

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

présentée pour obtenir le Diplôme de DOCTORAT
Spécialité: PHYSIOLOGIE, BIOLOGIE DES ORGANISMES ET DES POPULATIONS

APPORT DE LA GENETIQUE DES POPULATIONS A LA
TAXONOMIE DE *TRYPANOSOMA BRUCEI* ET A
L'EPIDEMIOLOGIE DE LA TRYpanosomiase HUMAINE
EN AFRIQUE CENTRALE

par

Philippe Truc

Soutenue le 4 avril 1991 devant le jury composé de:

MM	G. BOUIX	Président
	L. EUZET	
	J. A. RIOUX	
Mme	M. L. CARIOU	Rapporteur
MM	J. L. FREZIL	Rapporteur
	M. TIBAYRENC	

A LA MEMOIRE DE MON FRERE MICHEL

SOMMAIRE

- REMERCIEMENTS	5
- INTRODUCTION	8
- GENERALITES. RAPPELS	
1) <u>Biologie du parasite</u>	
1-1 Classification, morphologie et cycle évolutif	
1-1-1 Classification basée sur les caractères extrinséques du parasite	9
1-1-2 Morphologie et cycle évolutif	12
1-2 Pathogénicité de <i>T. brucei</i> chez l'homme	
1-2-1 La maladie du sommeil: cycle parasitaire et aspects cliniques	14
1-2-2 Epidémiologie de la maladie du sommeil au Congo, au Zaïre et au Cameroun	15
2) <u>Structure du génome et mode de reproduction du parasite</u>	
2-1 Structure du génome de <i>T. brucei</i>	20
2-2 Mode de reproduction	21
3) <u>Apport de l'étude des caractères intrinséques du parasite à la classification et à l'étude de l'épidémiologie de la T.H.A.</u>	
3-1 A propos de la classification	21
3-2 Apport de l'isoenzymologie à l'étude de l'épidémiologie de la T.H.A.	23
3-3 Comparaison des résultats isoenzymatiques avec le RFLP	24
- MATERIELS ET METHODES	
1) <u>Stocks de trypanosomes</u>	
1-1 Méthodes d'isolation	
1-1-1 Protocole de dépistage des malades	25
1-1-2 Recherche des infections chez le bétail domestique	26
1-1-3 Inoculation des parasites à des rongeurs	27
1-1-4 Isolement "in vitro" de trypanosomes: trousse KIVI	27
1-2 Cultures de masse	
1-2-1 Sur rat Whistar	28
1-2-2 A partir de l'isolation sur trousse KIVI	32
1-3 Cryopréservation des stocks	
1-3-1 Cas des formes sanguicoles	32
1-3-2 Cas des formes procycliques	32

1-4 Stocks étudiés	33
<u>2) Electrophorèse en acétate de cellulose</u>	
2-1 Principe de l'électrophorèse	38
2-2 Electrophorèse d'isoenzymes	38
2-3 Méthode	
2-3-1 Préparation des extraits enzymatiques	39
2-3-2 Protocole électrophorétique	40
2-4 Interprétation des résultats	
2-4-1 Relations phénétiques et phylogénétiques	40
2-4-2 A propos du mode de reproduction	45
<u>3) Analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP) de l'ADN kinétoplastique (ADNk)</u>	
3-1 Principe	46
3-2 Protocole	47
- RESULTATS ET DISCUSSION	
<u>1) Electrophorèse d'isoenzymes</u>	
1-1 Zymogrammes et interprétations	
1-1-1 Zymogrammes interprétés en terme allélique	49
1-1-2 Zymogrammes interprétés phénotypiquement	49
1-2 Zymodèmes individualisés, variabilité génétique et phénétique	50
1-3 Représentations graphiques des relations entre zymodèmes	54
1-4 Comparaisons des différentes représentations graphiques	60
<u>2) Etude du polymorphisme des fragments de restriction de l'ADNk (RFLP)</u>	
2-1 Profils de restriction	61
2-2 Comparaison entre schizodèmes et zymodèmes par paires de stocks	62
<u>3) Analyses des tests impliqués dans le mode de reproduction des trypanosomes</u>	
3-1 Tests de ségrégation (à un locus donné)	62
3-2 Tests de recombinaison (entre loci)	67

3-3 Conclusions taxonomiques et terminologiques à propos du mode de reproduction des trypanosomes dans notre échantillonnage	71
---	-----------

4) Répartition géographique des zymodèmes et corollaires épidémiologiques

4-1 Cas général	71
4-2 Cas du zymodème 7: notion de microfoyer de T.H.A. au Congo	75
4-3 A propos des autres foyers de T.H.A. au Congo	76
4-4 Cas du Zaïre	77
4-5 Cas du Cameroun	79
 - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	80
 - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	83

- ANNEXES

1 L'œdème facial ou "faciès lunaire".	96
2 Galeries forestières en communication dans le région de la Bouenza (Congo).	97
3 Lieu principal de contamination.	98
4 Test sérologique Testryp CATT.	99
5 Prélèvement de sang chez le porc et chez le mouton.	100
6 Trousse d'isolement KIVI.	101
7 Principe de la colonne de DEAE cellulose.	102
8 Code O.M.S. des stocks étudiés.	103
9 Noms et codifications des systèmes enzymatiques étudiés.	104
10 Liste des abréviations des produits chimiques.	105
11 Protocole d'extraction de l'ADN kinétoplastique (ADNk).	106/107
12 Publication acceptée dans Acta Tropica (mars 1991).	108/116
13 Exemple de zymogramme obtenu pour la glutathion réductase (GSR).	117
14 Exemple de zymogramme obtenu pour l'enzyme malique (ME).	118
15 Exemple de zymogramme obtenu pour l'enzyme alanine amino-transférase (ALAT).	119
16 Exemple de zymogramme obtenu pour l'enzyme isocitrate déshydrogénase (IDH).	120
17 Exemple de zymogramme obtenu pour l'enzyme nucléoside hydrolase (NH).	121
18 Exemple de zymogramme obtenu pour l'enzyme phosphoglucomutase (PGM).	122
19 Exemple de zymogramme obtenu pour l'enzyme aspartate aminotransférase (GOT).	123
20 Exemple de zymogramme obtenu pour l'enzyme peptidase II (PEP II).	124
21 Matrice des distances génétiques standart de Nei.	125

22	Matrice des distances phénétiques de Jacquard.	126
23	Corrélation entre distances génétiques calculées et mesurées sur le dendrogramme. Corrélation entre distances de Jacquard calculées et mesurées sur le dendrogramme.	127
24	Corrélation entre distances pratistiques et distances génétiques de Nei. Corrélation entre distances génétiques et distances phénétiques.	128
25	Corrélation entre distances de Jacquard et distances pratistiques.	129
26	Exemple de profil de restriction obtenu pour l'enzyme <i>HIND III</i> .	130
27	Exemple de profil de restriction obtenu pour l'enzyme <i>ECO RI</i> .	131

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier en premier lieu les membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger le présent travail. Ensuite, nous remercions tous les chercheurs et techniciens de l'ORSTOM sans lesquels nous n'aurions pu préparer cette thèse, tant à Montpellier (France) qu'à Brazzaville (République Populaire du Congo). Nous nommerons:

- mon maître et directeur de thèse, Michel Tibayrenc. Son travail sur l'agent de la maladie de Chagas, a lancé ce pur théoricien sur la voie, souvent impénétrable, de la théorie clonale des Protozoaires parasites. Son vif intérêt pour les applications de la génétique des populations à l'étude de l'épidémiologie de la maladie du sommeil, n'a d'égal que sa grande patience à notre égard, patience dont il a su faire preuve, sans désserer les dents, tout au long de cette thèse. Grâce à ses efforts acharnés et à son entêtement légendaire, nous avons acquis quelques rudiments de génétique des populations dont le présent travail est le témoin. C'est aussi en partie grâce aux compétences acquises dans son laboratoire, et sans doute à sa renommée internationale, que nous avons été recruté au sein du Tsetse Research Laboratory (Bristol, U.K.) dirigé par David Godfrey, initiateur de la notion de "zymodème" et spécialiste mondial en matière de trypanosomiase humaine. Qu'il trouve ici le témoignage de mon éternelle reconnaissance, et mes remerciements les plus sincères, en espérant que, pour son premier "thèsard", "l'accouchement" se fera sans douleur. Nous souhaitons aussi, à l'avenir, pouvoir entamer ensemble une longue collaboration scientifique européenne. Celle-ci, nous l'espérons, alliera plusieurs laboratoires, dans le cadre d'un grand programme multidisciplinaire, confirmant ainsi notre désir commun d'apporter des solutions aux nombreux problèmes qui restent encore posés en matière de trypanosomiase, en particulier en Afrique Centrale.

- Jean Louis Frézil: Directeur de recherche, Chef de L'U.R. "Trypanosomiases et Leishmanioses" et épidémiologiste fervent, dont le travail de longue haleine et d'une rare qualité sur le territoire congolais, nous a permis d'entamer la présente étude sur de solides bases épidémiologiques. Son plus vif intérêt pour notre travail et son aide précieuse dans la rédaction du manuscript nous ont considérablement aidé. Qu'il en soit ici infiniment remercié.

- Françoise Mathieu-Daudé : étudiante courageuse, avec laquelle nous avons beaucoup collaboré tout au long de notre thèse, nous appuyant souvent sur ses grandes compétences techniques. Seconde

"thésarde" de Michel, son travail de qualité aura, de façon certaine, tout l'impact qu'il mérite. Nous remercions très chaleureusement la collaboratrice, mais aussi la ravissante amie, pour l'aide et la patience dont elle a fait preuve à notre égard tout au long de cette thèse.

- François Noireau: seconde preuve vivante d'une possible compatibilité entre formation médicale et recherche de pointe sur le terrain et en laboratoire. Sa grande expérience en matière de trypanosomiase au Congo, ainsi que son attachement aux valeurs humaines de base, ont guidé nos premiers pas en Afrique, tant durant les missions que dans la vie quotidienne. Nous regrettons vivement, bien que celui-ci soit indiscutable, notre désaccord à propos des fameuses souches FY et LIICL2. Qu'il trouve ici l'expression de nos plus plates excuses, nos remerciements les plus sincères ainsi que le témoignage de notre amitié.
- toute l'équipe du Laboratoire de Génétique des Parasites et des Vecteurs de Montpellier: Frédérique Brénières-Campana, Marie-France Bosséno, Souha Ben Abderazak, Françoise Guerrini et Bruno Oury. Nous les remercions pour leur aide précieuse, tout particulièrement Frédérique, dont les grandes compétences en matière de biologie moléculaire nous ont été très utiles. Nous les regretterons toutes et tous beaucoup.
- Jacques Brengues: directeur de recherche et ancien Chef du Département Santé. Nous tenons à le remercier personnellement pour son aide sans laquelle tant notre travail de thèse en général que notre séjour au Congo en particulier, n'auraient été possible.
- toute l'équipe du laboratoire d'Entomologie Médicale et Parasitologie de Brazzaville, dont le dévouement doublé d'une grande compétence scientifique nous a permis, sur le terrain et au laboratoire, d'effectuer dans d'excellentes conditions notre travail. Un grand merci à : Marie Thérèse Louembet, Mme Akoundou, Félix Samba, Dominique Sinda, Albert Zoulani, Raphaël N'Kodia et Albert Malonga.

Nous tenons à rendre un hommage tout particulier à :

Monsieur Le Professeur Louis Euzet (U.S.T.L. Montpellier), pour nous avoir appris les premiers mots de la Parasitologie générale. Sa grande compétence scientifique, mais aussi sa bonté et son sourire resteront à jamais présents dans notre mémoire.

Monsieur le Professeur Jean-Antoine Rioux (Faculté de Médecine, Montpellier), qui nous a ouvert la voie souvent difficile de la recherche scientifique, en nous acceptant au sein de son laboratoire durant notre Diplôme d'Etudes Approfondies. Eminent spécialiste en matière d'Ecologie Parasitaire et d'Isoenzymologie appliquée, ses travaux en matière de taxonomie et de phylogénie des Protozoaires du genre *Leishmania* font notre admiration depuis toujours, doublée de notre plus grand respect.

Nous remercions ensuite les personnalités scientifiques françaises ou étrangères qui ont contribués à l'aboutissement de notre travail:

- le Dr Peter Dukes (Tsetse Research Laboratory, Langford House, Langford, Bristol, U. K.): pour son travail sur quelques uns de nos stocks congolais.
- les Professeurs Dominique Le Ray et Pasteur Kageruka (Institut de Médecine Tropicale d'Anvers, Belgique). Pour leurs judicieux conseils, et leurs aides techniques (stocks de références, trousse Kivi).
- le Dr Jean Jannin, Chef du Secteur "Trypanosomiase" du Ministère de la Santé congolais, et toute son excellente équipe de terrain (Stéphane N'gampo, Louya et tant d'autres).
- le Professeur David Godfrey (Tsetse Research Laboratory), pour son aide technique (stocks de référence), en le remerciant particulièrement pour notre recrutement au sein de son équipe.

Sans oublier Etienne Serres, dont les grandes connaissances en matière de classification numérique nous ont beaucoup aidé.

A tous un grand merci.

INTRODUCTION

Parmi les Protozoaires parasites, les trypanosomes du groupe *Trypanosoma brucei* Plummer et Bradford, 1899, sont pathogènes chez l'Homme et l'animal, sans qu'on puisse distinguer les souches zoophiles des anthropophiles par la morphologie. Seuls les caractères extrinsèques tels que le pouvoir pathogène, la spécificité d'hôte ou la distribution géographique, ont permis de regrouper ces trypanosomes en "sous-espèces": *Trypanosoma brucei gambiense* Dutton, 1902, *Trypanosoma brucei rhodesiense* Stephens et Fantham, 1910, et *Trypanosoma brucei brucei* Plummer et Bradford, 1899.

Récemment, l'étude de caractères intrinsèques du parasite, basée sur l'emploi de certains marqueurs génétiques (isoenzymes, polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN kinétoplastique, sondes d'ADN génomiques), a remis en question la classification subspécifique, et renouvelé nos connaissances sur le mode de reproduction de ces trypanosomes. Certains résultats sont en faveur d'un mode de reproduction sexuée, alors que d'autres confirment la notion classique d'un système de propagation uniparental.

Les "sous-espèces" *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* sont considérées comme responsables d'un véritable fléau qui ne sévit qu'en Afrique : la maladie du sommeil ou Trypanosomiase Humaine Africaine (T.H.A.). En Afrique Centrale, cette maladie, décrite depuis 1885, dont l'agent pathogène appartient classiquement à la sous-espèce *T. b. gambiense*, persiste à ce jour à l'état endémico-épidémique dans de nombreux foyers.

Le but de ce travail est d'évaluer l'apport possible de la génétique des populations à la compréhension de certains paramètres épidémiologiques. Les implications épidémiologiques de cette approche, comme l'évaluation du rôle d'un réservoir animal dans le cycle de la T.H.A. à *T. b. gambiense*, la délimitation des foyers historiques et la circulation interfocale des stocks de *T. brucei* seront discutées, en particulier au Congo. Une telle approche permettra de formuler des hypothèses quant à l'apparition, la propagation et la persistance de la maladie du sommeil en République Populaire du Congo.

GENERALITES. RAPPELS

1) Biologie du parasite

Les Trypanosomiases africaines ont pour agent responsable un Protozoaire Flagellé sanguicole parasitant l'homme et l'animal, qui a été identifié par DUTTON dès 1902, *Trypanosoma brucei*. La répartition de l'insecte vecteur, la glossine ou mouche "tsétsé", présent exclusivement en Afrique du 14ème degré de latitude Nord au 25ème degré de latitude Sud, conditionne la répartition de ces parasitoses.

1-1 Classification, morphologie et cycle évolutif

1-1-1 Classification basée sur les caractères extrinsèques du parasite

Les trypanosomes sont des Protozoaires de la classe des *Zoomastigophora* Calkins 1909, de l'ordre des *Kinetoplastida* Hönigberg, 1963, emend. Vickerman 1976, de la famille des *Trypanosomatidae* Döflein, 1901, du genre *Trypanosoma* Grüby, 1843.

Hoare (1972) a établi une classification des *Trypanosomatidae* de Mammifères, d'après leur mode de transmission de l'invertébré vecteur au vertébré, classification revue par Levine et al., 1980 (figure 1). Il distingue deux groupes:

— Chez les STERCORARIA, l'infestation se fait par ingestion d'un invertébré ou de ses déjections, ou par pénétration des formes infestantes contenues dans ces dernières à travers la peau ou les muqueuses. Ce groupe, caractérisé par le mode de transmission POSTEROGRADE (formes métacycliques infestantes localisées dans la partie postérieure du tube digestif), comprend trois sous-genres: *Megatrypanum*, *Herpetosoma* et *Schizotrypanum*.

— Chez les SALIVARIA (= à transmission ANTEROGRADE: formes infestantes dans la partie antérieure du tube digestif), la piqûre par le vecteur est responsable d'une inoculation transcutanée (salive). Ce mode de transmission se rencontre dans 5 sous-genres, qui sont *Duttonella*, *Nannomonas*, *Tejeraia*, *Pycnomonas* et *Trypanozoon*.

Le sous-genre *Trypanozoon* regroupe trois espèces, *Trypanosoma evansi*, *T. equiperdum* et *T. brucei*. Cette dernière est elle même subdivisée en trois "sous-espèces" d'après Hoare (1972) :

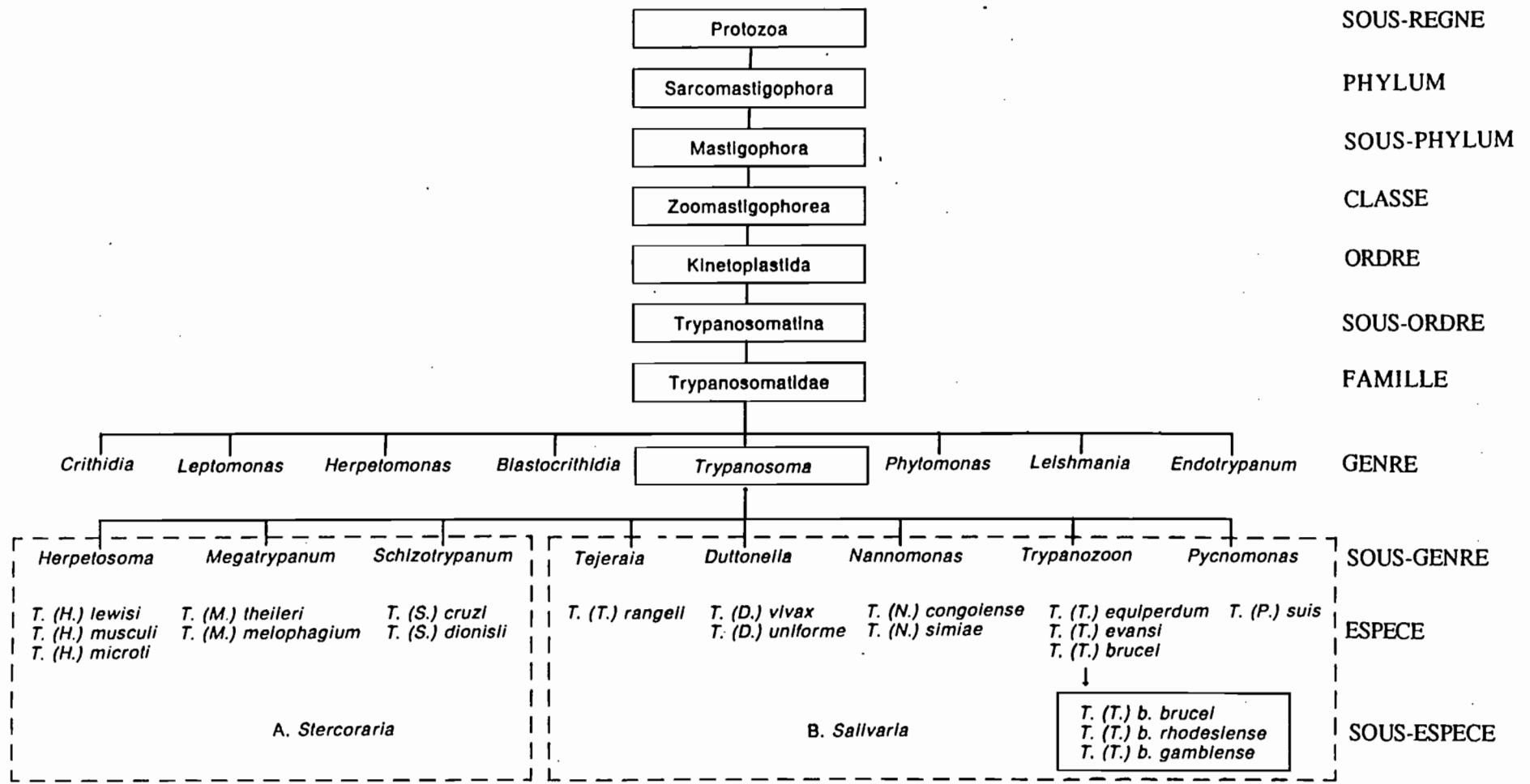


Figure 1: Classification des trypanosomes de Mammifères (d'après Hoare, 1972, revue par Levine et al., 1980). Anez, 1982, crée un nouveau sous-genre *Tejeraia*, retire *T. rangeli* du sous-genre *Herpetosoma* et place *Tejeraia* dans la section *Salivaria*. Document W.H.O., 1986.

- *T. b. brucei* : agent pathogène responsable de la "Nagana" (déformation de Ngana = maladie en Zoulou) chez l'animal, mais non pathogène chez l'homme. Cette maladie provoque des ravages dans les troupeaux domestiques, et représente ainsi un grave handicap économique.
- *T. b. gambiense* : agent pathogène parasite de l'homme, responsable de la maladie du sommeil en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale, d'évolution chronique. Cette affection est classiquement transmise par une glossine du groupe *Glossina palpalis*, dont l'habitat est essentiellement la végétation dense des galeries forestières bordant les rivières (glossine ripicole).
- *T.b. rhodesiense* : responsable de la maladie du sommeil en Afrique de l'Est, d'évolution aiguë. Cette sous-espèce, pour laquelle on incrimine un réservoir animal sauvage, est transmise par des mouches du groupe *G. morsitans*, qui vivent dans des régions de savanes (glossine savanicoile).

Les biologistes se sont efforcés de trouver d'autres critères de distinction. Par exemple, les formes nucléo-postérieures, rares chez *T.b. gambiense*, seraient plus fréquentes chez *T.b. rhodesiense*, permettant ainsi de distinguer les deux sous-espèces. Cette hypothèse est très controversée (Kleine, 1928, Wijers, 1960). La plus forte virulence chez le rongeur de laboratoire de *T.b. rhodesiense* a été également mis en doute (Lester, 1933). Par ailleurs, *T.b. rhodesiense* a été longtemps considéré d'abord comme l'agent d'une zoonose non pathogène chez l'animal sauvage, pouvant parfois infecter l'homme (alors considéré comme hôte accidentel). Afin de distinguer *T.b. rhodesiense* de *T.b. brucei*, des inoculations expérimentales ont été faites à des volontaires, et la sensibilité des souches au sérum humain a été testée (Rickman et Robson, 1970, Van Merveinne et al., 1976, Hawking, 1976).

La classification subspécifique ainsi établie est sujette à caution, car trop dépendante de l'environnement du parasite, d'où la nécessité de considérer les caractères intrinsèques de celui-ci (voir plus loin).

1-1-2 Morphologie et cycle évolutif

a) Caractères morphologiques

Les trypanosomes africains ont une forme allongée fusiforme, et mesurent de 10 à 40 µm de long sur 2 à 3 µm de large. Comme tous les kinétoplasmidés, ils possèdent, outre les constituants cellulaires classiques (noyau, cytoplasme), un organite spécifique, le kinéoplaste, dont la fonction est analogue à celle des mitochondries. L'existence d'un flagelle plus ou moins développé délimite avec le périplasme une membrane ondulante, qui permet de distinguer plusieurs stades de différenciation du parasite, tant chez l'insecte vecteur que chez l'hôte définitif (figure 2 d'après Vickerman et al., 1969). Ces stades permettent de distinguer des phases successives dans le cycle évolutif.

b) Cycle évolutif

Chez l'hôte définitif

Inoculés par piqûre chez le vertébré, les parasites se multiplient d'abord localement dans le collagène dermique. Les trypanosomes passent ensuite dans la circulation générale par voie sanguine ou lymphatique avec séjour plus ou moins prolongé dans les nœuds lymphatiques, où ils se multiplient. Ils ont acquis, depuis le stade métacyclique infectant dans les glandes salivaires de la glossine, la propriété de changer leur couverture antigénique avec une grande facilité, échappant ainsi aux réponses immunitaires de l'homme ou de l'animal (variation antigénique).

Les trypanosomes sanguicoles "trypomastigotes" se présentent sous différents aspects morphologiques:

- Une forme grêle, ou allongée (type "slender"), avec présence d'un flagelle libre délimitant, avec le périplasme, une membrane ondulante. Ces formes se multiplient activement, et sont très pathogènes.

- Une forme trapue, ou courte et massive (type "stumpy"), sans flagelle libre, caractérisée par un tube mitochondrial développé et très actif: ces formes massives ne se divisent plus chez l'hôte définitif et représentent un stade de "préadaptation" à l'hôte intermédiaire. Elles sont en effet les seules à pouvoir se développer chez l'insecte vecteur, qui se contaminera lors d'un repas sanguin par piqûre d'un mammifère infecté.

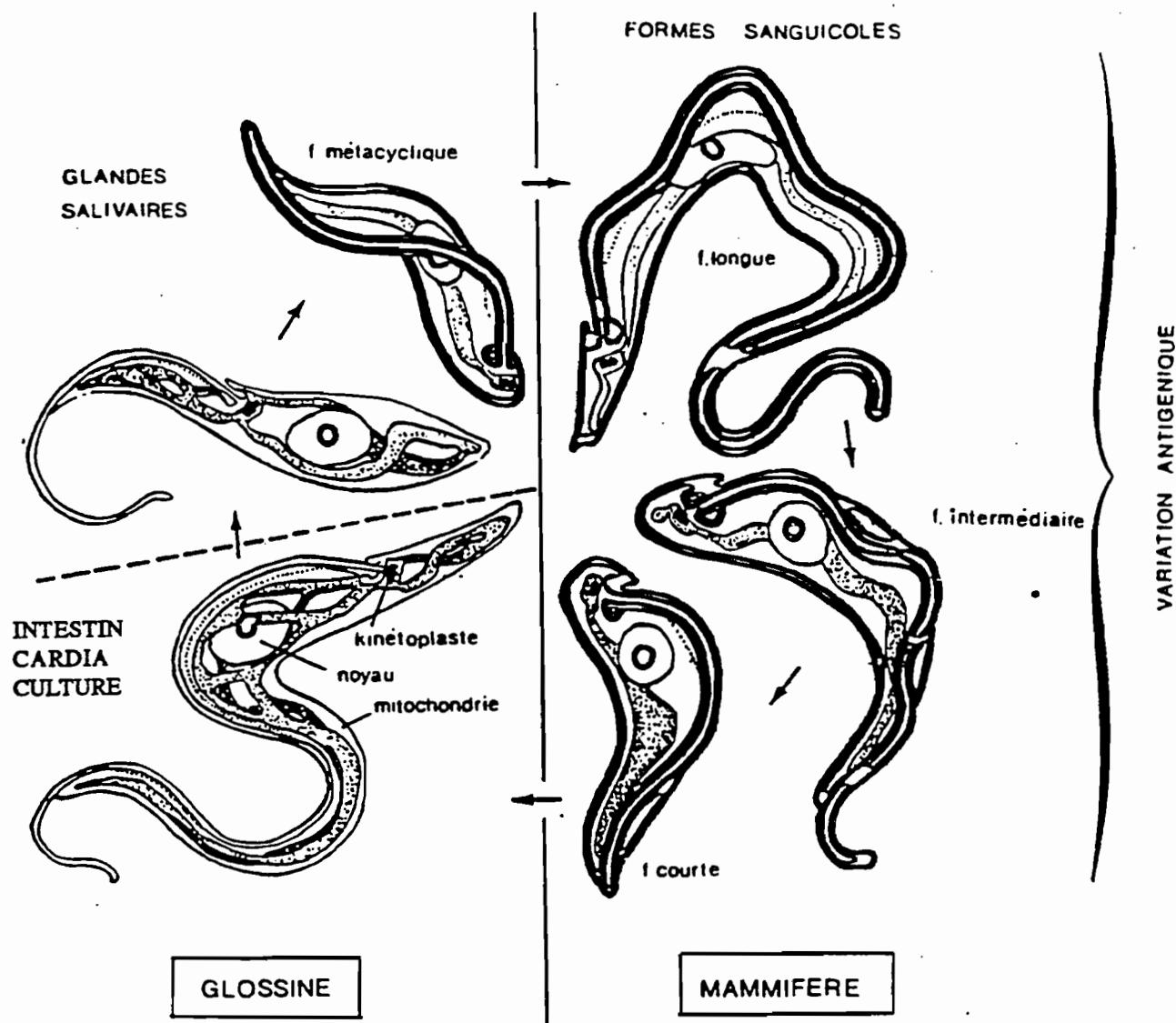


Figure 2: Cycle évolutif de *Trypanosoma brucei* (Vickerman et al., 1969). La membrane cellulaire en trait épais indique qu'à partir du stade métacyclique infestant dans les glandes salivaires de la glossine, puis chez l'homme ou l'animal, le trypanosome peut changer sa "couverture antigénique", échappant ainsi aux défenses immunitaires de son hôte (variation antigénique).

- Des formes intermédiaires, enfin, représentatives de l'évolution des formes élancées vers les formes courtes.

Chez l'insecte vecteur

Selon l'espèce parasitaire considérée, l'évolution chez l'insecte vecteur peut être différente mais elle est toujours pour *T. brucei*, initiée par des formes "procycliques". Ce sont des formes trypomastigotes qui se multiplient et évoluent pour atteindre progressivement le tube digestif antérieur de l'insecte, puis les glandes salivaires, respectivement sous forme épimastigote, puis trypomastigote. Les parasites sont alors à l'état métacyclique infestant. Ce cycle dure 15 à 35 jours, puis la glossine restera infectante durant toute sa vie.

1-2 Pathogénicité de *T. brucei* chez l'homme

1-2-1 La Maladie du Sommeil: cycle parasitaire et aspects cliniques

Après inoculation par la glossine, les trypanosomes vont se multiplier dans le sang pendant une période plus ou moins longue, de quelques mois à plus de deux ans. Ils circulent également dans les canaux lymphatiques, envahissent les ganglions et provoquent leur hypertrophie. Cette phase lymphatico-sanguine, ou "première période" est difficile à diagnostiquer: en effet, la plupart des signes cliniques durant celle-ci peuvent être imputés à d'autres parasitoses tropicales (paludisme, filariose par exemple). Les signes les plus fréquents sont : les céphalées, le prurit, la fièvre, l'hypertrophie des ganglions en particulier à la base du cou, l'amaigrissement, les troubles cardiaques et endocriniens. Notons la possibilité d'œdème facial dit "faciès lunaire" (annexe 1), caractéristique, qui intervient généralement à un stade avancé de la première période.

La seconde période est provoquée par le passage des trypanosomes à travers la barrière méningée. A ce stade, des troubles généraux du système nerveux se manifestent: hyperréflexivité, hyperesthésie profonde, paresthésie, convulsions, troubles mentaux, insomnie/somnolence. L'évolution se fait alors vers un coma, puis la mort.

a) Aspects spécifiques observés en Afrique Centrale

Durant la première période, la parasitémie dans le sang est très variable, et si généralement on peut y détecter les trypanosomes,

ils peuvent aussi être absents pendant des mois. Le paucisymptomatisme, voire l'asymptomatisme sont fréquents en Afrique Centrale (Frézil et Ginoux, 1980, Ginoux et Frézil, 1980). C'est un paramètre important dans la compréhension de l'épidémiologie de la maladie dans cette aire géographique. En effet, s'il ne se sent pas malade, le trypanosomé "asymptomatique" est un réservoir potentiel de trypanosomes, mettant en danger la communauté qui l'entoure.

b) Cas du réservoir animal

Dans les années 1940, dans l'ancien Congo Belge (actuellement Zaïre), Van Hoof et coll. ont démontré que des trypanosomes de la sous-espèce *T.b. gambiense*, prélevés sur l'homme, peuvent être transmis cycliquement à des chèvres, des chiens et des porcs, que l'infectiosité de l'agent pathogène ne disparaissait qu'au bout de 20 passages cycliques, et qu'à la suite des passages mouches-porcs, l'infectiosité pour l'homme des trypanosomes présents chez le porc se maintenait pendant au moins 18 mois (Van Hoff, 1947, Van Hoff et al., 1942). Toutes les infections d'animaux montraient en général des parasitémies faibles de durée variable, sans apparition de symptômes cliniques.

