association with cardiopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **37**, 302-307.

Atkins J. (1734). *The Navy Surgeon*

Authié E., Cuisance D., Force-Barge P., Frezil J.L., Gouteux J.P., Jannin J., Lancien J., Laveissière C., Lemesre J.L., Mathieu-Daudé F., Nitcheman S., Noireau F., Penchenier L., Tibayrenc M. & Truc P. (1991). Some new prospects in epidemiology and fight against human african trypanosomiasis. *Research Revue of Parasitology* **51** (1-4), 29-46.

Authié E. (1994). Bovine trypanosomosis and trypanotolerance: a role for "congopain"? *Parasitology today*, **10**, 360-364

Ayed Z., Brindel I., Bouteille B., Van Merveinne N., Doua F., Houinato D., Dumas M., & Jauberteau M.O. (1996). detection and characterization of autoantibodies directed against neurofilament proteins in human African trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **57**, 1-6.

Bailey J.W., Cunningham M.P. & Kimer C.D. (1967). The indirect fluorescent antibody technique applied to dried blood for use a screening test in the diagnosis of human trypanosomiasis in Africa. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **61**, 696-700.

Bailey J.W. & Smith D.H. (1992). The use of the acridine orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**, 630.

Bajyana-Songa E., Hamers R., Rickman L.R., Nantulya V.M., Mulla A.F. & Magnus E. (1991). Evidence for Widespread asymptomatic *Trypanosoma rhodesiense* human infection in the Luangwa Valley (Zambia). *Trop. Med. Parasitol.*, **42**, 389-393.

Baker J.R. (1995). The subspecific taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *Parasite*, **2**, 3-12.

Bisser S., Bouteille B., Sarda J., Stanghellini A., Ricard D., Jauberteau M.O., Marchan F., Dumas M. & Breton J.C. (1997). Apport des examens biochimiques dans le diagnostic de la phase nerveuse de la Trypanosomose humaine africaine. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **90**, 321-326.

Bisser S., Ayed Z., Bouteille B., Stanghellini A., Breton J.C., Dumas M. & Jauberteau M.O. (2000). Central nervous system involvement in African trypanosomiasis: presence of anti-galactocerebroside antibodies in patients' cerebrospinal fluid. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **94**, 225-226.

Biteau N., Bringaud F., Gibson W.C., Truc P. & Baltz T. (2000). Characterisation of Trypanozoon isolates using micro- and minisatellite markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **105**, 185-201.

Borst P., Van der Ploeg M., Van Hock J.F.M., Tas J. & James J. (1982). On the DNA content and ploidy of trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **6**, 13-23.

Boullerne A.I., Petry K.G., Meynard M. & Geffard M. (1995). Indirect evidence for nitric oxide involvement in multiple sclerosis by characterization of circulating antibodies directed against conjugated S-nitrosocysteine. *J. Neuroimmunol.*, **60**, 117-124.

Bouteille B., Marie-Daragon A., Chauvière G., De Albuquerque C., Enanga B., Dardé M.L., Vallat J.M., Perié J. & Dumas M. (1995). Effect of megalol on *Trypanosoma brucei brucei* acute and subacute infections in Swiss mice. *Acta Trop.*, **60**, 73-80.

Braut J. & Lapin J. (1898). Note sur l'étiologie de la pathogénie de la maladie du sommeil. *Arch. Parasitol.*, **1**, 369.

Brenière S.F., Tibayrenc M., Antezana G., Pabon J., Carrasco R., Selaes H. & Desjeux P. (1985). Résultats préliminaires en faveur d'une relation faible ou inexistante entre les formes cliniques de la maladie de Chagas et les souches isoenzymatiques de *Trypanosoma cruzi*. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **300**, 555-558.

Brenière S.F., Carrasco R., Revollo S., Aparicio G., Desjeux P. & Tibayrenc M. (1989). Chagas' disease in Bolivia. Clinical and epidemiological features and zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **41**, 521-529.

Bruce D. & Nabarro D. (1903). Progress report on sleeping sickness in Uganda. *Sleeping Sickness Commission of the Royal Society*, **2**, 39p.

Bruce D., Hamerton A.E., Bateman H.R. & Machie F.P. (1909). The development of *Trypanosoma gambiense* in *Glossina palpalis*. *Proc. Roy. Soc.*, **81**, 405-414.

Bruce D., Hamerton A.E., Bateman H.R. & Machie F.P. (1911). Further researches on the development of *Trypanosoma gambiense* in *Glossina palpalis*. *Proc. Roy. Soc.*, **83**, 513-527.

Brun R. & Schönenberger M. (1981). Stimulating effect of citrate and *cis*-aconitate on the transformation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms to procyclic forms *in vitro*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **66**, 17-24.

Büscher P., Draelants E., Magnus E., Vervoort T. & Van Meirvenne N. (1991). An experimental latex agglutination test for antibody detection in human African trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, **71**, 267-273.

Büscher P., Magnus E., & Van Meirvenne N. (1994). A latex agglutination test using a mixture of variable antigens of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Bull. Liais. Doc. OCEAC*, **27**, 226.

Büscher P., Lejon V., Magnus E. & Van Meirvenne N. (1999). Improved latex agglutination test for detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense* infected patients. *Acta Trop.*, **73**, 11-20.

Castellani A. (1903). On the discovery of a species of trypanosomia in the cerebro spinal fluid of cases of sleeping sickness. *Proc. R. Soc. ed.*, **81**, 501-508.

Cattand P., Miezian T.W. & de Raadt P. (1988). Human African trypanosomiasis: use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *Bull. W.H.O.*, **66**, 83-86.

Cibulskis R.E. (1988). Origins and organization of genetic diversity in natural population of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, **96**, 303-322.

Cunningham I. (1977). New culture medium for maintenance of Tsetse tissues and growth of Trypanosomatids. *Journal of Protozoology*, **21**, 325-329.

Degen R., Pospichal H., Enyaru J.C.K. & Jenni L. (1995). Sexual compatibility among *Trypanosoma brucei* isolates from an epidemic area in Southeastern Uganda. *Parasit. Res.*, **81**, 253-257.

De Greef C., Imbrechts H., Matthyssens G., Van Meirvenne N. & Hamers R. (1989). A gene expressed only in serum-resistant variant of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **36**, 169-176.

De Greef C. & Hamers R. (1994). The serum resistance-associated (SRA) gene of *Trypanosoma brucei rhodesiense* encodes a variant surface glycoprotein-like protein. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **68**, 277-284.

Dero B., Zampetti-Bosseler F., Pays E. & Steinert M. (1987). The genome and the antigen gene repertoire of *Trypanosoma brucei gambiense* are smaller than those of *T. b. brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **26**, 247-256.

Donelson J. & Turner M. (1985). Les métamorphoses du trypanosome. *Pour la science*, **4**, 14-23.

Dukes P., Rickman L.R., Killick-Kendrick R., Kakoma I., Wurapa F.K., de Raadt P. & Morrow R. (1984). A field comparison of seven diagnostic techniques for Human African Trypanosomiasis in the Luangwa Valley, Zambia. *Tropenmed. Parasit.*, **35**, 141-147.

Dumas M. & Bouteille B. (1996). Human African trypanosomiasis. *Compte-Rendu de la Société de Biologie*, **190**, 395-408.

Dutton J.E. (1902). Preliminary note upon a trypanosoma occurring in the blood of man. Thompson Yates and Johnston Laboratories, Report IV, 455-467.

Dutton J.E. (1903). Notes sur un trypanosome trouvé dans le sang de l'homme. *Ann. Hyg. Méd. Colon.*, **6**, 355-363.

Dutton J.E. & Todd J.L. (1906). The distribution and spread of sleeping sickness in the Congo Free State with suggestions on prophylaxis. Reports of the expedition the Congo, 1903-1905. Liverpool School of Tropical Medicine, Mem XVIII, 25-38.

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.

El-Sayed N.M., Hedge P., Quachenbush J., Melville S.E & Donelson J.E. (2000). The African trypanosome genome. *International Journal of Parasitology*, **30**, 329-345.

Enanga B., Keita M., Chauvière G., Dumas M. & Bouteille B. (1998). Megazol combined with suramin: a chemotherapy regimen which reversed the CNS pathology in a model of human African trypanosomiasis in mice. *Trop. Med. Int. Health*, **3**, 736-741.

Felgenhauer K. & Reiber H. (1992). The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. *Clin. Investig.*, **70**, 28-37.

Foulkes J. (1970). Human trypanosomiasis in Zambia. *Med. J. Zambia*, **4**, 167-177.

Frézil 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, ser. Ent. med. et Parasitol.*, **12**, 111-126.

Frézil J.L., Coulm J., Alary J.C. & Malonga J.R. (1978). La Trypanosomiase humaine au moment du dépistage en République Populaire de Congo. I - Distribution des cas et parasitologie. *Cah. ORSTOM, ser. Ent. med. et Parasitol.*, **16**, 299-307.

Frézil J.L., Samba F., Bosseno M.F. & Molinier M. (1979). Entretien de souches de *Trypanosoma brucei gambiense* en République Populaire du Congo. Etude de la virulence et relations avec l'épidémiologie. *Cah. ORSTOM, ser. Ent. med. et Parasitol.*, **17**, 107-118.

Gallais P., Cros R. & Arquie E. (1953). Contribution à l'étude des périodes cliniques et parasitologiques de la trypanosomiase humaine africaine. *Medecine Tropicale*, **13**, 844-856.

Garcia, A., Cot, M., Chippaux, J.P., Ranque, S., Feingold, J., Demenais, F. & Abel, L. (1998a). Genetic control of blood infection levels in human malaria: evidence for a complex genetic model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58**, 480-488.

Garcia, A., Marquet, S., Bucheton, B., Hillaire, D., Cot, M., Fievet, N., Dessein, A.J. & Abel, L. (1998b). Linkage analysis of blood *Plasmodium falciparum* levels: interest of the 5q31-q33 chromosome region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**, 705-709.

Garcia, A., Abel, L., Cot, M., Richard, P., Ranque, S., Feingold, J., Demenais, F., Boussinesq, M. & Chippaux, J.P. (1999). Genetic epidemiology of host predisposition microfilariemia in human loiasis. *Trop. Med. Int. Health*, **8**, 565-574.

Garcia A., Jamonneau V., Magnus E., Laveissière C., Lejon V., N'Guessan P., N'Dri L., Van Meirvenne N. & Büscher P.. Longitudinal survey of positive Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) but apparently aparasitemic individuals in Côte d'Ivoire: evidence for complex and heterogeneous population. *Tropical Medicine and International Health*, sous presse

Gashumba J.K., Baker R.D. & Godfrey D.G. (1988). *Trypanosoma congolense*: The distribution of enzymic variants in East and West Africa. *Parasitology*, **96**, 475-486.

Gentilini M. (1993). *Médecine Tropicale*. Cinquième édition. Flammarion médecine-sciences.

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

Gibson W.C., Osinga K.A., Michaels P.A.M. & Borst P. (1985a). Trypanosomes of the subgenus *Trypanozoon* are diploid for housekeeping genes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **16**, 231-242.

Gibson W.C., Borst P. & Fase-Fowler F. (1985b). Further analysis of intraspecific variation in *Trypanosoma brucei* using restriction site polymorphism in the maxi-circle of kinetoplast DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **15**, 21-36.

Gibson W.C. (1986). Will the real *Trypanosoma brucei gambiense* please stand up. *Parasitology Today*, **2**, 255-257.

Gibson W.C. & Borst P. (1986). Size-fractionation of the small chromosome of *Trypanozoon* and *Nannomonas* trypanosomes by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **18**, 127-140.

Gibson W.C. (1989). Analysis of a genetic cross between *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitology*, **99**, 391-402.

Gibson W.C. & Whittington H. (1993). Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*: selection of hybrid trypanosomes by introduction of genes conferring drug resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **60**, 19-26.

Gibson W.C. (1995). The significance of genetic exchange in trypanosomes. *Parasitol. Today*, **11**, 465-468.

Gibson W.C., Stevens J. & Truc P. (1999). Identification of trypanosomes: from morphology to molecular biology. In: Progress in human African trypanosomiasis, Ed. Springer, Paris, 7-29.

Ginoux P.Y. & Frezil J.L. (1981). Recherches sur la latence clinique et la trypanotolérance humaine dans le foyer du couloir du fleuve Congo. *Cahier ORSTOM, série Entomologie médicale et Parasitologie*, **XIX**, **1**, 33-40.

Godfrey D.G. & Kilgour V. (1976). Enzyme electrophoresis in characterizing the causative organism of Gambian trypanosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **70**, 219-224.

Godfrey D.G., Baker R.D., Rickman L.R. & Mehlitz D. (1990). The distribution, relationships and identification of enzymatic variants within the subgenus *Trypanozoon*. *Advances in Parasitology*, **29**, 1-39.

Gruby D. (1843). Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. *C. R. Acad. Sci.*, **17**, 1134.

Hager K.M. & Hajduk S.L. (1997). Mechanism of resistance in African trypanosomes to cytotoxic human HDL. *Nature*, **385**, 823-826.

Hajduk S.L. & Vickerman K. (1981). Antigenic variation in cyclically transmitted *Trypanosoma brucei*. Variable antigen type composition of the first parasitemia in mice bitten by trypanosome-infected *Glossina morsitans*. *Parasitology*, **63**, 609-21.

Hajduk S.L., Adler B., Bertrand K., Fearon K., Hager K., Hancock K., Harris M., Le Blanc A., Moore R., Pollard V., Priest J. & Wood Z. (1992). Molecular Biology of African Trypanosomes: Development of new strategies to combat an old disease. *Am. J. Med. Sci.*, **303**, 258-270.

Hanks J.H. & Wallace R.E. (1949). Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biology Med.*, **71**, 196-200.

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., Cattand P., Le Ray D., Barry J.D. & Tait A. (1990). The identification of *T. brucei* subspecies using repetitive DNA sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **39**, 213-226.

Hide G., Welburn S.C., Tait A. & Maudlin I. (1994). Epidemiological relationships of *Trypanosoma brucei* stocks from South East Uganda: evidence for different population structures in human and non human trypanosomes. *Parasitology*, **109**, 95-111.

Hide G., Tait A., Maudlin I. & Welburn S.C. (1996). The origins, dynamics and generation of *Trypanosoma brucei rhodesiense* epidemics in East Africa. *Parasitol. today*, **12**, 50-55.

Hide G. (1999). History of Sleeping Sickness in East Africa. *Clin. Microb. Rev.*, **12**, 112-125.

Hill A.V.S., Allsopp C.E.M., Kwiatkowski D., Anstey N.M., Twumasi P., Rowe P.A., Bennett S., Brewster D., McMichael A.J. & Greenwood B.M. (1991). Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, **352**, 595-600.

Hoare C.A. (1972). The trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph. *Blackwell Scientific Publications, Oxford*.

Jacquard A. (1973). Distances généalogiques et distances génétiques. *Cahiers d'Anthropologie et d'Ecologie humaine*, **1**, 11-124.

Jamonneau V., Truc P., Garcia A., Magnus E. & Büscher P. (2000). Preliminary evaluation of LATEX/*T.b.gambiense* and alternative versions of CATT/*T.b.gambiense* for the serodiagnosis of Human African Trypanosomiasis of a population at risk in Côte d'Ivoire: considerations for mass-screening. *Acta Tropica*, **76**, 175-183.

Jamonneau V., N'guessan P., N'Dri L., Simaro P. & Truc P. (2000). Distribution of *Trypanosoma brucei* ssp in West Africa by multilocus enzyme electrophoresis characterization. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, sous presse.

Jamonneau V., Garcia A., N'Guessan P., N'Dri L., Sanon R., Laveissière C. Frezil J.L. & Truc P.. Clinical and biological evolution of Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, sous presse.

Jamot E. (1926). La maladie du sommeil dans le Nord-Cameroun. *Ann. Méd. Pharm. Col.*

Jamot E. (1929). La maladie du sommeil au Cameroun. Comment nous la combattons? *Revue pratique des Maladies des Pays chauds*, **9**, 326-337.

Jamot E. (1932). La maladie du sommeil au Cameroun en Janvier 1929. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **6**, 473-496.

Jannin J., Moulia-Pelat J.P., Chanfreau B., Penchenier L., Louis J.P., Nzaba P., Elfassi de La Baume F., Eozenou P. & Cattand P. (1993). Trypanosomiase Humaine fricaine: étude d'un score de présomption de diagnostic au Congo. *Bulletin of the World Health Organisation*, **71**, 215-222.

Janssens P.G., Kivits M. & Vuylsteke J. (1992). Médecine et hygiène en Afrique centrale de 1885 à nos jours (2 vol.). Fondation Roi Baudouin, Bruxelles.

Jauberteau M.O., Bisser S., Ayed Z., Brindel I., Bouteille B., Stanghellini A., Gampo S., Doua F., Breton J.C. & Dumas M. (1994). Détection d'auanticorps antigalactocérobrosides au cours de la trypanosomose humaine africaine. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **87**, 333-336.

Jenni L., Marti J., Schweizer J., Betschart B., Le Page R.W.F., Wells J.M., Tait A., Paindavoine P., Pays E. & Steinert M. (1986). Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature*, **322**, 173-175.

Joshua R.A. (1989). Occurrence of human serum-resistant *Trypanosoma congolense* in goats and sheep in Nigeria. *Veterinary Parasitology*, **31**, 107-113.

Kabiri M., Franco J.R., Simarro P.P., Ruiz J.A., Sarsa M. & Steverding D. (1999). Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7. *Tropical Medicine and International Health*, **10**, 658-661.

Kanmogne G.D., Stevens J.R., Asonganyi T. & Gibson W.C. (1996). Genetic heterogeneity in the *Trypanosoma brucei gambiense* genome analysed by random amplification of polymorphic DNA. *Parasitol. Res.*, **82**, 535-541.

Kaukas A., Gashumba J.K., Lanham S.M. & Dukes P. (1990). The substitution of procyclic form for bloodstream form *Trypanosoma brucei gambiense* in isoenzyme studies. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **84**, 242-245.

Kaushik R.S., Uzonna J.E., Zhang Y., Gordon J.R. & Tabel H. (2000). Innate resistance to experimental African trypanosomiasis: differences in cytokine (TNF-alpha, IL-6, IL-10 and IL-12) production by bone marrow-derived macrophages from resistant and susceptible mice. *Cytokine*, **12**, 1024-1034.

Kemp S.J., Iraqi F., Darvasi A., Soller M. & Teale A.J. (1997). Localisation of genes controlling resistance to trypanosomiasis in mice. *Nature and Genetics*, **16**, 194-196.

Khonde N., Pepin J., Nivonsenga T. & De Wals P. (1997). Familial aggregation of *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis in a very high incidence community in Zaïre. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **91**, 521-524.

Kinghorn A. & Yorke W. (1912). On the transmission of human trypanosomes by *Glossina morsitans* Westw., and on the occurrence of human trypanosomes in game. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **6**, 1.

Kooy R.F., Hirumi H., Moloo S.K., Nantulya V.M., Dukes P., Van Der Linden P.M., Duijndam W.A.L., Janse C.J.K. & Overdulve J.P. (1989). Evidence for diploidy in metacyclic forms of African trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 5469-5472.

Kreutzer R.D. & Sousa O.E. (1981). Biochemical characterization of *Trypanosoma* spp. by isozyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **30**, 308-317.

Lanham S.M. & Godfrey G. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasit.*, **28**, 521-534.

Lanham S.M., Grendon J.M., Miles M.A., Povoá M.M. & De Souza A.A. (1981). A comparison of electrophoretic methods for isoenzyme characterization of trypanosomatids. I. Standard stocks of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from northeast Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 742-750.

Lapeyssonnie L. (1960). Deuxième note concernant un cas exceptionnel de trypanosomiase, parasitémie observée pendant 21 ans sans signes cliniques appréciables chez une malade traitée inefficacement pendant les 10 premières années. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **57**, 28-32.

Laurent J.P., Barnabé C., Quesney V., Noël S. & Tibayrenc M. (1997). Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, **114**, 213-218.

Laveissière C. & Hervouët J.P. (1991). La Trypanosomiase humaine en Afrique de l'Ouest. Epidémiologie et contrôle. Ed ORSTOM, coll. *Didactiques*.

Laveissière C., Grebaut P., Lemasson J.J., Meda A.H., Couret D., Doua F., Brou N. & Cattand P. (1994). Les communautés rurales et la lutte contre la maladie du sommeil en forêt de Côte d'Ivoire. OMS, Ed. Liliane Delbarre, Genève.

Lejon V., Büscher P., Sema P., Magnus E. & Van Meirvenne N. (1998). Human African Trypanosomiasis: a latex agglutination field test for quantifying IgM in cerebrospinal fluid. *Bulletin of the World Health Organisation*, **76**, 553-558.

Lejon V., Rosengren L.E., Büscher P., Karlsson J.E. & Sema P. (1999). Detection of light subunit neurofilament and glial fibrillary acidic protein in cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense* - infected patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**, 94-98.

Lejon V., Legros D., Rosengren L.E., Gastellu Etchegorry M. & Büscher P. (sous presse). Biological data and clinical symptoms as predictors of astrogliosis and neurodegeneration in second stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, accepté pour publication.

Le Ray D., Jadin J.B., Famerée L., Willaert E. & Beckers A. (1970). Quelques observations sur l'isolement et l'adaptation *in vitro* des trypanosomes africains pathogènes. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **63**, 675-684.

Le Ray D. (1975). Structures antigéniques de *Trypanosoma brucei* (Protozoa, Kinetoplastida). Analyse immunoélectrophorétique et étude comparative. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, **55**, 459-160.

Lévine R.A., Corliss J.O., Cox F.E., Deroux G., Grain J., Honigberg B. (1980). A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.*, **27**, 37-58.

Lumsden W.H.R., Kimber C.D. & Strange M. (1977). *Trypanosoma brucei*: a miniature anion-exchange/centrifugation technique for the detection of low parasitemias in mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **71**, 421-424.

Lumsden W.H.R., Kimber C.D., Evans D.A. & Doig S.J. (1979). *Trypanosoma brucei* : miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitemias; adapted for field use. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **73**, 312-317.

Lun Z.R. & Desser S.S. (1995). Karyotype analysis of anuran trypanosomes by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *J. Parasitol.*, **81**, 1018-1020.

Luquetti A.O., Miles M.A., Rassi A., De Rezende J.M., De Souza A., Povoá M. & Rodrigues I. (1986). *Trypanosoma cruzi*: Zymodeme associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **80**, 462-470.

MacKichan I.W. (1944). Rhodesian sleeping sickness in eastern Uganda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **38**, 49-60.

MacNamara J.J., Bailey J., 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. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **89**, 388-389.

Magnus E., Vervoort T. & Van Meirvenne N. (1978). A card-agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *T. gambiense* trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belg. Méd. Trop.*, **59**, 169-176.

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.

Marding R.D. & Hutchinson M.P. (1948). Sleeping Sickness of an unusual type in Sierra Leone and its attempted control. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **41**, 481-512.

Marquet, S., Abel, L., Hillaire, D., Dessein, H., Kalil, J., Feingold, J., Weissembach, J. & Dessein, A.J. (1996). Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Nature Genet.* **14**, 181-184.

Martin G., Leboeuf A. & Roubaud E. (1909). Rapport de la mission d'études de la maladie du sommeil au Congo français, 1906-1908. Masson Compagnie, Paris, 721p.

Mary C., Auriault V., Faugere B. & Dessein A.J. (1999). Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. *Infect. Immun.*, **67**, 5559-5566.

Mathieu-Daudé F. (1991). Mode de reproduction de *Trypanosoma brucei* dans ses populations naturelles: implications taxonomiques et épidémiologiques. *Thèse Doct. Sci., Université Montpellier II, France.*

Mathieu-Daudé F. & Tibayrenc M. (1994). Isoenzyme variability of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 by a specific kinetoplast DNA probe. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **50**, 13-19.

Mathieu-Daudé F., Stevens J., Welsh J. Tibayrenc M. & McClelland M. (1995). Genetic diversity and population structure of *Trypanosoma brucei* : clonality versus sexuality. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **72**, 89-101.

Melhitz D. (1986). Le réservoir animal de la maladie du sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense*. *Etudes et Synthèses de l'IEMVT*, **N. 18**.

Mehlitz D., Zillmann U., Scott C.M. & Godfrey D.G. (1982). Epidemiological studies on the animal reservoir of gambiense sleeping sickness. Part III. Characterization of *Trypanozoon* stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Tropenmedizin und Parasitologie*, **33**, 113-118.

Miezan T.W., Meda H.A., Doua F., Djé N.N., Lejon V. & Büscher P. (2000). Simple centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed Pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **94**, 293.

Michael N.L., Chang G., Louie L.G., Mascola J.R., Dondero D., Birx D.L. & Sheppard H.W. (1997). The role of viral phenotype and CCR5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature and Medicine*, **3**, 338-340.

Mile M.A., Sousa A.A., Pova M.M., Shaw J.J., Lainson R. & Toyé P.J. (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, **272**, 819-821.

Mile M.A., Cedillos R.A., Pova M.M., Prata A., Sousa A.A. & Macedo V. (1981). Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas's disease? *The Lancet*, **20**, 1338-1340.

Montamat E.E., De Luca G.M., Gallerano R.H., Sosa R. & Blanco A. (1996). Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes: correlation with clinical pictures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **55**, 625-628.

Moser D.R., Cook G.A., Ochs D.E., Bailey C.P., McKane M.R. & Donelson J.E. (1989). Detection of *trypanosoma congolense* and *trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*, **99**, 57-66.

Mowatt M.R. & Clayton C.E. (1988). Polymorphism in the procyclic acidic repetitive protein gene family of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cel. Biol.*, **8**, 4055-4062.

Murray M., Trail J.C.M. & d'Ieteren G.D.M. (1990). Trypanotolerance in cattle and prospects for the control of trypanosomiasis by selective breeding. *Revue scientifique et technique de l'Office international des Epizooties*, **9**, 369-386.

Noireau F., Gouteux J.P. & Frézil J.L. (1986a). Sensibilité du test d'agglutination sur carte (Testryp CATT) dans les infections porcines à *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* en République du Congo. *Ann. Soc. Belg. Méd. Trop.*, **66**, 63-68.

Noireau F., Gouteux J.P., Toudic A., Samba F. & Frézil J.L. (1986b). Importance épidémiologique du réservoir animal à *Trypanosoma brucei gambiense* au Congo. 1. Prévalence des trypanosomoses animales dans les foyers de maladie du sommeil. *Trop. Med. Parasitol.*, **37**, 393-398.

Noireau F., Lemesre J.L. & Vervoort T. (1991). Absence of serological markers of infection with *Trypanosoma brucei gambiense* in domestic animals in a sleeping sickness focus in south Congo. *Trop. Med. Parasitol.*, **42**, 195-196.

Okia M., Mbulamberi D.B. & De Muynck A. (1994). Risk factors assessment for *T. b. rhodesiense* sleeping sickness acquisition in S.E. Uganda. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **74**, 105-112.

Okomo-Assoumou M.C., Daulouède S., Lemesre J.L., N'Zila-Mouanda A. & Vincendeau P. (1995a). Correlation of high serum levels of tumor necrosis factor α with disease severity in human African trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **53**, 539-543.

Okomo-Assoumou M.C., Geffard M., Daulouède S., Chaugier C., Lemesre J.L. & Vincendeau P. (1995b). Circulating antibodies directed against tryptophan-like epitopes in sera of patients with human African trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **52**, 461-467.

OMS (1986). La trypanosomiase Africaine: épidémiologie et lutte. *Report of a WHO Expert Committee*. WHO Technical Report Series 739.

OMS (1996). Trypanosomiase Humaine Africaine. *Rapport annuel OMS*.

OMS (1998). Control and surveillance of African trypanosomiasis. *Report of a WHO Expert Committee*. WHO Technical Report Series 881.

Ortiz-Ordonez J.C., Sechelski J.B. & Seed J.R. (1994a). Characterization of human serum-resistant and serum-sensitive clones from a single *Trypanosoma brucei gambiense* parental clone. *J. Protozool.*, **80**, 550-557.

Ortiz-Ordonez J.C., Sechelski J.B. & Seed J.R. (1994b). Mechanism of lysis of *Trypanosoma brucei gambiense* by human serum. *J. Protozool.*, **80**, 924-930.

Ortiz-Ordonez J.C. & Seed J.R. (1995). The removal of trypanolytic activity from human serum by *Trypanosoma brucei gambiense* and its subsequent recovery in trypanosome lysates. *J. Protozool.*, **81**, 555-558.

Pays, E. (1989): Pseudogenes, chimaeric genes and the timing of antigen variation in African trypanosomes. *Trends in genetics*, **5**, 389-391.

Pélissier P. (1958). Les inconnues dans la trypanosomiase africaine et le problème de la chimiorésistance "à propos d'une observation de chimiorésistance prolongée". *Thèse, Faculté de Médecine de Montpellier*.

Penchenier L., Dumas V., Grébaud P., Reifenberg J.M. & Cuny G. (1996). Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomiasis. *Parasite*, **4**, 387-389.

Peter J.B. (1991). Use and interpretation of tests in neuroimmunology. *Speciality Laboratories Inc., CA USA*.

Poltera A.A., Hochmann A., Rudin W. & Lambert P.H. (1980). *Trypanosoma brucei brucei* : a model for cerebral trypanosomiasis in mice, an immunological, histological and electronmicroscopic study. *Clin. Exp. Immunol.*, **40**, 496-507.

Reiber H. (1980). The discrimination between different blood- CSF barrier dysfunctions and inflammatory reactions of the CNS by a recent evaluation graph for the protein profile of cerebrospinal fluid. *J. Neurol.*, **224**, 89-99.

Reiber H. (1998). Cerebrospinal fluid-physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Multiple sclerosis*, **4**, 99-107.

Reiber H. & Felgenhauer K. (1987). Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin. Chim. Acta*, **163**, 319-328.

Richet P. (1961). Discours inaugural. *Proceeding 21ème CTRC*, Conakry, Guinée.

Rifkin M. (1978). Identification of the trypanocidal factor in normal human serum: High density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3450-3454.

Rickman L.R. & Robson J. (1970). The testing of proven *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma rhodesiense* strains by the blood incubation infectivity test. *Bull. WHO*, **42**, 911-916.

Roditi I., Schwarz H., Pearson T.W., Beecroft R.P., Liu M.K., Richardson J.P., Buhring H.J., Pleiss J., Bulow R. & Williams R.O. (1989). Procyclin gene expression and loss of the variant surface glycoprotein during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell. Biol.*, **108**, 737-746.

Roubaud E. (1909). *La Glossina palpalis*. Sa biologie, son rôle dans l'étiologie des trypanosomiasés. Thèse doct. Sci. nat., Paris, 280 p.

Sadum E.H., Duxbury R.E., Williams J.S. & Anderson R.I. (1963). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of African and American Trypanosomiasis in man. *Parasitology*, **49**, 385-388.

Sartory A., Lasseur P. & Brissaud H. (1915). Un cas de Trypanosomiase chez un homme ayant quitté l'Afrique depuis 8 ans. *Bulletin de l'Académie de Médecine*, **73**, 631-633.

Schultzberg M., Mabatsis M., Samuelsson E.B., Kristensson K. & Van Merveinne N. (1988). Spread of *Trypanosoma brucei* to the nervous system: early attack on circum-ventricular organs and sensory ganglia. *J. Neurosci. Res.*, **21**, 56-61.

Schweizer J. & Jenni J. (1991). Hybrid formation in the life cycle of *Trypanosoma (T.) brucei*: Detection of hybrid trypanosomes in a midgut-derived isolate. *Acta Trop.*, **48**, 319-321.

Seed J.R. (1978). Competition among serologically different clones of *Trypanosoma brucei* gambiense in vivo. *J. Protozool.*, **25**, 526-529.

Seed J.R., Sechelski J.B., Ortiz J.O. & Chapman J.F. (1993). Relationship between human serum trypanocidal activity and host resistance to the african trypanosomes. *J. Parasitol.*, **79**, 226-232.

Shaw C.R. & Prasad R. (1969). Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, **4**, 297-320.

Sicé A. (1937). *La Trypanosomiase humaine en Afrique intertropicale*. Vigot Frères ed..

Smith A.B., Esko J.D. & Hajduk S.L. (1995). Killing of trypanosomes by the human haptoglobin-related protein. *Science*, **268**, 284-286.

Smith D.H. & Bailey J.W. (1997). Human African trypanosomiasis in south-eastern Uganda: clinical diversity and isoenzyme profiles. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **7**, 851-856.

Sneath P.H.A. & Sokal R.R. (1973). Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification. *W.H. Freeman and Co*, San Francisco, D. Kennedy & R.B. Park Eds., pp 573.

Stephens J.W.W. & Fantham H.B. (1910). On the peculiar morphology of a trypanosome from a case of sleeping sickness and the possibility of its being a new species (*T. rhodesiense*). *Proc. Roy. Soc.*, **86**, 187.

Sternberg J., Tait A., Haley S., Wells J.M. Le Page R.W.F Schweizer J. & Jenni L. (1988). Gene exchange in African trypanosomes: characterisation of a new hybrid genotype. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **27**, 191-200.

Stevens J.R., Nunes V.L.B., Lanham S.M. & Oshiro E.T. (1989). Isoenzyme characterization of *Trypanosoma evansi* isolated from capybaras and dogs in Brazil. *Acta Tropica*, **46**, 213-222.

Stevens J.R. & Godfrey D.G. (1992). Numerical taxonomy of Trypanozoon based on polymorphisms in a reduced range of enzymes. *Parasitol.*, **104**, 75-86.

Stevens J.R., Lanham S.M., Allingham R. & Gashumba J.K. (1992). A simplified method for identifying subspecies and strain groups in *Trypanozoon* by isoenzymes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **86**, 9-28.

Stevens J.R. & Tibayrenc M. (1996). *Trypanosoma brucei* s.l.: evolution, linkage and the clonality debate. *Parasitology*, **112**, 481-488.

Tait A. (1980). Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. *Nature*, **287**, 536-538.

Tait A. (1983). Sexual processes in the Kinetoplastida. *Parasitology*, **86**, 29-57.

- Tait A., Barry J.D., Wink R., Sanderson A. & Crowe J.S. (1985). Enzyme variation in *Trypanosoma brucei* ssp. II. Evidence for *T. b. rhodesiense* being a subset variant of *T. b. brucei*. *Parasitology*, **90**, 89-100.
- Tait A., Buchanan G., Hide G. & Turner C.M.R. (1996). Evidence for self-fertilisation in *T. brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **76**, 31-42.
- Taute M. (1913). Untersuchungen über die bedeutung des grosswildes der haustiere für die verbreitung der schlafkrankheit. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, **23**, 211-226.
- Tautz D. & Renz M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukariotic genomes. *Nucl. Ac. Res.*, **12**, 4127-4137.
- Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Ac. Res.*, **17**, 6463-6471.
- Tautz D. & Schlötterer C. (1994). Simple sequences. *Cur. Op. Genet. Dev.*, **4**, 832-837.
- Tibayrenc M., Cariou M.L., Solignac M., Dedet J.P., Poch O. & Desjeux P. (1985). New electrophoretic evidence of genetic variation and diploidy in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. *Genetica*, **67**, 223-230.
- Tibayrenc M., Ward P., Moya A. & Ayala F.J. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 115-119.
- Tibayrenc M., Kjellberg F. & Ayala F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa : The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2414-2418.
- Tibayrenc M. & Ayala F.J. (1991). Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol. Today*, **7**, 228-232.
- Tibayrenc M., Neubauer K., Barnabe C., Guerrini F., Skarecky D. & Ayala F.J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1335-1339.

Tomlinson S. & Raper J. (1996). The lysis of *Trypanosoma brucei brucei* by human serum. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 717-721.

Trail J.C.M., Wissocq N., d'Ieteren G.D.M., Kakiese O. & Murray M. (1994). Quantitative phenotyping of N'Dama cattle for aspects of trypanotolerance under field tsetse challenge. *Veterinary Parasitology*, **55**, 185-195.

Truc P. (1991). Apport de la génétique des populations à la taxonomie de *Trypanosoma brucei* et à l'épidémiologie de la trypanosomiase humaine en Afrique centrale. *Thèse Doct. Sci.*, Université Montpellier II, France.

Truc P., Mathieu Daudé F. & Tibayrenc M. (1991). Multilocus isoenzyme identification of *Trypanosoma brucei* stocks isolated in Central Africa: evidence for an animal reservoir of sleeping sickness in Congo. *Acta Tropica*, **49**, 127-135.

Truc P., Aerts D., McNamara J.J., Claes J.J., Allingham R., Le Ray D. & Godfrey D.G. (1992). The direct *in vitro* isolation of *Trypanosoma brucei* from man and animals, and its potential value for the diagnosis of Gambian trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **86**, 627-629.

Truc P. & Tibayrenc M. (1993). Population genetics of *Trypanosoma brucei* in Central Africa: taxonomic and epidemiological significance. *Parasitology*, **106**, 137-149.

Truc P., Formenty P., Diallo P.B., Komoin-Oka C. & Lauginie F. (1997a). Confirmation of two distinct classes of zymodemes of *Trypanosoma brucei* infecting patients and wild mammals in Côte d'Ivoire: suspected difference in pathogenicity. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **91**, 951-956.

Truc P., Formenty P., Duvallet G., Komoin-Oka C., Diallo P.B. & Lauginie F. (1997b). Identification of trypanosomes isolated by KIVI from wild mammals in Côte d'Ivoire: diagnostic, taxonomic and epidemiological considerations. *Acta Trop.*, **67**, 187-196.

Truc P., Jamonneau V., N'Guessan P., Diallo P.B. & Garcia A. (1998a). Parasitological diagnosis of African trypanosomiasis: a comparison of the QBC® and miniature anion-exchange centrifugation techniques. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **92**, 288-289.

Truc P., Jamonneau V., N'Guessan P., N'Dri L., Diallo P.B. & Cuny G. (1998b). A mixed infection in man with *Trypanosoma brucei* spp. and *Trypanosoma congolense* in Côte d'Ivoire:

a case report, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **92**, 537-538.

Truc P., Jamonneau V., N'Guessan P., N'Dri L., Diallo P.B. & Butigieg X. (1998c). Simplification of the miniature anion-exchange centrifugation technique for the parasitological diagnosis of human African trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **92**, 512.

Truc P., Jamonneau V., Cuny G. & Frezil J.L. (1999). Polymerase Chain Reaction in African Trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bulletin of the World Health Organization*, **77**, 745-749.

Truc P. & Cuny G..Apport de la biologie moléculaire à l'identification des trypanosomes responsables de la Trypanosomiase Humaine Africaine ou maladie du sommeil. *Med. Trop.*, **60**, sous presse.

Tumani H., Nölker G & Reiber H. (1995). Relevance of cerebrospinal fluid variables for early diagnosis of neuroborreliosis. *Neurology*, **45**, 1663-1670.

Valentin G. (1841). Ueber ein Entozoon im blute von *Salmo Fario*. *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med. (Berlin)*, 435.

Van Meirvenne N., Janssens P.G. & Magnus E. (1975). Antigenic variation in syringe passaged population of *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei*. Rationalization of the experimental approach. *Ann. Soc. Belg. Méd. Trop.*, **55**, 1-23.

Van Meirvenne N., Magnus E. & Vervoort T. (1977). Comparisons of variable antigenic types produced by trypanosome strains of the subgenus *Trypanozoon*. *Ann. Soc. Belg. Méd. Trop.*, **57**, 409-423.

Van Meirvenne N., Magnus E. & Büscher P. (1995). Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop.*, **60**, 189-199.

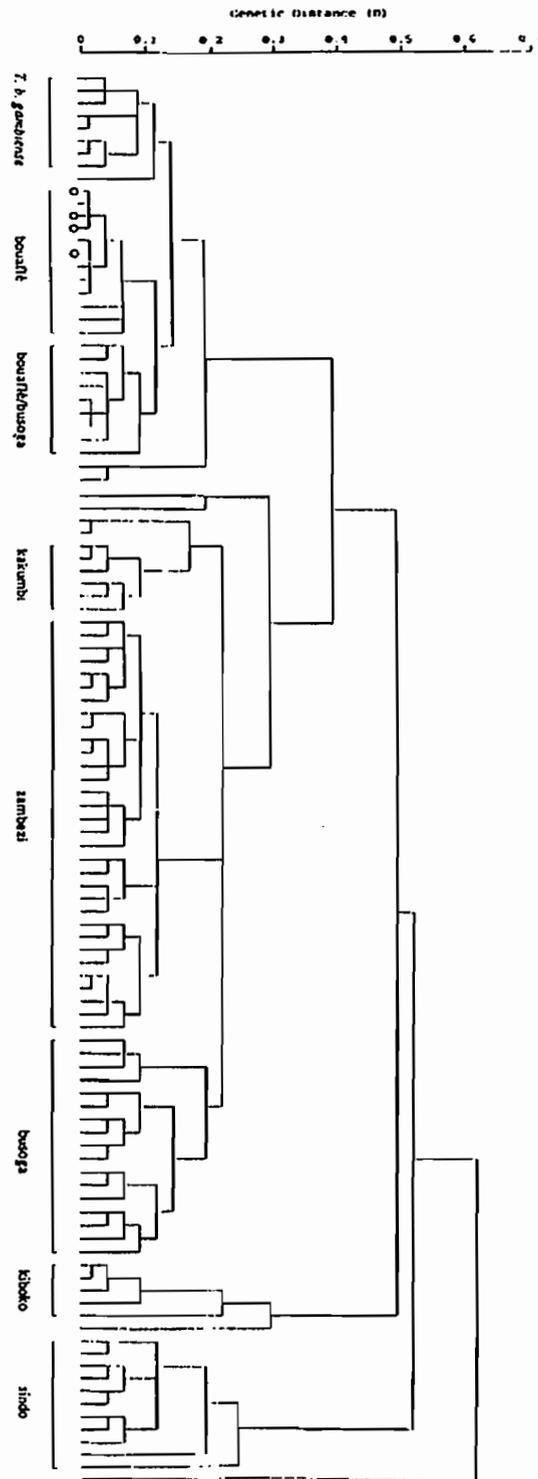
Vickerman K. (1969). The fine structure of *Trypanosoma congolense* in its bloodstream phase. *J. Protozool.*, **16**, 54.

Vickerman K. (1989). Trypanosome sociology and antigenic variation. *Parasitology*, **99**, S37-S47.