Depuis, les travaux entrepris en Afrique Centrale ont été rares, et font état chez les animaux domestiques de la présence de *T. brucei* (souvent associé à des trypanosomes de l'espèce *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*), sans manifestation clinique (Kageruka P. et al., 1977, Noireau et al., 1986, Makumyaviri et al., 1989). Les pourcentages d'infection sont inférieurs à ceux constatés en Afrique de l'Ouest (Gibson et al., 1978, Mehlitz et al. 1982, Mehlitz, 1986, Zillman et al., 1984). L'importance épidémiologique du réservoir animal sera discutée dans le paragraphe suivant.

1-2-2 Epidémiologie de la Maladie du Sommeil au Congo, au Zaïre et au Cameroun

a) Au Congo

Rappel historique

La première grande épidémie décrite a débuté en 1885 au confluent de l'Oubangui et du Congo (Labusquière et al., 1971). L'expansion de cette épidémie a provoqué des hécatombes, à tel point que Martin et al. (1909), citent des villages entièrement décimés par la maladie. Dès lors, et jusque dans les années 1960, l'intervention des équipes mobiles locales a permis d'enrayer la maladie dans pratiquement tout le pays.

A partir de 1968, on constate une recrudescence générale de la T.H.A. sur tout le territoire congolais. Malgré les travaux entrepris tant sur le plan des études épidémiologiques (Frézil, 1983, Gouteux et al., 1988, Noireau et al., 1986 a,b, 1987, 1988), que sur celui du contrôle et de la lutte contre les glossines (Frézil et Carnevale, 1976, Lancien et al., 1979, Lancien, 1981, Lancien et al., 1981), la situation au Congo est, de nos jours, très préoccupante.

Situation actuelle

La répartition de la T.H.A. au Congo (figures 3 et 4) couvre actuellement plusieurs régions, qui correspondent approximativement aux foyers historiques (Maillot, 1956). On distingue:

- La Cuvette: son centre urbain principal, Mossaka, situé sur le fleuve Congo, est inaccessible par voie terrestre. Dans cette forêt inondée, le vecteur est *Glossina fuscipes fuscipes*. En 1983, la prévalence de la T.H.A. était de 2,4%, pour doubler en 1990, soit 4,95% (Noireau et al., 1988). C'est un foyer en pleine recrudescence.
- Le Couloir: est également le long du fleuve Congo en descendant vers le sud. Les pourcentages de malades relevés en 1983 (19,5%) puis en 1989 (5%) (Jannin, communication personnelle), illustrent l'efficacité des efforts de dépistage et de traitement des malades dans cette région de savane. Le vecteur *G. fuscipes quanzensis* vit dans des galeries forestières le long des cours d'eau (Frézil, 1983).
- Le Pool: centré autour de Brazzaville, cette région présente le même type de végétation que le Couloir. C'est une zone de contact entre les deux sous-espèces de glossines, *G. p. palpalis* et *G. f. quanzensis*. On n'y trouve que quelques cas sporadiques de trypanosomiase.
- La Bouenza: est actuellement le foyer le plus important du pays (voir figure 12) par son nombre de cas nouveaux. Les 12% d'infestation à Mayanama, et 3,8% à Boko-Shongo en 1989 (Jannin, communication personnelle) font état de l'importance de la maladie. Il faut souligner que, dans cette région de savane, de nombreuses galeries forestières sont en étroite communication (annexe 2), permettant la libre circulation des glossines de la sous-espèce *G. palpalis palpalis*.

Dans tous ces foyers, la transmission de la maladie se fait à l'intérieur des villages ou à proximité (rivière entourées de galeries forestières: annexe 3). Ce sont les femmes et les enfants qui

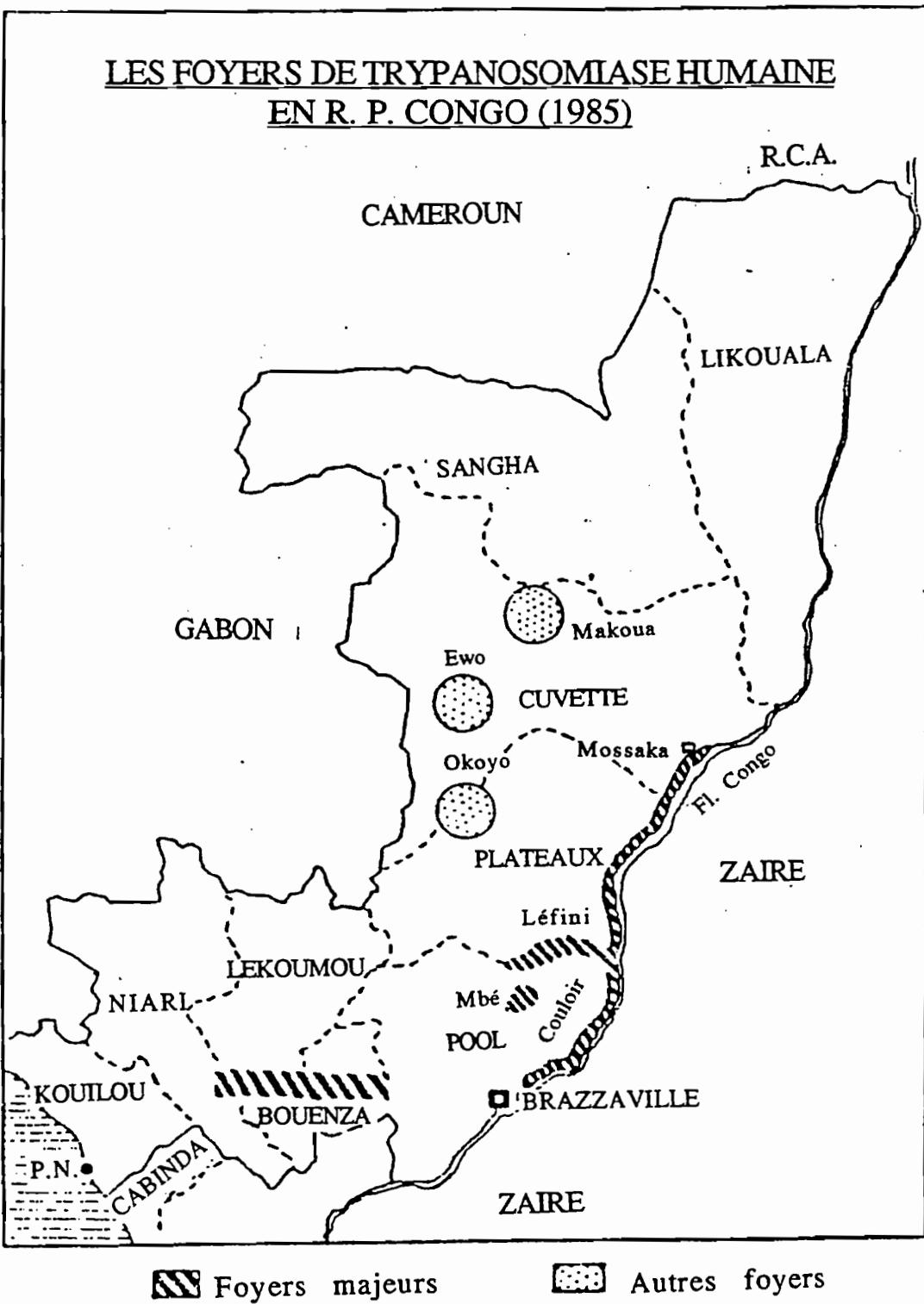


Figure 3: Principaux foyers de Trypanosomiase humaine au Congo.

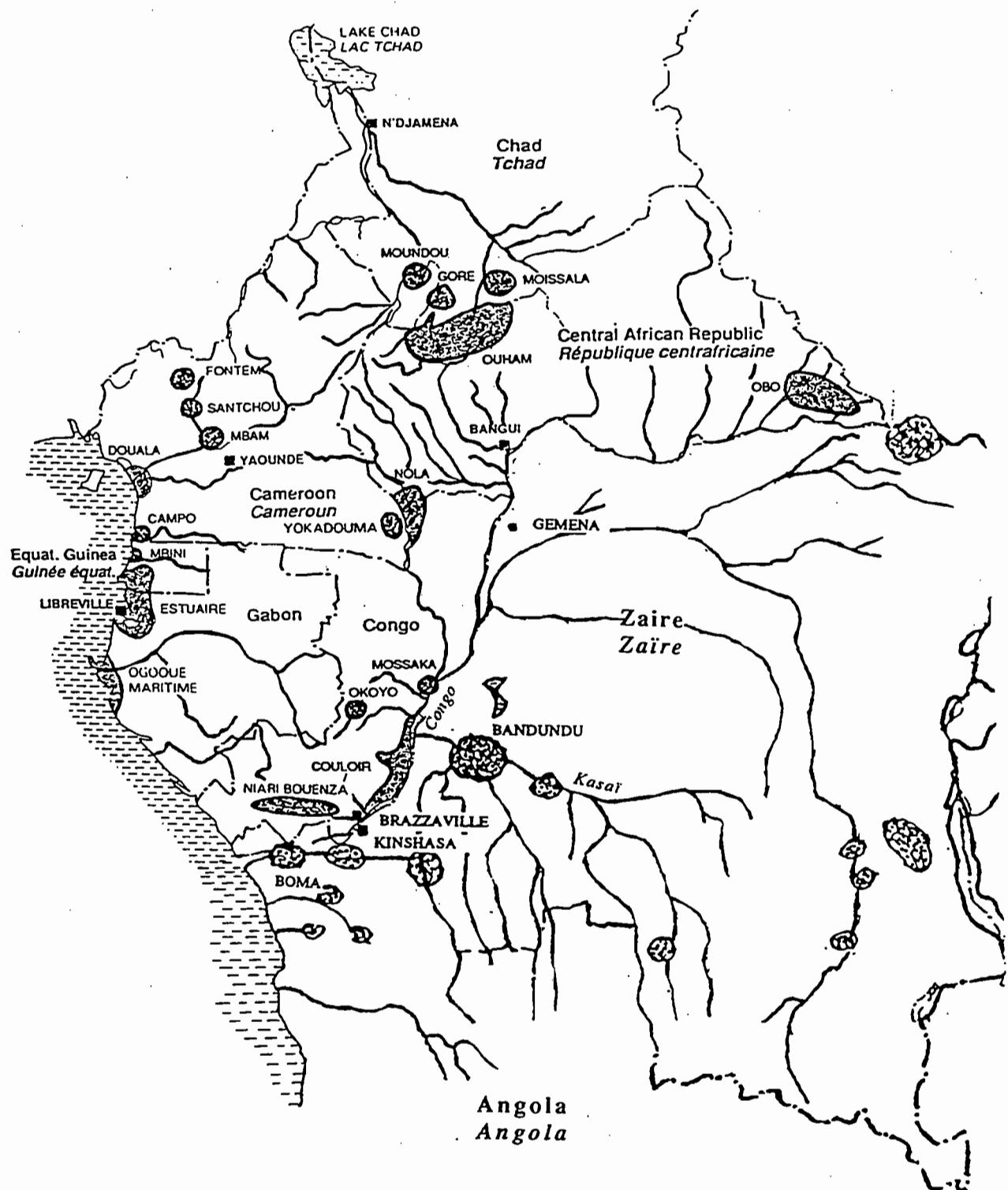


Figure 4: Distribution des principaux foyers de T.H.A. en Afrique Centrale (Document OCEAC, 1990).

sont les plus exposés de par leurs activités quotidiennes (lavage du linge, rouissage du manioc, jeux) à cette transmission péridomestique (Frézil, 1983). En ce sens, le cycle de la T.H.A. au Congo est essentiellement Homme-Glossine-Homme.

Des recherches sur la présence de *T. brucei* chez les animaux domestiques ont montré que seulement 0,5% sur un total de 1287 animaux examinés présentaient des trypanosomes du sous-genre *Trypanozoon*, dans dix cas sur onze associés à du *T. (N.) congolense*. Même si un animal présente une infection à *T. brucei* au Congo, son rôle dans le cycle épidémiologique semble probablement mineur pendant les phases d'expansion de la maladie, mais pourrait expliquer l'entretien à bas bruit de la maladie pendant les périodes inter-épidémiques (Noireau et al., 1986).

b) Situation au Zaïre

L'histoire situe la première épidémie de T.H.A. au Zaïre en 1885, au même moment qu'au Congo (Burke, 1974). Le premier foyer connu se situe dans la région du Bandundu (voir figure 4), à proximité du fleuve Kasai. Cette zone correspond sur la rive congolaise au foyer du Couloir, au sud du premier foyer historique congolais.

Si en 1958 l'endémie sommeilleuse est presque éteinte au Zaïre (presque simultanément on observe la même situation au Congo), dès 1964, se produit une recrudescence générale de la T.H.A. (Burke, 1971, Ruppel et Kazyumba, 1977, Kazyumba, 1979).

Actuellement, on distingue 5 grands foyers répartis sur tout le pays, mais nous avons du limiter notre étude du Zaïre à deux foyers limitrophes du Congo, car nous ne disposions pas de stocks en provenance d'autres foyers.

Les deux foyers étudiés sont:

- **Le foyer du Bandundu:** c'est une région de savane arbustive traversée par des galeries forestières (Henry et al., 1982), où vivent *G. fuscipes fuscipes* et *G. fuscipes quanzensis* (Kabeya et al., 1988). En 1987, la moitié des cas nouveaux de trypanosomiase humaine au Zaïre (environ 5000), sont recensés dans le Bandundu. Par extension, les cas sporadiques à Kinshasa sont considérés comme provenant du Bandundu.

- **le foyer de Boma:** située dans le prolongement sud du massif du Mayombe, cette région est recouverte d'une forêt secondaire sillonnée par plusieurs cours d'eau. Le vecteur est *G. palpalis palpalis* (Makumyaviri, 1986), et la prévalence de la maladie est d'environ 5% en 1987 (Makumyaviri et al., 1989).

Malgré l'immensité du territoire zaïrois (2.345.000 km², soit 7 fois la superficie du Congo), et l'importance de la T.H.A. dans tout le pays, peu d'études épidémiologiques ont été effectuées au Zaïre. Le type de transmission péridomestique est comparable à celui qui est incriminé au Congo. Des études sur la présence de *T. brucei* chez l'animal ont montré que la prévalence des infections chez l'animal domestique était plus forte en région forestière (Boma) qu'en zone de savane (Bandundu). En effet, 16,5% des porcs et 6,2% des moutons sont infectés, montrant aussi que d'une façon générale, la prévalence de l'infection à *T. brucei* chez l'animal est plus forte au Zaïre qu'au Congo (Makumyaviri et al., 1989).

c) Situation au Cameroun

Comme dans les pays voisins (figure 4), les foyers historiques de trypanosomiase persistent dans ce pays. En 1982, le programme de lutte contre la trypanosomiase a dépisté 773 malades parmi les 126 045 personnes examinées au cours d'enquête. En 1983, 1000 nouveaux cas ont été mis en évidence parmi les 142232 personnes examinées. Les foyers de Mbam et de Fontem sont les plus actifs; ensemble, ils sont à l'origine de près de 95% des cas dépistés au Cameroun. La maladie a fait son apparition dans la région de Mamfé, à l'ouest du pays (Rapport OCEAC, 1990). Peu de références bibliographiques relatent la situation historique et actuelle de la T.H.A. au Cameroun. Nous ne disposons que de quatre stocks humains, en provenance des foyers de Mbam (Bafia), Fontem et Campo.

2) Structure du génome et mode de reproduction du parasite

2-1 Structure du génome de *T. brucei*

Les études isoenzymatiques d'une part (Tait, 1980, 1983), et de l'ADN d'autre part (Tait et al., 1989, Kooy et al., 1989, Steinberg et al., 1989, Jenni et al., 1986, Gibson et al. 1985, Borst et al., 1980, 1982, Shapiro et al., 1984), suggèrent que les formes sanguicoles, procycliques, proventriculaires et métacycliques de *T. brucei* sont diploïdes.

On distingue:

- l'ADN nucléaire, qui comprendrait 7 paires de chromosomes homologues, plus une centaine de mini-chromosomes (Gottesdiener et al., 1990);
- l'ADN kinétoplastique (ADNk), qui peut être considéré dans une certaine mesure comme l'équivalent de l'ADN mitochondrial des autres organismes. Il est formé de mini-cercles non-transcrits (1 kb)

très nombreux et très hétérogènes, et de maxi-cercles (20 kb) transcrits, plus homogènes, formés chacun d'une région conservée et d'une région variable (Borst et al., 1979, 1980 b).

2-2 Mode de reproduction

Si tous les ouvrages anciens de Protistologie indiquent que les trypanosomes se multiplient de façon asexuée par division binaire longitudinale, de récents travaux de laboratoire font état de phénomènes de recombinaison sexuée (Jenni et al., 1986, Paindavoine et al., 1986, Sternberg et al., 1988). Un modèle "quasi-panmictique" a même été postulé pour les populations naturelles de *T. brucei* (Tait, 1980, 1984).

Cependant, Cibulskis, en 1988, souligne que l'incidence réelle de ces phénomènes de recombinaison dans les populations naturelles du parasite est difficile à cerner, et suggère la possibilité d'évolution séparée de certaines lignées parasitaires.

Tibayrenc et al., (1990), proposent une théorie de reproduction clonale pour les Protozoaires parasites. La présence d'hétérozygotes fixés, l'absence de certains génotypes recombinants, de fortes déviations par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg, l'ubiquité de génotypes multilocus, de forts déséquilibres de liaison et la corrélation entre deux types de marqueurs génétiques sont autant d'arguments en faveur d'une reproduction principalement clonale, et de l'existence de clones stables dans l'espace et dans le temps chez de nombreuses espèces de protozoaires, en particulier *T. brucei*. Une telle hypothèse a des conséquences importantes sur la taxonomie sub-spécifique du parasite, comme nous le verrons.

3) Apport de l'étude des caractères intrinsèques du parasite à la classification et à l'étude de l'épidémiologie de la T.H.A

3-1 A propos de la classification

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour préciser la classification, parmi lesquelles l'isoenzymologie et l'étude des sondes spécifiques de l'ADN.

a) Méthode isoenzymatique

Les isoenzymes ont été testés d'abord comme "outils" diagnostiques, afin de savoir si la variation de pathogénicité entre la forme chronique "gambienne" et la forme aiguë "rhodésienne" pouvait être corrélée au polymorphisme isoenzymatique (Kilgour et

Godfrey, 1973, Godfrey et Kilgour, 1976, Gibson et al., 1980, 1986, Tait et al., 1984, Godfrey et al., 1987, 1990). Cela revenait à rechercher un lien hypothétique entre caractéristiques pathologiques et sub-spécificité telle qu'elle était définie au sein de l'espèce *T. brucei*. Cette nécessité de clarifier la situation se justifiait d'autant plus que certains trypanosomes du groupe *T. brucei*, indistinguables morphologiquement des autres, étaient totalement inoffensifs pour l'homme mais provoquaient des ravages dans les troupeaux domestiques, aggravant la situation économique déjà précaire de plusieurs pays d'Afrique. Ni les aminotransférases comme ALAT ou ASAT, trouvées identiques chez *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* (Godfrey et Kilgour, 1976), ni les peptidases, présentant des profils communs à *T. b. gambiense* et *T. evansi* (Gibson et al., 1980), n'ont permis de distinguer clairement les sous-espèces de *T. brucei*. L'existence d'un groupe relativement homogène contenant la plupart des souches de *T. b. gambiense* (Groupe 1), présentant des profils isoenzymatiques caractéristiques, a été postulé (Gibson, 1986). D'autres résultats suggéreraient même l'hypothèse selon laquelle *T.b. gambiense* est une lignée adaptée de *T.b. brucei* chez l'homme (Tait et al., 1984).

Mais le problème de la classification sub-spécifique de *T. brucei* reste posé, car il est impossible de rattacher à ce groupe 1 de nombreux stocks présentant pourtant des pathologies de type "gambien", et s'y trouvent au contraire des stocks d'Afrique de l'Est. La compréhension d'une situation épidémiologique doit se baser obligatoirement sur une identification rigoureuse de l'agent pathogène en cause.

Tout au long du texte, nous entendrons par *T. b. gambiense*, selon le contexte:

- soit un stock étiqueté explicitement comme tel par le laboratoire l'ayant communiqué;
- soit un stock répondant à l'acception épidémiologique classique *T. b. gambiense* (stocks d'Afrique de l'Ouest et Centrale circulant préférentiellement chez l'homme, provoquant chez ce dernier une pathologie à évolution chronique, les stocks étant résistants au sérum humain).

b) Analyse de l'ADN

Après fragmentation par endonucléases de restriction et séparation par électrophorèse (polymorphisme de longueur de fragments de restriction ou en anglais Restriction Fragment Length Polymorphism, R.F.L.P.: Borst et al., 1980 a,b, 1981, Gibson et al., 1985), l'ADN nucléaire ou kinétoplastique peut être hybridé avec des sondes spécifiques (Pays et al., 1981, 1983 a,b,e, 1984,

Massamba et Williams, 1984, Paindavoine et al., 1986, 1989), ce qui permettrait de différencier *T.b. gambiense* des autres sous-espèces.

D'autres travaux basés sur les mêmes techniques, tout en confirmant l'existence d'un groupe homogène de *T.b. gambiense* en Afrique de l'Ouest, ont permis d'individualiser deux autres entités regroupant des stocks humains et animaux d'Afrique de l'Ouest d'une part, et des stocks humains d'Afrique de l'Ouest et de l'Est d'autre part (Hide et al., 1990).

3-2 Apport de l'isoenzymologie à l'étude de l'épidémiologie de la T.H.A.

a) A propos de la spécificité de l'hôte.

On considérait donc classiquement que *T.b. gambiense*, contrairement à *T.b. rhodesiense*, n'infectait que l'homme. Pourtant, de récents travaux d'isoenzymologie ont permis de suspecter la présence de *T.b. gambiense* chez l'animal en Afrique de l'Ouest et Centrale, et de confirmer la présence de *T.b. rhodesiense* chez de nombreux animaux en Afrique de l'Est. Des stocks isolés chez l'animal présentaient des profils enzymatiques identiques à des stocks humains en Afrique de l'Est (Gibson et al., 1980, Gibson et Gashumba, 1983, Gibson et Wellde, 1985, Mihok et al., 1990), en Afrique de l'Ouest (Gibson et al., 1978, Mehlitz et al., 1982, Zillman et al. 1984, Mehlitz, 1986), et en Afrique Centrale (Scott et al., 1983, Truc et al., sous presse: annexe 12). Ces données corroborent donc les infections expérimentales pratiquées chez des volontaires (Heisch et al., 1958, Geigy et al., 1975). Bien que connu depuis longtemps, le rôle du réservoir animal en Afrique de l'Est était sous-estimé jusqu'à l'apport d'informations par l'étude isoenzymatique, et jugé maintenant comme essentiel dans le maintien de la maladie pendant les périodes inter-épidémiques (Gibson et Miles, 1985).

b) A propos de la circulation interfocale des trypanosomes pathogènes.

Grâce aux isoenzymes, la dispersion de la maladie a été mieux comprise. Par exemple, le même zymodème (ensemble des stocks présentant le même profil enzymatique: voir matériels et méthodes) est apparu comme responsable de deux épidémies à 20 ans de distance dans deux régions voisines, le sud-est de l'Ouganda et le nord-ouest du Kenya. L'apparition de la T.H.A au nord du Kenya apparaissait donc comme résultant de la dispersion des stocks de l'épidémie ougandaise. Par ailleurs, des zymodèmes

différents du précédent sévissaient dans la région de la Lambwey Valley, sur la rive Est du lac Victoria. Les deux épidémies de T.H.A. au Kenya, bien que géographiquement proches, semblaient donc d'origines différentes (Gibson et al., 1980, Gibson and Gashumba, 1983). Mais il convient d'être prudent quant à une interprétation trop hâtive des résultats. Dans un même foyer de T.H.A., des zymodèmes différents peuvent cohabiter, dont certains ont pu être accidentellement importés d'autres foyers, à l'occasion par exemple du déplacement du malade (Mehlitz et al., 1982). L'utilisation des isoenzymes devrait permettre de préciser cette notion de "foyer".

Nous retiendrons, pour le présent travail, que les isoenzymes servent d'abord à établir un marquage multigénique fin permettant une identification stricte de l'agent pathogène, ainsi que l'évaluation du flux génique entre populations: on peut ainsi estimer l'individualisation et la stabilité des lignées parasitaires dans l'espace et dans le temps. Partant de cette base génétique, les corollaires épidémiologiques qui en découlent, réservoir animal et répartition/dispersion de la T.H.A., seront discutés.

3-3 Comparaison des résultats isoenzymatiques avec le R.F.L.P.

L'analyse du polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN kinétoplastique ou R.F.L.P., a été utilisée comme outil taxonomique chez *T. brucei* (cf paragraphe 1-3, b), mais aussi chez d'autres trypanosomes comme *T. cruzi* (Morel et al., 1980, Tibayrenc et Ayala, 1987). Nous avons appliqué cette technique dans la présente étude à quelques stocks de *T. brucei*.

MATERIEL ET METHODES

1) Stocks de trypanosomes

1-1 Méthodes d'isolement

1-1-1 Protocole de dépistage des malades.

Les enquêtes sont menées sur le terrain sous l'égide du Service de contrôle et de lutte des Grandes Endémies Tropicales du Ministère de la Santé congolais, section Trypanosomiase (responsable: Dr J. Jannin). La totalité de la population de la localité est convoquée dès 7 h du matin. Après l'enregistrement et la remise d'une carte de dépistage, chaque personne se présente au poste de travail N°1. Un prélèvement de sang est alors pratiqué par piqûre au doigt (Microlancette), et la récupération du sang se fait dans deux tubes capillaires héparinés (ou microhématocrites). L'un de ces tubes servira à la préparation du test Testryp CATT.

Testryp CATT:

Principe: L'infection chronique par *T. b. gambiense* donne lieu à la production d'anticorps circulants dirigés contre plusieurs antigènes de surface du parasite. Ces anticorps peuvent être détectés dans le sang total ou le plasma/sérum, par agglutination directe, en utilisant Testryp CATT (Magnus et al., 1978).

Le réactif CATT est une suspension lyophilisée de trypomastigotes sanguicoles, colorés et stabilisés. Ces trypanosomes appartiennent à des sérotypes bien définis, et sont sélectionnés (Van Meirvenne et al., 1975, 1977) afin d'obtenir une réactivité optimale dans les différents foyers de maladie du sommeil.

Le test est effectué sur une carte plastifiée. Une goutte de sang total ou une goutte de plasma/sérum dilué est mélangée avec une goutte du réactif CATT reconstitué. S'il y a présence d'anticorps, les trypanosomes seront agglutinés macroscopiquement en moins de 5 minutes (annexe 4).

Tous les sujets présentant des réactions au CATT sur sang total de très positives (****) à doûteuses (D) sont retenus. Si l'on dispose de suffisement de temps (ceci dépend surtout du nombre de personnes à dépister), une confirmation sur sérum est effectuée.

Ces sujets sont alors orientés vers le poste de travail N°2. Une palpation ganglionnaire est effectuée. Si la présence d'une adénopathie cervicale ou sus-claviculaire est dépistée, une ponction ganglionnaire est faite. Elle consiste à prélever grâce à une aiguille

de seringue un peu de suc ganglionnaire, qui sera observé entre lame et lamelle au grossissement x 400.

Parallèlement, le second tube hépariné prélevé au poste de travail N°1 est acheminé au poste de travail N°3. Le tube, préalablement obturé d'un seul côté grâce à une pâte spéciale, est centrifugé à 1500 g pendant 15 mn. Puis, une section du tube est faite grâce à un diamant 1 mm en dessous de l'interface hématies/sérum vers le sang. Les trypanosomes se localisent dans cette zone (Woo, 1970, Murray and Paris, 1979). L'extrémité du tube (côté section), est appliquée sur une lame de façon à laisser s'écouler par capillarité environ 10 µl de sérum. Une lamelle est déposée sur la goutte de sérum. La lecture est faite au grossissement x 400.

Tous les sujets CATT + sont convoqués à l'hôpital le plus proche afin d'y subir une ponction lombaire. La recherche des trypanosomes, la numération des leucocytes N, et la protéinorachie P du Liquide Céphalo-Rachidien permettent d'affirmer si le malade se trouve en première période ($N < 5$ et P faible), ou en seconde période ($N > 5$ et P élevée). Ceci orientera le choix du traitement (Lomidine, Arsobal ou DMFO).

1-1-2 Recherche des infections chez le bétail

Bien que la sensibilité du test CATT soit connue pour le dépistage des infections à *Trypanozoon* et *Nannomonas* chez le bétail, une réaction positive au CATT ne fait qu'indiquer que l'animal a réagi à l'inoculation de trypanosomes, sans pour autant permettre de différencier les deux types d'infections (Noireau et al. 1986). Pour *T. congolense*, ce test se révèle d'une faible utilité, tant la présence des parasites est facilement décelable dans le sang des animaux infectés. En effet, l'observation microscopique, entre lame et lamelle au grossissement x 400, de sang prélevé à la queue chez le porc, ou à la veine saphène chez le mouton (annexe 5) permet de révéler la présence de parasites, souvent en grand nombre (au minimum antilog 5.5, soit environ 2.5×10^5 parasites/ml, d'après Herbert et Lumsden, 1976). Sachant que la majorité des cas d'infections à *Trypanozoon* chez l'animal sont en fait des infections mixtes *Trypanozoon/Nannomonas*, toute infection chez l'animal, même si l'observation parasitologique semble indiquer qu'il ne s'agit que de *T. congolense*, doit être considérée comme un mélange possible *Trypanozoon/Nannomonas*.

1-1-3 Inoculation des parasites à des rongeurs

Tous les malades et tous les animaux présentant des parasites dans le sang subissent un prélèvement sur tube Venoject hépariné, puis 1 ml de ce sang est prélevé dans une seringue et inoculé par voie intrapéritonéale à un rat Whistar. Ceci représente l'isolement primaire P1 (Frézil, 1973, Frézil et al., 1979). Celui-ci sera contrôlé le quatrième jour suivant l'injection.

1-1-4 Isolement "in vitro" de trypanosomes: trousse KIVI.

Principe

La trousse d'isolement KIVI (Kit for In Vitro Isolation, Le Ray et Aerts, communication personnelle), permet de récolter des souches de trypanosomes sanguicoles qui se multiplient, après transformation, sous forme procyclique. D'un usage très pratique sur le terrain, sans contrainte particulière d'asepsie (annexe 6), elle se conserve à température ambiante. La trousse se compose de:

- 10 flacons de 15 ml de milieu GLSH-DCA (Le Ray, 1975, Brun et Schönenberger, 1981);
- Parafilm;
- 2 flacons contenant 1 ml de mélange d'antibiotiques (pénicilline + gentamicine + 5-fluorocytosine) pour la décontamination. Ils doivent être conservés à -20°C jusqu'à utilisation;
- 3 flacons de 2 ml de liquoïde 5 % (Polyanethol-sulfonate= anticoagulant, dans une solution saline), stérilisés et conservés au réfrigérateur;
- 10 seringues de 10 ml + aiguilles pour le prélèvement chez les trypanosomés;
- 10 seringues "à tuberculine" avec aiguilles pour introduire le mélange d'antibiotiques dans les flacons de milieu de culture.

Protocole d'ensemencement

- 1) introduire 0,5 ml de liquoïde dans la seringue de 10 ml, puis prélever au pli du coude du patient 9,5 ml de sang, soit au total 10 ml de mélange.
- 2) répartir les 10 ml de mélange obtenu à raison de 5 ml par flacon de milieu de culture: 2 flacons de milieu ensemencés par malade. Dans chaque deuxième flacon, ajouter 250 µl d'antibiotiques, puis homogénéiser en agitant manuellement.
- 3) recouvrir le bouchon du flacon de milieu avec du Parafilm.
- 4) garder les flacons ainsi ensemencés à 15/20°C.

Les repiquages et subcultures ont été effectués à l'Institut de Médecine Tropicale "Prince Leopold" d'Anvers sur milieu semi-défini (Cunningham, 1977).

1-2 Cultures de masse

1-2-1 Sur rat Whistar

Après avoir isolé le stock du malade sommeilleux sur rat (cf § 1-1-3), il faut adapter ce parasite chez son nouvel hôte. Les parasites apparaissent tardivement chez P1 (des contrôles de l'évolution de la parasitémie sont effectués chaque jour par prélèvement d'une goutte de sang à la queue), soit en moyenne 30 à 40 jours après inoculation. La parasitémie reste faible (environ de 10^6 à 7×10^6 trypses/ml), et décroît très rapidement, comme le montrent les figures 5 et 6. Elle reste très insuffisante pour récolter des culots de trypanosomes pour l'électrophorèse. Nous avons alors deux possibilités:

- 1) soit effectuer un passage sur un nouveau rat, P2
- 2) soit transformer les formes sanguicoles en formes procycliques "in vitro".

1) Passage sur un nouveau rat par ponction intracardiaque

Le rat parasité est anesthésié dans une cloche en verre contenant du chloroforme jusqu'à son endormissement en évitant de le tuer. En effet, il est souhaitable que le cœur batte encore pendant la ponction intracardiaque afin que, la circulation du sang dans le corps se faisant normalement, l'on puisse récupérer le maximum de sang. Pour maintenir le rat en anesthésie, un tampon de coton imbibé de chloroforme est placé à proximité de ses narines. L'animal est fixé sur une planche à dissection par des aiguilles plantées au niveau des extrémités. La surface de la cage thoracique est nettoyée à l'alcool, puis la ponction intracardiaque est effectuée stérilement grâce à une aiguille fine montée sur une seringue de 1 ml héparinée. Le sang prélevé sert, d'une part, à confectionner un aliquot qui est cryopréservé (voir paragraphe 1-3-1), et d'autre part, à inoculer par voie intrapéritonéale un nouveau rat. On renouvelle l'opération jusqu'à ce que la virulence de la souche permette une parasitémie suffisante pour la récolte des parasites (à antilog 8.7 à 9.0, soit 5×10^8 à 10^9 parasites / ml). Cette récolte se fait par passage du sang total sur colonne de cellulose DEAE 52 (Lanham et Godfrey, 1970). Ce protocole est schématisé dans

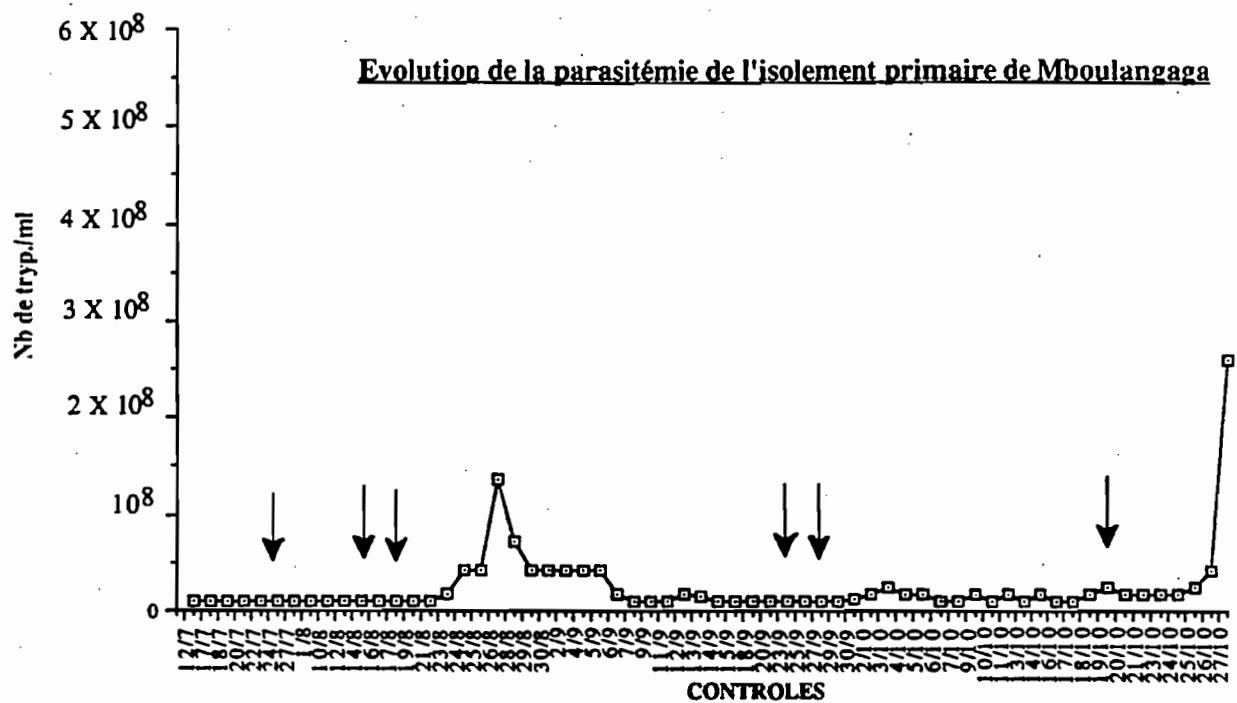


Figure 5: Evolution de la parasitémie pour l'isolement primaire du stock MBOULANG. Isolé de l'homme le 12/07/89 (malade en seconde période), la parasitémie n'a été décelable chez le rat que le 23/08/89, soit 42 jours après inoculation. Ceci est comparable aux résultats connus pour des stocks congolais (Frézil et al., 1979). Le premier pic parasitémique est précaire, nécessitant soit un subpassage à un nouveau rat afin d'augmenter la virulence du stock, soit un essai de transformation "in vitro" en forme procyclique (voir texte). Les flèches symbolisent les injections de Cyclophosphamide au rat, à raison de 80 mg/ kg de poids (Wéry et al., 1977).

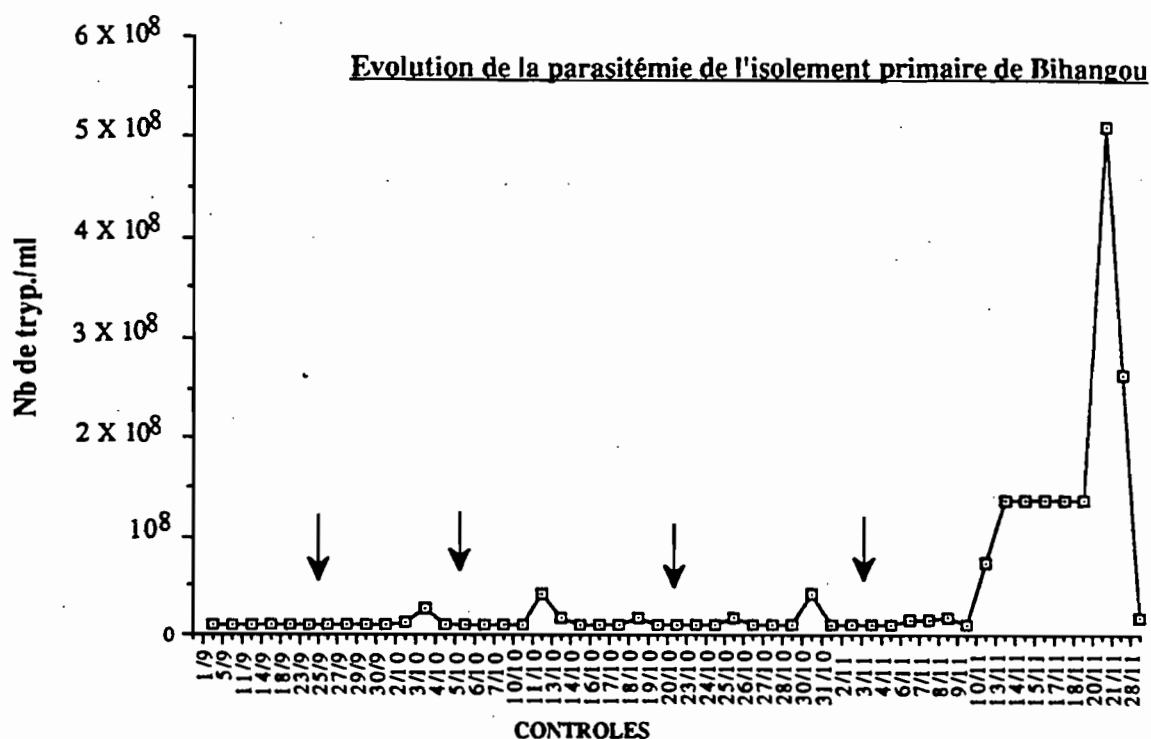


Figure 6: Evolution de la parasitèmeie pour l'isolement primaire du stock BIH. Isolé de l'homme le 1/09/89 (malade en première période), l'isolement du stock s'est avéré positif chez le rat après 32 jours. Du 1/09/89 au 8/11/89, soit pendant plus de deux mois, et malgré les injections de Cyclophosphamide (symbolisées par des flèches), la parasitèmeie n'a pas dépassé $7 \text{ à } 15 \times 10^6$ tryp./ml. Celle-ci était très insuffisante pour une récolte de masse en vue de l'étude isoenzymatique. Par contre, le pic du 20/11/89 à 5×10^8 tryp./ml était suffisant. Mais un tel pic parasitémique ne représentait qu'un cas exceptionnel sur l'ensemble des stocks congolais que nous avons isolés. Dans tous les cas, un subpassage était nécessaire, et un essai de transformation en procyclique était souhaitable dès que la parasitèmeie atteignait 3×10^7 tryp./ml.

l'annexe 7. On récupère ainsi, pour un rat de 400 grammes à antilog 9.0, environ 15 ml de sang, soit une centaine de milligrammes de parasites. Les culots de trypanosomes sont alors conservés à -70°C.

2) Transformation des formes sanguicoles en formes procycliques

a) Sans passage par la glossine

Ce protocole a été standardisé par nos soins, et largement utilisé du fait de la très faible virulence des stocks de *T. brucei* d'Afrique centrale. A partir de l'isolement primaire, il est préférable d'effectuer un passage sur un jeune rat (P2) pour les stocks de faible virulence (Babiker et al., 1981), selon le protocole détaillé dans le précédent paragraphe. L'utilisation d'immunodépresseurs comme la Cyclophosphamide (Endoxan R) est déconseillée sur l'isolement primaire, car les conditions de transport et d'hygiène des rats, sur le terrain facilitent les infections bactériennes, très souvent létales pour le rat. Néanmoins, la Cyclophosphamide peut être utilisée sur le P1 (voir figures 5 et 6), et se révèle très utile sur le P2, dans les deux cas à la même dose, à savoir 80 mg/kilogramme de poids (Wéry et al., 1977). Grâce à des injections répétées d'Endoxan à 72 heures d'intervalle, on peut obtenir des parasitémies au minimum de $1,6 \times 10^7$ tryps/ml. Une ponction intracardiaque stérile de 1 ml de sang est effectuée (paragraphe précédent), 2 ml de milieu semi-défini, supplémenté de 20 % (V/V) de sérum de veau fœtal et de 0,2% de gentamicine (P/V), sontensemencés avec 0,1 ml de sang parasité dans une boîte de culture (Bienen et al., 1980). Les cultures sont maintenues à 27°C. Après 4 à 5 jours, environ la moitié des essais d'ensemencement sont positifs, et présente des formes procycliques en cours de multiplication. La culture de masse se fait par addition progressive de milieu: 300 ml de milieu à forte concentration de parasites (plus de 10^9 /ml), permet de récolter, après centrifugation à 1500 g, environ 150 mg de trypanosomes.

b) par passage cyclique chez la glossine

(d'après Dukes et al., 1989)

Des glossines de la sous-espèce *G. morsitans morsitans* sont nourries sur membrane de silicium avec du sang contenant des trypanosomes peu virulents chez le rongeur. Environ 30 à 40 jours après l'infection, les glossines sont disséquées, et le tube digestif présentant des trypanosomes est ensemencé sur milieu semi-défini. On obtient ainsi des formes procycliques, que l'on peut cultiver en masse selon le protocole exposé à la fin du paragraphe précédent.

1-2-2 A partir de l'isolement sur trousse KIVI

Le protocole est le même que celui cité plus haut, à savoir addition progressive de milieu et centrifugation.

1-3 Cryopréservation des souches

1-3-1 Cas des formes sanguicoles

Il convient d'ajouter au sang contenant les trypanosomes un cryoprotecteur (glycérol), et du tampon PSG (voir annexe 7), le tout à volume égal de sang hépariné dans un tube plastique stérile cryorésistant type Nunc. La présence de glucose dans le tampon de congélation est très importante car ce glucose permet de fournir, à la décongélation, un apport nutritif aux parasites. La congélation se fait progressivement: 2 heures à -20°C, puis une nuit à -70°C, et enfin stockage dans l'azote liquide à -196°C.

1-3-2 Cas des formes procycliques

Le protocole est le suivant:

- Réaliser un comptage à l'aide d'une cellule de Thoma afin de préparer des stabilats de 2.10^6 tryp./ ml.
- Prélever 5 ml de culture dans un tube conique de 15 ml. Centrifuger à 1500 g à - 4°C pendant 10 mn.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 6 ml de milieu de congélation*.
- Aliquoter dans des tubes type Nunc de 1ml. Laisser sur la glace 20 mn, puis congeler progressivement : 2 heures à -20°C , une nuit à - 70°C, puis plonger dans l'azote.

*Milieu de congélation :

- Milieu de Cunningham	33,5 ml
- Serum de veau foetal	12,5 ml
- Glycérol (autoclavé)	4 ml
- Gentamicine	0,1 ml

1-4 Stocks étudiés

Peu d'études de ce type ont été entreprises sur l'Afrique Centrale. De ce fait, les stocks disponibles étaient rares dans les Cryobanques internationales. Ainsi, nous avons collecté des stocks sur le terrain en République Populaire du Congo, que nous avons entretenus au Centre ORSTOM de Brazzaville. Puis, certains ont été adaptés directement en forme procyclique au Centre ORSTOM de Montpellier par nos soins, d'autres ont été adaptés par passage cyclique chez *G. morsitans morsitans* au Tsetse Research Laboratory (Université de Bristol, U. K.), par le Dr Peter Dukes. Tous les autres stocks proviennent de cryobanques. Au total, 55 stocks ont été étudiés. Nous avons distingué:

- Tableau I: Ensemble des stocks isolés de l'homme et de l'animal avant 1988. Tous ont été étudiés sous forme sanguicole, sauf MBA, EATRO 1125 et PEYA, qui l'ont été sous forme procyclique.
- Tableau II: Ensemble des stocks humains isolés par nos soins au Congo en 1989. Tous ces stocks ont été adaptés et étudiés sous forme procyclique.
- Tableau III: Ensemble des stocks isolés de l'animal au Zaïre, adaptés et étudiés sous forme procyclique.

Les codes de référence O.M.S. sont répertoriés dans l'annexe 8.

Les formes procycliques sont un matériel convenable pour l'étude isoenzymatique (Kilgour, 1980, Kaukas et al., 1990). Les quelques différences d'activité de certains systèmes enzymatiques par rapport aux formes sanguicoles sont imputables à des variations de métabolisme entre les formes sanguicoles et les procycliques, et ne gênent en rien les interprétations génétiques. Elles seront discutées dans le chapitre "Résultats".

Conditions d'échantillonnage au Congo

En juin, les enquêtes ont été menées dans le foyer du couloir, en particulier dans les villages de M'bé et de N'gabé (voir figure 11): 2287 personnes ont été examinées (Testryp CATT): 134 étaient sérologiquement positives, dont 4 présentaient des trypanosomes dans le sang. Sur les 4 essais d'isolation, une seule souche a pu être stabilisée.

Tableau I: Historique des souches isolées de l'homme et de l'animal avant 1988. Sont précisés successivement (a) le laboratoire donneur (PROV. LABO.) ORST. BZV= Centre ORSTOM de Brazzaville, BP 181, Brazzaville, R.P. Congo, I.M.T.A.= Institut de Médecine Tropicale d'Anvers, Nationalestraat 155, B-2000, Anvers, Belgique; (b) le pays d'isolement (PAYS ISOL.), (c) la ville ou le village (VILL.), (d) le foyer ou la région , (e) l'hôte, (f) l'année d'isolement, (g) les références bibliographiques relatives à ces souches (1: Gibson et al., 1980 , 2: Scott et al., 1983 , 3: Tait et al., 1984 part I, 4: Paindavoine et al., 1986, 5: Tait et al., 1989, 6: Noireau et al., 1989; 7: Paindavoine et al., 1989, 8: Godfrey et al., 1990, 9: Hide et al., 1990), (h) les techniques utilisées par les précédents auteurs (I pour isoenzymes, S pour sondes d'A.D.N.), enfin (i) l'identification sub-spécifique effectuée par ces derniers (NG=non gambienne, Paindavoine et al., 1986).

SOUCHE	PROV. LABO.	PAYS ISOL.	VILL.	FOYER/REGION	HÔTE	ANNEE	REF. BIBLIO	TECHN.	IDENTIF.
D12K	ORST. BZV	CONGO	KOUNZOLOU	COULOIR	MOUTON	1980	2,3,4,7,8	I+S	<i>T.b. gambiense</i>
PA	ORST. BZV	CONGO	COMBA	BOUENZA	HOMME	1975	2,3,4,7,8,9	I+S	<i>T.b. gambiense</i>
OK	ORST. BZV	CONGO	MAKOUA	CUVETTE	HOMME	1974	2,3,4,7,8	I+S	<i>T.b. gambiense</i>
TB26	ORST. BZV	CONGO	KINZABA	BOUENZA	PORC	1983	/		
LIICL2	ORST. BZV	CONGO	BRAZZAVILLE	POOL	PORC	1985	6	S	<i>T.b. gambiense</i>
FY	ORST. BZV	CONGO	MBINDA**	BOUENZA?	HOMME	1985	6	S	<i>T.b. gambiense</i>
BB	ORST. BZV	CONGO	KINZABA	BOUENZA	HOMME	1973	2	I	<i>T.b. gambiense</i>
MA	ORST. BZV	CONGO	MOSSAKA	CUVETTE	HOMME	1974	3,4,7,9	I+S	<i>T.b. gambiense</i>
PEYA	ORST. BZV	CONGO	NGABE	COULOIR	HOMME	1980	/	/	/
C126	I.M.T.A.	ZAIRE	KINSHASA	?	HOMME	1971	1,8	I	<i>T.b. gambiense</i>
MBA (1811)	I.M.T.A.	ZAIRE	KINSHASA	?	HOMME	1974	3,4,7	I+S	<i>T.b. gambiense</i>
EATRO 1125*	I.M.T.A.	UGANDA	MAVUBWE	SOUTH BUSOGA	GUIB	1966	4,5,7,9	I+S	<i>T.b. brucei/NG</i>
ALJO (1829)	I.M.T.A.	ZAIRE	MUSHIE	BANDUNDU	HOMME	1970	/	/	/
KEMLO (1821)	I.M.T.A.	ZAIRE	GEMENA	HAUT-ZAIRE	HOMME	1974	3,4,7	I+S	<i>T.b. gambiense</i>
BOSENDJA (1869)	I.M.T.A.	ZAIRE	KINSHASA	?	HOMME	1972	3,4,7	I+S	<i>T.b. gambiense</i>
SANE (1786)	I.M.T.A.	CAMEROUN	GUEFIGUE	BAFIA(MBAM)	HOMME	1976	3,4,7	I+S	<i>T.b. gambiense</i>
MOS (1787)	I.M.T.A.	CAMEROUN	OMBESSA	BAFIA(MBAM)	HOMME	1974	3,4,7,9	I+S	<i>T.b. gambiense</i>
BIM (1789)	I.M.T.A.	CAMEROUN	CAMPO	CAMPO	HOMME	1974	3,4,7,9	I+S	<i>T.b. gambiense</i>
JUA (1790)	I.M.T.A.	CAMEROUN	FONTEM	FONTEM	HOMME	1974	3,4,7	I+S	<i>T.b. gambiense</i>

* souche de référence de *T. b. brucei*, ** cas importé de la Bouenza, dépisté à Mbinda (région de la Lékoumou).

Tableau II: Historique des souches isolées de l'homme au Congo. Sont indiqués successivement: (a) le nom et le prénom du malade, (b) son âge, (c) son sexe, (d) son village de résidence et (e) sa région. Puis sont indiqués: (f) les résultats du dépistage immunologique (CATT: *** Réaction positive avec agglutination très forte, ** Réaction positive avec agglutination forte, * Réaction positive avec présence d'agglutinats fins, D = Réaction douteuse), (g et h) les résultats de l'examen parasitologique (présence/absence de ganglions (OUI= présence de ganglions, POS= présence de trypanosomes dans le suc ganglionnaire), (i) les résultats de l'examen du LCR (numération des leucocytes et protéinorachie), (j) les méthodes d'isolement des souches (R= sur rat, K= trousses KIVI), détaillées dans le texte.

SOUCHE	NOM PRENOM	AGE	SEXE	VILLAGE	REGION	CATT	GANGLIONS	SANG *	LCR	ISOLEM.**
BAKOU	BAKOUBOULA A.	28	F	KINSAKA	BOUENZA	***	NON	***	0 0,20	R
BALEM	BALEMBIKISSA A.	8	F	MADIADIA	BOUENZA	***	NON	***	0 0,10	R
BALPA	BALOUKILA P.	38	F	KINSAKA	BOUENZA	***	NON	***	8 0,20	R
BISSI	BISSIAMOU V.	56	F	KINSAKA	BOUENZA	*	OUI POS	*	ABSENTE	K
BIH	BIHANGOU M.	50	F	TANGA	BOUENZA	***	OUI POS	*	3 0,80	R
BOULA	BOUKOULOUS.	?	M	MINGA	BOUENZA	?	?	?	?	K
DEMBA	DEMBA M.	50	F	MAYANAMA	BOUENZA	***	NON	**	35 0,30	R
DIANTETE	DIANTETE M.	17	F	MADIADIA	BOUENZA	D	NON	**	0 0,10	R
DICAR	DIBAMENZELA C.	?	F	MINGA	BOUENZA	?	?	?	?	K
DIMONA	DIMONA M.	20	F	KINSAKA	BOUENZA	D	OUI POS	*	0 0,20	R
KIKOU	KIKOUNGA L.	38	M	LOUDIMA	BOUENZA	**	NON	*	25 0,8 POS	R
KOA	KOUMBA A.	?	F	MINGA	BOUENZA	?	?	?	?	K
MABAYA	MABAYA D.	15	F	N'GABE	COULOIR	*	OUI POS	*	66 0,60	R
MABIA	MABIALA P.	25	M	KIMBANDA	BOUENZA	***	OUI POS	*	ABSENTE	R
MABOU	MABOUDI A.	10	M	KINSAKA	BOUENZA	***	OUI POS	*	0 0,18	R
MALOUNDA	MALOUNDA J.M.	25	M	LOUDIMA	BOUENZA	***	OUI POS	*	70 0,68	R
MATSOUMA	MATSOUMAN.	9	F	MAYANAMA	BOUENZA	***	NON	***	0 0,10	R
MAZOUR	MAZDUMBBOUE	11	M	KINGOLI+	POOL	***	OUI POS	*	115 0,40	R
MBOUSSA	MBOUSSA B.	25	F	N'GABE	COULOIR	*	NON	*	ENCEINTE	R
MBOULANG	MBOULANGAGA E.	80	M	MOSSAKA	CUVETTE	***	NON	*	66 0,80	R
NITOUL	NITOULOUVEZOU H.	7	M	MAYANAMA	BOUENZA	***	NON	*	0 0,10	R
MINJA	MINKINZA J.	50	F	MAYANAMA	BOUENZA	***	NON	*	6 0,20	K
NGABE	N'GABELA A.	19	F	N'GABE	COULOIR	**	OUI POS	*	230 0,20	R
NSOUNGUI	NSOUNGUI C.	35	F	MAYANAMA	BOUENZA	***	OUI POS	*	40 0,30	R
NSIMBA	NSIMBA J.	24	F	MAYANAMA	BOUENZA	***	OUI POS	*	1 0,10	R
SILOU	NZOUGSI L.	38	M	MAYANAMA	BOUENZA	***	OUI POS	**	10 0,20	K
SANNA	SANNA S.	18	F	KINSAKA	BOUENZA	***	NON	*	1 0,22	R

Tableau III: Historique des souches isolées de l'animal au Zaïre. La colonne S.S.H. correspond à la sensibilité au sérum humain: S= Sensible, R= Résistant.

SOUCHE	HÔTE	VILLAGE	FOYER	ANNEE	S.S.H.
SH/86	MOUTON	BANDUNDU	BANDUNDU	1986	R
SW1/87	PORC	DJUMUNA	BANDUNDU	1987	S
SW2/87	PORC	DJUMUNA	BANDUNDU	1987	S
SW3/87	PORC	DJUMUNA	BANDUNDU	1987	S
SW4/87	PORC	DJUMUNA	BANDUNDU	1987	S
SH161/87	MOUTON	BOMA	BOMA	1987	S
SH109/87	MOUTON	BOMA	BOMA	1987	S
SW94/87	PORC	BOMA	BOMA	1987	S
SW165/87	PORC	BOMA	BOMA	1987	S

En août, une mission a été faite dans la région de la Bouenza, plus précisément dans les villages de N'Kayi, Kimbanda, Tanga (figure 12): sur les 1454 personnes examinées, 154 étaient positives ou doûteuses sérologiquement, et 22 présentaient des trypanosomes dans le sang. Les 22 essais d'isolement ont été tentés, mais une erreur dans la périodicité des injections de cyclophosphamide aux rats a entraîné la perte de pratiquement tous les stocks. Deux stocks ont pu être cependant stabilisés. Des recherches de trypanosomes chez le bétail de ces villages (102 animaux examinés), se sont avérées négatives.

En septembre, une mission orientée uniquement sur l'évaluation des infections à *Trypanozoon* et *Nannomonas* chez le bétail domestique a été faite dans la région de la Bouenza, et en particulier dans le district de N'Kayi. Sur les 65 moutons et les 25 porcs examinés, 26 moutons présentaient des trypanosomes du sous-genre *Nannomonas*. 15 stocks ont été stabilisés.

En octobre, une tournée a eu lieu dans la Bouenza, sur l'axe Madingou- Boko Shongo. Les villages de Kinsaka, Mayanama, Tanga et Madiada ont été prospectés. Bilan: 1220 personnes examinées. Sur les 68 sujets présentant des parasites dans le sang, 41 essais d'isolement ont été effectués, 15 stocks ont été stabilisés.

Remarque 1:

D'un point de vue morphologique, il est aisément de distinguer *Nannomonas* de *Trypanozoon*. Noireau et al., (1986), suggèrent qu'il existe des infections mixtes à *Trypanozoon/Nannomonas* chez le bétail, et que "la parasitémie à *Trypanozoon* reste latente et ne s'extériorise qu'à l'occasion d'un transfert chez un nouvel hôte (rat), après plusieurs passages successifs". Nous avons appliqué ce protocole à nos 15 stocks, et après 4 à 7 passages chez le rat, ils continuaient à ne présenter que des trypanosomes du sous-genre *Nannomonas*. Les passages ont été alors interrompus, et les stocks ont été cryoconservés.

Remarque 2:

Parmi les 41 essais d'isolement, 5 ont été effectués sur trousse KIVI, dont 4 ont permis l'isolement et la stabilisation des stocks. Ce fort taux de réussite (4 sur 5), pour le premier essai de cette trousse

sur le terrain, est très prometteur quant à l'avenir de cette méthode d'isolement "in vitro".

2 Electrophorèse en actéate de cellulose

2-1 Principe de l'électrophorèse

Par électrophorèse, on désigne la séparation de molécules organiques par action d'un champ électrique. Quand les molécules sont des protéines, à caractère amphotère, elles sont ionisées sous l'effet du pH du milieu dans lequel elles sont en solution, et acquièrent une charge électrique. Cette dernière entraîne leur déplacement vers l'anode ou vers la cathode, dans la pellicule de tampon qui recouvre l'acétate de cellulose. Ce déplacement est la mobilité électrophorétique, qui est également influencée par la taille et la forme de la molécule protéique.

2-2 Electrophorèse d'isoenzymes

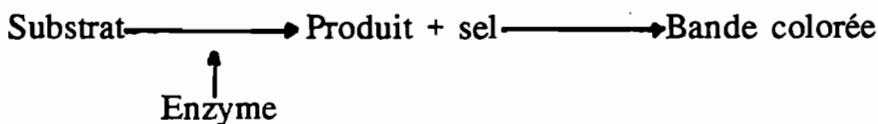
Les isoenzymes sont des protéines qui ont une même fonction enzymatique et migrent différemment à l'électrophorèse. Ces différences de migration reflètent les différences de charge électrique globale, lesquelles dépendent avant tout des variations de la structure primaire de la protéine. Ces variations de la structure primaire sont commandées directement par la séquence ADN (ou gène) correspondante. Les isoenzymes sont donc considérées comme des marqueurs génétiques. A un locus donné, différents allèles peuvent s'exprimer, visualisés après électrophorèse par des bandes distinctes. Ces allèles subissent une ségrégation mendéienne au sein des populations. Les isoenzymes représentant des allèles différents d'un même gène sont appelées allozymes (Prakash et al., 1969). Les résultats de l'électrophorèse ou zymogrammes sont interprétés, dans la mesure du possible, en terme allélique. Les zymogrammes définissent un profil enzymatique. L'ensemble des stocks présentant le même profil enzymatique est regroupé sous le terme de zymodème (Godfrey, 1979). Il est à remarquer que le concept de zymodème est purement descriptif et empirique, et n'a aucun pouvoir prédictif sur la nature biologique et le comportement évolutif des variants ainsi individualisés (Tibayrenc et Ayala, 1988).

Après électrophorèse, la mise en évidence des bandes pour un système enzymatique donné s'effectue par des procédés histochimiques spécifiques. La plaque d'acétate de cellulose est traitée par une solution contenant:

- le substrat spécifique de l'enzyme à analyser;

- des cofacteurs: coenzymes, ions et autres corps chimiques éventuellement nécessaires à l'activité de l'enzyme en cause;
- 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:



Exemple:

La plupart des déshydrogénases catalysent le transfert d'un atome d'hydrogène, de leur substrat à une coenzyme (NAD^+ ou NADP^+). L'atome d'hydrogène est transféré par la phénazine méthosulfate (PMS), sur un sel de tétrazolium (NBT ou MTT). Il se forme, à l'endroit de l'activité enzymatique, un précipité insoluble de couleur bleue: le formazan (Pasteur et al., 1987, Harris et Hopkinson, 1976).

2-3 Méthode

Nous avons utilisé 19 systèmes enzymatiques permettant l'étude de 24 loci : *ALAT, ALP, DIA2, GAPD, GOT, GPI, G6PD, GSR, IDH, LAP, MDH, ME1 et 2, NHa et b, NHc, PEP2, PGD, PGM, SODa et b, TDH, UGPP 1 et 2*. Les dénominations et les codes de référence sont regroupés dans l'annexe 9. Les procédures de migration et de coloration ont été adaptés à l'étude des trypanosomes africains d'après les protocoles communiqués par Cariou, 1977, Harris and Hopkinson, 1976, Kreutzer et al., 1980, 1981, 1983, Lanham et al., 1981, Pernin et al., 1985, Richardson et al., 1986, Shaw et Prasad, 1970, Stevens et al., 1989, et Tibayrenc et al., 1985.

2-3-1 Préparation des extraits enzymatiques

Les culots de trypanosomes (cf paragraphe 1-2) sont centrifugés à 1440 g. Le surnageant est retiré, et remplacé par un volume de stabilisateur d'enzyme (Miles et Ward, 1978) sensiblement égal à celui du culot parasitaire. Après homogénéisation, les culots sont disposés sur de la glace pendant 15 mn, puis centrifugés à 1440 g. Le surnageant, constituant l'extrait enzymatique, est aliquoté par volumes de 10 µl. Les extraits sont stockés à -70°C jusqu'à utilisation. Le culot résiduel est conservé à -70°C pour étude de l'ADN.

2-3-2 Protocole électrophorétique

Tout le matériel utilisé pour l'électrophorèse est fabriqué par HELENA Laboratories, et les produits chimiques proviennent de chez SIGMA.

Les tampons de migrations, ceux de révélation, les différentes conditions d'électrophorèse et de révélation spécifique sont détaillées respectivement dans les tableaux IV, V et VI.

a) Migration

La plaque d'acétate est imbibée dans le tampon de migration, ou une de ses dilutions (voir tableau VI), pendant 15 minutes. Puis, les échantillons sont déposés sur la plaque à l'aide d'un peigne spécial. Trois applications sont faites sur l'acétate de cellulose. La plaque est disposée, face plastifiée vers le haut, dans la cuve, dont chaque compartiment a été rempli au préalable de 50 ml de tampon de migration. Le compartiment central est, soit garni d'eau ou d'un système réfrigérant, soit laissé vide (cf tableau VI), ceci en fonction du tampon de migration. Une plaque en verre recouvre la plaque d'acétate pour assurer un meilleur contact électrique. La durée et le voltage de la migration varient selon le tampon utilisé (voir tableau VI).

b) Coloration

Les solutions de coloration spécifiques (tableau VI), sont mélangées à 10 ml d'agarose à 1,2 %, préalablement porté à ébullition, puis refroidi à 60°C. Le mélange est coulé dans une boîte de Pétri en plastique (diamètre 14 cm), disposée ensuite à l'abri de la lumière. Les plaques sont appliquées, côté acétate, dans la boîte de Pétri sur le mélange agarose/solution de coloration. Les boîtes sont placées à l'étuve à 37°C pour la révélation enzymatique. Lorsque les bandes sont suffisamment révélées, les plaques d'acétate sont retirées, et fixées dans l'acide acétique à 5 % pendant 5 minutes, puis séchées à l'air libre.

2-4 Interprétation des résultats

Dans un premier temps, l'interprétation des résultats permettra de discuter des degrés de parenté phénétiques ou génétiques qui relient les différents zymodèmes entre eux. Ensuite, plusieurs tests statistiques permettront de cerner le mode de reproduction de ces

Tableau IV: Tampons de migration.