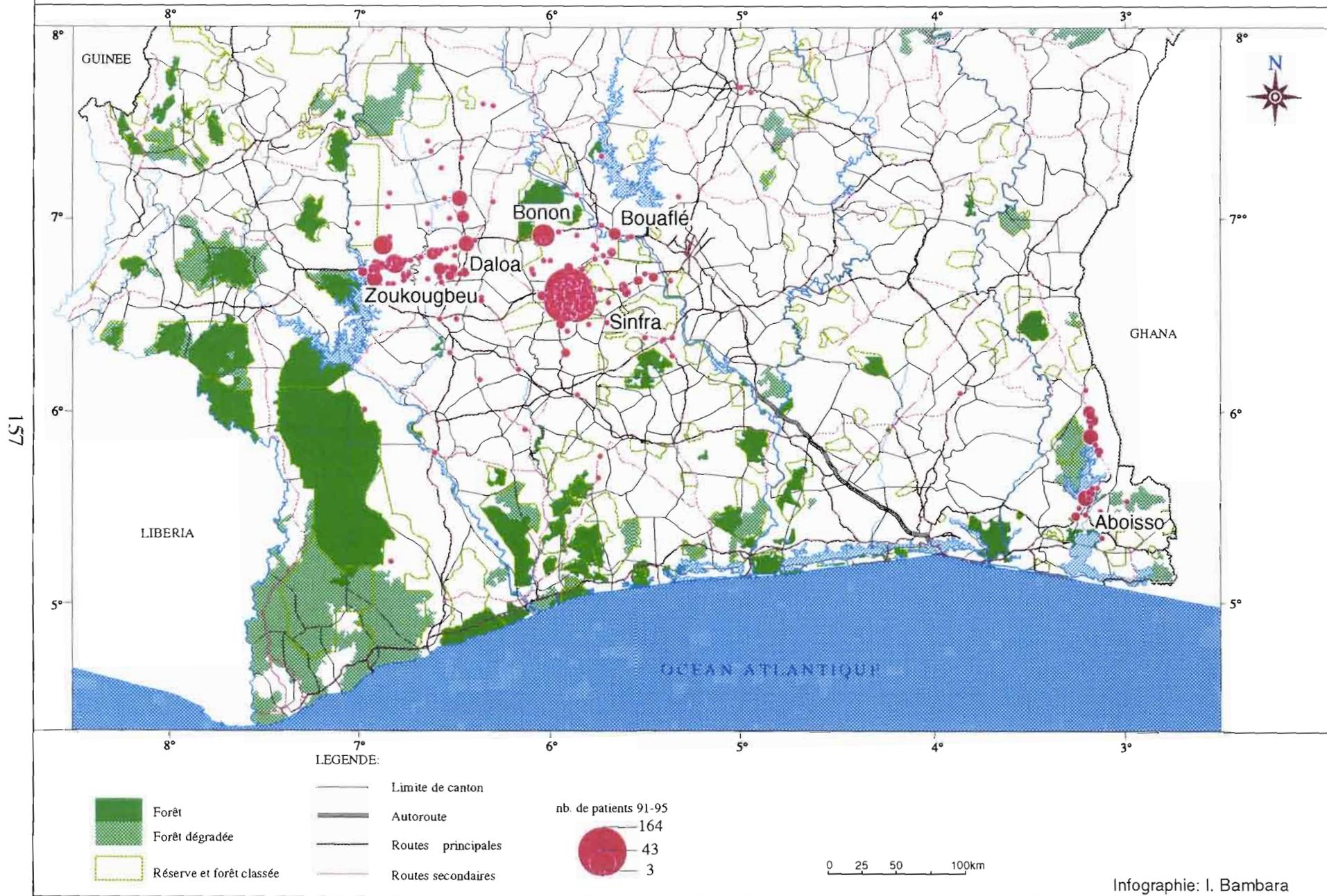
- Vincendeau P., Daulouède S., Veyret B., Dardé M.L., Bouteille B. & Lemesre J.L. (1992). Nitric oxide-mediated cytostatic activity on *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp. Parasitol.*, **75**, 353-360.
- Waitumbi J.N. & Murphy N.B. (1993). Inter- and intra-species differentiation of trypanosomes by genomic fingerprinting with arbitrary primers. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **58**, 181-186.
- Welsh J. & McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 7213-7218.
- Wery M. & Burke J. (1972). Humans "healthy carriers" of *Trypanosoma (brucei type)* discovered by immunofluorescence test in the République Démocratique du Congo. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **66**, 332-333.
- Wery M., Weyn J., Ngimbi N.M. & Colaert J. (1977). Isolement de souches de *T. gambiense* au Zaïre et leur adaptation aux animaux de laboratoire. *Ann. Soc. belge Med. Trop.*, **57**, 425-437.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. & Tingley S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 6531-6535.
- Woo P.T.K. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Tropica*, **27**, 384-386.
- Woodruff A.W., Evans D.A. & Owino N.O. (1982). A "healthy" carrier of African trypanosomiasis. *Journal of infection*, **5**, 89-92.
- Young C.J. & Godfrey D.G. (1983). Enzyme polymorphism and the distribution of *Trypanosoma congolense* isolates. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **77**, 467-481.

ANNEXE 1

Dendrogramme résumant la taxonomie intraspécifique de *Trypanosoma brucei* ssp. (d'après Gibson *et al.*, 1999)



Foyers contemporains de THA en Côte d'Ivoire forestière



ANNEXE 3 (1)

Illustration du déroulement d'une prospection médicale

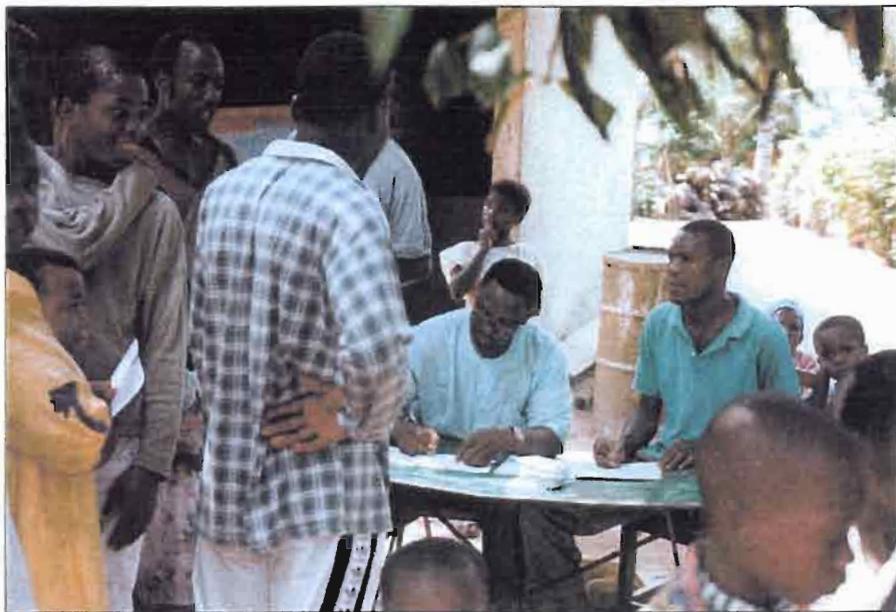


Photo 1. **Recensement/Enregistrement**

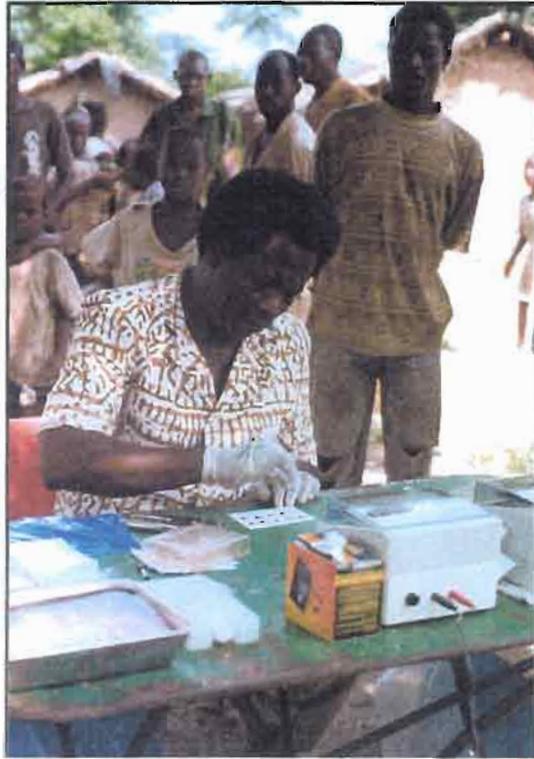
Recensement des sujets présents le jour de la prospection. Seuls les sujets enregistrés peuvent entrer dans la chaîne de dépistage



Photo 2. **Prélèvement**

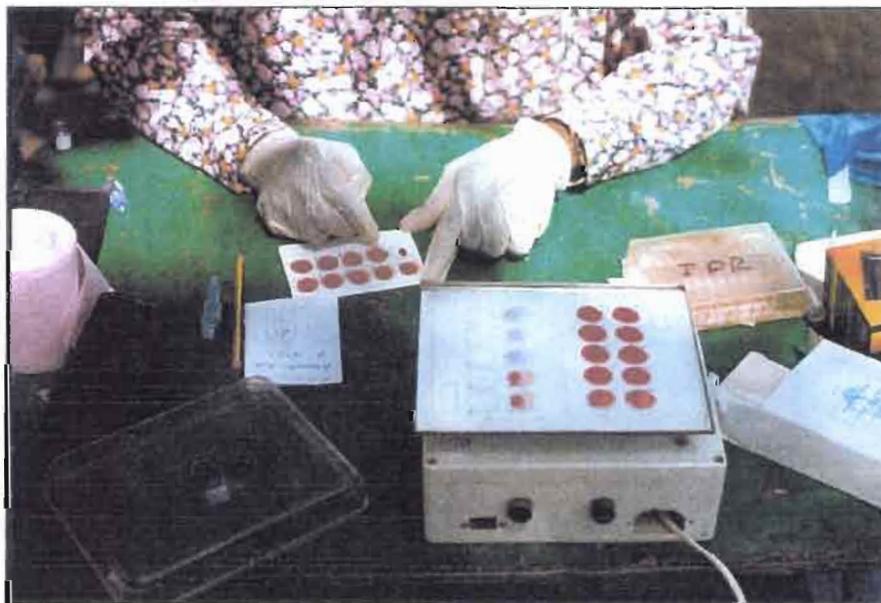
Prélèvement de toute la population par ponction digitale. Le sang prélevé dans les capillaires héparinés est destiné aux tests sérologiques

ANNEXE 3 (2)



Photos 3 et 4. **Sérologie**

Le test sérologique (CATT) est effectué pour tous les sujets prélevés. Les sujets séronégatifs sont libérés, les séropositifs sont maintenus pour la recherche des trypanosomes par les tests parasitologiques.

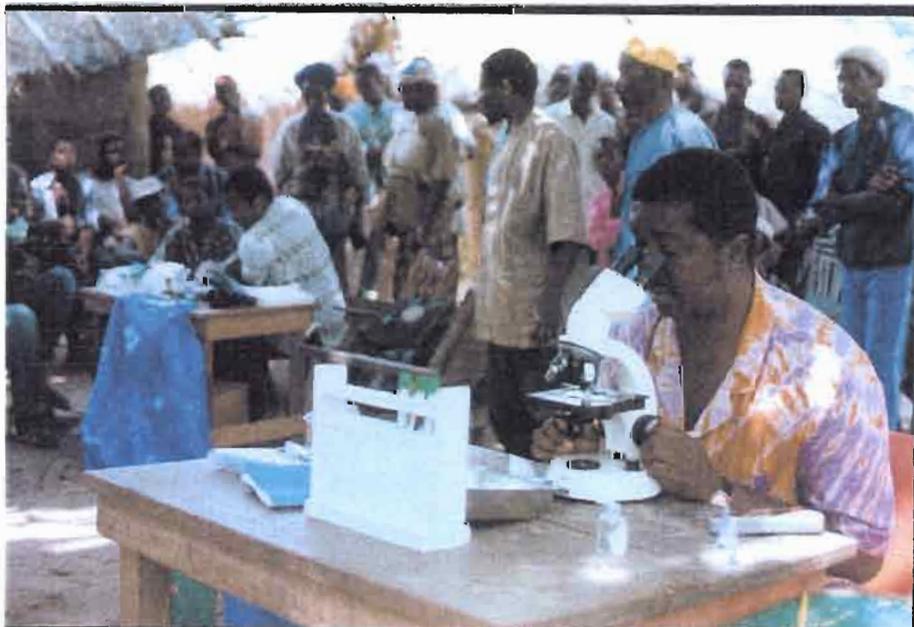


ANNEXE 3 (3)



Photos 5 et 6. Parasitologie

Du sang total hépariné est prélevé au pli du coude de chaque sujet séropositif (Photo 5) pour effectuer la mAECT. Les éventuels ganglions cervicaux sont ponctionnés pour la recherche des trypanosomes dans le suc ganglionnaire étalé à l'état frais entre lame et lamelle (Photo 6).



ANNEXE 3 (4)

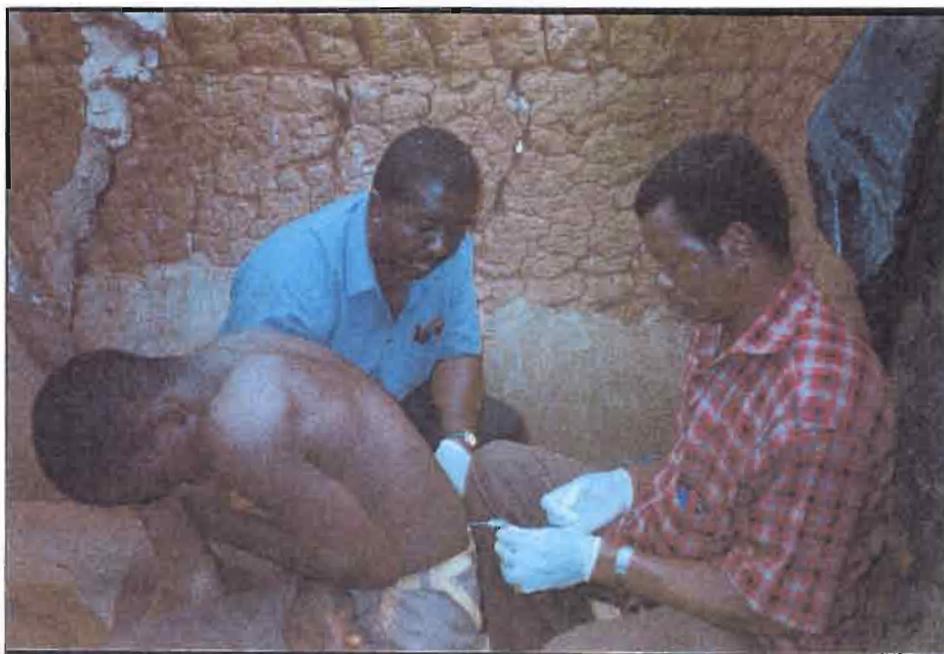


Photo 7. **Parasitologie** (suite)

Une ponction lombaire peut être effectuée au moment de la prospection pour les sujets négatifs en parasitologie mais présentant des signes d'atteinte neurologique (en accord avec le sujet).

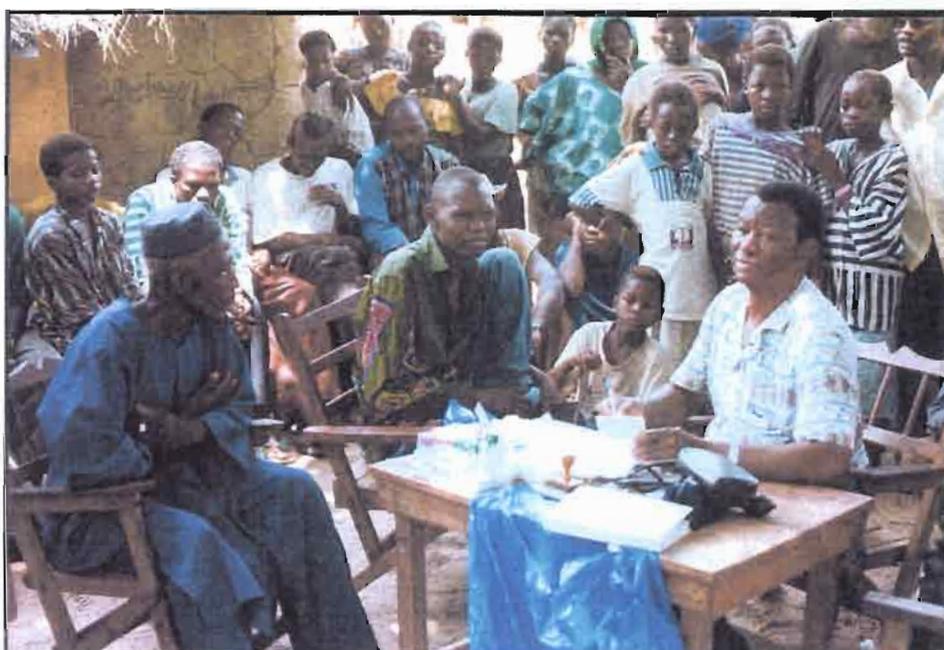


Photo 8. **Convocation pour le traitement**

Les sujets positifs en parasitologie sont instantanément convoqués au centre de traitement le plus proche. Un dossier comprenant une fiche d'identification ainsi qu'un questionnaire épidémiologique et clinique est constitué pour chaque trypanosomé par un infirmier spécialiste de la THA.

ANNEXE 4 (1) .

Données générales relatives aux 139 sujets d'étude

Patient	Ethnie	Nat.	Sexe	Age	Zone	Foyer	Profession	A. f.	C. ttt	M.	L. d.
2497	Gouro	CI	F	1952	CO	Sinfra	Ménagère	o	Daloo	A	Sinfra
2498	Mossi	BF	M	1962	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	A	Sinfra
2499	Dioula	CI	M	1932	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	A	Sinfra
2507	Sénoufo	CI	M	1930	CO	Bonon	Planteur	non	Daloo	P	PRCT
2508	Sénoufo	M	M	1937	CO	Bonon	Planteur	non	Daloo	P	PRCT
2548	Mossi	BF	M	1960	CO	Daloo	Planteur	non	Daloo	P	PRCT
2549	Mossi	BF	M	1971	CO	Daloo	Planteur	non	Daloo	P	PRCT
2557	Djimini	CI	M	1967	CO	Bonon	Planteur	non	Daloo	P	PRCT
2560	Dioula	BF	M	1966	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	A	Sinfra
2561	Sénoufo	M	M	1983	CO	Sinfra	Elève	o	Daloo	P	PRCT
2562	Dioula	CI	M	1968	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	A	Sinfra
2569	Niaboua	CI	F	1949	CO	Daloo	Ménagère	o	Daloo	P	PRCT
2570	Mossi	BF	F	1983	CO	Sinfra	Elève	non	Daloo	P	PRCT
2574	Sénoufo	CI	M	1955	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	P	PRCT
2582	Mossi	BF	M	1956	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	P	PRCT
2584	Dioula	M	F	1952	CO	Bonon	Ménagère	non	Daloo	P	PRCT
2587	Taghana	CI	F	1932	CO	Sinfra	Planteur	o	Daloo	A	Sinfra
2588	Dioula	CI	F	1984	CO	Sinfra	Ménagère	non	Daloo	A	Sinfra
2595	Gouro	CI	F	1930	CO	Bonon	Ménagère	non	Daloo	A	Bonon
2597	Gouro	CI	F	1941	CO	Bonon	Ménagère	non	Daloo	A	Bonon
2598	Gouro	CI	F	1962	CO	Bonon	Ménagère	non	Daloo	A	Bonon
2600	Gouro	CI	F	1950	CO	Bonon	Ménagère	non	Daloo	A	Bonon
2601	Gouro	CI	M	1941	CO	Bonon	Planteur	non	Daloo	A	bonon
2602	Gouro	CI	F	1956	CO	Bonon	Ménagère	non	Daloo	A	bonon
2603	Sénoufo	CI	F	1959	CO	Bonon	Ménagère	non	Daloo	A	bonon
2604	Sénoufo	CI	F	1975	CO	Bonon	Ménagère	non	Daloo	A	bonon
600	Bobo	BF	M	1983	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
602	Dioula	CI	M	1974	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
603	Mossi	BF	M	1982	CO	Bouaflé	Planteur	non	Bouaflé	P	Bouaflé
606	Dioula	CI	M	1977	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	A	Sinfra
610	Gouro	CI	F	1952	CO	Sinfra	Ménagère	non	Bouaflé	P	Sinfra
611	Malinké	CI	M	1950	CO	Sinfra	Planteur	o	Bouaflé	P	Sinfra
612	Malinké	CI	M	1988	CO	Sinfra	Elève	o	Bouaflé	A	Sinfra
613	Malinké	CI	F	1986	CO	Sinfra	Elève	o	Bouaflé	A	Sinfra
614	Malinké	CI	F	1984	CO	Sinfra	Sans prof.	non	Bouaflé	A	Sinfra
616	Gouro	CI	F	1985	CO	Sinfra	Elève	non	Bouaflé	A	Sinfra
619	Mossi	BF	F	1967	CO	Sinfra	Ménagère	non	Bouaflé	P	Sinfra
622	Mossi	BF	M	1924	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
625	Baoulé	CI	M	1971	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
632	Malinké	M	F	1957	CO	Bouaflé	Ménagère	non	Bouaflé	P	Bouaflé
634	Samoko	BF	M	1966	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Bouaflé
635	Gouro	CI	F	1942	CO	Bouaflé	Ménagère	non	Bouaflé	P	Bouaflé
636	Mossi	BF	M	1968	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
638	Malinké	M	F	1990	CO	Sinfra	Sans prof.	o	Bouaflé	A	Sinfra
648	Yoruba	Nigeria	F	1957	CO	Sinfra	Commercante	non	Bouaflé	P	Sinfra
654	Peul	Guinée	M	1958	CO	Bouaflé	Commercant	non	Bouaflé	P	Bouaflé
655	Mossi	BF	F	1959	CO	Bonon	Ménagère	non	Bouaflé	P	Bouaflé
656	Mossi	BF	F	1984	CO	Bouaflé	Sans prof.	non	Bouaflé	P	Bouaflé
657	Gouro	CI	F	1989	CO	Sinfra	Elève	o	Bouaflé	P	Bouaflé
659	Malinké	Guinée	M	1925	CO	Bonon	Planteur	non	Bouaflé	A	Bonon
660	Bobo	BF	M	1934	CO	Bonon	Planteur	non	Bouaflé	A	Bonon
661	Sénoufo	CI	M	1988	CO	Bonon	Elève	non	Bouaflé	A	Bonon

ANNEXE 4 (2)

Patient	Ethnie	Nat.	Sexe	Age	Zone	Foyer	Profession	A. f.	C. ttt	M.	L. d.
662	Sénoufo	CI	F	1976	CO	Bonon	Ménagère	non	Bouaflé	A	Bonon
664	Sénoufo	CI	M	1985	CO	Bonon	Planteur	non	Bouaflé	A	Bonon
665	Dioula	CI	F	1942	CO	Bonon	Ménagère	non	Bouaflé	A	Bonon
666	Dioula	M	F	1951	CO	Bonon	Ménagère	non	Bouaflé	A	Bonon
668	Malinké	M	M	1977	CO	Bonon	Planteur	o	Bouaflé	A	Bonon
669	Dioula	M	M	1980	CO	Bonon	Planteur	o	Bouaflé	A	Bonon
670	Sénoufo	CI	F	1957	CO	Bonon	Ménagère	non	Bouaflé	A	Bonon
380	Lobi	CI	M	1955	E	Aboisso	Planteur	non	Aboisso	A	Aboisso
383	Mossi	BF	M	1935	E	Aboisso	Planteur	2col	Aboisso	A	Aboisso
384	Mossi	BF	F	1945	E	Aboisso	Ménagère	o	Aboisso	A	Aboisso
387	Dioula	CI	M	1978	E	Aboisso	Planteur	o	Aboisso	A	Aboisso
388	Dioula	M	M	1979	E	Aboisso	Planteur	non	Aboisso	A	Aboisso
2477	Mossi	BF	M	1960	CO	Daloo	Planteur	non	Daloo	P	Daloo
2478	Dioula	M	M	1947	CO	Sinfra	Planteur	o	Daloo	A	Sinfra
2479	Dogon	M	M	1983	CO	Sinfra	Planteur	o	Daloo	A	Sinfra
2480	Mossi	BF	F	1984	CO	Sinfra	Ménagère	o	Daloo	A	Sinfra
2481	Mossi	BF	F	1972	CO	Sinfra	Ménagère	o	Daloo	A	Sinfra
2482	Sénoufo	CI	F	1982	CO	Sinfra	Elève	non	Daloo	A	Sinfra
2483	Dioula	CI	F	1979	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	A	Sinfra
2485	Mossi	BF	F	1958	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	A	Sinfra
2486	Dioula	CI	M	1975	CO	Sinfra	Commercant	non	Daloo	A	Sinfra
2487	Mossi	BF	M	1983	CO	Sinfra	Planteur	o	Daloo	A	Sinfra
2488	Bambara	M	M	1975	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	A	Sinfra
2489	Malinké	CI	F	1946	CO	Sinfra	Ménagère	o	Daloo	A	Sinfra
2490	Dioula	M	M	1954	CO	Sinfra	Planteur	o	Daloo	A	Sinfra
2492	Dioula	CI	M	1960	CO	Sinfra	Commercant	non	Daloo	A	Sinfra
2493	Dioula	CI	M	1964	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	A	Sinfra
2494	Baoulé	CI	M	1978	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	A	Sinfra
2495	Peul	Guinée	F	1962	CO	Sinfra	Commercant	non	Daloo	A	Sinfra
2496	Sénoufo	CI	M	1964	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	A	Sinfra
2500	Gouro	CI	M	1984	CO	Sinfra	Elève	o	Daloo	A	Sinfra
2501	Dioula	CI	M	1980	CO	Sinfra	Planteur	o	Daloo	A	Sinfra
2504	Mossi	BF	F	1982	CO	Sinfra	Ménagère	non	Daloo	A	Sinfra
2505	Tagbana	CI	M	1982	CO	Sinfra	Elève	o	Daloo	A	Sinfra
2509	Mossi	BF	F	1979	CO	Sinfra	Elève	non	Daloo	A	Sinfra
2510	Mossi	BF	M	1934	CO	Daloo	Planteur	non	Daloo	P	Daloo
2511	Tagbana	CI	M	1980	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	P	Sinfra
2519	Gouro	CI	F	1969	CO	Sinfra	Ménagère	o	Daloo	A	Sinfra
2520	Mossi	BF	M	1987	CO	Sinfra	Planteur	o	Daloo	A	Sinfra
2521	Gouro	CI	F	1941	CO	Sinfra	Ménagère	non	Daloo	A	Sinfra
2522	Gouro	CI	H	1982	CO	Sinfra	Elève	non	Daloo	A	Sinfra
2535	Bobo	BF	M	1949	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	A	Sinfra
2537	Dioula	M	F	1968	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	A	Sinfra
2555	Dioula	CI	F	1970	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	P	Sinfra
2564	Dioula	CI	F	1962	CO	Bonon	Commercant	non	Daloo	P	Daloo
2565	Mossi	BF	H	1973	CO	Daloo	Planteur	non	Daloo	P	Daloo
2567	Baoulé	CI	F	1985	CO	Sinfra	Elève	o	Daloo	P	Sinfra
2571	Mossi	BF	H	1956	CO	Daloo	Planteur	non	Daloo	P	Daloo
2585	Baoulé	CI	M	1969	CO	Sinfra	Planteur	non	Daloo	P	Sinfra
2589	Niaboua	CI	F	1948	CO	Daloo	Ménagère	non	Daloo	P	Daloo
2591	Sénoufo	CI	M	1960	CO	Sinfra	Commercant	non	Daloo	P	Sinfra
2592	Dioula	CI	M	1980	CO	Sinfra	Elève	non	Daloo	P	Sinfra

ANNEXE 4 (3)

Patient	Ethnie	Nat.	Sexe	Age	Zone	Foyer	Profession	A. f.	C. tt	M.	L. d.
594	Baoulé	CI	F	1959	CO	Sinfra	Ménagère	non	Bouaflé	P	Bouaflé
595	Dioula	CI	H	1975	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	A	Sinfra
596	Mossi	BF	F	1973	CO	Bouaflé	Ménagère	non	Bouaflé	P	Bouaflé
599	Dioula	CI	M	1935	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
601	Gouroussi	BF	F	1976	CO	Sinfra	Ménagère	non	Bouaflé	P	Sinfra
604	Mossi	BF	F	1964	CO	Bouaflé	Ménagère	non	Bouaflé	P	Bouaflé
605	Gouro	CI	M	1924	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
609	Gouro	CI	F	1978	CO	Sinfra	Ménagère	non	Bouaflé	P	Sinfra
621	Dioula	CI	M	1977	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
623	Gouro	CI	M	1980	CO	Bouaflé	Planteur	non	Bouaflé	P	Bouaflé
624	Gouroussi	BF	M	1980	CO	Bouaflé	Planteur	non	Bouaflé	P	Bouaflé
627	Baoulé	CI	M	1987	CO	Sinfra	Sans prof	o	Bouaflé	P	Bouaflé
628	Gouro	CI	M	1982	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
630	Gouro	CI	F	1973	CO	Sinfra	Ménagère	non	Bouaflé	P	Sinfra
631	Gouroussi	BF	F	1953	CO	Sinfra	Ménagère	non	Bouaflé	P	Bouaflé
637	Baoulé	CI	M	1984	CO	Bouaflé	Sans prof	non	Bouaflé	P	Bouaflé
639	Gouro	CI	M	1940	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
640	Dioula	M	F	1965	CO	Sinfra	Ménagère	o	Bouaflé	P	Bouaflé
641	Malinké	M	M	1957	CO	Sinfra	Commerçant	non	Bouaflé	P	Sinfra
642	Mossi	BF	F	1965	CO	Bouaflé	Ménagère	non	Bouaflé	P	Bouaflé
643	Baoulé	CI	M	1967	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
644	Baoulé	CI	M	1966	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
645	Gouro	CI	M	1953	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
646	Dioula	CI	F	1982	CO	Sinfra	Ménagère	non	Bouaflé	P	Sinfra
649	Gouro	CI	M	1975	CO	Bouaflé	Sans prof	non	Bouaflé	P	Bouaflé
650	Gouro	CI	M	1964	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Sinfra
653	Baoulé	CI	M	1961	CO	Bonon	Planteur	non	Bouaflé	P	Bouaflé
663	Sénoufo	CI	F	1955	CO	Bonon	Ménagère	non	Bouaflé	A	Bonon
667	Malinké	M	F	1979	CO	Bonon	Ménagère	non	Bouaflé	A	Bonon
672	Sénoufo	CI	M	1963	CO	Sinfra	Commerçant	non	Bouaflé	P	Sinfra
674	Dioula	CI	M	1978	CO	Sinfra	Planteur	non	Bouaflé	P	Bouaflé
381	Agni	CI	F	1951	E	Aboisso	Ménagère	non	Aboisso	A	Aboisso
385	Baoulé	CI	F	1985	E	Aboisso	Sans prof	non	Aboisso	A	Aboisso
382	Mossi	BF	M	1982	E	Aboisso	Planteur	o	Aboisso	A	Aboisso
389	Attié	CI	F	1964	E	Aboisso	Ménagère	non	Aboisso	A	Aboisso

Nat. = Nationalité (CI = Côte d'Ivoire, BF = Burkina Faso, M = Mali)

A. f. = Antécédent familiaux de THA (o = oui)

C. tt. = Centre de traitement

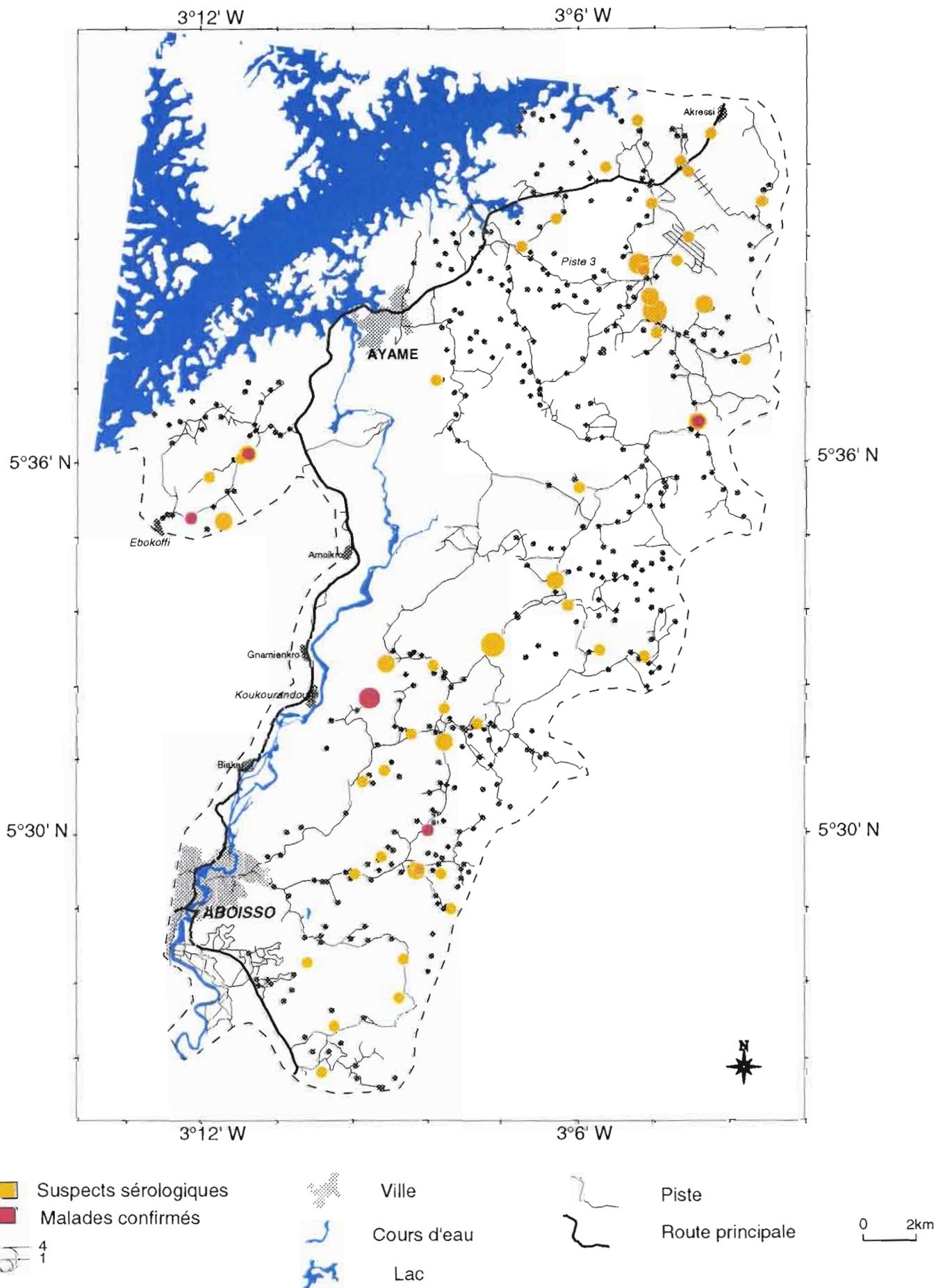
M. = Mode de dépistage (A = Actif et P = Passif)

L. d. = Lieu de dépistage

Sexe: M = Homme et F = Femme

Zone: CO = Centre-Ouest et E = Est

Prospection médicale à ABOISSO (juillet 1997) Distribution des malades et des suspects



- Suspects sérologiques
- Malades confirmés
- 4
- 1

- Ville
- Cours d'eau
- Lac

- Piste
- Route principale

0 2km

ANNEXE 6

Résultats de l'identification isoenzymatique des 64 souches isolées

Patient	ALAT	GOT	IDH	MDH	ME1	ME2	NHi1	NHi2	NHd	PEP2	SODa	SODb	TDH	PGM	Zym	Ss/esp
2497	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2498	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2499	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2507	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2508	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2548	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2549	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2557	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2560	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2561	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	38	T.b.e.l
2562	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2569	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2570	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2574	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	38	T.b.e.l
2582	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2584	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2587	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2588	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2595	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2597	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2598	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2600	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2601	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2602	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2603	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
2604	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
600	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
602	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
603	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
606	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	38	T.b.e.l
610	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l
611	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.e.l

ANNEXE 6 (suite)

Patient	ALAT	GOT	IDH	MDH	ME1	ME2	NH1	NH2	NHd	PEP2	SODa	SODb	TDH	PGM	Zym	Ss/esp
612	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
613	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
614	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
616	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
619	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
622	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
625	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
632	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
634	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
635	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
636	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
638	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
648	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
654	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
655	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
656	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
657	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
659	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
660	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
661	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
662	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
664	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
665	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
666	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
668	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
669	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
670	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
380	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
383	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
384	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
387	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1
388	6-7-8	5-7-8	5	5-6	2	1-2-3	3	3	9	1-2-4	3-6-7-11-13	3-5	3	11-12	3	T.b.g.1

Zym = zymodème

Ss/esp = sous-espèce

T.b.g.1 = *Trypanosoma gambiense* groupe 1

ANNEXE 7 (1)

Résultats des tests sérologiques et parasitologiques et période de la maladie pour les 139 sujets d'étude

Patient	C1	C2	mAECT	DC	Cyto.	Période	C1	mAECT	DC
	Entrée	Entrée	Entrée	Entrée	Entrée	Entrée	Sortie	Sortie	Sortie
2497	+	+	1	-	0	1	+	-	-
2498	+	+	15	+	728	2	+	-	-
2499	+	+	100	-	482	2	+	-	-
2507	+	+	3	+	502	2	Décédé	Décédé	Décédé
2508	+	+	100	+	1342	2	Décédé	Décédé	Décédé
2548	+	+	-	+	710	2	+	-	-
2549	+	+	10	+	276	2	+	-	-
2557	+	+	500	+	1058	2	+	-	-
2560	+	+	4	+	536	2	+	-	-
2561	+	+	20	-	28	2	+	-	-
2562	+	+	10	+	888	2	+	-	-
2569	+	+	50	+	304	2	+	-	-
2570	+	+	20	+	848	2	+	-	-
2574	+	+	5	+	50	2	+	-	-
2582	+	+	100	+	6	2	+	-	-
2584	+	+	10	-	6	2	+	-	-
2587	+	+	5	-	87	2	+	-	-
2588	+	+	ND	-	26	2	+/-	-	-
2595	+	+	100	-	10	2	+	-	-
2597	+	+	20	-	4	1	+	-	-
2598	+	+	14	-	6	2	+	-	-
2600	+	+	100	-	4	1	+	-	-
2601	+	+	10	-	10	2	+	-	-
2602	+	+	2	-	12	2	+	-	-
2603	+	+	4	-	12	2	+	-	-
2604	+	+	100	-	0	1	+	-	-
600	+	+	2	+	100	2	+	-	-
602	+	+	3	-	45	2	+	-	-
603	+	+	12	+	140	2	ND	ND	ND
606	+	+	8	-	0	1	+	-	-
610	+	+	3	-	50	2	+	-	-
611	+	+	2	-	0	1	+	-	-
612	+	+	1	-	0	1	+	-	-
613	+	+	3	-	0	1	+	-	-
614	+	+	3	-	0	1	+	-	-
616	+	+	4	-	0	1	+	-	-
619	+	+	2	-	3	1	+	-	-
622	+	+	50	ND	ND	2	ND	ND	ND
625	+	+	13	+	130	2	ND	ND	ND
632	+	+	26	-	26	2	+	-	-
634	+	+	13	+	48	2	+	-	-
635	+	+	14	+	240	2	+	-	-
636	+	+	3	-	4	1	+	-	-
638	+	+	20	+	113	2	+	-	-
648	+	+	3	-	15	2	+	-	-
654	+	+	10	+	70	2	ND	ND	ND
655	+	+	12	+	120	2	+	-	-
656	+	+	2	+	40	2	ND	ND	ND
657	+	+	4	+	7	2	ND	ND	ND

ANNEXE 7 (2)

Patient	C1	C2	mAECT	DC	Cyto.	Période	C1	mAECT	DC
	Entrée	Entrée	Entrée	Entrée	Entrée	Entrée	Sortie	Sortie	Sortie
659	+	+	nos	+	22	2	ND	ND	ND
660	+	+	-	-	0	1	+	-	-
661	+	+	nos	-	0	1	+	-	-
662	+	+	6	-	0	1	+	-	-
664	+	+	-	-	0	1	+	-	-
665	+	+	3	-	0	1	+	-	-
666	+	+	6	-	0	1	+	-	-
668	+	+	12	-	22	2	+	-	-
669	+	+	2	-	2	1	+	-	-
670	+	+	-	-	0	1	+	-	-
380	+	+	nos	-	47	2	+	-	-
383	+	+	nos	+	125	2	+	-	-
384	+	+	nos	-	5	2	+	-	-
387	+	+	nos	-	7	2	+	-	-
388	+	+	nos	-	23	2	+	-	-
2477	+	+	10	+	74	2	+	-	-
2478	+	+	1	-	12	2	+	-	-
2479	+	+	1	-	98	2	+	-	-
2480	+	+	10	-	0	1	+	-	-
2481	+	+	100	-	10	2	+	-	-
2482	+	+	3	-	354	2	+	-	-
2483	+	+	10	-	0	1	+	-	-
2485	+	+	100	-	0	1	+	-	-
2486	+	+	1	-	4	1	+	-	-
2487	+	+	200	-	6	2	+	-	-
2488	+	+	1	-	6	2	+	-	-
2489	+	+	50	-	0	1	+	-	-
2490	+	+	10	+	266	2	+/-	-	-
2492	+	+	3	-	4	1	+	-	-
2493	+	+	30	-	32	2	+	-	-
2494	+	+	20	-	252	2	+	-	-
2495	+	+	100	-	40	2	+	-	-
2496	+	+	10	-	0	1	+	-	-
2500	+	+	20	-	0	1	+	-	-
2501	+	+	1	+	872	2	+	-	-
2504	+	+	10	-	12	2	+	-	-
2505	+	+	30	-	518	2	+	-	-
2509	+	+	10	+	380	2	+	-	-
2510	+	+	20	+	74	2	ND	ND	ND
2511	+	+	-	+	728	2	+	-	-
2519	+	+	10	-	0	1	+	-	-
2520	+	+	20	-	0	1	+/-	-	-
2521	+	+	5	-	2	1	+	-	-
2522	+	+	1	-	24	2	+	-	-
2535	+	+	100	+	850	2	+	-	-
2537	+	+	1	-	0	1	+	-	-
2555	+	+	200	+	274	2	+	-	-
2564	+	+	10	-	450	2	ND	ND	ND
2565	+	+	3	+	1044	2	+	+	-
2567	+	+	1	-	260	2	+	-	-
2571	+	+	1	-	1152	2	+	-	-

ANNEXE 7 (3)

Patient	C1	C2	mAECT	DC	Cyto.	Période	C1	mAECT	DC
	Entrée	Entrée	Entrée	Entrée	Entrée	Entrée	Sortie	Sortie	Sortie
2585	+	+	-	+	122	2	+/-	-	-
2589	+	+	-	+	278	2	ND	ND	ND
2591	+	+	2	+	930	2	+	-	-
2592	+	+	10	+	226	2	+	-	-
594	+	+	10	+	80	2	+	-	-
595	+	+	-	-	0	1	+	-	-
596	+	+	5	-	40	2	+	-	-
599	+	+	3	-	200	2	ND	ND	ND
601	+	+	3	-	14	2	+	-	-
604	+	+	21	+	200	2	+	-	-
605	+	+	3	-	0	1	+	-	-
609	+	+	-	+	250	2	+	-	-
621	+	+	10	-	90	2	+	-	-
623	+	+	25	-	160	2	+	-	-
624	+	+	14	+	200	2	+	+	-
627	+	+	22	+	190	2	+	-	-
628	+	+	2	-	3	1	+	-	-
630	+	+	2	-	4	1	+	-	-
631	+	+	12	-	30	2	+	-	-
637	+	+	6	+	36	2	+	-	-
639	+	+	2	-	0	1	+	-	-
640	+	+	32	+	220	2	+	-	-
641	+	+	4	+	30	2	+	-	-
642	+	+	11	-	0	1	+	-	-
643	+	+	10	-	0	1	+	-	-
644	+	+	2	-	4	1	+	-	-
645	+	+	-	+	20	2	+	-	-
646	+	+	3	+	180	2	+	-	-
649	+	+	4	+	30	2	+	-	-
650	+	+	21	+	200	2	ND	ND	ND
653	+	+	32	+	150	2	+	-	-
663	+	+	3	-	0	1	+	-	-
667	+	+	15	-	0	1	+	-	-
672	+	+	14	+	140	2	+	-	-
674	+	+	-	+	62	2	+	-	-
381	+	-	50	-	1	1	+	-	-
385	+	+	pos	-	25	2	+	-	-
382	+	+	pos	+	210	2	+	-	-
389	+	+	pos	-	4	1	+	-	-

C1 = CATT sur sang total, C2 = CATT sur plasma

DC = Double Centrifugation, Cyto = Cytorachie

ND = Not done

pos. = positif sans quantification des trypanosomes

ANNEXE 8 (1)