CODE	COMPOSITION
A	TRIS-VERSENE-BORATE 0,5 M pH 8,0
B	TRIS BARBITAL SODIUM BARBITAL (HELENA HR) pH 9,0
C	TRIS 0,1 M, ACIDE MALEIQUE 0,004 M, EDTA 0,01 M, MG CL2 0,01 M pH 8,6
D	TRIS 0,66 M, ACIDE CITRIQUE 0,083 M pH 8,6
E	TRIS 0,2 M, TRICINE 0,025 M, K Cl 0,01 M pH 8,0
F	ACIDE CITRIQUE 0,15 M, Na H2 PO4 0,24 M pH 6,3
G	Na H2 PO4 0,2 M dans Na2 H PO4 0,2 M jusqu'à obtention de pH 7,0
H	TRIS 0,1 M, ACIDE CITRIQUE 0,01 M pH 8,2
I	TRIS 0,1 M, ACIDE BORIQUE 0,3 M pH 7,6 + 10% sucre

Tableau V: Tampons de révélation.

CODE	COMPOSITION
1	TRIS HCl 1,0 M pH 7,0
2	TRIS HCl 1,0 M pH 8,0
3	TRIS 0,076 M, ACIDE CITRIQUE 0,005 M pH 7,9
4	TRIS 0,2 M, ACIDE MALEIQUE 0,2 M pH 6,0
5	Na H ₂ PO ₄ 0,025 M, Na ₂ HPO ₄ 0,08 M pH 7,4
6	TRIS H Cl 0,1 M pH 8,6
7	Phosphate de Sodium 0,1 M + 0,0032 % de Riboflavine

Tableau VI: Conditions électrophoretiques et solutions de coloration spécifiques à chaque enzyme. Sont indiqués successivement: (a) le loci enzymatique, (b) le tampon de migration T. M. (cf tableau IV), avec entre parenthèses, la dilution appropriée de celui-ci pour l'imbibition des plaques d'acétate (voir texte). Certains de ces tampons doivent être dilués pour la migration (D au 3/4 pour l'ALAT, G au 1/2 pour GSR, A au 8/10 pour ME, C au 1/4 pour PGD, E au 8/10 pour TDH et B au 8/10 pour UGPP). Sont indiqués ensuite: (c) le voltage en volts (VOLT.), (d) la durée de migration (DUR.) en minutes, (e) le tampon de révélation (cf tableau V), (f) la solution de coloration spécifique (la liste des produits chimiques et leurs abréviations sont détaillées dans l'annexe 10).

ENZYME	T. M.	VOLT.	DUR.	T. R.	SOLUTION DE COLORATION
ALAT*	D (1/15)	200	45	5	acide alpha kétoglutarique 5 mg, L alanine 10 mg, LDH (de coeur de boeuf) 15 UI, NADH 2 mg
ALP*	F (5/10)	80	35	3	β naphtyl acide phosphate 50 mg, Mg Cl ₂ 20 mg, Mn Cl ₂ (4 H ₂ O) 2 mg, Fast Blue RR 15 mg dans 200 μ l acétone
DIA2*	J	200	20	6	NADPH Na ₄ salt 10 mg, 100 μ l MTT, 100 μ l DICP (solution 1 mg/ml)
GAPD	A (25/100)	200	25	1 (25/100)	Fructose 1,6 diphosphate Na ₄ salt 12,5 mg, aldolase (de muscle de lapin) 0,7 UI; incuber à 37°C pendant 60 mn, puis ajouter acide arsenic Na ₂ salt 12,5 mg, acide pyruvic 12,5 mg, NAD 5 mg, NBT 5 mg, PMS 1,5 mg
GOT	A (5/10)	160	35	2 (1/10)	L acide aspartic 25 mg, acide alpha kétoglutarique 20 mg, pyridoxal 5 phosphate 3 mg; réajuster à pH 8 avec NaOH 40%, puis ajouter Fast Blue BB 20 mg.
GPI	A (25/100)	180	30	1 (25/100)	fructose 6 phosphate 10 mg, G6PDH (de levure Torula) 5 UI, MgCl ₂ 50 mg, NADP 5 mg, NBT 5 mg, PMS 1,5 mg
G6PD*	B	200	25	1 (5/10)	glucose 6 phosphate 5 mg, MgCl ₂ 50 mg, NADP 5 mg, NBT 2,5 mg, PMS 3 mg
GSR*	G (15/100)	160	35	2 (25/100)	glutathion forme oxydée 10 mg, NADPH Na ₄ salt 5 mg, NBT 5 mg
IDH*	A (5/10)	160	35	2 (1/10)	DL acide isocitrique 10 mg, MgCl ₂ 50 mg, MnCl ₂ 5 mg, NADP 5 mg, NBT 2,5 mg, PMS 1,5 mg
LAP	A (25/100)	200	30	4 (15/100)	leucine β naphtylamide 30 mg, fast black K salt 10 mg
MDH	B	160	35	1 (2/10)	0,9 ml DL acide malique 1,0 M pH 7,0, NAD 5 mg, NBT 5 mg, PMS 1,5 mg
ME*	A (20/100)	160	40	1 (25/100)	0,6 ml DL acide malique 1,0 M pH 7,0, MgCl ₂ 50 mg, NADP 5 mg, NBT 5 mg, PMS 1,5 mg
NHa et b*	A (75/100)	200	30	2 (1/10)	inosine 10 mg, xanthine oxydase (de lait de beurre) 0,6 UI, MTT 0,6 mg, PMS 1,5 mg
NHc*	A (75/100)	160	30	2 (1/10)	déoxyinosine 10 mg, xanthine oxydase (de lait de beurre) 0,6 UI, MTT 0,6 mg, PMS 1,5 mg
PEP2	A	200	30	2 (1/10)	L. leucyl L alanine 5 mg, L amino acide oxydase 1 mg, peroxydase 1 mg, MgCl ₂ 30 mg, MnCl ₂ 3 mg, 3 aminoéthylcarbazole 5 mg dans 400 μ l d'éthanol
PGD*	C (25/100)	200	25	2 (25/100)	acide 6 phosphogluconique 10 mg, MgCl ₂ 50 mg, NADP 5 mg, NBT 5 mg, PMS 3 mg
PGM	A (25/100)	160	35	2 (25/100)	glucose 1 phosphate 20 mg, G6PDH 8 UI, MgCl ₂ 50 mg, NADP 5 mg, NBT 2,5 mg, PMS 3 mg
TDH*	E (5/10)	160	35	2 (1/10)	L thréonine 100 mg, KCl 150 mg, NAD 10 mg, MTT 1,8 mg, PMS 1,5 mg
SOD	I	300	30	7	EDTA 0,2 M 100 μ l, INT (5 mg/ml) 750 μ l, disposer la plaque sur la gélose, puis incuber 10 mn à l'abri de la lumière, et révéler ensuite sur un négatoscope
UGPP	B (75/100)	200	30	2 (4/10)	uridine diphosphoglucose 50 mg, pyrophosphate Na ₄ salt 70 mg, NADP 10 mg, G6PDH 10 UI, phosphoglucomutase (de muscle de lapin) 90 UI, glucose 1,6 diphosphate 1 mg, EDTA 60 mg, MgCl ₂ 50 mg, MTT 1,2 mg, PMS 3 mg

* nécessite un refroidissement (Cooling sponges de HELENA) + glace sur la cuve.

parasites. Enfin, en se basant sur la répartition géographique des zymodèmes, nous discuterons les implications épidémiologiques des résultats.

2-4-1 Relations phénétiques et phylogénétiques

a) Distance de Jaccard (Dj)

Cette distance permet de quantifier la ressemblance phénétique entre deux zymodèmes (Jaccard, 1973). Elle se calcule selon la formule:

$$Dj = 1 - \frac{C}{2N} \quad \text{avec } C = \text{nombre de bandes communes aux deux zymodèmes, et } N = \text{nombre de bandes totales révélées.}$$

b) Distance de Nei

Cette distance (Nei, 1972), présente divers avantages par rapport à une taxonomie phénétique. D'abord parce elle a une signification génétique précise (nombre moyen de codons différents par gène entre deux populations); puis elle a été utilisée pour l'étude d'organismes divers, en particulier des *Kinetoplastidae*, *T. cruzi* (Tibayrenc et Miles, 1983, Tibayrenc et al., 1986) ou le genre *Leishmania* (Serres et Roux, 1986). Les résultats numériques obtenus permettent donc des comparaisons interorganismes directes.

Formule

Si x_i est la fréquence du ième allèle d'un gène d'une population X, et y_i celle du ième allèle au même locus dans une population Y, la probabilité d'identité de deux allèles pris au hasard, l'un dans X et l'autre dans Y est $P(XY) = \sum_1^l x_i y_i$. Par ailleurs, la probabilité d'identité de deux allèles pris au hasard à ce locus, au sein de la population X est $P(X) = \sum_1^l x_i^2$, et au sein de Y, est $P(Y) = \sum_1^l y_i^2$.

Entre les deux populations, la distance de Nei (D) est:

$$D = -\ln \overline{P}(XY) / \sqrt{\overline{P}(X) \overline{P}(Y)}$$

La barre coiffant les P indiquent qu'il s'agit ici des moyennes des probabilités d'identités sur l'ensemble des loci étudiés (Pasteur et al., 1987).

c) Dendrogrammes

La classification hiérarchique, réalisée à l'aide de nombreux modèles d'agglomération (Lance et Williams, 1967, Legendre et

Legendre, 1979, Sneath et Sokal, 1973), aboutit à la construction d'un dendrogramme permettant de visualiser les relations taxonomiques entre les différents zymodèmes (programme informatique communiqué par Roux et Serres, voir Serres et Roux, 1986).

d) Réseau de Wagner

Dénommé aussi "arbre sans racine", le réseau de Wagner est basé sur le principe de parcimonie (nombre minimum de pas évolutifs). Il visualise les relations phylogéniques existant entre les différents zymodèmes. Le traitement des données est effectué grâce à l'algorithme MIX, extrait du programme PHYLIP distribué par J. Felsenstein, 1978.

e) Analyse Factorielle des Correspondances (AFC)

C'est une méthode d'analyse multidimensionnelle, essentiellement descriptive, adaptées au traitement des données qualitatives (Schwartz, 1963). Les variables sont les différents loci, les données sont les interprétations alléliques, ou phénotypes, à chaque locus, et pour chaque zymodème. Cette méthode permet de prendre en compte toutes les variables simultanément, de préciser leurs importances relatives, et de situer chaque zymodème sur un graphique à deux dimensions (Benzécri, 1982, 1984). Le traitement des données se fait grâce au programme BIOMEKO, fournit par le laboratoire de biométrie du CEPE (CNRS, Montpellier France).

2-4-2 A propos du mode de reproduction

Les tests de ségrégation et de recombinaison (Tibayrenc et al., 1990, Tibayrenc et al., sous presse), appliqués aux résultats isoenzymatiques des populations de *T. brucei*, permettent de vérifier plusieurs conséquences du mode de reproduction de ces parasites. Ils permettent de tester:

a) la ségrégation des allèles:

- présence d'hétérozygotes fixés: si l'on observe, à un ou plusieurs loci, un fort excès ou une présence exclusive d'hétérozygotes, ceci est incompatible avec une reproduction sexuée. La loi de ségrégation des allèles à la méiose devrait permettre d'obtenir des homozygotes dans la descendance ;
- plus généralement, l'absence ou l'excès de certains génotypes ségrégants: s'il y a reproduction sexuée donc méiose et ségrégation

allélique, il y a donc production dans la descendance d'homozygotes et d'hétérozygotes. Si certains génotypes pour un locus donné sont absents ou sous-représentés, ceci remet en cause l'hypothèse d'une reproduction sexuée;

- des populations se multipliant par recombinaison sexuée libre sont en équilibre de Hardy-Weinberg, ce qui permet une vérification des deux tests précédents. Une très forte déviation à cet équilibre est aussi en faveur d'une reproduction clonale;

b) les recombinaisons des génotypes entre les différents loci:

- l'ubiquité de certains génotypes multilocus et leurs hyper-représentations, ou au contraire la sous-représentation de certains génotypes multilocus, en des lieux géographiquement séparés, sont en faveur d'une reproduction clonale;

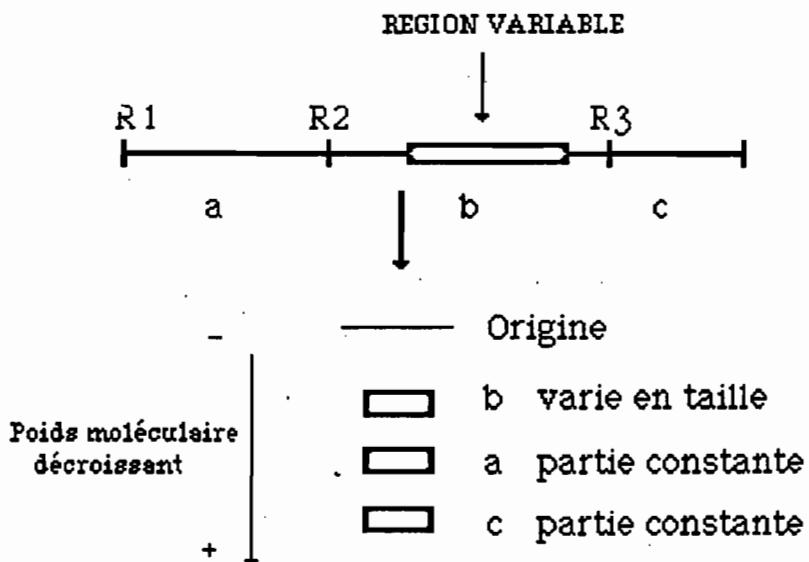
- une association inter-locus non aléatoire, ou déséquilibre de liaison, plaide en faveur d'une reproduction asexuée uniparentale.

Le détail de ces différents tests statistiques sera expliqué dans le chapitre "Résultats".

3 Analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP) de l'ADN kinétoplastique (ADNk)

3-1 Principe

L'ADNk est facilement séparable de l'ADN nucléaire (voir annexe 11). La digestion par endonucléases de restriction permet de linéariser cet ADN (maxicercles uniquement), en un nombre de fragments égal au nombre de sites de coupures (exemple: pour *ECO RI*, 3 sites de coupure R1, R2, R3 donnent 3 bandes). Sachant que les maxicercles sont formés d'une partie constante et d'une partie variable (Steinert et al., 1976, Fairlamb et al., 1978), si les sites de coupure encadrent la partie variable, sa taille pourra facilement s'évaluer par électrophorèse:



Tout changement du nombre de nucléotides au niveau de cette partie variable se traduira par un changement de taille, donc de poids moléculaire, décelable par migration électrophorétique sur gel d'agarose. Les bandes ainsi individualisées définissent un profil de restriction. Tous les stocks présentant le même profil de restriction se regroupent sous le terme de schizodème (Morel et al., 1980).

3-2 Protocole

La technique utilisée est issue de Gibson et al., (1985), avec quelques modifications (Gibson, communication personnelle). Le protocole d'extraction de l'ADNk est développé dans l'annexe 11. L'ADNk, très stable, peut se conserver à -4°C. Deux enzymes de restriction ont été utilisées: *ECO RI* et *HIND III*.

Dans chaque cas, le protocole de digestion est le suivant:

- 1) Préparer une solution 1 contenant Bovine Serum Albumin (BSA) 100 µg/ ml, et spermidine 4 mM.
- 2) Dans un Eppendorf, ajouter:
 - 7,5 µl de solution 1
 - 1 µl d'enzyme de restriction
 - 1,5 µl de tampon spécifique de l'enzyme (vendu avec elle)
 - 5 µl de solution d'ADNk

La digestion dure deux heures à 37°C. Chaque produit de digestion est additionné de 0,1% (V/V) de bleu de bromophénol utilisé comme marqueur de migration. Cette migration se fait dans un gel d'agarose à 0,6% dans du tampon TAE (Tris 40 mM, Acide acétique

1 mM, EDTA 0,5 M pH 8), additionné de bromure d'éthidium à raison de 0,5 µl/ ml.

La durée de migration est de deux heures à 50 volts, ou toute la nuit à 10 volts.

La révélation des bandes se fait en lumière ultra-violette (320 nm de longueur d'onde), et des photographies sont effectuées (Polaroïd Ouv. 4,5, t=1 mn).

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans un premier temps, nous exposons les résultats électrophorétiques, leurs interprétations et les représentations graphiques qui en découlent. Puis, les profils de restriction (RFLP) seront présentés, et comparés avec ceux de l'électrophorèse d'isoenzymes. Ensuite, nous appliquerons les tests de recombinaison et de ségrégation à nos résultats, et leurs conclusions seront discutées à propos du mode de reproduction des trypanosomes. Enfin, après avoir présenté la répartition géographique des différents zymodèmes, nous essayerons d'évaluer l'apport de cette étude à une meilleure compréhension des facteurs qui conditionnent l'épidémiologie de la THA au Congo, au Zaïre et au Cameroun.

1) Electrophorèse d'isoenzymes

1-1 Zymogrammes et interprétations

Nous avons distingué les zymogrammes permettant une interprétation allélique de ceux qui ne se prêtent qu'à une lecture purement phénotypique.

1-1-1 Zymogrammes interprétés en terme allélique

Considérant la structure du génome de *T. brucei* comme diploïde (cf Généralités § 2-1), la plupart des zymogrammes observés ont été interprétés en terme allélique. Les allèles à chaque locus sont numérotés à partir de 1, allèle le plus rapide. Sur les 24 loci étudiés, 20 loci ont permis une interprétation allélique, dont 8 se sont avérés monomorphes (*DIA2*, *GAPD*, *GPI*, *GSR* : annexe 13, *MDH*, *ME1* : annexe 14, *NH a* et *NH b*) et 12 ont présenté de la variabilité (*ALAT* : annexe 15, *ALP*, *G6PD*, *IDH* : annexe 16, *LAP*, *ME2* : annexe 14, *NH c* : annexe 17, *PGM* : annexe 18, *PGD*, *TDH*, *UGPP 1* et *UGPP 2*).

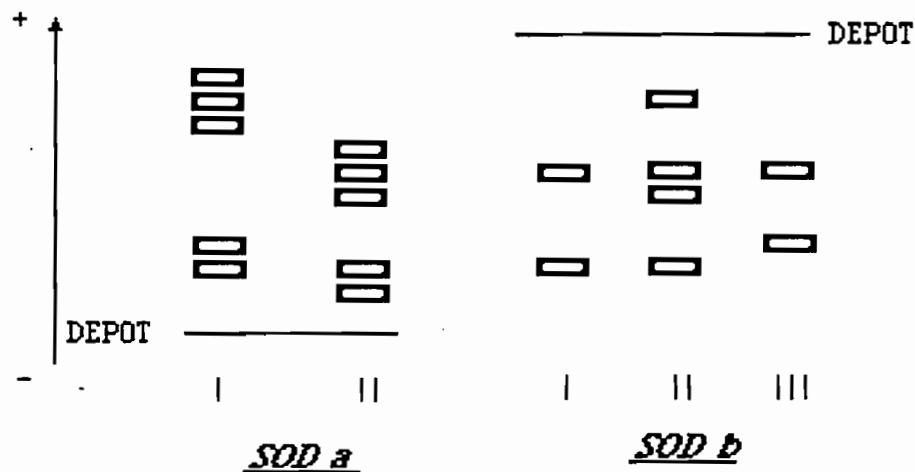
1-1-2 Zymogrammes interprétés phénotypiquement

Parmi les 24 loci étudiés, 4 se sont révélés difficilement interprétables en terme allélique. Il s'agit de :

- *GOT*: 4 phénotypes différents ont été observés (annexe 19) et regroupés dans 3 types: I, II et III. Le type I comprend deux phénotypes, chacun présentant deux bandes qui ne diffèrent entre elles que par l'intensité de chaque bande (la bande supérieure est plus forte pour les stocks étudiés sous forme procyclique, la bande inférieure est plus forte pour les stocks étudiés sous forme

sanguicole). Ces différences d'intensité reflètent des différences d'activité enzymatique GOT entre les formes sanguicoles et les formes procycliques. Sachant que la GOT intervient dans la transformation de l'alpha-kéto glutarate en oxaloacétate, qui est utilisé dans la production d'adénosine triphosphate (ATP), et que cette production d'ATP joue un rôle important dans l'activité métabolique cellulaire, les différences d'activité GOT entre formes sanguicoles et procycliques reflètent probablement un besoin métabolique qui varie selon le milieu environnant le parasite, à savoir le sang pour les sanguicoles, le milieu de culture "in vitro" pour les procycliques (Kilgour, 1980, Kaukas et al., 1990).

- *PEP2*: deux types de zymogrammes, I et II, ont été visualisés (annexe 20).
- *SOD a* et *SOD b*: la distinction entre les différents phénotypes observés répond au schéma suivant:



Le locus *SOD a* migre vers l'anode, et *SOD b* vers la cathode. Dans notre étude, le phénotype *SOD a* II était toujours associé au phénotype *SOD b* III, et *SOD a* I associé soit à *SOD b* I, soit à *SOD b* II.

1-2 Zymodèmes individualisés, variabilité génétique et phénétique

a) Zymodèmes individualisés

L'ensemble des 23 zymodèmes décrits sur la base de 24 loci sont exposés dans le tableau VII. Les stocks de parasites sont répertoriés par zymodème dans le tableau VIII. Des stocks qui apparaissent différents en étudiant 24 loci deviennent identiques en n'utilisant que les 20 loci se prêtant à l'interprétation allélique. Sur la base de ces 20 loci, nous avons les identités suivantes: Z4=Z5,

Tableau VII: Zymodèmes individualisés (Z) sur la base de 24 loci. Les loci monomorphes dans notre échantillonnage (*DIA 2*, *GAPD*, *GPI*, *GSR*, *MDH*, *ME 1*, *NH a* et *NH b*) ne sont pas indiqués. Les loci suivis de * ont été interprétés phénotypiquement (voir texte). La colonne (Nb) indique le nombre de stocks représentés pour chaque zymodème.

Z1	<i>ALAT</i>	<i>ALP</i>	<i>GOT*</i>	<i>G6PD</i>	<i>IDH</i>	<i>LAP</i>	<i>ME2</i>	<i>NHc</i>	<i>PEP2*</i>	<i>PGM</i>	<i>PGD</i>	<i>SODa*</i>	<i>SODb*</i>	<i>TDH</i>	<i>UGPPI</i>	<i>UGPP2</i>	Nb
1	414	212	1	111	111	111	112	212	11	112	111	11	111	212	112	111	1
2	212	212	1	111	111	111	112	212	11	112	111	11	111	111	112	111	1
3	212	212	1	111	112	111	111	112	11	111	111	1	111	212	212	111	1
4	212	212	1	111	111	212	111	212	11	112	111	1	111	212	212	111	1
5	212	212	1	111	111	212	111	212	11	112	111	1	111	212	212	111	6
6	113	212	1	111	111	111	111	212	1	112	0	1	1	212	212	111	1
7	214	212	1	111	111	212	112	212	11	212	111	11	111	212	112	111	20
8	214	212	1	111	111	212	0	212	1	212	111	11	111	212	112	111	4
9	212	212	111	111	112	212	111	212	1	111	111	1	111	212	212	111	2
10	214	212	1	111	111	212	112	212	1	212	111	11	111	212	112	111	1
11	414	212	1	111	111	212	112	212	11	212	111	11	111	212	112	111	1
12	212	212	1	111	111	212	112	212	11	212	111	11	111	212	112	111	3
13	414	212	1	111	111	212	112	212	11	212	111	11	111	111	112	111	2
14	414	212	1	111	111	212	112	212	1	212	111	11	111	212	112	111	1
15	214	212	1	111	111	212	112	212	11	212	111	11	111	112	212	111	1
16	212	212	1	111	111	212	112	212	11	212	111	11	111	212	212	111	1
17	214	212	1	111	111	212	112	212	11	212	111	11	111	112	112	111	1
18	214	111	1	111	111	212	0	212	1	212	111	11	111	212	212	112	1
19	214	111	1	111	111	212	0	212	1	212	111	11	111	212	212	111	2
20	214	111	1	212	111	212	0	212	1	212	111	11	111	212	212	111	1
21	414	212	11	111	111	111	0	212	1	212	111	11	111	212	212	111	1
22	214	212	11	111	111	212	0	212	1	212	111	11	111	212	212	111	1
23	214	212	1	111	111	212	0	212	1	112	111	11	111	212	212	111	2

Tableau VIII: Identification des stocks par zymodème. Les principales caractéristiques relatives au lieu (VILL.= ville ou village), à l'hôte, et à la date d'isolement de chaque stock sont rappelées, avec le zymodème correspondant dans la colonne (Z).

STOCKS	PAYS	REGION	VILL.	HOTE	ANNEE	Z
MBA	ZAIRE	?	KINSHASA	HOMME	1974	1
SH86	ZAIRE	BANDUNDU	BANDUNDU	MOUTON	1986	2
EATRO 1125	OUGANDA	SOUTH BUSOGA	MAVUBWE	GUILB	1966	3
SW3/87	ZAIRE	BANDUNDU	DJUMUNA	PORC	1987	4
SW1/87	ZAIRE	BANDUNDU	DJUMUNA	PORC	1987	5
SW2/87	ZAIRE	BANDUNDU	DJUMUNA	PORC	1987	5
SW4/87	ZAIRE	BANDUNDU	DJUMUNA	PORC	1987	5
SW161/87	ZAIRE	BOMA	BOMA	MOUTON	1987	5
SW94/87	ZAIRE	BOMA	BOMA	PORC	1987	5
SW165/87	ZAIRE	BOMA	BOMA	PORC	1987	5
SH109/87	ZAIRE	BOMA	BOMA	MOUTON	1987	6
DIMONA	CONGO	BOUENZA	KINSAKA	HOMME	1989	7
BALPA	CONGO	BOUENZA	KINSAKA	HOMME	1989	7
BISSI	CONGO	BOUENZA	TANGA	HOMME	1989	7
SILOU	CONGO	BOUENZA	MAYANAMA	HOMME	1989	7
MINJA	CONGO	BOUENZA	MAYANAMA	HOMME	1989	7
KOA	CONGO	BOUENZA	MINGA	HOMME	1989	7
DICAR	CONGO	BOUENZA	MINGA	HOMME	1989	7
SANNA	CONGO	BOUENZA	KINSAKA	HOMME	1989	7
DIANTETE	CONGO	BOUENZA	MADIADIA	HOMME	1989	7
NSOUNGUI	CONGO	BOUENZA	MAYANAMA	HOMME	1989	7
NITOUL	CONGO	BOUENZA	MAYANAMA	HOMME	1989	7
MABOU	CONGO	BOUENZA	KINSAKA	HOMME	1989	7
BIH	CONGO	BOUENZA	TANGA	HOMME	1989	7
NSIMBA	CONGO	BOUENZA	MAYANAMA	HOMME	1989	7
BAKOU	CONGO	BOUENZA	KINSAKA	HOMME	1989	7
MABIA	CONGO	BOUENZA	KIMBANDA	HOMME	1989	7
DEMBA	CONGO	BOUENZA	MAYANAMA	HOMME	1989	7
MAZOUR	CONGO	POOL	KINGOLI*	HOMME	1989	7
BALEM	CONGO	BOUENZA	MADIADIA	HOMME	1989	7
D12K	CONGO	COULOIR	KOUNZOLOU	MOUTON	1980	8
PA	CONGO	BOUENZA	COMBA	HOMME	1975	8
TB26	CONGO	BOUENZA	KINZABA	PORC	1983	8
OK	CONGO	CUVETTE	MAKOUA	HOMME	1974	8
LIICL2	CONGO	POOL	BRAZZAVILLE	PORC	1985	9
FY	CONGO	BOUENZA?	MDINDA	HOMME	1985	9
BB	CONGO	BOUENZA	KINZABA	HOMME	1973	10
KIKOU	CONGO	BOUENZA	LOUDIMA	HOMME	1989	11
PEYA	CONGO	COULOIR	NGABE	HOMME	1980	12
NGABELA	CONGO	COULOIR	NGABE	HOMME	1989	12
MABAYA	CONGO	COULOIR	NGABE	HOMME	1989	12
MBOLUANG	CONGO	CUVETTE	MOSSAKA	HOMME	1989	13
MALOUNDA	CONGO	BOUENZA	LOUDIMA	HOMME	1989	13
MA	CONGO	CUVETTE	MOSSAKA	HOMME	1974	14
BOULA	CONGO	BOUENZA	MINGA	HOMME	1989	15
MATSOUWA	CONGO	BOUENZA	MAYANAMA	HOMME	1989	16
MBOUSSA	CONGO	COULOIR	NGABE	HOMME	1989	17
SANE	CAMEROUN	BAFIA	GUEFIGUE	HOMME	1976	18
MOS	CAMEROUN	BAFIA	OMBESSA	HOMME	1974	19
BIM	CAMEROUN	CAMPO	CAMPO	HOMME	1974	19
JUA	CAMEROUN	FONTEM	FONTEM	HOMME	1974	20
KEMLO	ZAIRE	HAUT-ZAIRE	GEMENA	HOMME	1974	21
C126	ZAIRE	?	KINSHASA	HOMME	1971	22
ALJO	ZAIRE	BANDUNDU	MUSHIE	HOMME	1970	23
BOSENDJA	ZAIRE	?	KINSHASA	HOMME	1972	23

* près Mindouli

$Z7=Z10=Z15$ et $Z11=Z13=Z14$. Les 4 loci seulement accessible à une lecture phénotypique (*GOT*, *PEP2*, *SOD a* et *SOD b*), apparaissent ainsi comme très discriminants, puisqu'il permettent de distinguer 5 zymodèmes supplémentaires.

b) Variabilité génétique sur l'ensemble des souches

Les résultats électrophorétiques permettent de calculer plusieurs indices de variabilité génétique:

- Taux de polymorphisme P:

rappel: $P = \text{nombre de loci variables/nombre total de loci}$.
 $P=0,666$.

- Diversité génétique moyenne H ou hétérozygotie théorique:

rappel: $H = \sum h/r$ avec $h = 1 - \sum q_i^2$ h =diversité génétique à chaque locus, q_i =fréquence du i ème allèle du gène à ce locus (voir tableaux XIII et XIV), r =nombre de loci alléliquement interprétables (ici 18).
 $H=0,096$.

- Nombre moyen d'allèles A:

rappel: $A = \sum a/r$ avec a =nombre d'allèles par locus
/pour tous les loci $A=1,7$.
/pour les loci variables $A=2,83$

- Hétérozygotie observée H_o :

rappel: $H_o = \sum \text{hétérozygotes observés par loci}/r$
 $H_o=0,121$

- distances génétiques de Nei: elles sont indiquées dans l'annexe 21: distance génétique moyenne = 0,246; écart-type = 0,149; distance maximale = 0,72 (entre Z3 et Z20, qui diffèrent entre eux par 8 loci); distance minimale = 0,02 (entre Z18 et Z19, qui ne diffèrent que par un seul locus). Ces résultats reflètent une variabilité génétique non négligeable, mais qui reste relativement faible en comparaison de celles observées pour d'autres trypanosomes, appartenant par exemple à l'espèce *T. cruzi* (distances génétiques supérieures à 2, Tibayrenc et al., 1986).

c) Variabilité phénotypique

L'ensemble des distances de Jacquard est regroupé dans l'annexe 22: distance moyenne = 0,381, écart-type = 0,161, distance maximale = 0,71 (entre Z3 et Z20 qui diffèrent par 11 loci sur 24), distance minimale = 0,06 (entre Z18 et Z19 qui ne diffèrent que par un locus).

1-3 Représentations graphiques des relations entre zymodèmes

a) Basées sur l'interprétation allélique (20 loci)

1) Dendrogramme des distances génétiques de Nei

La classification hiérarchique ascendante obtenue, basée sur l'agglomération en liens moyens des zymodèmes, est présentée dans la figure 7.

Nous avons effectué des comparaisons, par paires de stocks, entre distances génétiques calculées (annexe 21) et distances génétiques mesurées sur le dendrogramme, dans le but de tester l'adéquation du dendrogramme à la matrice de distances. La corrélation est hautement significative (annexe 23): coefficient de corrélation $R=0,848$, $p<10^{-4}$, d.d.l. = 152. Le dendrogramme résume donc de façon satisfaisante la variabilité génétique constatée dans la matrice de distances génétiques standard. Deux "sous-groupes" apparaissent:

- **groupe A:** réunit les zymodèmes isolés de l'homme, excepté Z8, qui a été isolé de l'homme et de l'animal. Les stocks de référence, étiquetés comme *T. b. gambiense* (cf tableau I), se regroupent dans des zymodèmes agglomérés dans A, exceptés les stocks LIICL2 et FY (Z9).
- **groupe B:** rassemble 6 zymodèmes sur les 18 distingués par l'interprétation allélique: Z2, Z3, Z4, Z5, Z9 et Z6. Ce sont tous des zymodèmes isolés seulement de l'animal (Z3 comprend la stock de référence de *T. b. brucei* EATRO 1125), excepté Z9, isolé à la fois de l'homme et de l'animal.