Bilan clinique pour les 139 sujets d'étude

Patient	D. Sympt.	M. i.	Sv	Sv card.	Sv dig.	Sv derm.	Sv neuro.
2497	> 12 m	prog.	présent	a	présent	a	présent
2498	> 12 m	prog.	présent	a	a	lourd	lourd
2499	> 12 m	ND	présent	a	a	a	présent
2507	> 12 m	prog.	lourd	présent	présent	lourd	très lourd
2508	> 12 m	prog.	lourd	a	a	présent	très lourd
2548	> 12 m	prog.	présent	a	a	a	lourd
2549	> 12 m	prog.	présent	présent	présent	présent	lourd
2557	> 12 m	prog.	lourd	a	présent	lourd	lourd
2560	> 12 m	prog.	lourd	a	a	lourd	très lourd
2561	9-12 m	ND	présent	a	a	présent	a
2562	9-12 m	prog.	lourd	a	a	présent	très lourd
2569	0-3 m	brut.	présent	a	présent	lourd	a
2570	ND	ND	présent	a	a	présent	présent
2574	> 12 m	prog.	présent	a	a	a	très lourd
2582	> 12 m	prog.	présent	présent	a	a	lourd
2584	> 12 m	ND	présent	a	présent	a	a
2587	0-3 m	ND	présent	a	a	lourd	a
2588	> 12 m	prog.	présent	a	présent	a	a
2595	3-6 m	prog.	lourd	a	a	présent	présent
2597	> 12 m	prog.	présent	a	a	a	a
2598	6-9 m	prog.	lourd	a	a	présent	présent
2600	ND	ND	présent	a	a	a	a
2601	ND	ND	présent	présent	a	présent	présent
2602	ND	ND	lourd	a	a	a	présent
2603	3-6 m	ND	présent	a	a	a	a
2604	9-12 m	ND	présent	a	a	a	présent
600	> 12 m	prog.	présent	a	présent	lourd	lourd
602	3-6 m	prog.	lourd	a	présent	a	présent
603	ND	ND	lourd	a	présent	a	présent
606	9-12 m	prog.	présent	présent	a	a	présent
610	> 12 m	prog.	lourd	a	présent	présent	très lourd
611	0-3 m	prog.	présent	a	a	présent	a
612	6-9 m	prog.	présent	a	a	a	a
613	6-9 m	prog.	lourd	a	a	lourd	a
614	6-9 m	prog.	présent	a	a	lourd	présent
616	ND	prog.	présent	a	présent	a	a
619	ND	prog.	lourd	présent	a	a	lourd
622	> 12 m	ND	lourd	a	présent	présent	lourd
625	ND	ND	présent	a	a	lourd	lourd
632	0-3 m	ND	lourd	a	présent	a	lourd
634	9-12 m	prog.	lourd	a	présent	présent	lourd
635	9-12 m	brut.	présent	lourd	présent	présent	lourd
636	6-9 m	prog.	lourd	a	présent	présent	présent
638	3-6 m	ND	lourd	a	lourd	lourd	très lourd
648	9-12 m	prog.	lourd	a	présent	présent	lourd
654	6-9 m	ND	lourd	a	a	présent	lourd
655	9-12 m	ND	lourd	a	a	lourd	très lourd
656	3-6 m	ND	présent	a	présent	lourd	très lourd
657	3-6 m	ND	lourd	a	a	présent	a
659	> 12 m	prog.	lourd	a	présent	présent	présent

ANNEXE 8 (2)

Patient	D. Svmnt.	M. i.	Sv	Sv card.	Sv dig.	Sv derm.	Sv neuro.
660	> 12 m	prog.	lourd	a	présent	présent	présent
661	> 12 m	prog.	lourd	a	a	lourd	a
662	> 12 m	prog.	lourd	a	présent	lourd	présent
664	6-9 m	prog.	présent	a	présent	présent	a
665	> 12 m	prog.	lourd	a	a	présent	lourd
666	> 12 m	prog.	lourd	a	présent	lourd	présent
668	> 12 m	ND	présent	a	a	présent	lourd
669	3-6 m	prog.	lourd	a	présent	présent	présent
670	3-6 m	prog.	lourd	a	présent	lourd	présent
380	3-6 m	prog.	présent	a	a	a	a
383	6-9 m	prog.	lourd	a	a	lourd	présent
384	> 12 m	prog.	présent	a	a	présent	a
387	0-3 m	ND	présent	a	a	a	a
388	0-3 m	ND	a	a	a	a	a
2477	> 12 m	prog.	lourd	a	présent	lourd	a
2478	3-6 m	prog.	présent	a	a	lourd	a
2479	> 12 m	prog.	présent	a	a	lourd	a
2480	0-3 m	prog.	présent	a	a	a	a
2481	0-3 m	prog.	présent	a	a	présent	a
2482	3-6 m	prog.	présent	a	a	lourd	a
2483	6-9 m	prog.	présent	a	présent	présent	a
2485	9-12 m	prog.	présent	a	a	a	a
2486	0-3 m	prog.	présent	a	a	présent	a
2487	> 12 m	prog.	présent	a	a	présent	présent
2488	> 12 m	prog.	lourd	a	a	présent	présent
2489	3-6 m	prog.	lourd	a	a	lourd	présent
2490	> 12 m	prog.	lourd	présent	lourd	a	présent
2492	6-9 m	prog.	lourd	a	a	a	a
2493	9-12 m	prog.	lourd	a	a	lourd	a
2494	> 12 m	prog.	lourd	a	a	présent	lourd
2495	> 12 m	prog.	présent	a	a	lourd	présent
2496	6-9 m	prog.	présent	a	a	a	a
2500	6-9 m	prog.	présent	a	a	lourd	a
2501	> 12 m	prog.	présent	a	présent	lourd	a
2504	0-3 m	ND	a	a	a	a	a
2505	> 12 m	prog.	lourd	a	a	a	a
2509	> 12 m	prog.	lourd	a	a	a	présent
2510	> 12 m	brut	lourd	a	a	lourd	présent
2511	6-9 m	prog.	présent	a	a	a	a
2519	> 12 m	prog.	présent	présent	présent	lourd	a
2520	6-9 m	prog.	présent	a	a	a	a
2521	6-9 m	prog.	lourd	présent	présent	lourd	a
2522	> 12 m	prog.	lourd	a	présent	lourd	a
2535	> 12 m	prog.	lourd	présent	a	présent	lourd
2537	9-12 m	prog.	présent	a	a	présent	a
2555	> 12 m	prog.	lourd	a	a	présent	présent
2564	> 12 m	prog.	lourd	présent	a	présent	lourd
2565	0-3 m	brut	lourd	a	a	a	a
2567	> 12 m	prog.	lourd	a	a	lourd	a
2571	> 12 m	prog.	lourd	a	a	a	a
2585	> 12 m	prog.	lourd	a	a	présent	très lourd
2589	9-12 m	prog.	lourd	lourd	a	a	présent

ANNEXE 8 (3)

Patient	D. Sympt.	M. i.	Sy	Sy card.	Sy dig.	Sy derm.	Sy neuro.
2591	> 12 m	prog.	présent	présent	a	présent	présent
2592	> 12 m	prog.	lourd	lourd	a	présent	lourd
594	0-3 m	prog.	lourd	a	a	a	lourd
595	0-3 m	ND	a	a	a	a	a
596	> 12 m	prog.	lourd	a	a	présent	présent
599	> 12 m	prog.	lourd	présent	présent	lourd	lourd
601	> 12 m	prog.	lourd	a	a	lourd	présent
604	> 12 m	prog.	lourd	a	présent	a	présent
605	> 12 m	prog.	lourd	a	a	a	a
609	> 12 m	prog.	lourd	a	présent	lourd	très lourd
621	3-6 m	ND	présent	a	présent	présent	présent
623	> 12 m	prog.	indeterminé	a	a	a	très lourd
624	3-6 m	ND	lourd	a	présent	présent	présent
627	ND	ND	présent	a	présent	présent	lourd
628	6-9 m	ND	présent	a	a	présent	présent
630	6-9 m	prog.	présent	présent	a	a	présent
631	6-9 m	ND	lourd	a	présent	a	présent
637	3-6 m	ND	présent	a	présent	a	a
639	> 12 m	prog.	lourd	a	présent	présent	présent
640	> 12 m	prog.	lourd	a	a	présent	présent
641	> 12 m	prog.	présent	a	a	présent	lourd
642	6-9 m	ND	présent	a	a	présent	présent
643	6-9 m	prog.	lourd	a	présent	a	présent
644	3-6 m	prog.	présent	présent	présent	a	présent
645	3-6 m	prog.	lourd	a	présent	a	lourd
646	ND	ND	présent	a	présent	a	lourd
649	6-9 m	ND	a	a	a	présent	lourd
650	9-12 m	ND	présent	a	a	présent	lourd
653	> 12 m	ND	lourd	a	lourd	présent	lourd
663	ND	prog.	lourd	a	présent	présent	a
667	6-9 m	prog.	lourd	a	a	a	a
672	> 12 m	prog.	lourd	a	a	présent	présent
674	ND	ND	présent	a	a	présent	présent
381	> 12 m	prog.	lourd	a	a	a	a
385	> 12 m	prog.	présent	a	a	a	a
382	> 12 m	prog.	lourd	a	a	lourd	présent
389	> 12 m	prog.	lourd	présent	présent	présent	a

D. Sympt. = Date d'apparition des symptômes

M. i. = Mode d'apparition des symptômes

Sy inf./infl. = Syndrome infectieux/inflammatoire

Sy card. = Syndrome cardiaque

Sy dig. = Syndrome digestif

Sy derm. = Syndrome dermatologique

Sy neuro. = Syndrome neuropsychiatrique centrale

ND = Not Done

prog. = progressif

brut. = brutal

a = absence

ANNEXE 9 (1)

Résultats des dosages biologiques effectués à l'IMT d'Anvers sur les sérum et les LCR des 139 sujets d'étude

Patient	Latex serum	CATT serum	Latex LCR	Prot. LCR	Lx/IgM LCR	O(alb)	OSAI/IgG	OSAI/IgM
2497	16	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2498	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2499	128	16	2	1332	128	5.6	1.16	0.79
2507	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2508	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2548	32	32	1	1179	64	7.7	2.49	1.67
2549	128	16	2	951	128	5.1	0.97	1.23
2557	64	16	4	1546	128	9.3	2.07	1.52
2560	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2561	64	32	0	594	8	<3.4	1.71	> 3.2
2562	64	64	4	1532	256	10.8	1.5	1.5
2569	64	32	4	1316	128	6.4	0.79	0.53
2570	128	32	2	974	128	5.2	1.21	0.51
2574	128	32	2	549	64	4.6	2.72	8.23
2582	16	16	0	774	16	6.2	1.08	3.88
2584	64	32	0	665	8	<3.9	0.99	> 2.15
2587	128	32	0	679	32	3.1	0.82	0.83
2588	512	16	2	339	2	<2.9	ND	ND
2595	64	32	0	483	2	<3.4	0.7	> 0.51
2597	16	32	0	706	2	3.9	0.79	> 0.18
2598	16	32	0	627	0	<2.9	0.92	> 0.55
2600	128	16	0	583	1	<3.4	1.34	> 1
2601	64	64	0	761	4	<5	0.97	> 5.32
2602	128	32	0	716	4	5.9	1.23	> 1.69
2603	64	16	0	514	4	<3	1.39	> 4.26
2604	256	32	0	522	2	<2.5	0.96	> 0.47
600	ND	ND	8	1092	256	ND	ND	ND
602	64	64	2	1063	128	9.2	1.54	6.04
603	128	16	4	1302	128	8.9	1.37	1.21
606	32	32	0	726	16	3.6	0.94	2.74
610	512	64	4	739	64	6.8	1.94	0.67
611	64	32	0	487	8	<4.0	0.66	> 1.49
612	128	16	0	653	2	<3.6	0.71	> 0.73
613	16	32	0	554	0	<3.4	0.84	> 0.11
614	32	32	0	507	1	<3.4	0.76	> 0.59
616	<8	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
619	32	16	0	551	4	4.3	0.84	> 28.57
622	32	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
625	128	16	16	2564	256	21.5	ND	ND
632	16	8	8	983	128	5.3	ND	ND
634	128	64	8	1466	256	12.5	1.55	1.05
635	64	16	4	1198	128	5.8	2.18	4.31
636	32	32	0	573	64	3	0.97	0.7
638	256	32	8	776	128	<4.4	1.94	1.2
648	128	32	1	757	128	4.2	0.92	1.58
654	ND	ND	8	2338	256	ND	ND	ND
655	128	16	8	1828	128	15.2	1.52	0.76
656	128	16	16	1474	256	13.7	2.19	1.28
657	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ANNEXE 9 (2)

Patient	Latex serum	CATT serum	Latex LCR	Prot. LCR	Lx/IgM LCR	O(alb)	OSAI/IgG	OSAI/IgM
659	64	16	1	867	64	8.6	1.14	3.64
660	64	64	0	486	0	4.3	0.87	> 0.47
661	64	32	0	537	32	3.2	1.44	2.24
662	32	16	0	924	64	6.5	2	3.06
664	256	16	0	621	1	<3.1	0.99	> 0.78
665	64	32	2	1218	128	8.1	2.2	1.3
666	128	64	0	805	8	<5.9	0.86	> 4.88
668	512	64	16	1358	128	9.2	1.69	1.21
669	512	32	2	650	4	<3.8	1.58	> 1.76
670	64	64	0	730	4	3.3	1.09	> 3.13
380	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
383	64	32	4	1653	128	10.4	1.94	3.37
384	64	32	0	809	0	2.6	1.4	0.69
387	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
388	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2477	128	64	4	1484	128	7.1	0.83	1.69
2478	32	16	0	888	8	3.8	0.69	1.85
2479	16	16	1	959	64	<2.8	1.71	9.87
2480	16	8	0	549	0	<2.6	0.13	>0.42
2481	16	16	0	757	2	<2.9	0.70	>1.00
2482	256	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2483	32	32	0	549	0	<2.4	0.64	> 0.08
2485	32	32	0	599	8	<3.2	1.06	ND
2486	16	32	0	702	1	<1.8	0.94	> 0.33
2487	64	16	0	575	2	<2.6	0.79	> 3.07
2488	512	32	1	776	0	3	0.49	> 0.19
2489	64	16	0	741	2	4.3	0.83	> 1.17
2490	32	8	0	803	64	4.3	1.64	1.34
2492	64	32	0	608	2	<2.9	0.81	> 2.76
2493	64	32	0	670	4	<2.8	2.71	> 0.89
2494	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2495	32	32	2	1471	8	6.3	ND	ND
2496	64	32	0	626	4	<2.1	1.25	> 3.07
2500	32	16	0	526	0	<3.9	0.48	0.32
2501	32	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2504	128	32	0	652	2	3.1	0.74	> 0.36
2505	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2509	512	32	8	839	ND	8	1.17	0.76
2510	512	64	4	637	128	4.8	0.98	2.06
2511	32	32	2	1090	128	5.5	3.82	1.39
2519	256	32	0	652	2	<2.7	0.7	> 0.54
2520	32	16	0	653	0	<3.1	0.48	0
2521	64	16	0	786	4	<3.1	0.83	> 5.35
2522	32	64	0	723	8	4.1	1.82	> 2.77
2535	16	16	0	1220	128	8.2	1.36	1.37
2537	64	16	0	638	64	5.2	0.75	> 0.88
2555	128	64	2	1373	256	8.1	1.16	1.76
2564	128	64	1	1098	64	6.9	1.36	1.23
2565	64	32	16	1372	256	9.3	3.43	6.88
2567	64	32	0	859	64	4.4	1.18	2.42
2571	256	32	2	1571	256	9.4	0.79	1.12
2585	16	16	4	1326	128	5.8	5.3	1.59

ANNEXE 9 (3)

Patient	Latex serum	CATT serum	Latex LCR	Prot. LCR	Lx/IgM LCR	O(alb)	OSAI/IgG	OSAI/IgM
2589	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2591	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2592	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
594	64	32	0	1250	64	<3.6	2.3	0.9
595	128	32	0	426	1	<3.1	0.44	> 0.19
596	128	16	4	1627	128	17	2.32	0.4
599	16	64	4	2038	256	15.9	2.52	2.57
601	16	16	4	976	128	5.8	2.96	3.01
604	128	8	8	1560	128	15.7	1.9	0.53
605	32	64	ND	ND	4	ND	ND	ND
609	64	32	1	955	128	4.3	2.12	1.62
621	32	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
623	32	32	1	931	32	8.5	ND	3.93
624	32	16	ND	ND	ND	ND	ND	ND
627	64	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
628	32	32	0	398	0	ND	ND	ND
630	64	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
631	16	64	1	809	64	3.9	1.3	2.75
637	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
639	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
640	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
641	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
642	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
643	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
644	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
645	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
646	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
649	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
650	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
653	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
663	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
667	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
672	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
674	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
381	<8	4	0	837	0	3	0	0
385	8	16	0	731	0	2.7	0.78	> 0.53
382	128	32	1	987	64	3.2	1.52	0.8
389	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Prot. = Protéinorachie

Lx/IgM = Latex/IgM

ND = Not done

ANNEXE 10 (1)

Résultats de l'identification de 50 souches de notre étude et de 7 souches de référence, par la technique des RAPD

Souche	Amorce						
	A2	A4	A7	A8	A10	A11	A18
2497	2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2498	2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2499	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2507	2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2508	2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2548	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2549	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2557	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2560	2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2561	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2562	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2569	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2570	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2574	2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2582	2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2584	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2587	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2588	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2595	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2597	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2598	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2600	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2601	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2602	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2603	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
2604	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
600	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
606	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
610	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
612	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
614	2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
622	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
634	2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
636	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
638	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
648	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
654	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
655	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
657	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
659	1-2-3	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5

ANNEXE 10 (2)

Souche	Amorce						
	A2	A4	A7	A8	A10	A11	A18
660	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
661	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
662	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
664	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
666	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
668	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
669	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
670	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
806/9	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
B120/9	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
Jua*	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
Peya*	1-2-3-4	2-3-5-6-7	2-3	3	1-3-4-8	4-6-7-9	1-2-5
KP465*	1-2-3-4-5	2-3-5-7	2-3	2-3	1-3-4-8	4-5-6-9	1-2-4-5
TSW65*	1-2-3-4	5-6-7	2-3	3	1-3-4-7-8	3-4-6-9	1-2-5
058Cl.A3*	1-2-3-4-5	5-6-7	2-3-5	3-6	1-3-4-8	1-4-6-9	1-2-5
Eatrol125*	1-2-3-4-5	5-7	2-3-5	3-5	1-3-4-8	2-4-6-8	1-2-5
TRPZ105*	4-6	1-4-8	1-4	1-2-4-7	2-5-6	4-7	1-3-4

* le détail des souches de référence est donné dans le Tableau .

ANNEXE 11.

Use of polymerase chain reaction in human African trypanosomiasis stage determination and follow-up

P. Truc,¹ V. Jamonneau,² G. Cuny,¹ & J.L. Frézil¹

Stage determination of human African trypanosomiasis is based on the detection of parasites and measurements of biological changes in the cerebrospinal fluid (CSF) (concentration of white blood cells > 5 cells per mm^3 and increased total protein levels). The patient is treated accordingly. Demonstration of the absence or presence of trypanosomes by the double centrifugation technique is still the only test available to clinicians for assessing treatment success. In this study, however, we evaluate the polymerase chain reaction (PCR) as a tool for assessing the disease stage of trypanosomiasis and for determining whether treatment has been successful. All 15 study patients considered to be in the advanced stage of the disease were PCR positive; however, trypanosomes were demonstrated by double centrifugation in only 11 patients. Of the five remaining patients, who were considered to be in the early stage, PCR and double centrifugation were negative. Following treatment, 13 of the 15 second-stage patients were found to be negative for the disease in at least two samples by PCR and double centrifugation. Two others were still positive by PCR immediately and one month after the treatment. Trypanosome DNA detection using PCR suggested that the two positive patients were not cured but that their possible relapse could not be identified by a search for parasites using the double centrifugation technique. Further evaluation of the PCR method is required, in particular to determine whether PCR assays could be used in studies on patients who fail to respond to melarsoprol, as observed in several foci.

Voir page 747 le résumé en français. En la página 747 figura un resumen en español.

Human African trypanosomiasis evolves from the haematolymphatic phase (first or early stage) to the meningoencephalitic stage (second or advanced stage). Although neurological signs and symptoms do occur during the first stage, they become more pronounced and more frequent during the second stage (1). The stage determination of the disease is currently based on measurements of the biological changes occurring in the cerebrospinal fluid (CSF) and the presence of parasites. The generally accepted criteria for CSF biological alteration are the same as those currently used in neurology: concentration of white blood cells > 5 cells per mm^3 and increased total protein levels (> 37 mg per 100 ml in a dye-binding-protein assay). In human African trypanosomiasis, an increased cell count and/or protein level, with or without the presence of trypanosomes, consequently leads to the conclusion that the disease is at an advanced stage, and the patient will be treated accordingly. The presence of trypanosomes alone without any CSF alteration is considered by some workers to be insufficient indication for central nervous system involvement and second-stage

diagnosis (2). Consequently, they have suggested various techniques for identifying changes in CSF that would allow the diagnosis of second stage of the disease, such as the presence of antitrypanosomal-specific antibodies determined by immunofluorescence (3), autoantibodies directed against neurofilament proteins (4), trypanosome-specific antibody (5), and elevated trypanosome-specific and nonspecific IgM levels (6). It should be noted that IgM levels can now be determined through a recently developed latex agglutination test (Latex/IgM) which combines stability, sensitivity and simplicity (7), and which has demonstrated its many advantages for application in the field.

It has been shown that, following treatment, it is usually several months before the number of cells and total protein level in CSF return to normal. Demonstration of the absence or presence of trypanosomes by the double centrifugation technique (8) is still the only means available to clinicians for assessing treatment success. However, despite its good sensitivity, double centrifugation is hampered by the fluctuation of parasite numbers in CSF. Given the efficiency of the polymerase chain reaction (PCR) in detecting the presence of trypanosomes in whole blood (9), we report in the present article on the use of this technique as a tool for diagnosing disease stage and for determining treatment success or failure.