2) Réseau de Wagner

Il est présenté dans la figure 8. Les distances patristiques, ou pas évolutifs, sont indiqués entre chaque intersection et permettent de quantifier les relations phylogénétiques entre les différents zymodèmes.

Le regroupement des zymodèmes en sous-ensembles nettement distincts est moins net que dans le cas du dendrogramme. Cependant, nous pouvons supposer que le groupe B, décrit du dendrogramme (cf paragraphe précédent), se visualise sur le réseau de Wagner (ensemble des zymodèmes Z2, Z3, Z4, Z5, Z6 et Z9).

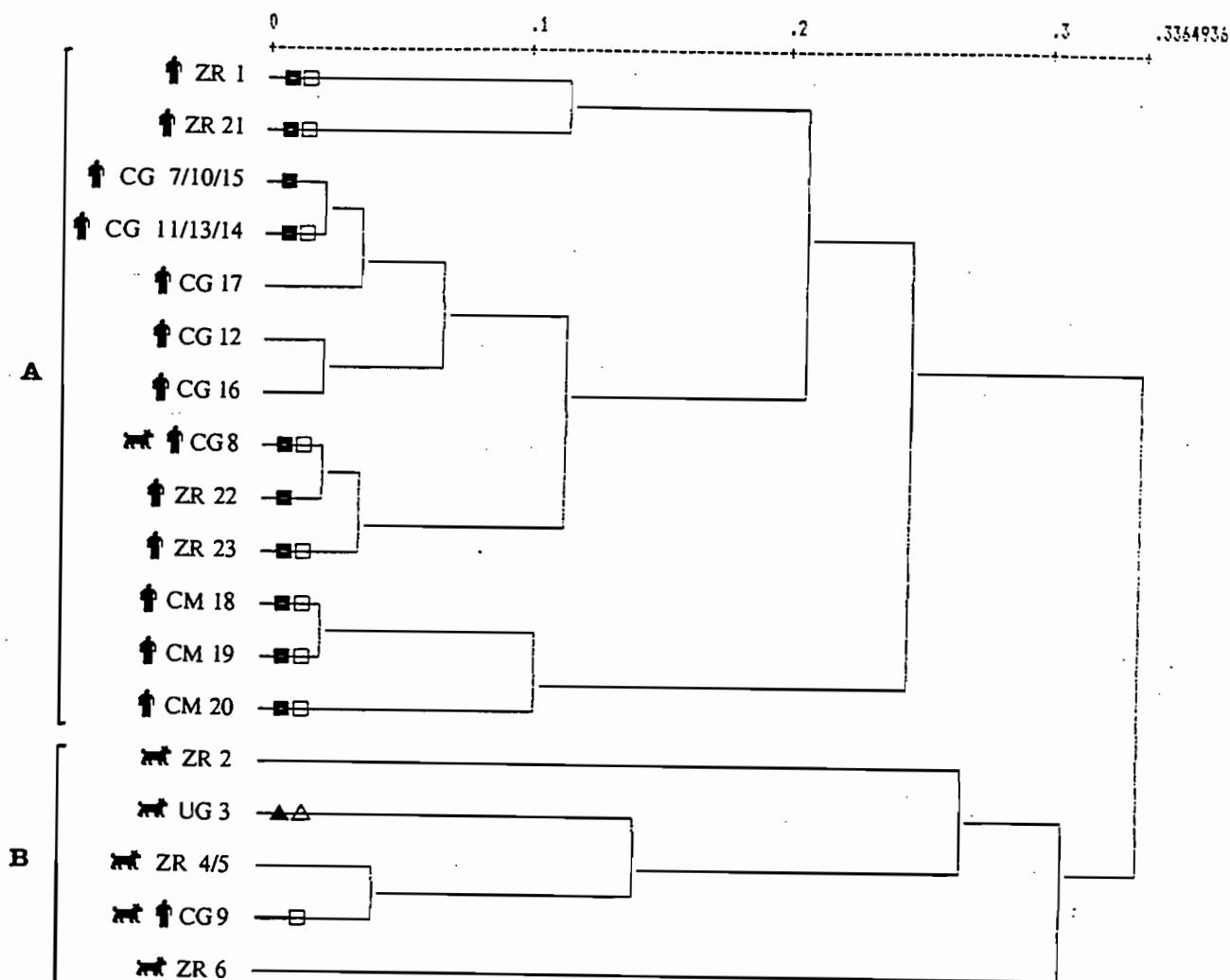


Figure 7: Dendrogramme visualisant les distances génétiques standard de Nei entre les différents zymodèmes (voir annexe 21). Sont indiqués successivement (a) l'hôte (schématisé par une figurine: **homme**, **animal**), (b) le pays d'isolement des stocks (CG= Congo, ZR= Zaïre, CM= Cameroun et UG= Ouganda), (c) le(s) numéro(s) de zymodème(s). Les zymodèmes comprenant des stocks de référence sont indiqués par un carré pour *T. b. gambiense* (carré plein si l'identification a été faite grâce aux isoenzymes, carré vide si l'identification a été faite grâce à des sondes d'ADN), par un triangle pour *T. b. brucei* (plein ou vide selon la méthode utilisée pour l'identification, voir plus haut). Nous avons distingué le groupe A du groupe B (voir texte).

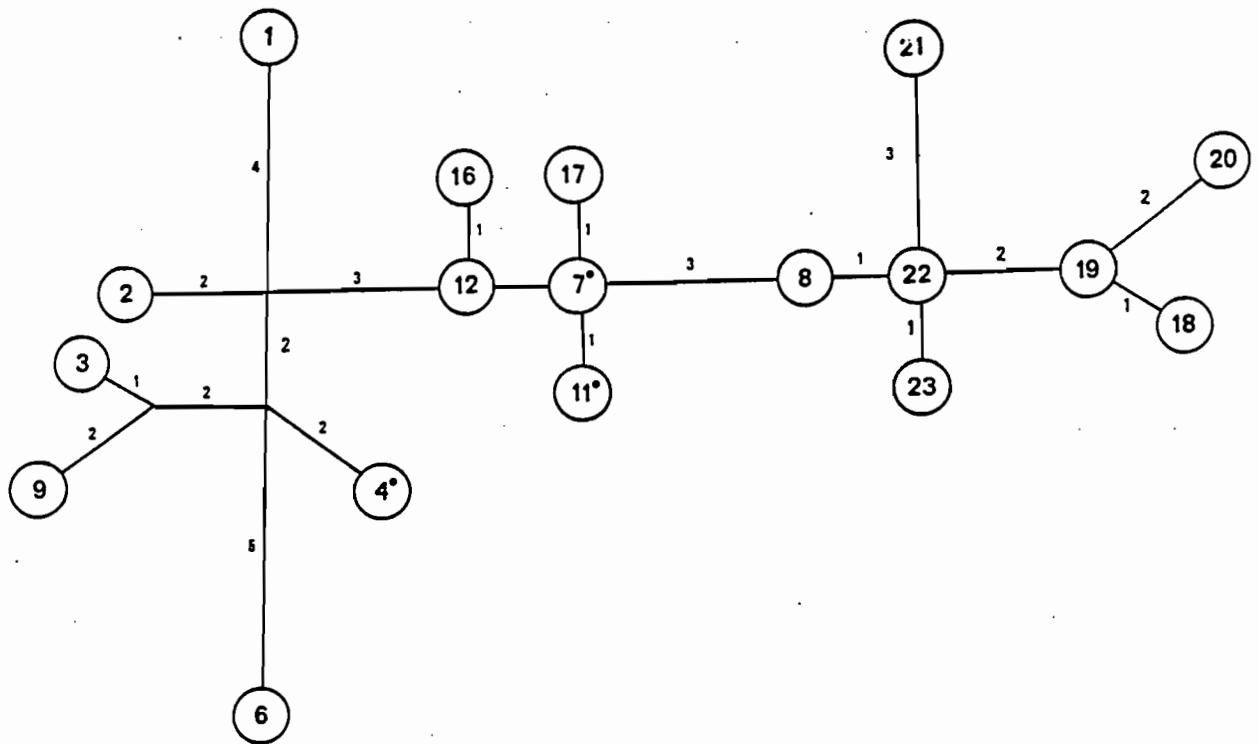


Figure 8: Réseau de Wagner ou arbre sans racine. Il visualise les relations phylogénétiques entre les 23 zymodèmes individualisés. Certains zymodèmes sont identiques sur la base de 20 loci (voir texte). Dans ce cas, nous n'avons indiqué qu'un seul représentant repéré par (•), sachant que: Z4 = Z5, Z7 = Z10 = Z15 et Z11 = Z13 = Z14. Les valeurs indiquées entre chaque intersection sont les distances patristiques ou pas évolutifs.

b) Basées sur les distances phénétiques

1) Dendrogramme

Il est présenté dans la figure 9. La corrélation entre distances de Jaccard calculées (annexe 22), et celles mesurées sur le dendrogramme, est significative (annexe 23): $R=0,848$, $p<10^{-4}$, d.d.l. = 252. Le dendrogramme, également dans ce cas, apparaît donc comme un résumé satisfaisant de la variabilité constatée dans la matrice de distances phénétiques.

En comparant ce dendrogramme à celui décrit dans le chapitre précédent, nous retrouvons approximativement les deux groupes A et B. Le groupe A regroupe tous les zymodèmes exclusivement isolés de l'homme, plus le Z8, isolé de l'homme et de l'animal, et Z2, isolé seulement de l'animal. Le groupe B ne regroupe que des zymodèmes animaux, excepté Z9, qui comprend un stock isolé de l'homme et un stock isolé de l'animal.

2) Analyse Factorielle des Correspondances (AFC)

L'AFC se base sur les résultats phénétiques de l'électrophorèse (Serres et Roux, 1986). Les zymogrammes, à chaque locus, sont codés par 1 (présence d'une bande donnée), ou 0 (absence de la bande). La majorité des loci ne présentant qu'un faible nombre d'allèles (exemple: *ALP*, 2 allèles, *G6PD*, 2 allèles), le codage ainsi réalisé favorise la discrimination par les loci multialléliques ou multibandes, c'est à dire présentant dans notre étude plus de deux allèles ou plusieurs bandes (*ALAT* révèle 4 allèles, *SOD a* et *SOD b* présentent de 2 à 5 bandes). Ainsi, les contributions relatives de ces loci à la projection des zymodèmes selon deux axes est forte. Pourtant, ce codage est une étape obligatoire pour l'élaboration de l'AFC. Nous en tiendrons compte dans l'interprétation (figure 10). Le graphe se compose de deux axes I et II, dont les pourcentages d'inertie respectifs sont 48,98 et 15,27%. Par conséquent, le plan I-II représente correctement l'ensemble des données. Nous distinguons trois nuages de points:

- a: regroupe tous les zymodèmes isolés de l'homme, exceptés Z1, Z7 et Z8.
- b: regroupe tous les zymodèmes isolés de l'animal, exceptés Z2 et Z8.
- c: regroupe les zymodèmes Z1, Z2, Z7 et Z8.

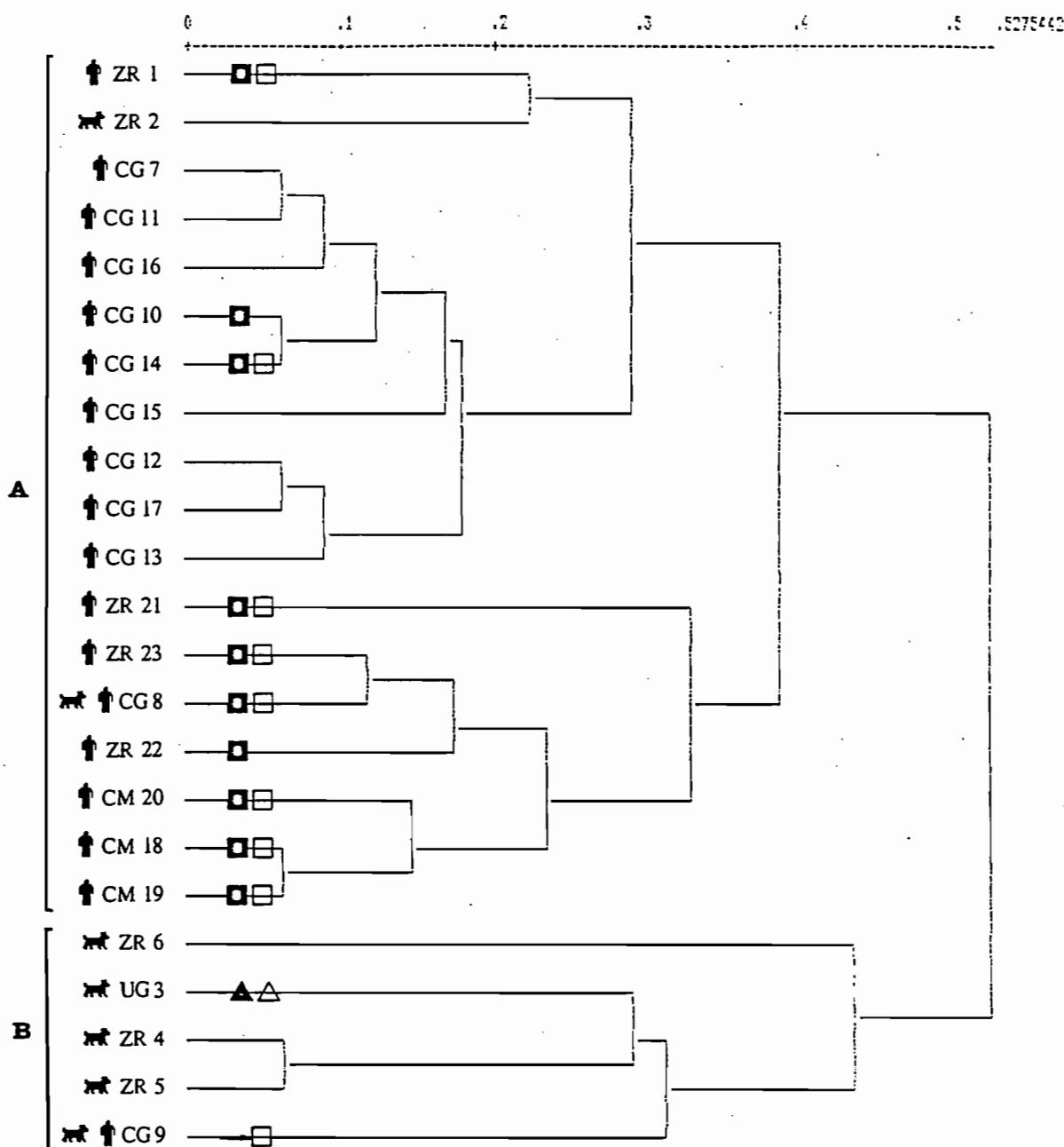


Figure 9: Dendrogramme résumant les distances phénétiques entre zymodèmes (indice de Jacquard). Sont indiqués successivement (a) l'hôte (schématisé par une figurine: ♂=homme, ♂=animal), (b) le pays d'isolement des stocks (CG= Congo, ZR= Zaïre, CM= Cameroun et UG= Ouganda), (c) les numéros de zymodèmes. Les zymodèmes comprenant des stocks de référence sont indiqués par un carré pour *T. b. gambiense* (carré plein si l'identification a été faite grâce aux isoenzymes, carré vide si l'identification a été faite grâce à des sondes d'ADN), par un triangle pour *T. b. brucei* (plein ou vide selon la méthode utilisée pour l'identification, voir plus haut). Nous avons distingué le groupe A du groupe B (voir texte).

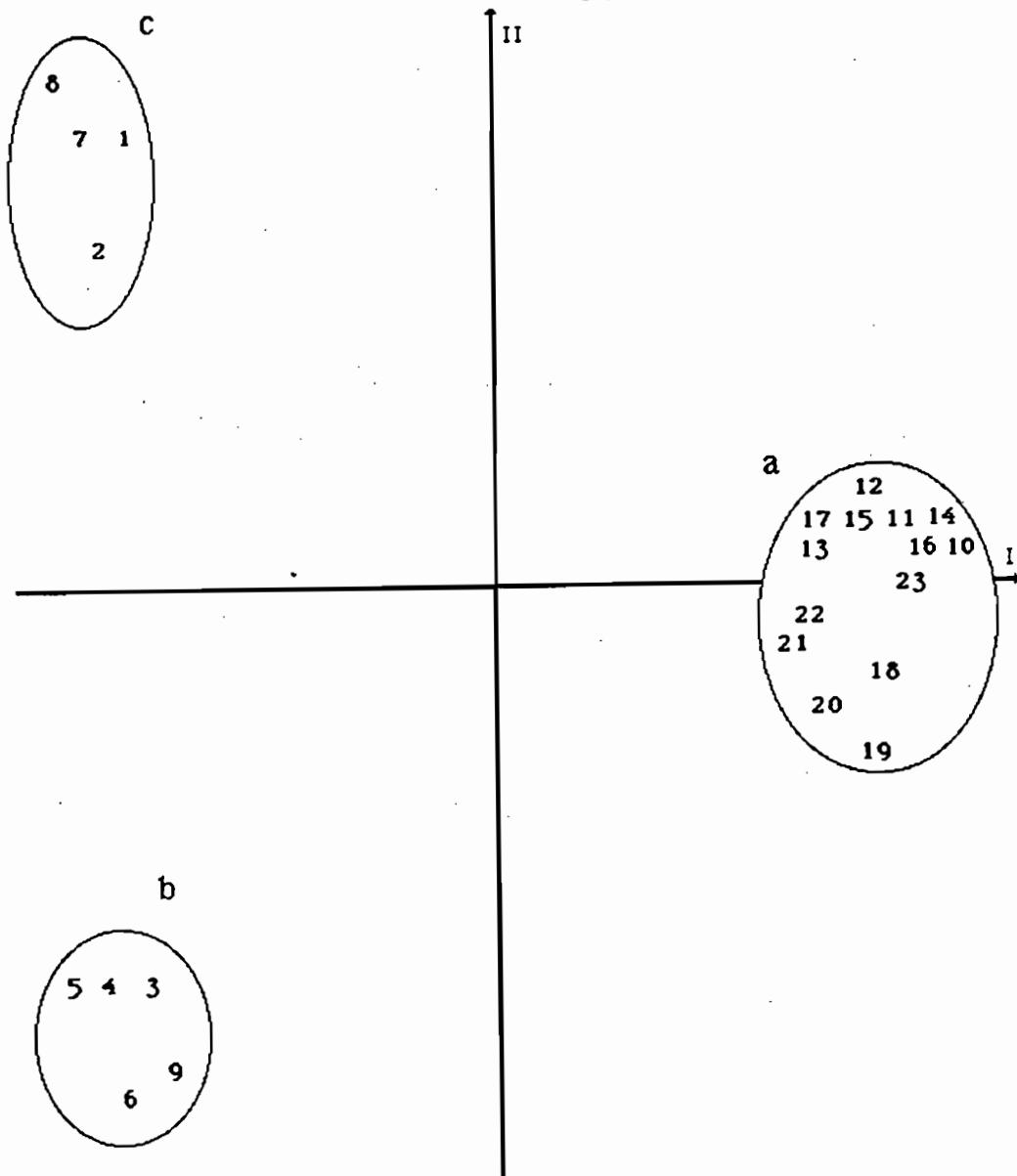


Figure 10: Analyse factorielle des correspondances. Axes I-II: les pourcentages d'inertie des axes I et II sont respectivement 48,98 et 15,27%. Le plan I-II apparaît comme une représentation satisfaisante des relations entre les différents zymodèmes. Les allèles constituent l'axe I. Certains loci présentant des profils multialléliques, ou multibandes (essentiellement *ALAT*, *SOD a* et *SOD b*), sont très discriminants sur l'axe II, du fait du système de codage des bandes utilisé (voir texte).

1-4 Comparaisons des différentes représentations graphiques

1) Corrélations entre les différents types de distances utilisés.

Les corrélations sont hautement significatives entre :

- distances pratistiques et distances génétiques (annexe 24):
 $R=0,779$, $p<10^{-4}$, d.d.l. = 152;
- distances génétiques et distances phénétiques (annexe 24):
 $R=0,823$, $p<10^{-4}$, d.d.l. = 152;
- distances phénétiques et distances pratistiques (annexe 25):
 $R=0,851$, $p<10^{-4}$, d.d.l. = 152.

Cette concordance très forte s'explique par le fait que ces différentes mesures de distances sont toutes basées sur des résultats expérimentaux similaires (électrophorèse d'isoenzymes avec échantillonnage d'un nombre important de loci).

2) En confrontant les données des différentes méthodes graphiques, nous distinguons finalement deux groupes: A (stocks majoritairement humains) et B (stocks majoritairement animaux). Pour cette série de données, les deux loci *SOD* sont "diagnostic": le groupe A est caractérisé par *SOD a II*, *SOD b III*, le groupe B est caractérisé par *SOD a I*, *SOD b I* ou *II*.

Deux types de stocks de référence sont inclus dans le groupe B, et définissent les zymodèmes suivants:

- Z3 : le stock EATRO 1125, étiqueté comme *T. b. brucei*, a été largement étudié par différents auteurs à l'aide de plusieurs méthodes (cf tableau I).
- Z9 : les stocks LIICL2 et FY ont été identifiés comme *T. b. gambiense* dans une seule publication, grâce à une seule méthode: des sondes ADN spécifiques (Noireau et al., 1989).

La présence de Z3 et de la majorité des stocks isolés de l'animal, stocks qui sont par ailleurs sensibles au sérum humain (cf tableau III), nous permet de supposer que ce groupe B correspondrait à la sous-espèce communément décrite comme *T. b. brucei*.

Dès lors, la présence de Z9 dans ce groupe est insolite. Le stock LIICL2 a été isolé du porc à Brazzaville en 1985. FY a été isolé d'un patient dont le lieu de résidence est incertain (cf tableau I). Nous ne disposons pas de plus amples renseignements sur ce stock. Il semble prudent de considérer l'identification de FY avec une certaine réserve. Nous ne pouvons pas exclure une possible erreur qui aurait pu intervenir pendant l'entretien sur rat de ce stock au Congo, par exemple un échange de cages. Ainsi, nous considérerons,

pour la suite de notre étude, que Z9 est représenté par un seul stock isolé de l'animal, LIICL2.

3) le groupe A rassemble, d'une part la majorité des zymodèmes isolés de l'homme, et d'autre part, un zymodème isolé de l'homme et de l'animal, Z8, ainsi qu'un zymodème isolé de l'animal, Z2. Ce dernier est inclus dans le groupe A uniquement dans le cas du dendrogramme construit avec les distances phénétiques. Dans toutes les autres représentations graphiques, Z2 se situe soit dans le groupe B, soit dans un troisième groupe, c (cf AFC).

Pour conclure ce chapitre, l'ensemble des stocks étudiés apparaît comme relativement hétérogène, les 55 stocks étant regroupés en 23 zymodèmes. Toutefois, nous distinguons un groupe principal, relativement homogène, qui pourrait répondre à l'acception classique de la sous-espèce *T. b. gambiense* et rassemblant la plupart de zymodèmes. Le second groupe réunit un nombre plus faible de zymodèmes isolés uniquement de l'animal, qui correspondraient à la sous-espèce classique *T. b. brucei*.

2) Etude du polymorphisme des fragments de restriction de l'ADNk (RFLP)

2-1 Profils de restriction

a) Pour l'enzyme *Hind* III

Nous présentons dans l'annexe 26 un exemple de profil de restriction obtenu pour les maxicercles digérés par *Hind* III. L'interprétation se base sur les cartes de restriction établies par Borst et Fase Fowler (1979). L'évaluation de la taille du fragment d'ADN linéarisé incluant la région variable, en kilobases nous a permis de distinguer 8 types différents, définissant 8 schizodèmes: A, B, C, D, E, F, G et H (tableau IX). La taille de ce fragment, pour les stocks étudiés, est comprise entre 7,8 et 10 kilobases, ce qui représente environ la moitié de la taille totale des maxicercles (20 kb). Le tableau X présente les différents stocks étudiés avec les schizodèmes correspondants.

b) Pour l'enzyme *ECO RI*

Un exemple de profil obtenu est présenté dans l'annexe 27. La taille du fragment incluant la région variable est comprise entre 9,8 et 12,25 kb (tableau IX). Les schizodèmes définis grâce à *Hind* III, sont corroborés par *ECO RI*, exceptés B et C d'une part, D et F d'autre part, qui présentent respectivement le même profil pour *ECO RI*.

2-2 Comparaison entre schizodèmes et zymodèmes par paires de stocks

L'ensemble des 22 stocks comparés par électrophorèse d'isoenzymes et polymorphisme des fragments de restriction de l'ADNk sont regroupés dans le tableau X. Nous constatons que la plupart des stocks se groupent dans des zymodèmes différents, répondent également à des schizodèmes différents. Cependant, les zymodèmes 7, 12 et 13, présentent le même profil de restriction (F). En général, les résultats de l'analyse isoenzymatique de cette étude sont corroborés par le RFLP, ce qui confirme les résultats obtenus par exemple pour *T. cruzi* (Tibayrenc et Ayala, 1988). Cette corrélation entre deux marqueurs génétiques est un cas particulier de déséquilibre de liaison (voir ci-après), très illustratif, car impliquant génomes nucléaire (isoenzymes) et extranucléaire (ADNk). Ceci plaide en faveur d'une reproduction principalement clonale des trypanosomes dans notre échantillonnage (Tibayrenc et Ayala, op. cit.). Par ailleurs, nos résultats indiquent que les isoenzymes semblent plus discriminants que l'analyse RFLP pour *T. brucei*, ce qui corrobore des travaux antérieurs (Gibson et al., 1985, Gibson, communication personnelle).

3) Analyses des tests impliqués dans l'étude du mode de reproduction des trypanosomes

3-1 Tests de ségrégation (à un locus donné)

Concernant l'équilibre de Hardy-Weinberg

Cet équilibre a été testé d'une part pour les 36 stocks isolés au Congo, et d'autre part pour l'ensemble des 55 stocks étudiés. Les comparaisons pour chaque génotype unilocus, entre effectifs observés et effectifs théoriques, ont été évaluées par le test du χ^2 pour des effectifs théoriques égaux ou supérieurs à 5, ou par le test FACTO (Tibayrenc et al., 1990), pour les effectifs théoriques inférieurs à 5. Ces tests s'appliquent classiquement dans des conditions proches de la sympatrie. Ces conditions ne sont pas observées de façon rigoureuse sur des zones géographiques étendues comme celles concernées par notre étude. Cependant, un contre-exemple pris chez une espèce sexuée, l'Homme, montre qu'au niveau de résolution génétique qui est celui de l'électrophorèse d'isoenzymes, les déviations par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg sont faibles même en cas d'allopatrie notable (Tibayrenc et al., sous presse). Il est donc acceptable de conduire les tests de Hardy-Weinberg dans notre échantillonnage, en gardant à l'esprit les biaisages possibles introduits par la

Tableau IX: Schizodèmes individualisés. Le nombre indique la taille, en kilobases, du fragment incluant la région variable. Les deux autres fragments obtenus sont de tailles respectives 5,8 et 3,6 pour *ECO R1*, 6,8 et 6 pour *HIND III* (cf annexes 26 et 27).

SCHIZOD.	<i>ECO R1</i>	<i>HIND III</i>
A	9,8	7,8
B	10,2	8,2
C	10,2	8,8
D	11,25	9
E	11	10
F	11,25	8
G	12,25	9,2
H	12	8,6

Tableau X: Profils zymodémiques et schizodémiques obtenus pour 22 stocks de *T. brucei*.

STOCKS	ZYM.	SCHIZ.
SH86	2	A
BOSENDJA	2 3	A
EATRO 1125	3	B
MBA	1	C
C126	2 2	D
SW161/87	5	E
SW1/87	5	E
SW2/87	5	E
SW3/87	5	E
SW4/87	5	E
SW94/87	5	E
BIH	7	F
BISSI	7	F
NITOUL	7	F
NSOUN	7	F
MABAYA	1 2	F
NGABELA	1 2	F
MINJA	7	F
MALOUNDA	1 3	F
MBOUL	1 3	F
PA	8	G
KIKOU	1 1	H

structuration géographique des populations (différences de fréquences alléliques). Les mêmes remarques s'appliquent aux tests de recombinaison.

1) Cas des stocks isolés au Congo

Les comparaisons sont significatives pour les 3 génotypes observés pour l'*ALAT*, pour les génotypes *1/2, 0/0* (homozygote pour l'allèle nul) de *ME 2*, pour le génotype *1/1* de *PGM*, et pour les 3 génotypes de l'*UGPP* (tableau XI). Ils mettent en évidence une déviation hautement significative par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Pour tous les autres loci (*ME 2, PGM, IDH* et *TDH*), les tests ne sont pas significatifs.

2) Cas de l'ensemble des stocks étudiés (Congo, Zaïre, Cameroun)

Les tests ont permis de mettre en évidence un déséquilibre pour les génotypes suivants (tableau XII): *ALAT 2/4, ALP 1/1 et 1/2, IDH 1/1, LAP 2/2, 1/1 et 1/2, ME 2 1/2, 0/0, 2/0 et 1/0, TDH 1/1, UGPP 1 1/1, 1/2 et 1/2*. Pour tous les autres génotypes aux différents loci, les résultats ne sont pas significatifs.

Les différences entre effectifs observés et théoriques à chaque locus (tableau XI et XII), montrent en général un excès d'hétérozygotes. Ceci est à l'opposé du déficit d'hétérozygotes (effet "Wahlund") normalement observé en cas d'isolement géographique des populations (Tibayenc et al., sous presse). L'hypothèse selon laquelle les déviations par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg dans notre échantillonnage serait dues à un isolement géographique est donc à rejeter. Les deux autres hypothèses permettant d'expliquer un tel excès seraient:

- soit une reproduction uniparentale;
- soit une sélection naturelle qui tendrait à sélectionner les stocks présentant des hétérozygotes, au détriment des autres.

Bien que la sélection puisse moduler la répartition des génotypes, il est peu probable qu'elle constitue une explication globale au tableau obtenu: en effet, si une sélection positive très énergique des hétérozygotes à un locus donné est une hypothèse acceptable, cette explication devient très lourde quand plusieurs loci sont impliqués, comme c'est le cas ici.

Cas particulier de l'"hétérozygotie fixée":

Nous observons que le zymodème 7 a été retrouvé dans plusieurs villages congolais (cf tableau VIII), dont certains sont éloignés les

Tableau XI: Tests d'équilibre de Hardy-Weinberg pour les stocks isolés au Congo. Sont indiqués successivement: (a) les loci enzymatiques, (b) les génotypes correspondants, (c) leurs fréquences observées (F. OBS.) et théoriques (F. THE.), (d) les effectifs observés (E. OBS.) et théoriques (E. THE.), (e) le test utilisé et (f) le résultat du test (CONCL.: dans le cas du χ^2 , si le test est significatif, le niveau de signification est de 0,05) avec S si le test est significatif ou NS si le test n'est pas significatif. Dans le cas où certains effectifs théoriques étaient inférieurs à 5, le test a été pratiqué en regroupant les petits effectifs en une seule catégorie. Le nombre de degré de liberté est: ddl = c-n avec c = nb de génotypes au locus étudié, n = nb d'allèles (Pasteur et al., 1987).

LOCUS	GENOT.	F. OBS.	F. THE.	E. OBS.	E. THE.	TEST	CONCL.
ALAT	<i>2I2</i>	0,17	0,28	6	10,08	χ^2	S
	<i>4I4</i>	0,11	0,22	4	7,92		
	<i>2I4</i>	0,72	0,5	26	18		
IDH	<i>1I1</i>	0,94	0,95	34	34,2	Facto.	0,73 NS
	<i>1I2</i>	0,06	0,06	2	2,16	Facto.	0,64 NS
	<i>2I2</i>	0	9.10-4	0	0,032	Facto.	1 NS
ME2	<i>1I2</i>	0,83	0,39	30	14,04	Facto.	6.10-8 S
	<i>1I1</i>	0,06	0,22	2	7,92	Facto.	0,9 NS
	<i>0I0</i>	0,11	0,012	4	0,43	Facto.	8,9.10-4 S
	<i>2I0</i>	0	0,092	0	3,31	Facto.	1 NS
	<i>1I0</i>	0	0,103	0	3,7	Facto.	1 NS
	<i>2I2</i>	0	0,17	0	6,12	Facto.	1 NS
PGM	<i>1I1</i>	0,06	0,003	2	0,108	Facto.	5,3.10-3 S
	<i>2I2</i>	0,94	0,88	34	31,68	Facto.	0,176 NS
	<i>1I2</i>	0	0,113	0	4,06	Facto.	0,1 NS
TDH	<i>1I1</i>	0,05	0,006	2	0,216	χ^2	NS
	<i>2I2</i>	0,89	0,84	32	30,24		
	<i>1I2</i>	0,05	0,15	2	5,4		
UGPP1	<i>1I1</i>	0	0,2	0	7,2	χ^2	S
	<i>1I2</i>	0,9	0,49	32	17,64		
	<i>2I2</i>	0,1	0,3	4	10,8		

Tableau XII: Tests d'équilibre de Hardy-Weinberg pour l'ensemble des stocks étudiés (Congo, Zaïre et Cameroun). Sont indiqués successivement: (a) les loci enzymatiques, (b) les génotypes correspondants, (c) leurs fréquences observées (F. OBS.) et théoriques (F. THE.), (d) les effectifs observés (E. OBS.) et théoriques (E. THE.), (e) le test utilisé et (f) le résultat du test (CONCL.: dans le cas du χ^2 , si le test est significatif, le niveau de signification est de 0,05) avec S si le test est significatif ou NS si le test n'est pas significatif. Dans le cas où certains effectifs théoriques étaient inférieurs à 5, le test a été pratiqué en regroupant les petits effectifs en une seule catégorie. Le nombre de degré de liberté est: ddl = c-n avec c = nb de génotypes au locus étudié, n = nb d'allèles (Pasteur et al., 1987).