CSF samples were obtained from 20 patients from Côte d'Ivoire. For each patient, samples had been taken prior to treatment, at the end of the

¹ Institut de Recherche pour le Développement (previously ORSTOM), BP 5045, Montpellier 34032, France. Correspondence to Dr Truc at this address.

² Institut Pierre Richet, Organisation de Coordination et de Coopération pour la lutte contre les Grandes Endémies (OCCGE), 01 BP 1500, Bouaké, Côte d'Ivoire.

treatment, and at 1, 3, 6 and 12 months after treatment. Samples were aliquoted. One aliquot was used immediately to test for the presence of parasites by double centrifugation, cell count and determination of the protein level. Another aliquot of each sample was frozen in Nunc (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) and stored in liquid nitrogen for further studies.

Aliquots were not available from all samples for this study. CSF double centrifugation, cell counts, determinations of protein levels and PCR could only be performed for each patient on samples collected before treatment and on at least two samples collected after treatment.

Each frozen 1.5-ml aliquot of CSF was thawed at room temperature and 500 µl was transferred to a 0.6-ml Eppendorf conical tube and centrifuged at 13 000 g for 20 min at 4 °C. By means of a pipette, 450 µl of the supernatant was gently removed and discarded. The pellet was resuspended in the remaining liquid and vortexed for 5 min. Subsequently, 100 µl of 5% Chelex solution in sterile purified water (Chelex[®] 100 Resin, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) was added to each tube. The tubes were then vortexed for 1 min, centrifuged at 13 000 g for 1 min and incubated at 56 °C for 1 hour. This was followed by a second incubation at 95 °C for 30 min. After incubation, the tubes were again centrifuged for 5 min at 13 000 g. The supernatant, now containing single strands of DNA, was used directly or after storage at 4 °C for no longer than 2 days.

PCR was performed according to the method described by Penchenier et al. (9) using *Trypanosoma*

brucei-specific primers (10). The amplification conditions were as follows: 40 cycles with the denaturation step at 94 °C for 1 min, the annealing step at 56 °C for 1 min, and the polymerization step at 72 °C for 1 min. The final elongation was at 72 °C for 5 min. Samples of 10 µl of each reaction product were run in 2% agarose gel with 1x 40mM Tris-acetate, 1mM EDTA (TAE) buffer at 100 V for 30 min. The gel was then stained for 20 min with a 0.5 µg/ml solution of ethidium bromide before being visualized under ultraviolet light.

Table 1 shows the PCR, double centrifugation, protein level and cell count results for the pre-treatment samples taken from each patient. Of the 15 patients considered to have second-stage trypanosomiasis according to the number of cells and/or protein content, all were PCR positive; however, trypanosomes were demonstrated by double centrifugation in only 11 of these patients. For the five remaining patients, who were considered to be first stage, the PCR and double centrifugation results were negative. Among these, one (patient 2522) had a cell count of 24, and might be in an early-late stage of the disease, a result which supports the controversial value of 5 cells for the cut-off between the first and second stages (11). Furthermore, patients with up to 20 cells in their CSF have been successfully treated with pentamidine rather than melarsoprol (12).

For the post-treatment samples, 13 of the 15 patients considered to be in the second stage were found to be negative in at least two samples by PCR and double centrifugation. Two others (patients 2585 and 2552) were still PCR positive both immediately and 1 month after receiving treatment. For these two patients, the double centrifugation did not disclose the presence of parasites but their cell counts and protein levels were abnormal.

The detection of parasites either by double centrifugation or by parasite DNA detection using PCR seems to be the only reliable technique for assessing the efficacy of trypanosomiasis treatment, since cell number and protein level are slow to return to normal and remain high even 3 months after treatment has ended. Detection of trypanosome DNA using PCR in the two positive patients indicated that they had not been cured but that their potential relapse could not be identified using the double centrifugation technique since it is not sufficiently sensitive.

Occasionally, CSF samples with a normal cell count and protein level have been found to harbour trypanosomes (13). In such cases, the patients are considered to be in the first stage of the disease. Other occasional observations indicate a difference in CSF analysis depending on the site of the spinal puncture (suboccipital or lumbar) (14). PCR may be an appropriate method for studying such unusual cases.

Our study indicates that the PCR technique described could be useful for determining the stage of the disease in human African trypanosomiasis. It might also be useful for identifying early treatment

Table 1. Results of PCR, double centrifugation, protein level determination and cell count for patients with human African trypanosomiasis prior to treatment

Patient	PCR	Double centrifugation	Protein level (mg/100 ml)	Cell count	Stage
2501	+	+	70	872	2
2555	+	+	70	274	2
2565	+	+	71	1044	2
2585	+	+	53	122	2
2591	+	+	38	930	2
2511	+	+	60	728	2
2552	-	+	127	132	2
2589	+	+	60	278	2
2592	+	+	71	228	2
637	+	+	NP ^a	36	2
649	+	+	NP	30	2
2564	-	-	87	450	2
2567	+	-	45	260	2
2571	-	-	71	1152	2
2494	-	-	68	252	2
2520	-	-	19	0	1
2521	-	-	26	2	1
2522	-	-	29	24	1
2586	-	-	24	4	1
2543	-	-	34	0	1

^a NP = not performed.

failures. Further evaluation of the method is required, in particular to determine whether PCR assays could be used in studies on patients who fail to respond to melarsoprol, as observed in several foci (e.g. Angola, Sudan, and Uganda). ■

Acknowledgements

We thank the Projet de Recherche clinique sur la Trypanosomiase, Daloa, Côte d'Ivoire, and the Base de Santé rurale de Bouafé, Côte d'Ivoire, for their excellent technical support; and Pierre Cattand (WHO, Geneva) for correcting the manuscript. This work was supported by IRD, ORSTOM and by a grant from Fonds d'Aide à la Coopération, Ministère français des Affaires étrangères, Secrétariat d'Etat à la Coopération et à la Francophonie.

Résumé

Amplification génique (PCR) appliquée à la détection du stade et au suivi de la trypanosomiase africaine humaine

La détermination du stade de la trypanosomiase africaine humaine est actuellement fondée sur la recherche du parasite et la mesure des modifications biologiques du liquide céphalorachidien (LCR) : une concentration des leucocytes >5 par μl et une augmentation de la protéinorachie (>37 mg/100 ml avec la méthode colorimétrique). Une augmentation de la cellularité et/ou de la concentration en protéines, avec ou sans présence de trypanosomes, débouche sur un diagnostic de stade avancé (deuxième stade), et le patient sera traité comme il se doit. La mise en évidence de l'absence ou de la présence de trypanosomes par double centrifugation demeure le seul moyen dont dispose le clinicien pour juger de la réussite du traitement. Compte tenu de l'efficacité de la PCR pour détecter la présence de trypanosomes dans le sang total, nous avons étudié cette technique en tant qu'instrument permettant d'évaluer le stade de la maladie et de déterminer le succès ou l'échec du traitement. On a obtenu des prélèvements de LCR pour 20 patients de Côte d'Ivoire. Sur 15 patients considérés comme ayant une trypanosomiase de deuxième stade en fonction de leurs cellulorachie et protéinorachie, tous étaient PCR positifs; toutefois, la double centrifugation n'a montré la présence de trypanosomes que chez 11 de ces patients. Les résultats de la PCR et de la double centrifugation pour les 5 patients restants, considérés comme en étant au

premier stade, étaient négatifs. Un de ces patients avait 24 cellules par μl et pouvait se trouver à un stade soit précoce soit tardif de la maladie, ce qui vient à l'appui du chiffre contesté de 5 cellules par μl comme étant le seuil entre le premier et le deuxième stade. Des prélèvements postérieurs au traitement effectués chez 13 des 15 malades présumés au deuxième stade ont été trouvés négatifs au moins à deux occasions, à la fois par la PCR et par la double centrifugation. Les deux autres sont demeurés positifs pour la PCR, immédiatement après le traitement et un mois suivant la fin de ce dernier. La recherche du parasite soit par double centrifugation soit par la PCR pour mettre en évidence l'ADN du parasite semble être la seule technique fiable, car le nombre des cellules comme la concentration en protéines ne reviennent à la normale que lentement et demeurent élevés même trois mois après le traitement. Les résultats de la PCR donnent à penser que les deux patients positifs n'étaient pas guéris, mais que leur rechute éventuelle n'a pu être identifiée par une recherche du parasite à l'aide de la double centrifugation, cette technique n'étant pas suffisamment sensible. Il faut évaluer plus avant la PCR, notamment pour déterminer si elle peut être utilisée dans les études sur les patients qui ne répondent pas au melarsoprol ainsi qu'on a pu l'observer dans plusieurs foyers.

Resumen

Empleo de la reacción en cadena de la polimerasa para la determinación de la fase de la tripanosomiasis africana humana y su seguimiento

La determinación de la fase de la tripanosomiasis africana humana se basa actualmente en la detección de los parásitos y en la medición de los cambios biológicos del líquido cefalorraquídeo (LCR): concentración de leucocitos superior a 5 células por μl y aumento de las proteínas totales (>37 mg/100 ml usando un método colorimétrico). Así pues, un aumento del número de células y/o de la concentración de proteínas, con o sin presencia de tripanosomas, permitirá diagnosticar una fase avanzada (segunda fase) de la enfermedad y tratar al paciente en consecuencia. La demostración de la ausencia o presencia de tripanosomas mediante la técnica de doble centrifugación es todavía el único medio

de que dispone el personal clínico para evaluar el éxito del tratamiento. En vista de la eficiencia de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) como medio de detección de la presencia de tripanosomas en sangre entera, hemos evaluado el uso de esta técnica para determinar la fase de la enfermedad y el éxito o el fracaso del tratamiento. Se obtuvieron muestras de líquido cefalorraquídeo de 20 pacientes de Côte d'Ivoire. Los 15 pacientes a quienes se consideraba en la segunda fase de tripanosomiasis, según el recuento leucocitario y el nivel de proteínas en su LCR, eran todos RCP-positivos. En cambio, la doble centrifugación sólo mostró tripanosomas en 11 de esos pacientes. Los resultados

de la RCP y de la doble centrifugación para los cinco pacientes restantes, a quienes se consideraba en la primera fase, fueron negativos. Uno de esos pacientes tenía 24 células por μl y podía hallarse tanto en una fase temprana como en una fase avanzada de la enfermedad, lo que respaldaría la consideración del controvertido valor de 5 células por μl como el límite entre las fases primera y segunda. Las muestras posteriores al tratamiento de 13 de los 15 pacientes a quienes se consideraba en la segunda fase fueron negativas por lo menos en dos ocasiones tanto en la RCP como en la doble centrifugación. Los otros dos seguían siendo RCP-positivos inmediatamente después del tratamiento y un mes más tarde. La detección de los parásitos, ya sea por

doble centrifugación o empleando la RCP para identificar el ADN del parásito, parece la única técnica fiable, ya que tanto el recuento leucocitario como los niveles de proteínas tardan en volver a la normalidad y siguen siendo altos incluso tres meses después del tratamiento. Los resultados de la RCP sugieren que los dos pacientes positivos no estaban curados, pero no se hubiese podido prever su eventual recaída buscando los parásitos mediante la técnica de doble centrifugación, ya que ésta no es lo bastante sensible. Es necesario evaluar mejor el método de la RCP, en particular para determinar si puede emplearse en los estudios de pacientes que no responden al melarsoprol, como se ha observado en varios focos.

References

1. WHO Expert Committee on Control and Surveillance of African Trypanosomiasis. Geneva, World Health Organization, 1998 (WHO Technical Report Series, No. 881).
2. Büscher P, Van Meirvenne N. Actualités diagnostiques. In: *Proceedings of the Second European Congress on Tropical Medicine, Clone, Cure and Control, September 1998*. Liverpool, Liverpool School of Medicine, 1998: 113.
3. Frézil JL, Coulm J, Alary JC. L'immunofluorescence indirecte dans le surveillance thérapeutique des trypanosomes. *Cahiers ORSTOM, série entomologie médicale*, 1978, 16: 191-207.
4. Ayed Z et al. Auto-anticorps spécifiques de constituants neuronaux au cours de la trypanosomose humaine africaine, détection et corrélation avec le stade de la maladie. In: *XVIIIème Conférence Technique de l'OCEAC, May, 1997*. Yaoundé, Cameroon. Organisation Commune Contre les Endémies en Afrique Centrale, 1997: 134.
5. Lejon V et al. Trypanosome specific antibody profile in serum and cerebrospinal fluid of *T. b. gambiense* patients: a latex agglutination test for field application. In: *Proceedings of the 23rd Meeting of the International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control, Banjul, Gambia, September 1995*. Nairobi, Kenya, OUA/ISCTRC, 1997, 118: 78-91.
6. Mattem P. État actuel et résultats des techniques immunologiques utilisées à l'Institut Pasteur de Dakar pour le diagnostic et l'étude de la trypanosomiose humaine africaine. *Bulletin of the World Health Organization*, 1968, 38: 1-8.
7. Lejon V et al. IgM quantification in cerebrospinal fluid of Human African Trypanosomiasis patients: a latex agglutination test for field application. *Bulletin of the World Health Organization*, 1999, 76: 553-558.
8. Cattand P, Miezán TW, de Raadt, P. Human African trypanosomiasis: use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *Bulletin of the World Health Organization*, 1988, 66: 83-86.
9. Penchenier L et al. Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomiasis. *Parasite*, 1996, 4: 387-389.
10. Moser DR et al. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*, 1989, 99: 57-66.
11. Bisser S et al. Apport des examens biochimiques dans le diagnostic de la phase nerveuse de la trypanosomose humaine africaine. *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*, 1997, 90: 321-326.
12. Doua F et al. The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 1996, 55: 586-588.
13. *Epidemiology and control of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee*. Geneva, World Health Organization, 1986 (WHO Technical Report Series, No. 739).
14. Neujean G, Evens F, Stijns J. Note sur l'invasion nerveuse dans la maladie du sommeil à *T. gambiense*. In: *Proceedings of the Fifth Meeting of the International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control, October 1954, Pretoria, South Africa*. Nairobi, Kenya, OUA/ISCTRC, 1954, 54: 12.

ANNEXE 12

Taylor, T. E., Wirima, J. J. & Molyneux, M. E. (1990). Hypoglycaemia and cerebral malaria. *Lancet*, 336, 950-951.

Van-Hensbroeck, M. B., Onyiorah, E., Jaffar, S., Schneider, G., Palmer, A., Frenkel, J., Enwere, G., Forsk, S., Nusmeijer, A., Bennett, S., Greenwood, B. & Kwiatkowski, D. (1996). A trial of artemether or quinine in children with cerebral malaria. *New England Journal of Medicine*, 335, 69-75.

Warrell, D. A., Molyneux, M. E. & Beales, P. F. (1990). Severe and complicated malaria, 2nd edition. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, supplement 2.

White, N. J., Mills, K. D., Marsh, K., Berry, C. D., Turner,

R. C., Williamson, D. H. & Brown, J. (1987). Hypoglycaemia in African children with severe malaria. *Lancet*, 708-711.

Wiecko, J. & Sherman, W. R. (1976). Boroacetylation of carbohydrates. Correlations between structure and mass spectral behaviour in monoacetylhexose cyclic boronic esters. *Journal of the American Chemical Society*, 98, 7631-7637.

Received 12 May 1998; accepted for publication 16 June 1998

TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE (1998) 92, 537-538

Short Report

Trypanosoma brucei ssp. and *T. congolense*: mixed human infection in Côte d'Ivoire

Philippe Truc¹, Vincent Jamonneau¹, Paul N'Guessan¹, Louis N'Dri¹, Papa Boubacar Diallo¹ and Gérard Cuny² *Institut Pierre Richet, OCCGE, Laboratoire de Biologie des Parasites et Vecteurs, 01 R.P. 1500, Bouaké, Côte d'Ivoire; ²ORSTOM, Centre de Montpellier, B.P. 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France*

Keywords: trypanosomiasis, human African trypanosomiasis, *Trypanosoma brucei* spp., *Trypanosoma congolense*, double infection, Côte d'Ivoire

It is generally agreed that human African trypanosomiasis (HAT) in West and Central Africa is caused by *Trypanosoma brucei gambiense*. However, recent studies have found patients harbouring other *T. brucei* subspecies identified mainly by isoenzyme analysis, such as the houliet strain group (STEVENS & GODFREY, 1992). Furthermore, TRUC *et al.* (1997) have shown that the disease in these patients followed a more rapid and severe course: characterization of the parasite isolates was confirmed by isoenzyme electrophoresis using cellulose acetate (TRUC *et al.*, 1991).

Due to the toxicity of the available drugs to treat HAT, the presence of parasites must be confirmed before therapy is started. In the field, active case detection commonly involves establishing a suspicion of infection by serology, followed by the microscopical examination of blood or lymph of seropositive cases. The card agglutination trypanosomiasis test (CATT) is commonly used, on serum or plasma (MAGNUS *et al.*, 1978), followed by one or more parasitological tests, such as the capillary centrifugation test, the mini-anion exchange centrifugation technique (m-AECT) (LUMSDEN *et al.*, 1979) or the quantitative buffy coat (QBC[®]) technique.

In the Aboisso HAT focus in south-eastern Côte d'Ivoire, a 50 years old woman gave a weakly positive CATT result using whole blood but a negative result with plasma; she also gave a negative result in the latex agglutination test (BUSCHER *et al.*, 1991), using whole blood. Parasites were detected by the m-AECT using heparinized whole blood collected by venepuncture, as recently recommended by TRUC *et al.* (1998), over 100 trypanosomes being seen in the eluate. The morphology of these trypanosomes was different from that of *T. brucei* spp.; they were shorter, without a free flagellum, and were only weakly motile. No *T. brucei* slender form was observed and the trypanosomes died in the m-AECT collector tube in less than 20 min, unlike *T. brucei* spp., which survive for several hours.

The extremely bad physical condition of this patient indicated that she was in the advanced stage of the disease. However, no trypanosome was found in her cerebrospinal fluid by double centrifugation, and the cell count was only 1/mm³. No malaria parasite was found in a blood film, and no intestinal parasite was detected by faecal examination.

The blood collected for the m-AECT was divided into aliquots and deep frozen in liquid nitrogen, inoculated into a kit for the *in vitro* isolation of trypanosomes (KIVI) (AGRTS *et al.*, 1992), and inoculated intraperitoneally to a white mouse. Both attempts to isolate trypanosomes *in vitro* and *in vivo* failed after 60 d follow-up.

Deoxyribonucleic acid (DNA) was isolated from the whole trypanosomes (PENCHENIER *et al.*, 1996) and amplified by the polymerase chain reaction (PCR) (MASIGA *et al.*, 1992) using specific primers for *T. brucei* spp. and *T. congolense* (Kilifi, forest and savannah groups). DNA amplification, done in 2 different laboratories, gave clearly positive results when using primers for the *T. congolense* savannah group (MAIWA & OTIENO, 1990) and for *T. brucei* ssp. (MOSER *et al.*, 1989). Positive and negative controls confirmed the specificity of the PCR and the absence of contamination by parasite DNA.

The initial microscopical observation of the trypanosomes suggested that they might be *T. congolense* and the failure to isolate parasites *in vitro* or *in vivo* confirmed our suspicion that they were not *T. b. gambiense*. Furthermore, the weak CATT reaction and the negative results in the other serological tests corroborated this. The patient was seronegative for human immunodeficiency virus infection in the Murex[®] 230A Ice Pack enzyme-linked immunosorbent assay and the Innogenetics[™] 1036 line immunoassay.

Resistance of *T. congolense* to human serum has been suggested previously (JOSHUA, 1989). In a previous study, 3 stocks of *T. congolense* isolated from goats and sheep in Nigeria were resistant to human serum in the blood incubation infectivity test (RICKMAN & ROYSON, 1970).

The fact that this patient was treated successfully with pentamidine (7 intramuscular injections over 14 d), with no parasite being seen on follow-up examination immediately after treatment and one month later and her general health improving within 2 weeks after starting the treatment, suggests that she might have had a mixed infection. However, the presence of *T. brucei* was indicated only by the weak CATT reaction and the PCR result.

Mixed infections in humans involving allegedly non-infective trypanosomes, confirmed by DNA identification, have never, to our knowledge, been described.

Address for correspondence: Dr P. Truc, ORSTOM, B.P. 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France.

Whether our patient's disease was due to *T. brucei* and not to *T. congolense* is irrelevant; this case report simply shows that *T. congolense* can infect humans. The importance of this in endemic countries, as well as the possible pathogenicity of such parasites, remains to be determined.

Acknowledgements

We sincerely thank the team of Institut Pierre Richet/OC-CGE at Bouaké, Côte d'Ivoire, for their excellent technical support, and Pierre Cattand (World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases, Geneva, Switzerland) for his help in writing the paper. The work was supported by a grant from Fonds l'Aide à la Coopération du Ministère Français pour la Coopération et le Développement.

References

- 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. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **86**, 394-395.
- Büscher, P., Draclants, E., Magnus, E., Vervoort, T. & Van Meirvenne, N. (1991). An experimental latex agglutination test for antibody detection in human African trypanosomiasis. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **71**, 267-273.
- Joshua, R. A. (1989). Occurrence of human serum-resistant *Trypanosoma congolense* in goats and sheep in Nigeria. *Veterinary Parasitology*, **31**, 107-113.
- Lumsden, W. H. R., Kimber, C. D., Evans, D. A. & Doig, S. J. (1979). *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: adaptation for field use. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**, 312-317.
- Magnus, E., Vervoort, T. & Van Meirvenne, N. (1978). A card agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **58**, 169-176.
- Majiwa, P. A. O. & Otieno, L. H. (1990). Recombinant DNA probes reveal simultaneous infection of tsetse flies with different trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **40**, 245-254.
- 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. *International Journal for Parasitology*, **22**, 909-918.
- 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. *Parasitology*, **99**, 57-66.
- Penchenier, L., Dumas, V., Grébaud, P., Reifenberg, J. M. & Cuny, G. (1996). Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomiasis. *Parasite*, **4**, 387-389.
- Rickman, L. R. & Robson, J. (1970). The testing of proven *Trypanosoma brucei* and *T. rhodesiense* strains by the blood incubation infectivity test. *Bulletin of the World Health Organization*, **42**, 911-916.
- Stevens, J. R. & Godfrey, D. G. (1992). Numerical taxonomy of *Trypanozoa* based on polymorphisms in a reduced range of enzymes. *Parasitology*, **104**, 75-86.
- Truc, P., Mathieu-Daudé, F. & Tibayrenc, A. (1991). Multilocus isoenzyme identification of *Trypanosoma brucei* stocks isolated in Central Africa: evidence for an animal reservoir of sleeping sickness in Congo. *Acta Tropica*, **49**, 127-155.
- Truc, P., Aerts, D., McNamara, J. J., Claes, Y., Allingham, R., Le Ray, D. & Godfrey, D. G. (1992). Direct isolation *in vivo* of *Trypanosoma brucei* from man and other animals, and its potential value for the diagnosis of gambian trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **86**, 627-629.
- Truc, P., Formenty, P., Diallo, P. B., Konoin-Oka, C. & Laagnie, F. (1997). Confirmation of two distinct classes of zymodemes of *Trypanosoma brucei* infecting patients and wild mammals in Côte d'Ivoire: suspected difference in pathogenicity. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **91**, 951-956.
- Truc, P., Jamonneau, V., N'Guessan, P., Diallo, P. B. & Garcia, A. (1998). Parasitological diagnosis of human African trypanosomiasis: a comparison of the QBC® and the miniature anion-exchange centrifugation techniques. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **92**, 288-289.