LOCUS	GENOT.	F. OBS.	F. THE.	E. OBS.	E. THE.	TEST	CONCL.
ALAT	2I2	0,27	0,32	15	17,6	Facto.	0,8 NS
	4I4	0,11	0,17	6	9,35	Facto.	0,075 NS
	2I4	0,6	0,47	33	25,85	Facto.	0,035 S
	1I3	0,02	0,02	1	1,1	Facto.	0,369 NS
	2I3	0	0,011	0	0,605	Facto.	0,544 NS
	1I2	0	0,011	0	0,605	Facto.	0,544 NS
	1I1	0	0,0001	0	5,5.10-3	Facto.	0,994 NS
	3I3	0	0,0001	0	5,5.10-3	Facto.	0,994 NS
	3I4	0	0,008	0	0,44	Facto.	0,642 NS
ALP	2I2	0,93	0,86	51	47,3	Facto.	0,06 NS
	1I1	0,07	0,005	4	0,275	Facto.	1,7.10-4 S
	1I2	0	0,13	0	7,15	Facto.	4,8.10-4 S
G6PD	1I1	0,98	0,96	54	52,8	Facto.	0,242 NS
	2I2	0,02	0,0004	1	0,002	Facto.	0,22 NS
	1I2	0	0,04	0	2,2	Facto.	0,105 NS
IDH	1I1	0,94	0,94	52	51,7	Facto.	0,226 NS
	1I2	0,06	0,0009	3	3,3	Facto.	1,9.10-5 S
	2I2	0	0,0004	0	0,022	Facto.	0,978 NS
LAP	2I2	0,91	0,79	50	43,45	Facto.	0,013 S
	1I1	0,09	0,012	5	0,66	Facto.	5.10-4 S
	1I2	0	0,19	0	10,45	Facto.	.10-5 S
ME2	1I2	0,58	0,33	32	18,15	Facto.	7.10-5 S
	1I1	0,2	0,25	11	13,75	Facto.	0,09 NS
	0I0	0,22	0,048	12	2,64	Facto.	7,8.10-6 S
	2I2	0	0,108	0	5,94	Facto.	0,05 NS
	2I0	0	0,145	0	7,97	Facto.	1,8.10-4 S
	1I0	0	0,22	0	12,1	Facto.	1,16.10-6 S
	2I2	0,98	0,98	54	53,9	Facto.	0,369 NS
NHC	1I2	0,02	0,0004	1	2,2.10-2	Facto.	0,24 NS
	1I1	0	0,0001	0	5,5.10-3	Facto.	0,994 NS
	2I2	0,73	0,68	40	37,4	Facto.	0,09 NS
PGM	1I1	0,05	0,028	3	1,54	Facto.	0,131 NS
	1I2	0,22	0,28	12	15,4	Facto.	0,075 NS
	2I0	0,02	0,0004	1	2,2.10-2	Facto.	2,3 NS
6PGD	1I1	0,98	0,96	54	52,8	Facto.	0,242 NS
	1I0	0,02	0,0004	1	2,2.10-2	Facto.	2,3 NS
	1I0	0	0,04	0	2,2	Facto.	0,105 NF
TDH	2I2	0,91	0,86	50	47,3	Facto.	0,1 NS
	1I1	0,05	0,005	3	0,275	Facto.	0,003 S
	1I2	0,04	0,13	2	7,15	Facto.	0,05 NS
UGPP1	1I1	0	0,096	0	5,28		
	2I2	0,38	0,47	21	25,85	X2	7,81 S
	1I2	0,62	0,43	34	23,65		
UGPP2	1I1	0,98	0,98	54	53,9	Facto.	0,369 NS
	1I2	0,02	0,0004	1	2,2.10-2	Facto.	2,3 NS
	2I2	0	0,0001	0	5,5.10-3	Facto.	1 NS

uns des autres (par exemple, Kingoli qui se situe dans le Pool, à proximité de Mindouli, est distant d'environ 170 kms de Minga), comme le montre la figure 12. Ce zymodème 7 présente des hétérozygotes à 3 loci différents (*ALAT*, *ME 2* et *UGPP 1*). Cette "hétérozygotie fixée" (Tibayrenc et Ayala, 1988), cas particulier extrême de l'excès d'hérérozygotes évoqué précédemment, est un indicateur très classique de clonalité.

A propos de l'absence de certains génotypes unilocus

Mis à part le résultat brut des déviations par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg, l'observation des différents génotypes obtenus dans notre étude (tableaux XI et XII), indique l'absence totale de certains génotypes que nous aurions du observer dans le cas d'une reproduction sexuée libre. En effet, la loi de ségrégation des allèles à la méiose implique l'apparition de tous les génotypes recombinants dans la descendance, en accord avec les fréquences alléliques observées. Par exemple, au Congo, nous constatons l'absence totale des génotypes suivants: *ME 2* 2/2, 2/0, 1/0, et *UGPP 1* 1/1 (tableau XI). Ces génotypes n'ont pas été observés alors que leurs effectifs théoriques respectifs sont supérieurs ou égaux à 2.

En conclusion nous pouvons suggérer que les nombreux résultats, qui mettent en évidence un déséquilibre par rapport à la loi de Hardy-Weinberg, plaident en faveur d'une reproduction uniparentale des trypanosomes étudiés dans notre échantillonnage.

3-2 Tests de recombinaisons (entre loci)

En premier lieu, il n'est pas nécessaire d'utiliser des tests statistiques pour constater que le zymodème 8 (figure 11) est représenté, au Congo, en des points géographiquement distants. D'autre part, les stocks PEYA, N'GABELA et MABAYA, isolés au même endroit, N'gabé au Congo, à 9 années d'intervalles, sont regroupés dans un même zymodème Z12. Cette stabilité génétique dans l'espace et dans le temps, ainsi que l'ubiquité de Z8, sont en faveur d'une reproduction essentiellement clonale dans notre échantillonnage (Tibayrenc et al., 1990).

Tests sur la représentation excessive ou insuffisante de certains génotypes recombinants (Tibayrenc et al., 1990)

Le principe général des tests de recombinaison est basé sur l'hypothèse d'une reproduction sexuée libre, permettant des

recombinations ou des échanges génétiques randomisés entre populations, dans une aire géographique précise, ces populations ayant des fréquences unilocus connues. Nous distinguerons:

1) les tests combinatoires

2) les simulations de Monte Carlo: elles permettent de calculer la probabilité d'obtenir un génotype multilocus donné sur une série de 10.000 tirages aléatoires.

Soit, ces tests ne tiennent pas compte de la ploïdie du génome (xn), et ils utilisent alors les fréquences génotypiques observées à un locus donné (nombre de stocks présentant un génotype unilocus donné / nombre total de stocks), soit ils considèrent le génome comme diploïde ($2n$), et tiennent compte alors des fréquences alléliques (effectif d'un allèle donné / effectif allélique total). Dans ce cas, la probabilité d'obtenir un génotype multilocus donné est le produit des fréquences théoriques des génotypes unilocus qui le composent, calculées en fonction des fréquences alléliques observées; alors que dans les tests xn , cette probabilité est le produit des fréquences observées des génotypes unilocus qui composent le génotype multilocus. En règle générale, à nombre de loci égaux, les tests ($2n$) sont plus puissants que les tests (xn), car ils tiennent compte, non seulement de l'indépendance des loci (déséquilibre de liaison), mais aussi de l'équilibre de Hardy-Weinberg à chaque locus.

Les tests ont été effectués dans deux aires géographiques, le Congo et l'ensemble Congo-Zaïre-Cameroun. Grâce au programme TURBO (Tibayrenc et al., 1990), nous avons calculé plusieurs probabilités:

1) Quelle est la probabilité d'obtenir un génotype (hypothèse xn ou hypothèse $2n$) multilocus quelconque, avec un effectif observé égal ou supérieur à celui du génotype majoritaire Z7 de notre échantillon?

2) Quelle est la probabilité d'obtenir un nombre de génotypes différents égal ou inférieur au nombre effectivement observé dans notre échantillonnage?

3) Quelle est la probabilité d'obtenir autant ou davantage d'individus que le génotype le plus abondant dans notre échantillonnage (Z7 au Congo, Z7 ou Z5 pour Congo-Zaïre-Cameroun)?

Les résultats et les conclusions à ces trois questions sont regroupées dans le tableau XIII. Il apparaît que toutes les probabilités statistiques obtenues sont hautement significatives. En d'autres termes, les probabilités d'obtenir un génotype quelconque avec l'effectif du génotype majoritaire sont très faibles dans l'hypothèse

Tableau XIII: Tests sur la représentation excessive ou insuffisante de certains génotypes recombinants. Les probabilités calculées (1, 2 et 3) sont définies dans le texte. Sont indiqués successivement: (a) le numéro repérant la probabilité calculée (QUEST.), (b) l'aire géographique concernée par le test, (c) le numéro du zymodème (ZYMOD.) si nécessaire (voir texte), (d) le modèle de ploïdie du génome considéré (MODELE) et (e) le résultat obtenu (PROBA.).

QUEST.	AIRE	ZYMOD.	MODELE	PROBA.	CONCLUSION
1	CG		xn	10-3	SIGNIFICATIF
			2n	0	SIGNIFICATIF
1	CG+ZR+CM		xn	0	SIGNIFICATIF
			2n	0	SIGNIFICATIF
2	CG		xn	3 x10-4	SIGNIFICATIF
			2n	0	SIGNIFICATIF
2	CG+ZR+CM		xn	0	SIGNIFICATIF
			2n	4 x10-4	SIGNIFICATIF
3	CG	7	xn	9,17 x 10-3	SIGNIFICATIF
			2n	1,4 x 10-13	SIGNIFICATIF
3	CG+ZR+CM	7	xn	8,75 x 10-7	SIGNIFICATIF
			2n	4,2 x 10-18	SIGNIFICATIF
3	CG+ZR+CM	15	xn	9,38 x 10-18	SIGNIFICATIF
			2n	4,12 x 10-7	SIGNIFICATIF

d'une reproduction sexuée importante. Prenons un exemple: à la question n°1, nous pouvons répondre dans le cas du Congo, selon l'hypothèse (2n), que la probabilité étant nulle, il n'y a pas de génotype quelconque représenté 11 fois ou plus: il n'y a jamais un génotype quelconque répété 20 fois (nombre effectivement observé) après 10.000 tirages successifs.

Tests classiques de déséquilibre de liaison ou associations non aléatoires interlocus

Pour effectuer ces tests, nous avons codé les tableaux de phénotypes et de génotypes selon la méthode suivante (Tibayrenc et al., 1990):

Cas xn

- 1 pour le génotype le plus représenté
- 0 pour les autres

Cas 2n

- 2 pour l'homozygote de l'allèle le plus fréquent
- 1 pour les hétérozygotes de l'allèle le plus fréquent
- 0 pour le reste

Nous testons toujours la même hypothèse, à savoir la reproduction sexuée libre panmictique, dans deux aires géographiques, le Congo d'une part, l'ensemble Congo-Zaïre-Cameroun d'autre part, et selon les deux hypothèses précédemment citées (xn ou 2n). La question posée est la suivante:

Quelle est la probabilité (p) d'obtenir un déséquilibre de liaison égal ou supérieur à celui constaté dans l'échantillon?

Au Congo: nombre total de stocks=36

- xn) nb de loci=10, $p=0$ pour un déséquilibre de $2,04 \times 10^{-3}$
- 2n) nb de loci=6, $p=2,34 \times 10^{-2}$ pour un déséquilibre de $3,43 \times 10^{-4}$

Pour Congo+Zaïre+Cameroun:

- xn) N=55 nb de loci=16 $p=0$ pour un déséquilibre de $2,64 \times 10^{-3}$
- 2n) N=55 nb de loci=12 $p=0$ pour un déséquilibre de $2,39 \times 10^{-4}$

Conclusion à propos des déséquilibres de liaison

Des déséquilibres de liaisons considérables sont constatés par les différents tests. Par exemple, nous observons que le phénotype II pour *SOD a* est systématiquement associé au phénotype III pour

SOD b. Cette association inter-locus non aléatoire est en faveur d'une reproduction clonale des trypanosomes dans notre échantillonnage.

3-3 Conclusions taxonomiques et terminologiques à propos du mode de reproduction des trypanosomes dans notre échantillonnage

L'ensemble des tests révèle une structure fondamentalement clonale des populations naturelles de *T. brucei* dans notre échantillonnage, ce qui corrobore les résultats obtenus pour cette même espèce dans d'autres zones géographiques (Tibayrenc et al., 1990, Tibayrenc et al., sous presse). Les zymodèmes peuvent être assimilés à des clones naturels (ou des familles de clones étroitement apparentés) stables dans l'espace et dans le temps. Nous considérons ces clones naturels comme des unités taxonomiques, c'est-à-dire des unités génétiques de base, dont nous devons maintenant considérer la répartition géographique, avec les corollaires épidémiologiques qui en découlent.

4) Répartition géographique des zymodèmes et corollaires épidémiologiques

4-1 Cas général

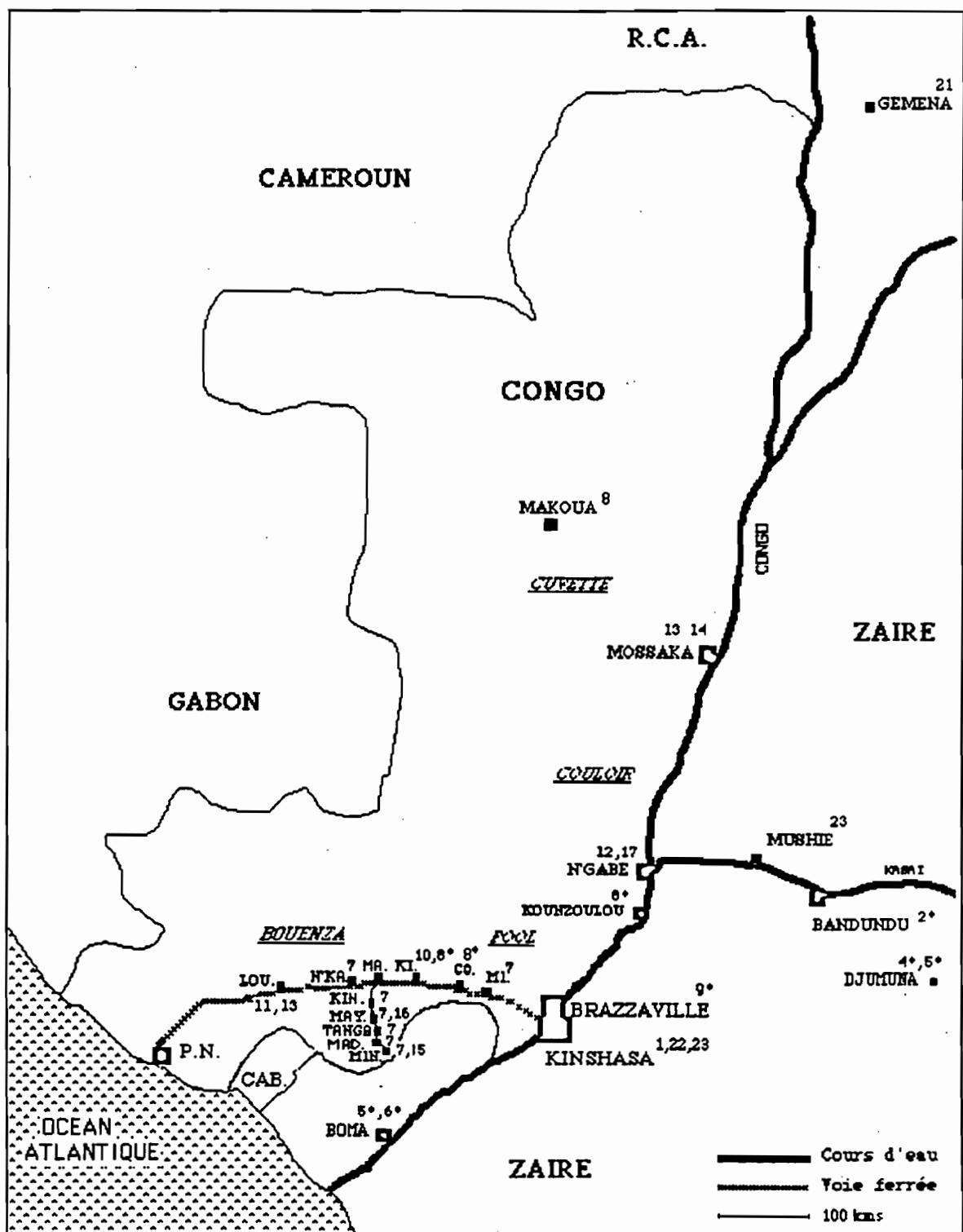
La distribution géographique des zymodèmes est représentée pour le Congo et le Zaïre à la figure 11, et à la figure 12 pour la région séparant Mindouli de Loubomo au Congo.

La figure 11 montre que la distribution des zymodèmes se fait le long des axes principaux de communication: les fleuves (le Congo et le Kasaï), les axes routiers (route principale Brazzaville/Pointe Noire et route secondaire Madingou/Minga) et l'axe ferroviaire.

Ceci pourrait être imputable, en premier lieu, à la répartition démographique des populations, aussi bien au Congo qu'au Zaïre. En effet, connaissant le mode de transmission péridomestique de la maladie, il est logique de constater que la répartition des zymodèmes est "superposable" à la répartition des principales agglomérations, celles-ci étant situées le long des cours d'eau, ou le long des rares axes routiers ou ferroviaire. Notons que l'axe principal reliant Brazzaville à Pointe Noire, qui est un lieu d'intense circulation humaine, comporte seulement une route, non revêtue pour sa plus grande part, et une seule voie ferrée.

Dans un second temps, il n'est pas surprenant de constater une telle répartition des zymodèmes le long des fleuves, car les principaux vecteurs, à savoir les glossines du groupe *palpalis* sont étroitement

Figure 11: Répartition géographique des zymodèmes individualisés au Congo et au Zaïre. Les zymodèmes sont numérotés en chiffres romains, suivis d'une astérisque * s'ils regroupent des stocks humains et animaux. Seul Z3, dont le stock de référence EATRO 1125 a été isolé en Ouganda, n'apparaît pas sur la carte. La région séparant Loubomo de Mindouli au Congo, est détaillée dans la figure 26. Les abréviations utilisées pour le repérage des villes, villages ou pays sont les suivantes: CAB = Cabinda, CO = Comba, KI = Kinzaba, KIN = Kinsaka, Lou = Loudima, MA = Madingou, MAD = Madiadia, MAY = Mayanama, MI = Mindouli, MIN = Minga, N'KA = N'Kayi, P.N. = Pointe Noire et R.C.A. = République Centrafricaine.



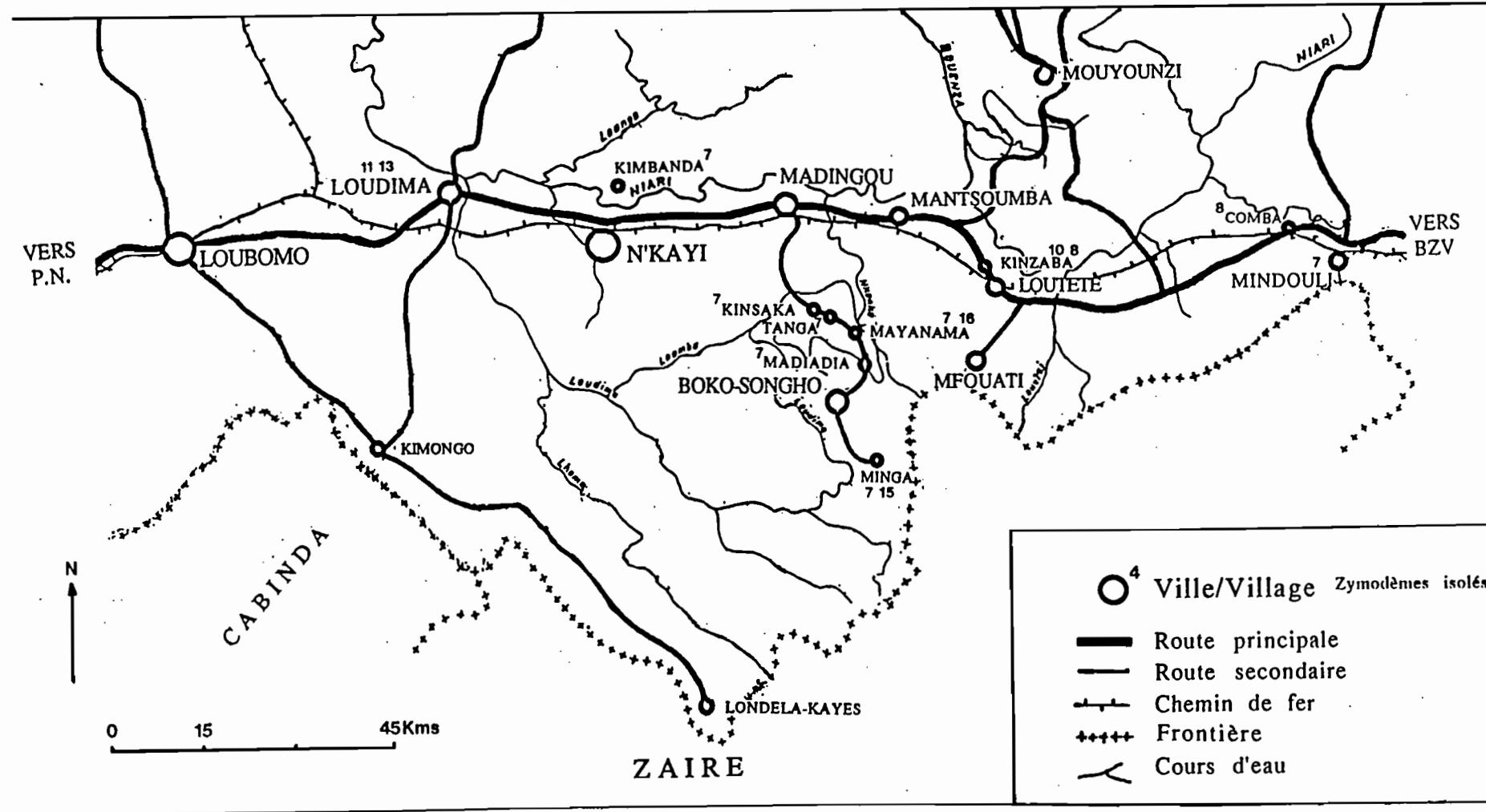


Figure 12: Répartition géographique des zymodèmes individualisés au Congo dans le foyer de la Bouenza. Mindouli est la limite entre le foyer historique du Pool centré autour de Brazzaville, et le foyer de la Bouenza (voir figure 11).

inféodés à l'eau. Notons à ce sujet que des stocks appartenant à des zymodèmes identiques semblent pouvoir être transmis par des glossines différentes (par exemple Z13 est présent à Mossaka dans une région où vivent des glossines de l'espèce *fuscipes*, mais aussi à Loudima où ne vivent que des glossines de l'espèce *palpalis*). Il ne semble pas exister, au Congo, de spécificité vectorielle des stocks de *T. brucei*.

La distribution des zymodèmes ne semble pas aléatoire. Même si nous retrouvons un zymodème donné en plusieurs points géographiquement distants (Z8 présent à Makoua et à Comba, Z13 à Mossaka et Loudima, Z5 à Djumuna et à Boma, Z7 à Minga et à Mindouli), la majorité des zymodèmes apparaît inféodée à des aires géographiques précises. Ainsi, Z14 n'a été échantillonné qu'à Mossaka, Z23 à Mushie, Z4 à Djumuna, Z15 à Minga, Z20 à Fontem. Ceci semble confirmer le caractère endémique de la T.H.A. dans cette partie de l'Afrique.

D'autre part, la présence d'un même zymodème en des points géographiquement éloignés, ne peut s'expliquer par le déplacement de l'insecte vecteur, sauf cas accidentel mais peu probable (une glossine peut toujours être transportée involontairement dans une automobile, dans un train ou sur un bateau). Il est aussi peu probable qu'un même zymodème soit généré à des points très distants les uns des autres par convergence à partir d'un ancêtre commun. L'hypothèse la plus parcimonieuse est la dispersion des zymodèmes par l'homme ou l'animal:

Dispersion des trypanosomes par l'homme

Le caractère endémo-épidémique de la T.H.A. au Congo, défini sur des bases épidémiologiques (cf Généralités § 1-2-2), est corroboré par notre étude. En effet, si nous confirmons l'aspect endémique de maladie du sommeil au Congo, au Zaïre et au Cameroun (voir paragraphe précédent), la dispersion de certains zymodèmes reflèterait l'aspect épidémique. La distribution d'autres zymodèmes, comme par exemple Z13 à Loudima et à Mossaka, ou Z8 à Comba et à Makoua, s'explique par la circulation humaine, très importante le long des axes principaux de communication. Cette hypothèse est rendue plausible par l'asymptomatisme de la T.H.A., qui est une donnée connue dans cette aire géographique. En effet, les trypanosomés asymptomatiques, inconscients du danger qu'ils représentent en tant que réservoir potentiel de trypanosomes, disséminent, à l'occasion d'un déplacement professionnel ou personnel, les stocks de trypanosomes dans tous le pays. L'exemple que nous avons choisi pour illustrer cette hypothèse est celui de Z7:

4-2 Cas du zymodème 7: notion de microfoyer de T.H.A. au Congo

1) Considérations générales

Z7 a été identifié de Minga (région de la Bouenza) à Mindouli (région du Pool) au Congo (cf figure 12), uniquement chez l'homme. Sa répartition semble définir ainsi les limites d'un micro-foyer à caractère épidémique, qui est en fait inclus dans le foyer principal, ici le foyer de la Bouenza, essentiellement endémique. Le profil isoenzymatique de Z7 est spécifique de stocks humains isolés en 1989. Nous savons que les galeries forestières sont en étroite communication entre Minga et Kinsaka (cf annexe 2, et Généralités § 1-2-2). D'une part, la libre circulation des glossines ripicoles du groupe *palpalis* peut expliquer en partie la dissémination de Z7 entre par exemple Tanga et Kinsaka, qui sont des villages très proches l'un de l'autre. D'autre part, c'est le déplacement de malades asymptomatiques qui pourrait rendre compte de la dissémination de Z7, soit dans d'autres agglomérations du microfoyer de Minga, ou du foyer de la Bouenza (par exemple Kimbanda), soit dans un foyer limitrophe comme le Pool (par exemple à Mindouli). Cette interprétation dépend essentiellement des barrières naturelles entre les microfoyers, et *a fortiori*, entre les foyers. Si un stock appartient au même zymodème que le zymodème majeur identifié pendant une épidémie, et qu'il a été isolé en un lieu séparé du foyer d'origine par des barrières naturelles (distances importantes, absence de communication entre galeries forestières, dépassement du "rayon d'action" des glossines), ce stock devrait être considéré comme ponctuellement introduit par l'homme, et non pas comme une preuve de l'extension géographique du foyer d'origine (cas de Z7 à Mindouli dans la région du Pool).

Remarque:

C'est l'actuelle "bouffée" épidémique dans le foyer de Minga et son accès aisément accessible qui expliquent notre choix de prospection, et ainsi l'importance de l'échantillonnage effectué dans cette région. Nous ne disposions pas des moyens nécessaires, en temps et en fonds, pour envisager un tel échantillonnage dans les autres foyers de trypanosomiase au Congo. En particulier, il eût été instructif de pouvoir effectuer comparativement une telle "micro-étude" épidémiologique sur le foyer de la Cuvette. Situé autour de Mossaka, dans le nord du pays, ce foyer historique est, lui aussi,

actuellement en pleine recrudescence (Jannin, communication personnelle), et se trouve lui, très isolé du reste du pays.

4-3 A propos des autres foyers de T.H.A. au Congo

Notre échantillonnage est faible en ce qui concerne les autres foyers de T.H.A. au Congo. Cependant, il confirme d'une manière générale, le caractère endémique de la maladie par la localisation spécifique des zymodèmes individualisés. D'autre part, le zymodème Z8 regroupe des stocks humains (PA et OK), et des stocks animaux (TB 26 et D12K). Ceci confirme, pour D12K, les résultats de Scott et al. (1983), qui décrivent D12K comme appartenant à la sous-espèce *T. b. gambiense* par son profil isoenzymatique, et sa haute résistance au sérum humain. Nous pouvons donc dire que des stocks génétiquement identiques ou très apparentés circulent à la fois chez l'homme et chez l'animal. Il est impossible d'affirmer que ces stocks TB 26 et D12K sont pathogènes chez l'homme, ce que seule pourrait confirmer l'inoculation expérimentale à des volontaires. Et même si cela était réalisable en laboratoire, il n'est pas évident que cela soit reproductible dans les conditions naturelles. Nous ne pouvons avoir que de fortes présomptions, et supposer que ces stocks, isolés de l'animal et génétiquement identiques à d'autres stocks isolés de l'Homme, sont potentiellement infectants pour l'homme. Quoiqu'il en soit, la rareté, voire l'absence des infections à *T. brucei* chez le bétail domestique au Congo, contrairement aux prévalences constatées en Afrique de l'Ouest chez l'animal domestique (Gibson et al., 1978, Mehlitz et al., 1982, Mehlitz, 1986, Zillman et al., 1986), semble indiquer que le rôle du réservoir animal au Congo serait minime en période épidémique (Noireau et al., 1986).

Cas particulier du zymodème Z9

Z9 n'est représenté que par le stock LIICL2, isolé du porc à Brazzaville. Notre analyse isoenzymatique a permis de situer Z9 au sein du groupe B (ou b), groupe qui correspondrait à la sous-espèce classiquement dénommée *T. b. brucei*. Cette sous-espèce n'a jamais été décrite à ce jour au Congo, et LIICL2 a été au préalable identifié, par utilisation de sondes spécifiques d'ADN, comme appartenant à la sous-espèce *T. b. gambiense* (Noireau et al., 1989). Il est regrettable que le test de sensibilité au sérum humain n'ait pas été réalisé pour ce stock. Notre étude indique que ce stock LIICL2 est plus proche génétiquement de stocks animaux zaïrois que de stocks humains congolais (cf figures 7, 9 et 10). Ce résultat est donc contradictoire avec l'hypothèse que ces sondes utilisées par Noireau et al. (1989) soient spécifiques de stocks préférentiellement humains (sous-espèce classique *T. b.*

gambiense). Etroitement apparenté aussi au stock de référence EATRO 1125 (*T. b. brucei*), LIICL2 est probablement un stock non pathogène pour l'homme, qui a pu être importé du Zaïre au Congo. Les transactions commerciales étant nombreuses entre le Zaïre et le Congo (de nombreux bateaux relient, plusieurs fois par jour, Brazzaville et Kinshasa qui sont séparées uniquement par le fleuve Congo), il ne serait pas surprenant que ce porc d'origine "zaïroise", porteur asymptomatique de *T. b. brucei*, ait été acheté par l'entreprise congolaise qui régit la porcherie de Brazzaville où le stock a été isolé.

Remarque:

Aucun des animaux domestiques (porcs et moutons), examinés dans le foyer de Minga en 1989, ne présentaient de trypanosomes. Pourtant des travaux récents dans la région de la Bouenza, ont fait état d'une part d'une forte prévalence des infections à *Nannomonas* (95%), et d'autre part, d'une faible prévalence des infections mixtes à *Nannomonas* et *Trypanozoon*, surtout chez le porc (Noireau et al, 1986). De plus, les analyses des repas sanguins chez les glossines du groupe *palpalis* dans cette région, font état d'une faible anthropophilie (3%), et d'une forte préférence des glossines pour le porc (55,7% des repas sont pris sur ces animaux). Le rôle du porc comme réservoir de la T.H.A. dans ce foyer semble négligeable, le cycle Homme-Glossine-Homme suffit à expliquer l'épidémie qui y sévit actuellement. Nous remarquons par ailleurs, qu'à Kimbanda où nous n'avons trouvé qu'un seul malade trypanosomé (par Z7, voir figure 12), 26 moutons (sur 65) présentaient des infections à *Nannomonas*. Aucun des porcs examinés n'était infecté (cf Matériels et Méthodes § 1-4). Cette constatation suggère l'hypothèse d'une éventuelle compétition entre *T. congolense* et *T. brucei* chez leur vecteur commun ou chez l'animal domestique, mais nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

4-4 Cas du Zaïre

Comme au Congo, de nombreux zymodèmes sont spécifiques de leur lieu d'isolement, résultat compatible avec le caractère endémique de la T.H.A. en Afrique Centrale. Bien que les mouvements de populations soient fréquents entre le Zaïre et le Congo, et que leurs foyers de T.H.A. soient limitrophes, nous n'avons identifié aucun zymodème commun à ces deux pays. Selon notre interprétation, les zymodèmes Z1, Z21, Z22 et Z23, isolés de l'homme, font partie de notre groupe principal A. Ces stocks correspondraient à la sous-espèce classique *T. b. gambiense*. Les stocks animaux, appartenant aux zymodèmes Z4, Z5 et Z6 sont regroupés dans notre groupe B,

probablement rattachable dans une certaine mesure à la sous-espèce classique *T. b. brucei*. Cette hypothèse est renforcée par la sensibilité de ces stocks au sérum humain. Les animaux infectés ne présentent aucun symptôme clinique: ils seraient donc porteurs sains ou asymptomatiques. Les deux foyers principaux, le Bandundu (région de savane à *glossina fuscipes*) et Boma (région forestière à *glossina palpalis*), géographiquement isolés, ont pourtant un zymodème commun, Z5. Comme nous l'avons dit pour le Congo, il ne semble pas y avoir non plus de spécificité vectorielle des zymodèmes au Zaïre. Ce Z5 a pu être disséminé d'un foyer vers l'autre à l'occasion, sans doute, du transfert d'un animal infecté. A priori, l'analyse isoenzymatique ne nous permet pas de distinguer clairement la plupart des stocks animaux isolés au Zaïre (vraisemblablement non pathogènes chez l'homme), du stock animal SH86, résistant au sérum humain, qui définit Z2. En effet, Z2 est aussi proche génétiquement de stocks du groupe A que de stocks du groupe B (cf figures 7 et 9).

Cas particulier de Z2: rôle du réservoir animal au Zaïre

Z2 est très proche génétiquement de Z1, qui est défini par le stock de référence MBA, isolé de l'homme, et étiqueté comme *T. b. gambiense* grâce aux isoenzymes et aux sondes d'ADN (Tait et al., 1984, Paindavoine et al., 1986, 1989). Cette similitude génétique (par exemple, la distance de Jacquard entre Z1 et Z2 est égale à 0,22), est illustrée par les figures 8, 9 et 10. En particulier, le réseau de Wagner (figure 8), indique que Z1 et Z2 semblent assez proches entre eux. L'unique stock, isolé du mouton, appartenant à ce Z2 est SH86, qui est par ailleurs résistant au sérum humain (cf tableau III). Nous pouvons suspecter SH86 d'être un stock pathogène pour l'homme, avec toute la prudence déjà observée dans le cas des stocks animaux congolais (cf paragraphe précédent). L'existence d'un réservoir animal de T.H.A. au Zaïre est suspectée depuis longtemps, mais la présence de *T. b. brucei* l'est également (Kageruka et al., 1977, Makumyaviri et al., 1989). Alors qu'au Congo (excepté LIICL2), les stocks de *T. brucei* isolés de l'animal semblent systématiquement reconnus comme appartenant à notre groupe A, ce qui correspondrait à la sous-espèce classique *T. b. gambiense*. Au Zaïre, un marquage multigénique précis est absolument nécessaire en combinaison avec le test de sensibilité au sérum humain, afin de distinguer clairement les stocks animaux non pathogènes des stocks potentiellement pathogènes pour l'homme.

Dans le foyer de Bandundu, la présence de Z2 pourrait suggérer l'existence au Zaïre d'un réservoir animal dans le cycle de la T.H.A, dont l'importance semble moins négligeable qu'au Congo: les taux d'infections à *T. brucei* chez l'animal sont en effet notablement plus

élevés au Zaïre (16,5 % des porcs et 6,2 % des moutons) qu'au Congo (0,5 % de l'ensemble des animaux examinés).

4-5 Cas du Cameroun

Le faible échantillonnage étudié ici (seulement 4 stocks humains), ne nous permet pas de proposer des conclusions fermes quant à l'apport de notre étude à la compréhension de l'épidémiologie de la T.H.A. au Cameroun. La présence de Z19 à la fois dans le foyer de Bafia et de Campo (figure 4), pourrait cependant refléter également dans ce pays d'Afrique Centrale, l'importance du réservoir humain en tant que responsable de la dissémination de la maladie au delà des foyers d'origine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude isoenzymatique nous a permis de constater que l'espèce *T. brucei* est relativement homogène dans cette partie de l'Afrique, par rapport à d'autres espèces de trypanosomes comme par exemple *T. cruzi*. Cependant, nous avons pu distinguer deux groupes principaux de stocks:

- le premier regroupe les stocks humains et trois stocks animaux, et peut être considéré comme un représentant de la sous-espèce classique *T. b. gambiense*, agent de la maladie du sommeil en Afrique Centrale et en Afrique de l'Ouest.
- le second rassemble les stocks animaux considérés comme non pathogènes chez l'homme, qui correspondent à la sous-espèce classique *T. b. brucei*.

Cette analyse est, dans ses grandes lignes, en accord avec la taxonomie connue.

L'analyse statistique des résultats isoenzymatiques montre que la reproduction des trypanosomes est essentiellement clonale dans notre échantillonnage. Les échanges génétiques semblent limités entre les populations de trypanosomes. Par conséquent, ceci implique que:

- les zymodèmes sont assimilables à des clones naturels ou à des groupes de clones étroitement apparentés, stables dans l'espace et dans le temps (Tibayrenc et Ayala, 1988);
- ces clones naturels sont les unités taxonomiques à considérer dans les recherches médicales (en particulier épidémiologiques). La situation serait différente pour un autre parasite, *Plasmodium falciparum*, chez lequel on a postulé un modèle de reproduction quasi-panmictique (Walliker, 1985). Selon un tel modèle, il est vain de distinguer au sein de l'espèce des "souches", c'est-à-dire des entités génétiques discrètes: les zymodèmes de *falciparum* ne sont alors que de simples variants individuels, sans aucune valeur taxonomique.

La génétique des populations offre l'espoir d'assoir l'épidémiologie de la THA sur de nouvelles bases. Par rapport à l'approche développée dans le présent travail, des progrès devront être obtenus sur les points suivants:

-échantillonnage de stocks plus important et plus diversifié, en essayant de perfectionner les techniques d'isolements "in vitro" de stocks utilisables sur le terrain;

- augmentation de la résolution du sondage génétique, en essayant de minimiser le biaisage du à la subculture, par utilisation d'autres techniques (PCR par exemple);
- perfectionnement des méthodes statistiques de génétique des populations, permettant de cerner plus finement l'impact d'une recombinaison sexuée à bas bruit sur le devenir des clones, et la diffusion des génotypes d'un point à un autre (évaluation statistique de la notion d'ubiquité des clones).

L'importance du réservoir humain asymptomatique, principal responsable passif de la persistance de la maladie à l'état endémique, et le caractère endémo-épidémique de la T.H.A. en Afrique Centrale (localisation géographique limitée de certains clones et ubiquité d'autres clones), nécessitent impérativement le dépistage de toute la population, qui vit dans des foyers endémiques, *a fortiori* pendant les périodes épidémiques.

Même si l'importance du réservoir animal domestique semble plus minime au Congo qu'au Zaïre, il ne doit pas être sous-estimé dans les deux cas (zymodèmes rassemblant stocks humains et animaux) aussi bien au Congo qu'au Zaïre, mais au contraire considéré comme un paramètre non négligeable, pouvant être responsable du maintien à bas bruit de la maladie pendant les périodes inter-épidémiques (Noireau et al., 1986). En ce sens, il est primordial de continuer l'examen systématique des élevages domestiques en zone d'endémie sommeilleuse.

Si l'Histoire indique que l'apparition des premières épidémies décrites de T.H.A. au Congo et au Zaïre s'est faite en des lieux géographiquement très proches les uns des autres (le long du fleuve Congo), au même moment (vers 1885), l'origine de la T.H.A. se situe certainement bien avant. Il est probable que la T.H.A. a la même origine ancestrale aussi bien au Congo qu'au Zaïre, et que les voies de communications naturelles (les fleuves), puis que l'apparition des routes et autre voie ferrée, a favorisé l'expansion de la maladie grâce en partie à la circulation des glossines, mais surtout au déplacement des malades trypanosomés asymptomatiques. Enfin, l'isolement géographique de la plupart des agglomérations entre elles aurait favorisé la persistance de la maladie à l'état endémique.

A l'avenir, nous souhaitons pouvoir continuer nos recherches en généralisant ce type d'études à la majorité des pays d'Afrique Centrale touchés par la THA. En ce sens, nous espérons pouvoir contribuer à des programmes de recherche pluridisciplinaires

comme celle qui est présentée ici, illustrant une collaboration exemplaire entre des équipes de terrain et des laboratoires de référence.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anez N., 1982 - Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 27, 405-415.

Babiker E. A. & Le Ray D., 1981 - Adaptation of low virulence stocks of *Trypanosoma brucei gambiense* to rat and mouse. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 61, 15-29.

Benzecri J. P., 1982 - L'analyse des données, vol. I, la taxonomie. Dunod, Paris, 635 p..

Benzecri J. P., 1984 - L'analyse des données, vol. II, l'analyse des correspondances. Dunod, Paris, 632 p..

Bienen E. J., Hammadi E. & Hill G. C., 1980 - Initiation of trypanosome transformation from bloodstream trypomastigotes to procyclic trypomastigotes. J. Parasitol., 66, 4, 680-682.

Borst P. & Fase Fowler F., 1979 - The maxi-circle of *Trypanosoma brucei* kinetoplast DNA. Biochem. Biophys. Acta, 610, 197-210.

Borst P. & Hoeijmakers J. H. J., 1979 - Structure and function of kinetoplast DNA of the African trypanosomes. In: Extrachromosomal DNA: ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology (Cunnings D.J., Borst P., Dawid I.B., Weissman S.M. and Fox C.F., eds.), vol.15, 515-531, Academic Press, New York.

Borst P., Fase Fowler F. & Gibson W. C., 1981 - Quantitation of genetic differences between *Trypanosoma brucei gambiense*, *rhodesiense* and *brucei* by restriction enzyme analysis of kinetoplast DNA. Mol... Biochem. Parasitol. 3, 117-131.

Borst P., Fase Fowler F., Frasch A. C. C., Hoeijmakers J. H .J. & Weijers P. J., 1980, a - Characterization of DNA from *Trypanosoma brucei* and related trypanosomes by restriction endonuclease digestion. Mol. Biochem. Parasitol., 1, 221-246.

Borst P., Fase Fowler F., Hoeijmakers J. H. J. & Frasch A. C. C., 1980, b - Variations in maxi-circle and mini-circle sequences in the kinetoplast DNAs from different *Trypanosoma brucei* strains. Biochem. Biophys. Acta, 610, 197-210.

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

Brun R. & Schönenberger M., 1981 - In: Parasitenkd., 66, 17-24.

Burke M., 1971 - Historique de la lutte contre la maladie du sommeil au Congo. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 51, 465-470.

Burke M., 1974 - Considérations au sujet de certains problèmes épidémiologiques, diagnostiques et cliniques sur la maladie du sommeil au Zaïre. Document Bureau Central de la Trypanosomiase, Kinshasa, Zaïre.

Cariou M. L., 1977 - Recherches sur le polymorphisme enzymatique du complexe *Jaera albifrons*, leach (Crustacé, Isopode). Thèse Sciences Paris VI.

Cibulskis R. E., 1988 - Origins and organization of genetic diversity in natural populations of *Trypanosoma brucei*. Parasitol., 96, 303-322.

Cunningham I., 1977 - New culture medium for maintenance of Tsetse tissues and growth of Trypanosomatids. J. Protozool., 21, 2, 325-329.

Dukes P., Kaukas A., Hudson K. M., Asongangui T. & Gashumba J. K., 1989 - A new method for isolating *Trypanosoma brucei gambiense* from sleeping sickness patients. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 83, 636-639.

Fairlamb A. H., Weislogel P. O., Hoeijmakers J. H. J. & Borst P., 1978 - Isolation and characterization of kinetoplast DNA from bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. J. Cell. Biol., 76, 293-309.

Felsenstein J., 1978 - The number of evolutionary trees. System. Zool., 27, 27-33.

Frézil J.L., 1983 - La Trypanosomiase humaine en République Populaire du Congo. Trav. Doc. ORSTOM N°155, Paris.

Frézil J. L., 1973 - Isolement de souches de *Trypanosoma brucei gambiense* en République Populaire du Congo. Conséquences pratiques et épidémiologiques. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasitol., XI, 3, 195-198.

Frézil J. L. & Carnevale P., 1976 - Utilisation de la carboglace pour la capture des glossines du groupe *palpalis* avec le piége Challier-Laveissière. Conséquences épidémiologiques. Rapp. final, 11ème Conf. Techn. OCEAC, Yaoundé, 25-27 mars 1976: 293-309 et Cah. ORSTOM sér. Ent. méd. Parasitol. XIV, 3, 225-233.

Frézil J. L. & Ginoux P. Y., 1980 - Trypanotolérance et thérapeutique. 13ème Conf. Techn. OCEAC, Yaoundé, 4-6 juin 1980, 305-307.

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 en relation avec l'épidémiologie. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasitol., XVII, 2, 107-118.

Geigy R., Jenni L., Kauffmann M., Onyango R. J., & Weiss N., 1975 - Identification of *Trypanosoma brucei*-subgroup strains isolated from game. Acta Tropica (Basel), 32, 190-205.

Gibson W. C., 1986 - Will the real *Trypanosoma brucei gambiense*, please, stand up. Parasit. Today, 29, 255-257.

Gibson W. C. & Gashumba J. K., 1983 - Isoenzyme characterization of some *Trypanozoon* stocks from a recent trypanosomiasis epidemic in Uganda. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 77, 114-118.

Gibson W. C. & Miles M. A., 1985 - Application fo new technologies to epidemiology. Br. Med. Bull. 41, 2 115-121.

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

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

Gibson W. C., Mehlitz D., Lanham S. & Godfrey D.G., 1978 - The identification of *Trypanosoma brucei gambiense* in Liberian pigs and dogs by isoenzymes and by resistance to human plasma. Tropenmed. Parasitol. 29, 335-345.

Gibson W. C., Osinga K. A., Michels P. A. M. & Borst P., 1985 - Trypanosomes of subgenus *Trypanozoon* are diploid for housekeepings genes. Mol. Biochem. Parasitol., 16, 231-242.

Gibson W. C. & Wellde B. T., 1985 - Characterization of *Trypanozoon* stocks from the South Nyanza sleeping sickness focus in Western Kenya. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 79, 671-676.

Ginoux P. Y. & Frézil J. L., 1980 - Recherche sur la latence clinique et la trypanotolérance humaine dans le foyer du Couloir du fleuve Congo. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasitol. XIX, 1, 33-40.

Godfrey D. G., 1979 - The zymodemes of trypanosomes. In: Problems in the identification of parasites and their vectors. Symp. Brit. Soc. Parasit. Taylor A.E.R., Muller R., eds *Blacwell Scientific Publ.*, Oxford, 17, 31-54.

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 enzymic variants within the subgenus *Trypanozoon*. Adv. Parasitol., 29, 1-39.

Godfrey D. G., Scott C. M., Gibson W. C., Mehlitz D. & Zillmann U., 1977 - Enzym polymorphism and the identity of *Trypanosoma brucei gambiense*. Parasitol., 94, 337-347.

Gottesdiener K., Garcia-Anoveros J., Gwo-Shuler M. & Van der Ploeg L. H. T. V., 1990 - Chromosome organization of the Protozoan *Trypanosoma brucei*. Mol. Cell. Biol., 10, 11, 6079-6083.

Gouteux J. P., Noireau F., Malonga J. R. & Frézil J. L., 1988 - Effet de case et contamination familiale dans la maladie du sommeil: essai d'interprétation du phénomène. Exemple de 3 foyers congolais. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 63, 5, 315-333.

Harris H. & Hopkinson D. A., 1976 - Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland Publishing, Amsterdam/Oxford.

Hawking F., 1976 - The resistance to human plasma of *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. II: Survey of strains from East Africa and Nigeria. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 70 513-520.

Heisch R. B., Mac Mahon J. P. & Manson-Bahr P. E. C., 1958 - The isolation of *Trypanosoma rhodesiense* from a bushbuck. Br. Med. J., 2, 1203-1204.

Henry M. C., Ruppol J. F. & Bruneel H., 1982 - Distribution de l'infection à *Trypanosoma brucei gambiense* dans une population du Bandundu en République du Zaïre. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 62, 301-313.

Hide G., Cattand P., Le Ray D., Barry J. D. & Tait A., 1990 - The identification of *Trypanosoma brucei* sub-species using repetitive DNA sequences. Molecul. and Biochem. Parasitol., 39, 213-226.

Hoare C. A., 1972 - The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 749 p..

Hubert W. J. & Lumsden W. H. R., 1976 - *Trypanosoma brucei*: a rapid "Matching" Method for estimating the host's Parasitemia. Exp. Parasitol. 40, 427-431.

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

Jenni L., Martin S., 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, London 322, 171-175.

Kabeya N. M., Pochet A. & Mandiangu M., 1988 - Evolution et épidémiologie des Trypanosomiases humaines africaines (THA) au Zaïre. Med. Trop., 48, 3, 277-283.

Kageruka P., Colaert I. & Ngimbi N. P., 1977 - Strain of *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei* isolated from pigs in Bas-Zaïre. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 57, 85-88.

Kaukas A., Gashumba J. K., Lanham S. M. & Dukes P., 1990 - The substitution of procyclic for bloodstream form *Trypanosoma brucei gambiense* in isoenzyme studies. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 84, 2, 242-245.

Kazumba G. L., 1979 - L'endémie sommeilleuse en République du Zaïre au cours des 25 dernières années (1952-1976). Méd. Afr. Noire, 26, 47-52.

Kilgour V., 1980 - The electrophoretic mobilities and activities of eleven enzymes of bloodstream forms and culture forms of *Trypanosoma brucei* compared. Mol. Biochem. Parasitol., 2, 51-62.

Kilgour V. & Godfrey D. G. - Species-characteristic isoenzymes of two aminotransferases in trypanosomes. Nature. London, 244, 69-70.

Kleine F. K., 1928 - Final report league of Nations International Commission on Human Trypanosomiasis, Geneva, 7-20.

Kooy R. F., Hirumi H., Moloo S. K., Nantulya V. M., Dukes P., Van der Lindin P. M., Duijndan W. A. L., Janse C. J. & Overdulve J. P., 1989 - Evidence for diploidy in metacyclic forms of Africans trypanosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 5469-5472.

Kreutzer R. D. & Christensen H. A., 1980 - Characterization of *Leishmania* spp. by isoenzyme electrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, 2, 199-208.

Kreutzer R. D. & Sousa O. E., 1981 - Biochemical characterization of *Trypanosoma* spp. by isozyme electrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30, 2, 308-317.

Kreutzer R. D., Semko M. E., Hendricks L. D. & Wright N., 1983 - Identification of *Leishmania* spp. by isoenzymes analysis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32, 4, 703-715.

Labusquière R., Dutertre J. & Gateff C., 1971 - Les Trypanosomiases humaines africaines. Encyclopédie Médico-chirurgicale, 8095, A10, 1-14.

Lance G. N. & Williams W. T., 1967 - A general theory of classifications systems. Computer, 59, 360-373.

Lancien J., 1981 - Description du piège monoconique utilisé pour l'élimination des glossines en République Populaire du Congo. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasitol., XIX, 4.

Lancien J., Eouzan J. P., Frézil J. L. & Mouchet J., 1981 - Elimination des glossines par le piégeage dans deux foyers de trypanosomiase

en République Populaire du Congo. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasitol., XIX, 239-246.

Lancien J., Molinier M., Carnevale P. & Frézil J. L., 1979 - Dynamique d'une population isolée de *Glossina fuscipes quanzensis* au Congo. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasitol., XVII, 2, 127-136.

Lanham S. M. & Godfrey D. G., 1970 - Isolation of salivarian trypanosomes from man and other animals using DEAE cellulose. Exp. Parasitol., 25, 521-534.

Lanham S. M., Grendon J. M., Miles M. A., Povoa M. M. & Almeida de Souza A. A., 1981 - A comparaison of electrophoretic methods for isoenzyme characterization of trypanosomatids. I: Standart stocks of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from Northeast Brazil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 5, 742-750.

Legendre L. & Legendre P., 1979 - La structure des données écologiques. Collection d'Ecologie. Masson, 2, 247 p..

Lester H. M. O. , 1933 - Ann. Torp. Med. Parasitol., 27, 361-395.

Le Ray D., 1975 - In: Ann. Soc. belge Méd. Trop., 55, p.159.

Levine N. D. & al., 1980 - A newly revised classification of the Protozoa. J. Protozool., 27, 1, 37-58.

Mac Kichan I. W., 1944 - Rhodesian sleeping sickness in Eastern Uganda. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 38, 49-60.

Magnus E., Vervoort T. & Van Merveinne N., 1978 - A card agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 58, 169-176.

Maillet L., 1956 - Carte de répartition des glossines de l'Afrique Equatoriale Française. ORSTOM éd..

Makumyaviri A. M., 1986 - Un apperçu de la répartition géographique de *Glossina* spp. (Diptera, Glossinidae) au Zaïre. Rev. Méd. Vét., 137, 107-109.

Makumyaviri A., Mehlitz D., Kageruka P., Kazyumba G. L. & Molisho D., 1989 - Le réservoir animal de *Trypanosoma brucei gambiense* au Zaïre: infections trypanosomiennes dans deux foyers du Bas-Zaïre. Trop. Med. Parasit., 40, 258-262.

Martin G., Le Boeuf R. & Roubaud E., 1909 - La maladie du sommeil au Congo Français, 1906-1908. Masson éd. Paris.

Massamba N. N. & Williams R. O., 1984 - Distinction of African Trypanosome species using nucleic acid hybridization. Parasitol., 88, 55-65.

Mehlitz D., Zilmann U., Scott C. M. & Godfrey D. G., 1982 - Epidemiological studies on the animal reservoir of *gambiense* sleeping sickness. 3: Characterization of *Trypanozoon* stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. Tropenmed. Parasit., 33, 113-118.

Mehlitz D., 1986 - Le réservoir animal de la maladie du sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense*. Etudes et synthèses de l'IEMVT. Ed. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), Eschborn, RFA, vol.16, 156 p..

Mihok S., Otieno L. H. & Darji N., 1990 - Populations genetics of *Trypanosoma brucei* and the epidemiology of human sleeping sickness in the Lambwe Valley, Kenya. Parasitol., 100, 219-233.

Miles M. & Ward R., 1978 - Preliminary isoenzymes studies on phlebotomines sandflies (*Diptera, Psychodidae*). Ann. Trop. Med. Parasitol., 35, 105-108.

Morel C., Chiari E., Plessmann Camargo E., Mattei D. M., Romanha A. J. & Simpson L., 1980 - Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6810-6814.

Murray M. & Paris J., 1979 - Diagnosis of African trypanosomiasis: the sensitivity of diagnostic techniques. ILRAD Research and Training Activities, Annual Report, p.37.

Nei M., 1972 - Genetics distances between populations. Amer. Natural., 106, 283-292.

Noireau F., Gouteux J. P. & Duteurtre J. P., 1987 - Valeur diagnostique du test d'agglutination sur carte (Testryp Catt) dans le dépistage de masse de la trypanosomiase au Congo. Bull. Soc. Path. Exot., 80, 731-740.

Noireau F., Gouteux J. P. & Frézil J. L., 1986, a - Sensibilité du test d'agglutination sur carte (Testryp Catt), dans les infections porcines

à *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* en République Populaire du Congo. Ann. Soc. belge Méd. trop., 66, 63-68.

Noireau F., Gouteux J. P., Toudic A., Samba F. & Frézil J. L., 1986, b - Importance épidémiologique du réservoir animal à *Trypanosoma brucei gambiense* au Congo. 1: Prévalence des trypanosomiases animales dans les foyers de maladie du sommeil. Trop. Med. Parasit., 67, 393-398.

Noireau F., Lemesre J. L., Gouteux J. P., Mpolesha-Kapiamba K. & Frézil J. L., 1988 - Epidémiologie et aspects évolutifs de la Trypanosomiase dans le foyer de la Shanga (Congo). Ann. Soc. belge Méd. trop., 68, 83-94.

Noireau F., Paindavoine P., Lemesre J. L., Toudic A., Pays E., Gouteux J. P., Steinert M. & Frézil J. L., 1989 - The epidemiological importance of the animal reservoir of *Trypanosoma brucei gambiense* in the Congo. II: Characterization of the *T. brucei* complex. Trop. Med. Parasitol., 40, 9-11.

OCEAC, 1990 - Relevé épidém. hebd.: N°50, 388-391.

Paindavoine P., Pays E., Laurent M., Geltmeyer Y., Le Ray D., Mehlitz D. & Steinert M., 1986 - The use of DNA hybridization and numerical taxonomy in determining relationships between *Trypanosoma brucei* stocks and sub-species. Parasitol., 92, 31-50.

Paindavoine P., Zampetti-Bosseler F., Coquelet H., Pays E. & Steinert M., 1989 - Different alleles frequencies in *Trypanosoma brucei brucei* and *T. b. gambiense* populations. Mol. Biochem. Parasitol., 32, 61-72.

Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J. & Britton-Davidian J., 1987 - Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. TEC et DOC (Lavoisier), Paris, 217 p..

Pays E., Dekkerck P., Van Assel S., Eldirdiri A. B., Le Ray D., Van Merveinne N. & Steinert M., 1983, e - Comparative analysis of a *Trypanosoma brucei gambiense* antigen family and its potential use in epidemiology of sleeping sickness. Mol. Biochem. Parasitol., 7, 63-74.

Pays E., Lheureux M., Vervoort T. & Steinert M., 1981 - Conservation of a variant-specific surface antigen gene in different trypanosome species and sub-species. Mol. Biochem. Parasitol., 4, 349-357.

Pays E., Van Assel S., Laurent M., Darville M., Vervoort T., Van Merveinne N. & Steinert M., 1983, b - Gene conversion as a mechanism for antigenic variation in trypanosomes. *Cell.*, 34, 371-381.

Pays E., Van Assel S., Laurent M., Dero B., Michiels F., Kronenberger P., Matthysse G., Van Meirvenne N., Le Ray D. & Steinert M., 1983, a - At least two transposed sequences are associated in the expression site of a surface antigen in different trypanosome clones. *Cell.*, 34, 359-369.

Pays E., Van Assel S., Le Ray D., Van Merveinne N., Mehltz D. & Steinert M., 1984 - Discrimination of the *Trypanosoma brucei gambiense* sub-species by molecular hybridization with specific cloned DNA probes. In: *New Approaches to the identification of Parasites and their vectors* (ed. B. N. Newton and F. Michal), pp 217-223. Basel: *Tropical Diseases Research Series*, Schwabe and Co. AG.

Pernin P., Cariou M. L. & Jacquier A., 1985 - Biochemical identification and phylogenetic relationships in freeliving Amoebas of the genus *Naegleria*. *J. Protozool.*, 32, 4, 592-603.

Prakash L., Lewontin R. C. & Hubby J. L., 1969 - A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 61, 841-868.

Richardson B. J., Baverstock P. R. & Adams M., 1986 - A handbook for animal systematics and population studies. *Academic Press*, 410 p..

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 W.H.O.*, 42, 911-916.

Ruppol J. F. & Kazyumba L., 1977 - Situation actuelle de la lutte contre la maladie du sommeil au Zaïre. *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 57, 299-314.

Schwartz P., 1963 - Méthodes statistiques à l'usage des médecins et biologistes. *Flammarion Médecine Sciences*, Paris, 318 p..

Scott C. M., Frézil J. L., Toudic A. & Godfrey D. G., 1983 - The sheep as a potential reservoir of human trypanosomiasis in the Republic of Congo. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77, 397-401.

Serres E. & Roux M., 1986 - Pratique de la classification automatique. L'exemple des *Leishmania*. *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. Coll. Int. CNRS/INSERM, 1984. IMEEE, Montpellier, 27-40.

Shapiro S. Z., Naessens J., Liesengang B., Molo S. K. & Magondi J., 1984 - Analysis by flow cytometry of DNA synthesis during the life-cycle of African trypanosomes. *Acta Tropica*, 41, 313-312.

Shaw C. R. & Prasad R., 1970 - Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Gen.*, 4, 197-320.

Sneath P. H. A. & Sokal R. R., 1973 - Numerical taxonomy. The principles and practices of numerical classification. *Freeman*, 573 p..

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

Steinert M., Van Assel S., Borst P. & Newton B. A., 1976 - Evolution of kinetoplast DNA. The Genetic function of mitochondrial DNA. C. *Saccone and A. M. Kroon*, editors. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 71-81.

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.

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

Tait A., Eldirdiri A. B. & Le Ray D., 1984 - Enzyme variation in *Trypanosoma brucei* ssp. I: Evidence for the sub-speciation of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Parasitol.*, 89, 311-326.

Tait A., Turner C. M. R. T., Le Page R. W. F. & Wells J. M., 1989 - Genetic evidence that metacyclic forms of *Trypanosoma brucei* are diploid. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 37, 247-256.

Tibayrenc M., 1979 - Les isoenzymes et l'Entomologie médicale. *Cah. ORSTOM* sér. Ent. méd. *Parasitol.*, XVII, 4, 249-256.

Tibayrenc M., 1986 - La variabilité isoenzymatique de *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas: signification génétique, taxonomique et épidémiologique. Thèse Doctorat d'Etat. Université de Paris-Sud.

Tibayrenc M. & Ayala F. J., 1988 - Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: Genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution, 42, 2, 277-292.

Tibayrenc M. & Miles M. A., 1983 - A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 77, 1, 73-83.

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 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 multyclonal 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., Kjellberg F., Arnaud J., Oury B., Brenière S. F., Dardé M. L. & Ayala F. J., 1991 - Are eucaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, sous presse.

Truc P., Mathieu-Daudé F. & Tibayrenc M., 1991 - Multilocus isozyme identification of *Trypanosoma brucei* stocks isolated from Central Africa: evidence for an animal reservoir of sleeping sickness in Congo. Acta Tropica, sous presse.

Van Hoof L. M. J. J., 1947 - Observations on trypanosomiasis in the Belgian Congo. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 40, 728-761.

Van Hoof L. M. J. J., Henrard C. & Peel E., 1942 - Irrégularités de la transmission du *Trypanosoma gambiense* par *Glossina palpalis*. Recl. Trav. Sci. Méd. Congo Belge, 1, 53-68.

Van Merveinne N., Janssens P. G. & Magnus E., 1975 - In: Ann. Soc. belge Méd. Trop., 55, 1-23.

Van Merveinne N., Magnus E. & Janssens P. G., 1976 - The effect of distinct antigenic type (Etat 1 to 12), isolated from a strain of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Ann. Soc. belge Méd. trop., 56, 53-63.

Van Merveinne N., Magnus E. & Vervoort T., 1977 - In: Ann. Soc. belge Méd. Trop., 57, 409-423.

Vickerman K. & Luckins A. G., 1969 - Localization of variable antigens in the surface coat of *Trypanosoma brucei* using ferritin-conjugate antibody. Nature, 224, 1125-1126.

Walliker D., 1985 - Characterization of *Plasmodium falciparum* of different countries. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 65, Suppl., 2, 69-77.

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

Wijers D. J. B., 1959 - Polymorphism in *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma rhodesiense* and the significance of intermediate forms. Ann. Trop. Med. Parasitol., 53, 1, 59-68.

Woo P. T. K., 1970 - The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. Acta Tropica, 27, 384-386.