Received 8 May 1998; revised 30 June 1998; accepted for publication 30 June 1998

ANNEXE 13

Exploration of the distribution of *Trypanosoma brucei* ssp. in West Africa, by multilocus enzyme electrophoresis

Trypanosoma brucei gambiense and *T. b. rhodesiense* are generally held responsible for the chronic form of human African trypanosomiasis (HAT) seen in West and Central Africa, and the acute form observed in East Africa, respectively. Over the last 25 years, genetic characterization of these parasites has helped in elucidating the epidemiology of HAT. Genetic identification was initially based on the investigation of isoenzyme polymorphism by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE). This technique is now considered limited in terms of the level of genetic variability it can be used to demonstrate. However, it remains more robust and cheaper than the newer, DNA-based methods (Gibson *et al.*, 1999), and very useful for basic epidemiological studies, such as the identification of the animal reservoirs of the parasites causing HAT. From a taxonomical point of view, MLEE allows a clear distinction between the homogeneous *T. b. gambiense* group 1 (Gibson, 1986) and the heterogeneous *T. brucei gambiense* group 2 or *T. brucei* 'bouaflé' group (Godfrey *et al.*, 1990; Baker, 1995). The latter group is also suspected to be pathogenic to humans (Truc *et al.*, 1997a). The main objectives of the present study were to use MLEE to identify stocks isolated mainly from humans and to analyse the distribution and persistence of zymodemes in space and time in West Africa, particularly in Côte d'Ivoire, using stocks isolated between 1992 and 1999.

Stocks were isolated, from HAT cases diagnosed during several medical surveys in Côte d'Ivoire (222 cases), Guinea (23) or Equatorial Guinea (six), by inoculation of rodents with infected blood (pre-1991) or, more recently, using the kit for in-vitro isolation (KIVI; Aerts *et al.*, 1992). The positive samples from the KIVI were sub-inoculated in semi-defined medium (Cunningham, 1977) supplemented with foetal calf serum and antibiotic (Truc

et al., 1992). The pellets of parasites were conserved in liquid nitrogen until use.

The 251 stocks isolated from humans were compared with 16 reference stocks isolated from humans and other animals between 1977 and 1994 (see Table) and identified as *T. brucei gambiense* group 1, the bouaflé strain-group of *T. brucei*, or *T. congolense* (TSW103; Gashumba *et al.*, 1988).

Thirteen enzyme systems, representing 16 loci, were subjected to electrophoresis on cellulose acetate (Helena® system; Helena Laboratories, Beaumont, TX): alanine aminotransferase (ALAT; EC 2.6.1.2); aspartate aminotransferase [ASAT (= GOT); EC 1.2.1.12]; glucose phosphate dehydrogenase (GPI; EC 5.3.1.9); isocitrate dehydrogenase (IDH; EC 1.1.1.42); malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37); malic enzyme (ME; EC 1.1.1.40); nucleoside hydrolase (EC 3.2.2.1) with inosine substrate (NHI) or deoxyinosine substrate (NHD); peptidase with L-leucyl-L-alanine substrate (PEP2; EC 3.4.11 or EC 3.4.13); 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD; EC 1.1.1.44); phosphoglucomutase (PGM; EC 2.7.5.1); superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1); and threonine dehydrogenase (TDH; EC 1.1.1.103). SOD was investigated as described by Stevens *et al.* (1989) and all other enzymes as detailed by Truc *et al.* (1991) and Truc and Tibayrenc (1993). All chemicals were obtained from Sigma. Stocks were grouped by zymodemes and compared with the reference isolates.

A dendrogram of relationships was built, using the method of Jacquard (1973) to calculate the distance (d) between each zymodeme and any other (Serres and Roux, 1986).

Eighteen zymodemes were identified (see Table). The single *T. congolense* stock investigated, TSW103 of zymodeme 27, was clearly distinct ($d=0.9$) from the other groups, as Truc *et al.* (1997b) also observed. The two

TABLE
The origin, year of isolation and identification of the 267 stocks investigated

Zymodeme	Stocks*	Country	Location	Year
1 (T. b. g. group 1)	DAL072†	Côte d'Ivoire	Vavoua	1978
2 (T. b. g. group 1)	TRAZIE†	Côte d'Ivoire	Sinfra	1991
3 (T. b. g. group 1)	380, 383, 384, B 120/9, 107/4	Côte d'Ivoire	Aboisso	1997
	2507, 2508, 2557, 2584, 2595, 2597, 2598, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604	Côte d'Ivoire	Bonon	1997
	694 jo, B 28/4, T 20/2, B 53/5, B 59/2, B 3/7, CEI, T 9/3, 655, 659, 660, 661, 662, 664, 665, 666, 668, 669, 670	Côte d'Ivoire	Bonon	1998
	5033/2, 5038/3, 5061/1, 3513/2	Côte d'Ivoire	Bonon	1999
	603, 632, 635	Côte d'Ivoire	Bouaflé	1997
	654, 656, 657	Côte d'Ivoire	Bouaflé	1998
	1973, 1976, 1979, 1981, 1983, 1986, 1987, 1992, 1993, 2088, 2087, 2093	Côte d'Ivoire	Daloa	1994
	2548, 2549, 2569	Côte d'Ivoire	Daloa	1997
	T 21/4 A	Côte d'Ivoire	G. Zathry	1999
	2085, 2084	Côte d'Ivoire	Ouragahio	1994
	SIQUE†	Côte d'Ivoire	Sinfra	1991
	1967, 1968, 1969, 1971	Côte d'Ivoire	Sinfra	1993
	1977, 1978, T67/2, G2/12, F16/1, 07/1, D25/41, N43/6, C5/6, 2107, 2099, 2086, 2090, 2091, 2098, 2101	Côte d'Ivoire	Sinfra	1994
	2112, 2114, 2120, 2137, 2139, 2155, 2138, 2162, 2147, 2259, C96/4, 20.2, 12.3, 2260, 2240, 1/6, 2226, 23/1, 2265, 2254, 2224, 46/5, 2223, 2218, 2217, C74/7, 2241, 15/3, 28/1, 25/41, 139/10, 53/5/1, Kabib, C55/1, 9/9, C5/1, 7/8, 2145, 2150, 2161	Côte d'Ivoire	Sinfra	1995
	C48E/1, 2/2, C2/1, 26/2, Mok, Na, Koak, Seco, Bage, Fada, 8/7, 9/13, Sal, Gla, 51/11, 43/5, C51/5, C8/1, C55 C/3, 133/14, 12/3, G7/27	Côte d'Ivoire	Sinfra	1996
	234/8 NX, 234/1, SOUM, LJF, KMOD, 2548, YAD, 2549, 602, 4/5, BO, 2497, 2498, 2499, 2560, 2562, 2570, 2582, 2587, 2588, 600, 602, 610, 611, 612, 613, 614, 616, 619, 622, 625, 634, 636, 638	Côte d'Ivoire	Sinfra	1997
	673, 675, 684 jo, 686 jo, 690, 691, 692 j3, 693 j3, 695 jo, 696 jo, 93/5, 5/7, 648	Côte d'Ivoire	Sinfra	1998
	M 2/4, L 1/7	Côte d'Ivoire	Sinfra	1999
	1991	Côte d'Ivoire	Soubré	1994
	1965, 1966	Côte d'Ivoire	Vavoua	1993
	2102	Côte d'Ivoire	Vavoua	1994
	1GE, 4GE, 5GE, 6GE, 7GE, 8GE	Equatorial Guinea	?	1997
	9/1 GCK, MAM GCK, 9/2 GCK, SAL, 26/16 GCK	Guinea	Dubreka	1997
	F31/4, F10/5, F35/2, B5/2, B4/1, F4/1, F34/1, B18/9, F2/2, F7/6, F55/3, B15/7, B34/2, F12/20, N°1 GC	Guinea	Dubreka	1998

6 (<i>T. brucei</i> 'bouaflé')	SH017†	Côte d'Ivoire	Aboisso	1989
7 (<i>T. brucei</i> 'bouaflé')	SH196†	Côte d'Ivoire	Daloa	1990
10 (<i>T. brucei</i> 'bouaflé')	SH276†	Côte d'Ivoire	Daloa	1992
11 (T. b. g. group 1)	SINF1†	Côte d'Ivoire	Sinfra	1992
12 (T. b. g. group 1)	SINF5†	Côte d'Ivoire	Gouneffa	1992
12 (T. b. g. group 1)	70/2 GCK, MSY GCK, 15/3 GCK	Guinea	Dubreka	1997
14 (<i>T. brucei</i> 'bouaflé')	TH2†	Côte d'Ivoire	Daloa	1978
15 (<i>T. brucei</i> 'bouaflé')	TSW53 (pig)†	Côte d'Ivoire	Bouaflé	1982
27 (<i>T. congolense</i>)	TSW103 (pig)†	Liberia	Sanniquelle	1977
30 (<i>T. brucei</i> 'bouaflé')	132 (kob)†	Côte d'Ivoire	Comoé	1993
33 (<i>T. brucei</i> 'bouaflé')	KK39 (kob)†	Côte d'Ivoire	Comoé	1980
37 (<i>T. brucei</i> 'bouaflé')	AB14 (hartebeest)†	Côte d'Ivoire	Comoé	1980
38 (T. b. g. group 1)	1972†	Côte d'Ivoire	Sinfra	1993
	1974	Côte d'Ivoire	Sinfra	1994
	2146	Côte d'Ivoire	Sinfra	1995
	C4D/1, 19/3	Côte d'Ivoire	Sinfra	1996
	2561, 2574, 606	Côte d'Ivoire	Sinfra	1997
	687 jo, 689 jo	Côte d'Ivoire	Sinfra	1998
39 (T. b. g. group 1)	D25/41	Côte d'Ivoire	Sinfra	1994
	86/1, 27/7	Côte d'Ivoire	Sinfra	1995
40 (T. b. g. group 1)	Bub6 (hartebeest)†	Côte d'Ivoire	Marahoué	1994
41 (T. b. g. group 1)	PT 41, PT 237, PT 265, PT 400, PT 436	Côte d'Ivoire	Daloa	1992
	2143, 2157, D139/10	Côte d'Ivoire	Sinfra	1995
	2390, YLB, OA	Côte d'Ivoire	Sinfra	1996

* From humans unless indicated otherwise.

† Reference stock: DAL072, TSW53, AB14 (Stevens *et al.*, 1992); TRAZIE, SIQUE, SH017, SH196, SH276, SINF1, SINF5, 1972, Bub 6 (Truc *et al.*, 1997a); TH2 (Mehlitz *et al.*, 1982); TSW103 (Gashumba *et al.*, 1988); 132 (Truc *et al.*, 1997b); KK39 (Young and Godfrey, 1983).

T. b. g. group 1, *Trypanosoma brucei gambiense* group 1.

classical groups within *T. brucei* (*T. b. gambiense* group 1 and *T. brucei* 'bouaflé') were also easily separable, also confirming the results of previous studies (Gibson, 1986; Godfrey *et al.*, 1990). Zymodemes 1, 2, 3, 11, 12, 38, 39, 40 and 41 were clustered together as *T. b. gambiense* group 1 whereas zymodemes 6, 7, 10, 14, 15, 30, 33 and 37 formed the *T. brucei* 'bouaflé' group. The level of genetic variability within each of these two groups appeared low, with *d*-values of <0.2 and <0.3, respectively (see Fig.).

Within *T. b. gambiense* group 1, zymodemes 1, 2, 11 and 40 were each represented by a single isolate from Côte d'Ivoire (each a reference stock), whereas three of the 'new' isolates from Guinea were of zymodeme 12, and three of those from Côte d'Ivoire were of zymodeme 39. Zymodemes 38 and 41 were represented by 9 and 11 new stocks from

Côte d'Ivoire, respectively. Zymodeme 3 was by far the most common zymodeme, represented by 226 isolates (200 of 237 from Côte d'Ivoire, 20 of 23 from Guinea, and all six isolates from Equatorial Guinea).

All the stocks identified as *T. brucei* 'bouaflé' were reference stocks isolated, in Côte d'Ivoire, from humans or other animals (see Table). As the two most recent isolates to be identified as 'bouaflé' were collected from a human in 1992 (SH276) and a kob in 1993 (132), all of the 241 stocks isolated since 1994 have been identified as members of *T. b. gambiense* group 1. In fact, only five zymodemes in *T. b. gambiense* group 1 (3, 12, 38, 39 and 41) have been isolated since 1992. Although an isolate of zymodeme 38 was collected in Côte d'Ivoire at least once per year between 1993 and 1998, zymodeme 39 (isolated in 1994–1995) has not been recognized



Fig. A 'UGPMA' dendrogram built from a matrix of Jacquard's distances (not shown), showing how the zymodemes (Z) cluster. Each zymodeme number is followed by the name of a stock representative of that zymodeme. The scale bar indicates a d -value of 0.1.

among the isolates collected after 1995. Stocks identified as zymodeme 41 have only been collected around Daloa (in 1992) and Sinfra (in 1995/1996). Zymodeme 12 was isolated in Côte d'Ivoire in 1992 (the isolate becoming reference stock SINF5) but no subsequent isolates from this country have been found to belong to this zymodeme. It appeared in Guinea in 1997 but was not among the 15 Guinean stocks collected in 1998, all of which belonged to zymodeme 3. Zymodeme 3 appears to remain predominant from year to year, particularly in Côte d'Ivoire (where it accounted for 81% of the stocks isolated in 1996 and 96% of those collected in 1998).

The most surprising result of the present study is the observation that zymodeme 3 (Z3) is widely distributed, in both West and Central Africa. In Côte d'Ivoire, Z3 appears to be evenly distributed throughout the country, and the main cause of the current epidemic of HAT, at least since 1991. This zymodeme is common not only in the historical foci of HAT (Aboisso, Bouaflé, Vavoua and Daloa) but also in the 'new' foci around Bonon, Sinfra and Soubré. The spread of Z3 (and therefore of HAT) within Côte d'Ivoire could be the result of the movement of untreated patients from established foci, as observed in Central Africa (Truc and Tibayrenc, 1993). The two other main zymodemes in Côte d'Ivoire (Z38 and Z41) appear to occur only around Daloa and/or Sinfra (even though Sinfra is an area of particularly intense transmission). It is unclear why Z3 is much more widespread than any other zymodeme in Côte d'Ivoire; it may develop better in the local vectors and/or be more infective to humans. The other, minor zymodeme identified in Côte d'Ivoire (Z2, Z11, Z12 and Z39) generally appear restricted to this country (Z12 has also been found in Guinea) and may be responsible for 'endemic' patterns of HAT. That Z3 appears as common in Guinea as Côte d'Ivoire is not surprising as these countries are neighbours, with considerable cross-border travel among their human populations. However, that Z3 is also present and perhaps equally common in Equatorial Guinea, in Central Africa > 1000 km to the east, is more

difficult to explain. If, as some suspect (Truc and Tibayrenc, 1993), the historical origin of HAT lies in Central Africa, Z3 may have entered West Africa from Central Africa many years ago, probably in untreated but asymptomatic human cases.

Another surprising result is that, over the last decade, parasites of the *T. brucei* 'bouaflé' group appear to have disappeared in Côte d'Ivoire (at least as human infections). Although such parasites may be responsible for an acute form of HAT (Truc *et al.*, 1997a), the results of a recent, MLEE-based study have indicated that parasites of zymodeme 3 cause a wide variety of clinical patterns, including asymptomatic, 'self-cure', classical, chronic HAT and a similarly acute form of the disease (unpubl. obs.). The variation may reflect differences between individuals in susceptibility to infection, although this needs to be investigated further.

The relevance and usefulness of the present results are to some extent limited because the level of discrimination possible using MLEE is relatively low compared with that achievable using DNA-based methods. For example, multiprimer, RAPD fingerprinting recently revealed that a patient found (by MLEE) to be infected with Z3 was carrying multiple clones of *T. b. gambiense* (P. Truc, V. Jamonneau, V. Lejon, E. Magnus, P. Vincendeau, M. Tibayrenc, and B. Oury, unpubl. obs.). However, MLEE-based characterization remains useful for epidemiological studies of HAT, because of the generally low level of genetic variability within the *T. brucei* subgroups. The use of more sophisticated techniques, such as those based on PCR and analysis of the repetitive sequences of microsatellite DNA analysis, has confirmed such low variability (Biteau *et al.*, 2000). Whatever the technique used for the characterization of African trypanosomes, the parasites still have to be manipulated and cultured, introducing complexity and bias. Use of KIVI for the field isolation of trypanosomes, for example, may select for those clones or zymodemes which multiply best in culture (McNamara *et al.*, 1995). Although the number of parasites needed for DNA-based methods of identification is much smaller than

the number needed for MLEE, a simple, direct method for the identification of the parasites, while they are in samples of blood, lymphatic juice or cerebrospinal fluid, would be very useful.

ACKNOWLEDGEMENTS. We thank the teams of the National Control Programmes of Côte d'Ivoire, Guinea and Equatorial Guinea, and all of the HAT team at the Institut Pierre Richet. This work was supported by a grant from the Fonds d'Aide à la Coopération of the Ministère français des Affaires Etrangères.

V. JAMONNEAU

Institut de Recherche pour le Développement (IRD),
Département Sociétés et Santé, B.P. 5045,
34032 Montpellier, France, and
Institut Pierre Richet, B.P. 1500,
Bouaké 01, Côte d'Ivoire

P. N'GUESSAN

L. N'DRI

Institut Pierre Richet, B.P. 1500,
Bouaké 01, Côte d'Ivoire

P. SIMARRO

Centro Control Trypanosomiasis,
Apartado 560, Bata, Equatorial Guinea

P. TRUC*

Laboratoire de Recherche et de
Coordination sur les Trypanosomoses,
CIRAD/EMVT/IRD, LRCT,
Campus International de Baillarguet,
34398 Montpellier Cedex 5, France

Received 21 June 2000, Revised 21 July 2000,
Accepted 23 July 2000

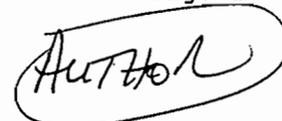
* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: truc@mpl.ird.fr; fax: + 33 4 67 59 39 20.

REFERENCES

- AERTS, D., TRUC, P., PENCHENIER, L., CLAES, Y. & LE RAY, D. (1992). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86, 394–395.
- BAKER, J. R. (1995). *Parasite*, 2, 3–12.
- BITEAU, N., BRINGAUD, F., GIBSON, W. C., TRUC, P. & BALTZ, T. (2000). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 105, 185–201.
- CUNNINGHAM, I. (1977). *Journal of Protozoology*, 21, 325–329.
- GASHUMBA, J. K., BAKER, R. D. & GODFREY, D. G. (1988). *Parasitology*, 96, 475–486.
- GIBSON, W. C. (1986). *Parasitology Today*, 2, 255–257.
- GIBSON, W. C., STEVENS, J. & TRUC, P. (1999). In *Progress in Human African Trypanosomiasis, Sleeping Sickness*, eds Dumas, M., Boutcille, B. & Buguet, A. pp. 7–29. Paris: Springer.
- GODFREY, D. G., BAKER, R. D., RICKMAN, L. R. & MEHLITZ, D. (1990). *Advances in Parasitology*, 29, 1–39.
- JACQUARD, A. (1973). *Cahiers d'Anthropologie et d'Ecologie Humaine*, 1, 11–124.
- MCMNAMARA, J. J., BAILEY, J. W., SMITH, D. H., WAKHOOL, S. & GODFREY, D. G. (1995). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89, 388–389.
- MEHLITZ, D., ZILLMANN, U., SCOTT, C. M. & GODFREY, D. G. (1982). *Tropenmedizin und Parasitologie*, 33, 113–118.
- SERRES, E. & ROUX, M. (1986). In *Leishmania: Taxonomie-Phylogénèse*, ed. Rioux, J. A. pp. 27–40. Montpellier: Institut Méditerranéen d'Etudes Epidémiologiques et Ecologiques.
- STEVENS, J. R., NUNES, V. L. B., LANHAM, S. M. & OSHIRO, E. T. (1989). *Acta Tropica*, 46, 213–222.
- STEVENS, J. R., LANHAM, S. M., ALLINGHAM, R. & GASHUMBA, J. K. (1992). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86, 9–28.
- TRUC, P. & TIBAYRENC, M. (1993). *Parasitology*, 106, 137–149.
- TRUC, P., MATHIEU DAUDÉ, F. & TIBAYRENC, M. (1991). *Acta Tropica*, 49, 127–135.
- TRUC, P., AERTS, D., MCMNAMARA, J. J., CLAES, Y., ALLINGHAM, R., LE RAY, D. & GODFREY, D. G. (1992). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86, 627–629.

-
- TRUC, P., FORMENTY, P., DIALLO, P. B., KOMOIN-OKA, C. & LAUGINIE, F. (1997a). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **91**, 951–956.
- TRUC, P., FORMENTY, P., DUVALLET, G., KOMOIN-OKA, C., DIALLO, P. B. & LAUGINIE, F. (1997b). *Acta Tropica*, **67**, 187–196.
- YOUNG, C. J. & GODFREY, D. G. (1983). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **77**, 467–481.

ANNEXE 14



Clinical and biological evolution of human trypanosomiasis in Côte d'Ivoire

Despite more than 60 years of control activities, human African trypanosomiasis (HAT) remains an important health problem in sub-Saharan Africa. In 1998, for example, the World Health Organization estimated that 60 million were at risk of acquiring the disease and that as many as 500 000 people were infected with *Trypanosoma brucei* spp., the causative agents (WHO, 1998). Two stages of the disease are classically observed: a haemato-lymphatic stage, in which there are no specific clinical signs (Jannin *et al.*, 1993; Dumas and Bouteille, 1996), leading to a meningo-encephalitic stage, usually characterized by neurological disorders. However, human infection with *T. b. gambiense*—the cause of the usually chronic form of HAT (often known as Gambian sleeping sickness) found in West and Central Africa—may be asymptomatic (Gallais *et al.*, 1953; Lapeyssonnie, 1960; Wery and Burke, 1972; Ginoux and Frezil, 1981; Woodruff *et al.*, 1982) or even cause acute disease, as suspected in Côte d'Ivoire (Truc *et al.*, 1997). This diversity in clinical pattern may reflect variation in the parasite, in individual susceptibility to infection, or both. However, the relationship between the genetic diversity of *Trypanosoma brucei* spp. and the clinical evolution of HAT is still a matter of controversy, and marked variation in the susceptibility of humans to infection has never been demonstrated.

In Côte d'Ivoire, 63 people living in the Sinfra area (30 local-born and 33 migrants from Mali, Burkina Faso or northern Côte d'Ivoire) refused treatment for 1–5 years after they had first been found infected with trypanosomes in 1995–1996. Whenever possible and appropriate (see below), each was clinically re-examined and re-checked for infection with *T. b. gambiense* at regular intervals during this period (June 1997, January 1998 and March 1999). Plasma samples were checked

with the card agglutination test for trypanosomiasis (CATT; Magnus *et al.*, 1978), whole blood or lymph juice was investigated using the miniature anion-exchange centrifugation technique (mAECT; Lumsden *et al.*, 1977), and lymph-juice samples (from those with swollen lymph nodes) were checked under the microscope, for trypanosomes. Although the main aim of these investigations was to persuade those infected to accept appropriate treatment, the results obtained are of considerable interest and are therefore reported here.

By the time of the first follow-up, in June 1997, two of the subjects had died (of unknown causes) and 11 had left the Sinfra area, leaving 53 available for re-examination. By the time of the last follow-up, in March 1999, 29 of these 53 had accepted treatment and two more subjects had died, both with severe neuro-psychiatric illness probably attributable to HAT. Only 19 of the original subjects were therefore left untreated and available for the final follow-up. Two of these refused to permit blood samples to be taken from them in March 1999 (although clinical examination of these two at each of the three follow-ups failed to reveal any signs of HAT) and blood samples were not taken from another two subjects at this last follow-up because they had been found to be CATT-negative at the first follow-up, in 1997. The serological, parasitological and clinical data discussed below are confined to the 15 subjects, here numbered 1–15 for convenience, who were still untreated at the last follow-up and from whom blood samples were taken at that time (see Table).

Numbers 1–8 were all parasitologically negative at the 3-year follow-up, although either CATT-positive in 1999 (numbers 3–8), or CATT-positive in 1997 and 1998 and CATT-negative in 1999 (numbers 1 and 2). Numbers 1–6 had never been found to have

3216 JAMONNEAU ET AL.

TABLE
Serological, parasitological and clinical evolution of 15 untreated subjects between parasitologically confirmed diagnosis in 1995–1996 and the end of the follow-up in March 1999

Subject no.	Follow-up									
	1995–1996	June 1997			January 1998			March 1999		
	Tryps	CATT	Tryps	Signs	CATT	Tryps	Signs	CATT	Tryps	Signs
1	+	+	-	-	+	-	-	-	ND	-
2	+	+	-	-	+	-	-	-	ND	-
3	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
4	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
5	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
6	+	+	-	-	NA	NA	NA	+	-	-
7	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	-	S
8	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	-	S
9	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
10	+	NA	NA	NA	+	+	-	+	+	-
11	+	+	+	-	NA	NA	NA	+	+	-
12	+	+	+	-	NA	NA	NA	+	+	-
13	+	+	-	S	+	+	+	+	+	S
14	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	SS
15	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-

Tryps, Presence (+) or absence (-) of trypanosomes in samples processed by the miniature anion-exchange centrifugation technique; CATT, positive or negative result after plasma investigated in a card agglutination test for trypanosomiasis; Signs, clinical signs consistent with the first stage (S) of human African trypanosomiasis (fever, headache, asthenia, cutaneous manifestation and/or presence of swollen lymph nodes, but without neuro-psychiatric disorders) or with the second-stage (SS) of the disease (presence of neuro-psychiatric symptoms such as sleep disturbance, impaired consciousness, unusual behaviour or character, impotence, or motor disorders); ND, not determined; NA, subject not available for follow-up.

any signs indicative of HAT during the follow-up period, although number 5 had had several clinical signs characteristic of the second-stage of the disease (i.e. sleepiness, sexual impotence and behavioural disorders) when first examined in 1995. Numbers 7 and 8, who were only available for the March 1999 follow-up, were then found to have some of the clinical manifestations of HAT. [When first examined, in 1996, number 7 had impaired consciousness, behavioural disorders and trypanosomes in his cerebro-spinal fluid (CSF).]

Although numbers 9–14 were found to be positive for infection, both parasitologically and by the CATT, in March 1999 and whenever checked during the follow-up period, only one of these six subjects, number 14, was

ever seen with a neuro-psychiatric disorder (and then only at the final follow-up).

The final subject to be considered, number 15, was CATT-positive and parasitologically positive in June 1997 and January 1998 but negative, both by the CATT and the mAECT, at the last follow-up in March 1999. During the follow-up period of the present study, this subject was also examined by staff from the Daloa-based Projet de Recherche Contre la Trypanosomiase (PRCT), in November 1998 and January 1999. On both of these occasions, subject 15 was found negative by the CATT and the mAECT and no trypanosomes could be found in CSF samples. Thus this subject was apparently CATT-negative from November 1998 to the end of the present study.

HUMAN TRYPANOSOMIASIS IN CÔTE D'IVOIRE 3217

That 63 trypanosome-infected subjects refused treatment for months or even years is disconcerting. Such subjects may simply have wondered why they needed treatment when they felt well (the first stage of HAT being largely asymptomatic), being unaware of how their infection might develop into lethal disease if left untreated. Fortunately, follow-up visits convinced 29 of these subjects to accept treatment, although sometimes only after neurological disorders had developed (data not shown).

The seroconversion, from CATT-positivity to CATT-negativity, seen among some of the subjects who remained asymptomatic throughout the follow-up period (e.g. numbers 1, 2 and 15), is unusual. Subjects 1 and 2, who were never found trypanosome-positive after first being found infected in 1995–1996, may have had infections with *T. congolense* (Truc *et al.*, 1998) or *T. b. brucei* rather than *T. b. gambiense*. Although *T. congolense* and *T. b. brucei* are human-serum sensitive and probably quickly eliminated, transient infections with these parasites may induce a non-specific immune response and lead to false-positive CATT results because of cross-reactivity (Noireau *et al.*, 1986). However, the slow seroconversion observed in subjects 1 and 2 is inconsistent with a transient infection with a non-human parasite, since such infections are unlikely to maintain CATT positivity for 2 or 3 years.

Trypanosomes isolated from subject 15, who had become CATT-negative by November 1998, were confirmed to be of *T. b. gambiense* group 1 (Gibson, 1986) by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE; Jamonneau *et al.*, 2000). Thus, subjects 1, 2, and 15 were probably infected with *T. b. gambiense* when first examined in 1995–1996, and probably became CATT-negative by March 1999 as the result of clearance of their infections, even though they had not been treated with 'conventional' medicine. These three cases were therefore probably examples of self-cure, although some of the present subjects (3, 5 and 15) were followed-up and probably partially treated by a 'healer'. The efficacy of traditional medicines used to treat

HAT remains unclear and must be investigated.

The present data confirm that HAT is diverse in its clinical evolution, with infections that remain asymptomatic (Gallais *et al.*, 1953; Ginoux and Frezil, 1981) and some apparent cases of self-cure among those that lead into the second-stage of the disease, with chronic or acute neurological disorders. This variation may be associated with genetic variability in the parasites, as observed in Uganda (Smith and Bailey, 1997). However, the genetic variability of trypanosome stocks from Côte d'Ivoire, mostly collected in the Sinfra area, has always appeared to be very low, whether investigated using the repetitive sequences of microsatellite DNA and PCR (Biteau *et al.*, 2000), RAPD or MLEE (Jamonneau *et al.*, 2000). The results of MLEE (Jamonneau *et al.*, 2000) have, in fact, indicated that the parasites infecting subjects 9–15 in the present study belonged to the same zymodeme, and no relationship between zymodeme and pathogenicity in humans has ever been noticed in studies in Côte d'Ivoire.

Is variation in human response to the infection, rather than variation in the parasite, responsible for the diversity in clinical evolution? Ginoux and Frezil (1981) suspected that asymptomatic infection, with low parasitaemia, no swollen lymph nodes and no neurological sign, was the result of human trypanotolerance. Such a phenomenon may explain why subjects 3–8 in the present study remained CATT-positive but apparently aparasitaemic (Kabiri *et al.*, 1999). Although the trypanotolerant individual may remain asymptomatic for several years, the equilibrium may be broken, leading to the sudden appearance of nervous disorders, as observed in other trypanotolerant animals (Murray *et al.*, 1990; Authié, 1994). Variation in individual susceptibility to infection has been already demonstrated for both viral (Michael *et al.*, 1997) and bacterial infections (Altare *et al.*, 1998) and the results of numerous studies indicate that host genetics play a role in susceptibility to infection with some parasites (Marquet *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1999). In mice, genes on chromosomes 5, 11 and 17 of the host are involved in resistance to *T. congolense* (Kemp

3218 JAMONNEAU ET AL.

et al., 1997), and indirect data indicate a similar link in human infection with *T. b. rhodesiense* (Okia et al., 1994). In Central Africa, the trypanolytic activity of sera from Bantus is markedly different to that of sera from Pygmies (Authié et al., 1991). Further investigation is needed to see if ethnicity (and therefore genetics) affects susceptibility to HAT, as it affects susceptibility to leishmaniasis (Alcais et al., 1997).

ACKNOWLEDGEMENTS. We would like to express our sincere thanks to the staff of the Institut Pierre Richet/OCCGE at Bouaké (Côte d'Ivoire) for their excellent technical help. This work was supported by Fonds d'Aide à la Coopération, Ministère français des Affaires Etrangères, Direction du Développement et de la Coopération technique, and the Institut de Recherche pour le Développement.

V. JAMONNEAU

A. GARCIA

Unité de Recherche et de Lutte contre la THA, Institut Pierre Richet, B.P. 1500, Bouaké 01, Côte d'Ivoire, and Département Sociétés et Santé, Institut de Recherche pour le Développement (IRD-ex ORSTOM), 911 Avenue Agropolis, 34032 Montpellier, France

J. L. FREZIL

Département Sociétés et Santé, Institut de Recherche pour le Développement (IRD-ex ORSTOM), 911 Avenue Agropolis, 34032 Montpellier, France

P. N'GUESSAN

L. N'DRI

R. SANON

Unité de Recherche et de Lutte contre la THA, Institut Pierre Richet, B.P. 1500, Bouaké 01, Côte d'Ivoire

C. LAVEISSIÈRE

Département Sociétés et Santé, Institut de Recherche pour le Développement (IRD-ex ORSTOM), 911 Avenue Agropolis, 34032 Montpellier, France, and Laboratoire de Recherche sur les Trypanosomoses, OCEAC, B.P. 288, Yaoundé, Cameroon

P. TRUC*

Département Sociétés et Santé, Institut de Recherche pour le Développement (IRD-ex ORSTOM), 911 Avenue Agropolis, 34032 Montpellier, France, and Laboratoire de Recherches et de Coopération sur les Trypanosomoses (LRCT), CIRAD/IRD, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Received 28 July 2000,

Revised 12 September 2000,

Accepted 14 September 2000

* Author to whom correspondence should be addressed. Address for correspondence: Laboratoire de Recherches et de Coopération sur les Trypanosomoses (LRCT), CIRAD/IRD, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France. E-mail: truc@mpl.ird.fr; fax: +33 4 67 59 39 20.

REFERENCES

- AERTS, D., TRUC, P., PENCHENIER, L. CIAES, Y. & LE RAY, D. (1992). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86, 394-395.
- ALCAIS, A., ABEL, L., DAVID, C., TORREZ, M. E., FLANDRE, P. & DEDET, J. P. (1997). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57, 79-84.
- ALTARE, F., JOUANGUY, E., LAMHAMED, S., DOFFINGER, R., FISCHER, A. & CASANOVA, J. L. (1998). *Current Opinion in Immunology*, 10, 413-417.
- AUTHIÉ, E. (1994). *Parasitology Today*, 10, 360-364.
- AUTHIÉ, E., CUISANCE, D., FORCE-BARGE, P., FREZIL, J. L., GOUTEUX, J. P., JANNIN, J., LANCIEN, J.,

HUMAN TRYPANOSOMIASIS IN CÔTE D'IVOIRE 3219

- LAVEISSIÈRE, C., LEMESRE, J. L., MATHIEU-DAUDÉ, F., NITCHEMAN, S., NOIREAU, F., PENCHENIER, L., TIBAYRENC, M. & TRUC, P. (1991). *Research and Reviews in Parasitology*, 51, 29-46.
- BITEAU, N., BRENGAUD, F., GIBSON, W. C., TRUC, P. & BALTZ, T. (2000). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 105, 185-201.
- DUMAS, M. & BOUTEILLE, B. (1996). *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales*, 190, 395-408.
- GALLAIS, P., CROS, R. & ARQUIÉ, E. (1953). *Médecine Tropicale*, 13, 844-856.
- GARCIA, A., ABEL, L., COT, M., RICHARD, P., RANQUE, S., FEINGOLD, J., DEMENAI, F., BOUSSINESQ, M. & CHIPPAUX, J. P. (1999). *Tropical Medicine and International Health*, 8, 565-574.
- GIBSON, W. C. (1986). *Parasitology Today*, 2, 255-257.
- GINOUX, P. Y. & FRÉZIL, J. L. (1981). *Cahiers O.R.S.T.O.M, Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, 19, 33-40.
- JAMONNEAU, V., N'GUESSAN, P., N'DRI, L., SIMARRO, P. & TRUC, P. (2000). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 94, 000-000.
- JANNIN, J., MOULIA-PELAT, J. P., CHANFREAU, B., PENCHENIER, L., LOUIS, J. P., NZABA, P., ELFASSI DE LA BAUME, F., EOZENOU, P. & CATTAND, P. (1993). *Bulletin of the World Health Organization*, 71, 215-222.
- KABIRI, M., FRANCO, J. R., SIMARRO, P. P., RUIZ, J. A., SARSA, M. & STEVERDING, D. (1999). *Tropical Medicine and International Health*, 10, 658-661.
- KEMP, S. J., IRAQI, F., DARVASI, A., SOLLER, M. & TEALE, A. J. (1997). *Nature Genetics*, 16, 194-196.
- LAPEYSSONNIE, L. (1960). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 57, 28-32.
- LUMSDEN, W. H. R., KLIMBER, C. D. & STRANGE, M. (1977). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71, 421-424.
- MAGNUS, E., VERVOORT, T. & VAN MEIRVENNE, N. (1978). *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 59, 169-176.
- MARQUET, S., ABEL, L., HILLAIRE, D., DESSEIN, H., KALIL, J., FEINGOLD, J., WEISSEBACH, J. & DESSEIN, A. J. (1996). *Nature Genetics*, 14, 181-184.
- MICHAEL, N. L., CHANG, G., LESLIE, G. L., MASCOLA, J. R., DONDERO, D., BIRX, D. L. & SHEPPARD, H. W. (1997). *Nature Medicine*, 3, 338-340.
- MURRAY, M., TRAIL, J. C. M. & D'ETEREN, G. D. M. (1990). *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 9, 369-386.
- NOIREAU, F., GOUTEUX, J. P. & FRÉZIL, J. L. (1986). *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 66, 63-68.
- OKIA, M., MBULAMBERI, D. B. & DE MLYNCK, A. (1994). *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 74, 105-112.
- SMITH, D. H. & BAILEY, J. W. (1997). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91, 851-856.
- TRUC, P., FORMENTY, P., DIALLO, P. B., KOMOIN-OKA, C. & LAUGINIE, F. (1997). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91, 951-956.
- TRUC, P., JAMONNEAU, V., N'GUESSAN, P., N'DRI, L., DIALLO, P. B. & CUNY, G. (1998). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92, 537-538.
- WERY, M. & BURKE, J. (1972). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 66, 332-333.
- WOODRUFF, A. W., EVANS, D. A. & OWINO, N. O. (1982). *Journal of Infection*, 5, 89-92.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1998). *Control and Surveillance of African Trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee*. Technical Report Series No. 881. Geneva: WHO.

ANNEXE 15

Liste des publications scientifiques de l'auteur

Truc P., **Jamonneau V.**, N'Guessan P., Diallo P.B. & Garcia A. (1998). Parasitological diagnosis of human African trypanosomiasis: a comparison of the QBC® and the miniature anion-exchange centrifugation technique. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **92**, 288-289.

Truc P., **Jamonneau V.**, N'Guessan P., Diallo P.B. & Bustigier X. (1998). Simplification of the mini-anion exchange technique for the parasitological diagnosis of Human African Trypanosomiasis, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **92**, 512.

Truc P., **Jamonneau V.**, N'Guessan P., N'Dri L., Diallo P. B. & Cuny G. (1998). A mixed infection in man with *Trypanosoma brucei* spp. and *Trypanosoma congolense* in Côte d'Ivoire: a case report, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **92**, 537-538.

Truc P., **Jamonneau V.**, Cuny G. & Frezil J.L (1999). Polymerase Chain Reaction in Human African Trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bulletin OMS*, **77**, 745-748.

Jamonneau V., Truc P., Garcia A., Magnus E. & Büscher P. (2000). Preliminary evaluation of LATEX/T.b.gambiense and alternative versions of CATT/T.b.gambiense for the serodiagnosis of Human African Trypanosomiasis of a population at risk in Côte d'Ivoire: considerations for mass-screening. *Acta Tropica*, **76**, 175-183.

Jamonneau V., Garcia A., N'Guessan P., N'Dri L., Sanon R., Laveissière C. Frezil J.L. & Truc P.. Clinical and biological evolution of Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, sous presse.

Jamonneau V., N'Guessan P., N'Dri L., Simaro P. & Truc P.. Exploration of the distribution of *Trypanosoma brucei* ssp. in West Africa, by multilocus enzyme electrophoresis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, sous presse.

Garcia A., **Jamonneau V.**, Magnus E., Laveissière C., Lejon V., N'Guessan P., N'Dri L., Van Meirvenne N. & Büscher P.. Longitudinal survey of positive Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) but apparently aparasitemic individuals in Côte d'Ivoire: evidence for complex and heterogeneous population. *Tropical Medicine and International Health*, sous presse

Garcia A., **Jamonneau V.**, Sane B., Fournet F., N'Guessan P., N'Dri L., Sanon R., Kaba D. & Laveissière C.. Host age and time of exposure as risk factors in *Trypanosoma brucei gambiense* in Human African Trypanosomiasis. Soumis pour publication

Résumé

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) est une affection parasitaire due à un protozoaire de l'espèce *Trypanosoma brucei*. La complexité de l'évolution clinique de la maladie est fréquemment évoquée. Lors de cette étude en Côte d'Ivoire, l'origine de cette complexité a été recherchée à la fois chez le parasite par l'étude de la diversité génétique au sein de *Trypanosoma brucei* ssp., et chez l'hôte chez lequel une susceptibilité individuelle à l'infection est suspectée. Deux enquêtes ont été nécessaires pour mener à bien ces recherches, la première consistant à étudier l'existence d'associations entre la diversité génétique des trypanosomes et la diversité des formes cliniques qu'ils occasionnent, et la deuxième consistant en un suivi à long terme de sujets refusant le traitement. Les techniques de caractérisation des trypanosomes ont mis en évidence un important monomorphisme génétique au sein des souches circulant en Côte d'Ivoire alors que l'étude clinique a confirmé une grande diversité de tableaux et d'évolutions cliniques. Cependant, les taux d'isolement observés ont été particulièrement faibles, pouvant entraîner un biais dans notre échantillonnage de parasites, mais quoiqu'il en soit, l'existence d'une susceptibilité individuelle à l'infection semble devoir être prise en considération et devra être étudiée par des travaux complémentaires.

Genetic characterization of *Trypanosoma brucei* ssp. and clinical évolution of Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire

Summary

Human African Trypanosomiasis is a parasitic infection caused by protozoa belonging to *Trypanosoma brucei* ssp. The complexity of the clinical evolution of this disease is frequently mentioned. This complexity might be due to : - the parasite, since a genetic diversity is known in *Trypanosoma brucei* ssp., - or to the suspected individual susceptibility to infection. These two aspects were developed in two studies carried out in Côte d'Ivoire. In the first one, correlations between the genetic diversity of trypanosomes and the diversity of clinical patterns were investigated, and in the second one, a long term follow-up of patients refusing treatment was performed. An important genetic monomorphism among stocks isolated in Côte d'Ivoire was shown thanks to the identification techniques of trypanosomes. In the same time, the diversity of clinical patterns and evolutions was confirmed by the clinical analysis. The existence of an individual susceptibility to infection must be taken into account even if our genetic conclusions might be distorted because the observed isolation rates were particularly poor.

Mots clés : *Trypanosoma brucei*, isoenzymes, RAPD, susceptibilité individuelle, Côte d'Ivoire