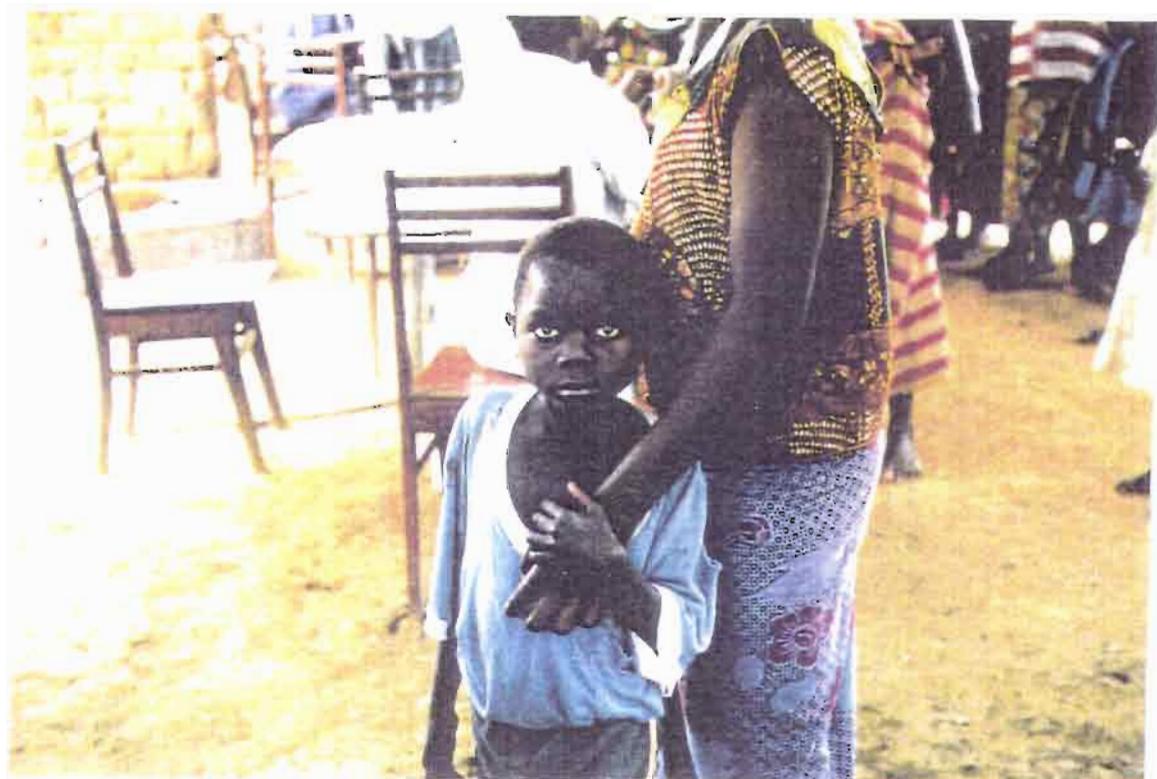
W.H.O., 1986 - Epidemiology and control of African trypanosomiasis. Report of a W.H.O. Expert Committee, Technical Report Series 739, World Health Organization, Geneva, 127 p..

Zillman U., Mehlitz D. & Sachs R., 1984 - Identity of *Trypanozoon* stocks & domestic dogs in Liberia. Tropenmed. Parasitol., 35, 105-108.

ANNEXES

ANNEXE I

L'oedème facial ou "faciès lunaire", caractéristique, est un signe clinique fréquent de la T.H.A.





Galeries forestières en communication, dans la région de savane de la Bouenza (Congo).

ANNEXE 3

Photo n°1 : Lieu principal de contamination. Situé à proximité du village (photo n°2), c'est le lieu de nombreuses activités quotidiennes des villageois (lavage du linge, jeux des enfants...)

Photo n°1

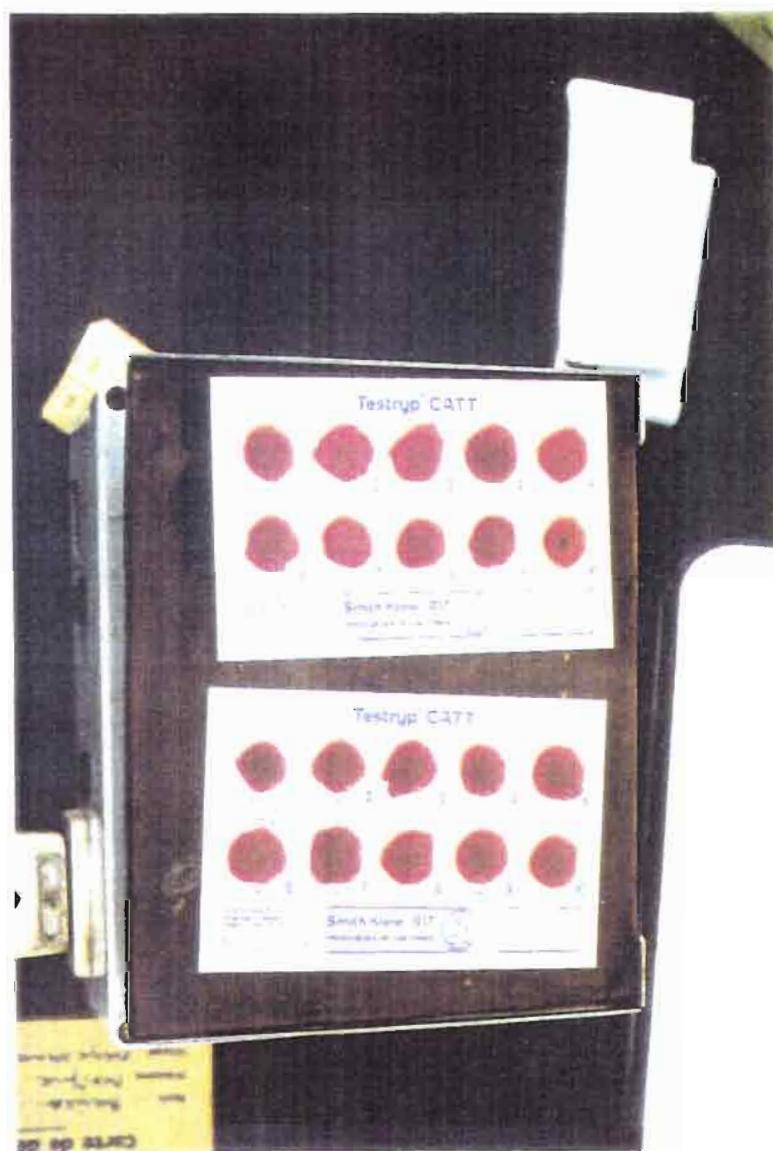


Photo n°2



ANNEXE 4

Test sérologique Testryp CATT (Magnus et al., 1978). Les réactions positives (présence d'agglutinats) emplacement n°2, 7, 9 et 10 sur la carte plastifiée du haut se distinguent facilement des réactions douteuses (n°1 de la plaque du bas) ou négatives (tous les autres emplacements).



ANNEXE 5

Prélèvement de sang à la queue chez le porc (photo n°1), ou à la veine de la patte postérieure chez le mouton (photo n°2).

Photo n°1



Photo n°2



ANNEXE 6

Trousse d'isolement de stocks de trypanosomies KIVI (Kit for In Vitro Isolation) (Le Ray et Aerts, communication personnelle).

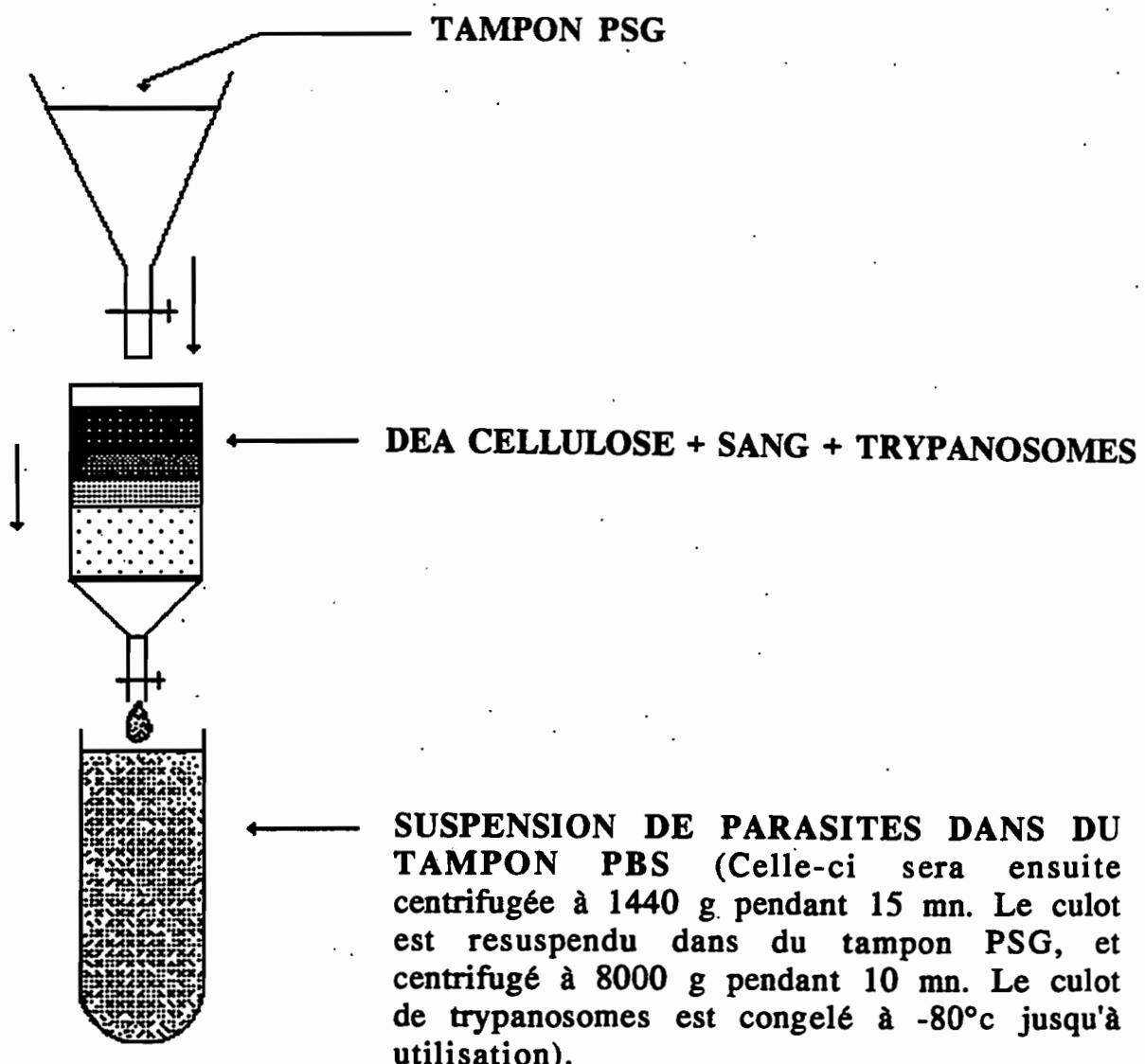


ANNEXE 7

Principe de la séparation des trypanosomes des cellules sanguines par la technique de colonne échangeuses d'ions DEAE Cellulose
 (Lanham et Godfrey, 1970)

C'est une élution sélective des trypanosomes à partir du sang parasité. Il s'effectue une rétention des éléments figurés (globules rouges, globules blancs et plaquettes), qui restent adsorbés aux particules de l'échangeur d'ions (cellulose), grâce à une différence de charge électrique.

- Solution PBS: NaCl 44 mM, NaH₂PO₄ 3 mM, Na₂HPO₄ 57 mM pH 8
- Solution PSG= 300 ml de solution PBS+200 ml H₂O+1% glucose pH 8



ANNEXE 8

Codes O.M.S. des stocks étudiés.

STOCKS	CODE O.M.S.	STOCKS	CODE O.M.S
BAKOU	MHOM/CG/89/BAKOU	D12 K	MOVS/CG/80/D12K
BALEM	MHOM/CG/89/BALEM	PA	MHOM/CG/75/ITMAP 1843
BALPA	MHOM/CG/89/BALPA	OK	MHOM/CG/74/OK
BISSI	MHOM/CG/89/BISSI	TB26	MSUS/CG/83/TB26
BIH	MHOM/CG/89/BIH	LIICL2	MOVS/CG/85/ORBZV 503
BOULA	MHOM/CG/89/BOULA	FY	MHOM/CG/85/ORBZV 113
DEMBA	MHOM/CG/89/DEMBA	MA	MHOM/CG/74/MA
DIANTETE	MHOM/CG/89/DIAN	PEYA	MHOM/CG/80/PEYA
DICAR	MHOM/CG/89/DICAR	C126	MHOM/ZR/71/C126
DIMONA	MHOM/CG/89/DIM	MBA (1811)	MHOM/ZR/74/ITMAP 1811
KIKOU	MHOM/CG/89/KIKOU	EATRO 1125	MTRG/UG/66/EATRO 1125
KOA	MHOM/CG/89/KOA	ALJO (1829)	MHOM/ZR/70/ITMAP 1829
MABAYA	MHOM/CG/89/MABAYA	KEMLO (1821)	MHOM/ZR/74/ITMAP 1821
MABIA	MHOM/CG/89/MABIA	BOSENDJA (1869)	MHOM/ZR/72/ITMAP 1869
MABOU	MHOM/CG/89/MABOU	SANE (1786)	MHOM/CM/76/ITMAP 1786
MALOUNDA	MHOM/CG/89/MAL	MOS (1787)	MHOM/CM/74/ITMAP 1787
MATSOUA	MHOM/CG/89/MATSOU	BIM (1789)	MHOM/CM/74/ITMAP 1789
MAZOUN	MHOM/CG/89/MAZ	JUA (1790)	MHOM/CM/74/ITMAP 1790
MBOUSSA	MHOM/CG/89/BOUSSA	SH/86	MOVS/ZR/86/SH 86
MBOULANG	MHOM/CG/89/MBOUL	SW1/87	MSUS/ZR/87/SW1 87
NITOUL	MHOM/CG/89/NITOUL	SW2/87	MSUS/ZR/87/SW2 87
MINJA	MHOM/CG/89/MINJA	SW3/87	MSUS/ZR/87/SW3 87
NGABE	MHOM/CG/89/NGABE	SW4/87	MSUS/ZR/87/SW4 87
NSOUNGUI	MHOM/CG/89/NSOUN	SH161/87	MOVS/ZR/87/SH 161 87
NSIMBA	MHOM/CG/89/SIMJ	SH109/87	MOVS/ZR/87/SH 109 87
SILOU	MHOM/CG/89/SILOU	SW94/87	MSUS/ZR/87/SW94 87
SANNA	MHOM/CG/89/SANNA	SW165/87	MSUS/ZR/87/SW165 87

ANNEXE 9

Noms et codifications des systèmes enzymatiques étudiés.

ABBREV.	IDENTIF	CODE
ALAT	Alanine amino transférase	E.C.2.6.1.2.
ALP	Alkaline phosphatase	E.C.3.1.3.1.
DIA	Diaphorase	E.C.1.6.**
GAPD	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	E.C.1.2.1.12.
GOT	Aspartate amino transférase	E.C.2.6.1.1.
GPI	Glucose phosphate isomérase	E.C.5.3.1.9.
G6PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase	E.C.1.1.1.49.
GSR	Glutathion réductase	E.C.1.6.4.2.
IDH	Isocitrate déshydrogénase	E.C.1.1.1.42
LAP	Leucine amino peptidase	E.C.3.4.11 OU 13.*.
MDH	Malate déshydrogénase	E.C.1.1.1.37.
ME	Enzyme malique	E.C.1.1.1.40.
NH	Nucléoside hydrolase	E.C.3.2.2.1.
PEP2	Peptidase (L Leucyl L alanine)	E.C.3.4.11 ou 13.*.
PGD	6-phosphogluconate déshydrogénase	E.C.1.1.1.44.
PGM	Phosphoglucomutase	E.C.2.7.5.1.
TDH	Thréonine déshydrogénase	E.C.1.1.1.103.
UGPP	Uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase	E.C.2.7.7.9.

ANNEXE 10

Liste des abréviations des produits chimiques utilisés pour les colorations spécifiques de l'électrophorèse.

ABBR.	NOM	FONCTION
DICP	DICHLOROPHENOL-INDOPHENOL	COLORANT
EDTA	ACIDE ETHYLENEDIAMINE-TETRA-ACETIQUE	COENZYME
G6PDH	GLUCOSE 6 PHOSPHATE DESHYDROGENASE	ENZYME DE LIAISON
INT	IODONITROTETRAZOLIUM	COLORANT
LDH	LACTATE DESHYDROGENASE	ENZYME DE LIAISON
MTT	METHYL THIAZOLYL BLUE	COLORANT
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	COENZYME
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Forme Reduite	COENZYME
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate	COENZYME
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Forme Reduite	COENZYME
NBT	NITRO BLUE TETRAZOLIUM	COLORANT
PMS	PHENAZYNE METHOSULFATE	COLORANT

ANNEXE 11

Protocole d'extraction de l'ADN kinétoplastique (ADNk).

a) Digestion des Protéines

- 1-Resuspendre le culot "sec"de trypanosomes (minimum 100 mg), dans 500 µl de tampon SE (Na Cl 0,1 M, Tris 0,01 M, EDTA 0,1 M pH 8,0), ajouter 1,5 ml de SE, homogénéiser, et transvaser dans un grand tube à fond conique .
- 2-Ajouter 33 µl/ml de Sarkosyl (détergent).
- 3-Ajouter 2,5 µl/ml de Protéinase K (enzyme protéolytique non spécifique très active).
- 4-Incubation 30 mn à 37°C.

b) Séparation ADNk/ADN nucléaire

- 5-Prendre une seringue de 5 ml et une aiguille 23 G/1,25. Enlever le piston, puis remplir le corps de la seringue avec le lysat de protéines. Presser énergiquement sur le piston, récupérer le liquide dans un tube à vis de 15 ml, cette phase a pour but de fragmenter l'ADN nucléaire.
- 6-Transvaser le liquide dans un tube Beckman à centrifuger. Centrifuger 60 mn à 10000 g.
- 7-Récupérer le surnageant (ADN nucléaire).
- 8-Resuspendre le culot dans 200 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,5) et transvaser dans un tube Eppendorf, laver l'ancien tube avec 300 µl de TE et le rajouter dans l'Eppendorf.
- 9-Centrifuger 30 mn à 6000 g.
- 10-Récupérer le surnageant , resuspendre le culot dans 200 µl de TE , bien homogénéiser.
- 11-Centrifuger 30 mn à 6000 g (renouveler l'opération, soit au total 3 rinçages).

c) Extraction de l'ADNk

- 12-Après le dernier rinçage, enlever le surnageant, et ajouter 200 µl de TE + 5 µl de RNase.
- 13-Mettre au bain-marie à 37°C pendant 30 mn.
- 14-Ajouter 2 µl de SDS 10% (Lauryl sulfate sels de sodium = détergent) et 5 µl de Protéinase K (20 mg/ml solution).
- 15-Incuber 30 mn à 37°C.
- 16-Ajouter Vol/Vol de Phénol*, homogénéiser au vortex, et centrifuger 1 mn à 6000 g.

*solvant organique captant les protéines et les polypeptides (inhibe les réactions enzymatiques).

ANNEXE 11 (suite)

- 17-Récupérer le surnageant avec précaution dans un tube Eppendorf, resuspendre le culot avec 100 µl de TE, homogénéiser au vortex, et recentrifuger 1 mn à 6000 g. Mettre le surnageant avec le premier.
- 18-Ajouter Vol/Vol de Chloroforme-isoamylalcool** dans le culot, homogénéiser au vortex, et centrifuger 1 mn à 6000 g.
- 19-Ajouter 1/10^e du volume d'acétate de Na 3,0 M ***, et 2,5 volume d'éthanol absolu, homogénéiser au vortex, mettre à - 20°C à précipiter toute la nuit.
- 20-Centrifuger 10 mn à 6000 g.
- 21-Retirer le surnageant.
- 22-Rajouter 500 µl d'Ethanol 70%, homogénéiser au vortex et centrifuger 10 mn à 6000 g.
- 23-Retirer complètement le surnageant (culot sec).
- 24-Resuspendre dans 50 à 100 µl de Tris 10 mM pH8, homogénéiser au vortex, laisser reposer une heure.

**(24:1 V/V) le chloroforme est un solvant organique dénaturant les protéines. L'isoamyl alcool facilite la séparation des phases aqueuse et organique. De plus, ce solvant capte le phénol.

*** permet d'ajuster la quantité de cations pour la précipitation de l'ADN.

ANNEXE 12

Publication acceptée dans Acta Tropica (mars 1991).

Acta Tropica, 00(1991)000-000
Elsevier

ACTROP 00143

N.B. These are uncorrected proofs.
Reproduction does not reflect
final printing quality.

Multilocus isozyme identification of *Trypanosoma brucei* stocks isolated in Central Africa: evidence for an animal reservoir of sleeping sickness in Congo

Philippe Truc, Françoise Mathieu-Daudé and Michel Tibayrenc

Laboratoire de Génétique des Parasites et des Vecteurs, ORSTOM, Montpellier, France

(Received 2 March 1990; accepted 27 November 1990)

Six Congolese and 3 Zairian *Trypanosoma brucei* stocks were studied by isozyme cellulose acetate electrophoresis. Twenty isozyme systems were used, of which only 5 showed variability. These 5 polymorphic systems made it possible to identify 5 different zymodemes. Zymodemes isolated from man were recorded both from pig and sheep too, which confirms the results of previous authors. This favors the existence of an animal reservoir of human African trypanosomiasis in the Congo, which could play a role in the transmission of the disease, at least by the maintenance of residual foci.

Key words: *Trypanosoma brucei*; Epidemiology; Strain characterization; Genetic interpretation

Introduction

The existence of an animal reservoir of human African trypanosomiasis has been established in Western Africa (Mehlitz, 1977; Mehlitz et al., 1982; Gibson et al., 1978, 1980; Godfrey et al., 1990). A similar situation was suspected for Central Africa, particularly in the Congo (Scott et al., 1983; Paindavoine et al., 1986; Noireau et al., 1989) by use of genetic markers (isozymes and DNA probes). But these data remain scanty due to the small number of stocks studied (only one stock was isolated from animals in the work by Scott et al., 1983). In this study, we present isozyme data on 9 stocks from Central Africa (3 from Zaire, 6 from the Congo). 21 loci are analysed by cellulose acetate electrophoresis. The results are compared with those obtained by previous authors (Tait et al., 1984; Paindavoine et al., 1986; Scott et al., 1983).

Material and Methods

Preparation of samples for electrophoresis:

The origin of the stocks is listed in Table 1. Primary isolates were intraperitoneally inoculated into Wistar rats, which made it possible to obtain 5×10^8 parasites/ml.

Correspondence address: Philippe Truc, Laboratoire de Génétique des Parasites et des Vecteurs, ORSTOM, 2051 Avenue du Val de Montferrand, BP5045, 34032 Montpellier Cedex, France.

ANNEXE 12 (suite)

2

TABLE I

Historical and geographical data about the stocks under study

Stock	Host	Country	Area	Year
TB26	pig	Congo	Kinzaba (Niari)	1983
LIICL2	pig	Congo	Brazzaville (Pool)	1985
D12K	sheep	Congo	Kounzoulou (Couloir)	1980
OK	man	Congo	Makoua (Cuvette)	1974
PA	man	Congo	Comba (Niari)	1975
FY	man	Congo	Mbiodia (Lekoumou)*	1985
1811	man	Zaire	Kinshasa	1974
1821	man	Zaire	Gemena	1974
CI26	man	Zaire	Kinshasa	1971

*Imported case from Bouenza area.

Parasites were separated from rat blood by passage through DEAE-cellulose columns (Lanham and Godfrey, 1970), and pellets of trypanosomes were obtained by centrifugation at 1440 $\times g$. Cells were mixed with an equal volume of enzyme stabilizer (Miles and Ward, 1978) and kept on ice for 20 min. Cells were then pelleted by centrifugation at 8000 $\times g$ and discarded. The supernatant was stored at -70°C.

Cellulose acetate electrophoresis:

Electrophoresis and staining procedures (see Tables 2 and 3), were adapted to African trypanosomes from the recipes of Cariou (1977), Kreutzer et al. (1980, 1981, 1983), Lanham et al. (1981), Richardson et al. (1986), Shaw and Prasad (1970), and Tibayrenc et al. (1985). The 20 enzyme systems studied are: AK (EC 2.7.4.3), ALAT (EC 2.6.1.2), ALP (EC 3.1.3.1), EST (EC 3.1.1.1), FK (EC 2.7.1.1), G6PDH (EC 1.1.1.49), GPI (EC 5.3.1.9), GAPD (EC 1.2.1.12), GOT (EC 2.6.1.1), GSR (EC 1.6.4.2), ICD (EC 1.1.1.42), LAP (EC 3.4.11 OR 13.*), MDH (EC 1.1.1.37), ME (EC 1.1.1.40), NH (EC 3.2.2.1), PEP2 (L-Leucyl-L-alanine EC 3.4.11 or 13.*), 6PGD (EC 1.1.1.44), PGM (EC 2.7.5.1), TDH (EC 1.1.1.103), and UGPP (EC 2.7.7.9). The Helena system was used for all experiments.

Results

The 20 enzyme systems made it possible to identify 21 putative genetic loci (NH exhibits the activity of two separate loci, NH1 and NH2). Of these 21 loci, 16 were monomorphic for the stocks under study: AK, ALP, EST, FK, G6PD, GAPD, GPI, GSR, LAP, MDH, ME, NH1, NH2, 6PGD, TDH and UGPP. The 5 variable loci were ALAT, GOT, IDH, PEP 2 and PGM. The variability of these 5 loci produced 5 different zymodemes, which are listed in Table 4.

In order to initiate population genetic studies on *Trypanosoma brucei* (see Cibulskis, 1988), we tried to interpret our data in terms of Mendelian genetics, an approach initiated by Tait (1980) in the case of *T. brucei* and successfully used by us for *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease (Tibayrenc et al., 1981, 1986). When possible, electromorphs were equated to alleles, following the hypothesis of

TABLE 2
Buffers used in the present study

Code	Cell buffers	Code	Reaction buffers
A	0.5 M Tris versene borate pH 8.0	1	1 M Tris HCl pH 7
B	Tris barbital sodium barbital (Helena HR) pH 9.0	2	1 M Tris HCl pH 8
C	0.1 M Tris 0.1 M maleic acid 0.01 M EDTA 0.01 M MgCl ₂ pH 7.4	3	0.076 M Tris 0.005 M citric acid pH 7.9
D	0.1 M Tris 0.0044 M maleic acid 0.01 M EDTA 0.01 M MgCl ₂ pH 6.6	4	0.2 M Tris 0.2 M maleic acid pH 6.0
E	0.015 M Tris 0.005 M EDTA 0.01 M MgCl ₂ 0.01 M boric acid pH 7.8	5	0.1 M Tris adjust to pH 6.5 with 1 M maleic acid
F	0.66 M Tris 0.083 M citric acid pH 8.6	6	0.025 M NaH ₂ PO ₄ 0.08 M Na ₂ HPO ₄ pH 7.4
G	0.2 M Tris 0.025 M tricine 0.01 M KCl pH 8.0		
H	0.15 M citric acid 0.24 M NaH ₂ PO ₄ pH 6.3		
I	Add 0.2 M NaH ₂ PO ₄ to 0.2 M Na ₂ HPO ₄ reach pH 7.0		

TABLE 3

Electrophoresis and staining procedures. The cell buffers F, C and D must be diluted for electrophoresis, respectively at 3/4, 1/2 and 1/4. The quotient in brackets indicated after each cell buffer (CB) is the dilution used for cellulose acetate plate soaking; RB = reaction buffer (10 ml in every recipe) with the appropriate dilution in brackets. ALAT and EST both visualized under UV light. All chemicals were obtained from Sigma

Enzyme	CB	Voltage	Time	RB	Staining solution
AK*	C (75/100)	160	20	2 (1/10)	60 mg α -D-glucose, 6 mg ADP, 20 units hexokinase (from bakers' yeast), G6PDH (from Torula yeast), 50 mg MgCl ₂ (6H ₂ O), 5 mg NADP, 5 mg NBT, 1.5 mg PMS
ALAT*	F (1/15)	200	45	6	5 mg α -ketoglutaric acid, 10 mg L-alanine, 15 units LDH (from bovine heart), 2 mg NADH
ALP*	H (5/10)	80	35	3	50 mg β -naphthyl acid phosphate, 20 mg MgCl ₂ , 2 mg MnCl ₂ (4 H ₂ O), 15 mg Fast Blue RR in 200 μ l acetone
EST*	E (25/100)	150	40	5	4 methylumbelliferylacetate 10 mg in 0.6 ml acetone 50%
FK*	C (5/10)	200	30	2 (6/100)	30 mg β -D-fructose, 17 units PGI (from rabbit muscle), 10 mg ATP, (Na ₂ salt) (from equine muscle), 15 units G6PDH (from Torula yeast), 50 mg MgCl ₂ (6H ₂ O), 5 mg NADP, 0.6 mg MTT, 1.5 mg PMS
G6PD*	B	200	25	1 (5/10)	5 mg glucose-6 phosphate, 50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 2.5 mg NBT, 3 mg PMS
GAPD	A (25/100)	200	25	1 (25/100)	12.5 mg fructose-1,6-diphosphate Na ₄ salt, 0.7 unit aldolase (from rabbit muscle): incubate at 25°C for 60 m; n, then add 12.5 mg acid arsenic Na ₂ salt, 12.5 mg pyruvic acid (Na), 5 mg NAD, 5 mg NBT, 1.5 mg PMS
GOT	A (5/10)	150	45	2 (1/10)	25 mg L-aspartic acid, 20 mg α -ketoglutaric acid, 3 mg pyridoxal-5 phosphate: readjust pH to 8.00 with 40% NaOH, then add 20 mg Fast Blue BB
GPI	A (25/100)	200	45	1 (25/100)	10 mg fructose-6 phosphate, 5 units G6PDH (from Torula yeast), 50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 5 mg NBT, 1.5 mg PMS
GSR*	I (1/10)	200	20	2 (25/100)	10 mg glutathione (oxidized form), 5 mg NADPH (Na ₄ salt), 5 mg NBT
ICD	A (25/100)	160	25	2 (1/10)	10 mg DL-isocitric acid, 50 mg MgCl ₂ , 5 mg MnCl ₂ , 5 mg NADP, 2.5 mg NBT, 1.5 mg PMS
MDH*	B	200	20	1 (2/10)	0.9 ml 1 M malic acid pH 7 (DL-malic acid), 5 mg NAD, 5 mg NBT, 1.5 mg PMS
ME*	A (5/10)	150	30	1 (25/100)	0.6 ml 1 M malic acid pH 7, 50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 5 mg NBT, 1.5 mg PMS
NH	A	120	30	2 (1/10)	10 mg inosine, 0.6 units xanthine oxydase (from buttermilk), 0.6 mg MTT, 1.5 mg PMS

ANNEXE 12 (suite)

rang left



6PGD	D (25/100)	200	25	2 (25/100)	10 mg 6-phosphogluconic acid, 50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 5 mg NBT, 3 mg PMS
PEP 2	A	200	25	2 (1/10)	5 mg L-leucyl L-alanine, 1 mg L amino acid oxidase, 1 mg peroxidase, 30 mg MgCl ₂ , 3 mg MnCl ₂ , 5 mg 3-aminoethylcarbazole in 400 µl ethanol
LAP	A (25/100)	200	45	4 (15/100)	10 mg L-leucine β-naphthylamide, 5 mg fast black K salt
PGM	A (25/100)	200	45	2 (25/100)	20 mg glucose-1 phosphate, 8 units G6PDH, 50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 2.5 mg NBT, 3 mg PMS
TDH*	G	200	15	2 (1/10)	100 mg L-threonine, 150 mg KCl, 10 mg NAD, 1.8 mg MTT, 1.5 mg PMS
UGPP	B	200	20	2 (4/10)	50 mg uridine diphosphoglucose, 70 mg tetrasodium pyrophosphate, 10 mg NADP, 10 units G6PDH, 90 units phosphoglucomutase (from rabbit muscle), 1 mg glucose-1,6 diphosphate, 60 mg EDTA, 50 mg MgCl ₂ , 1.2 mg MTT, 3 mg PMS

*Cooled by using the cooling device provided by Helena.

ANNEXE 12 (suite)

6

TABLE 4

Zymodemes recorded in the present study. Alleles at any given locus are numbered starting from I for the fastest allele. The variability recorded for PEP 2 was interpreted phenotypically (see text)

ZYM	ALAT	GOT	IDH	PEP2	PGM	Stocks
1	4/4	1/1	1/1	I	2/2	1811
2	4/4	1/1	1/1	IV	2/2	1821
3	1/3	1/1	1/1	III	2/2	C126
4	2/2	2/2	1/2	II	1/1	FY.LIICL2
5	2/4	1/1	1/1	IV	2/2	D12K,TB26,PA,OK

diploidy established by Tait (1980), Gibson et al. (1980), Jenni et al. (1986) and Sternberg et al. (1989) for *T. brucei*. The different putative alleles at a given locus were numbered starting from I for the fastest allele. Table 4 gives the inferred genotypes for the 5 zymodemes recorded. The locus PEP2 was not suitable for allelic interpretation, and its variability was interpreted phenotypically.

Some of our results disagree slightly with the ones communicated by other workers (Tait et al., 1984), who studied the same isolates. This might be due to a different technical approach. These divergent results involve, for example, the D12K stock. These authors have recorded complex, multi-banded patterns for this stock, for the enzyme system PEP2, while our results show a one-banded pattern at this locus (see Fig. 1). Conversely, for the locus ALAT, we recorded a three-banded pattern (see Fig. 2), as Scott et al. did, while Tait et al. recorded a one-banded pattern.

Discussion

The present study is based on the use of 21 isozyme loci, which provide a sound picture of the actual genetic variability of the stocks. Indeed such a number of loci is considered as statistically significant in population and evolutionary studies: Avise and Aquadro (1982) chose a lower limit of 14 loci for accepting the phylogenetic value of genetic distances in vertebrates. Nevertheless, we do not want to give the zymodemes recorded here any definitive labelling or numbering. Indeed, delineation of zymodemes is highly dependent upon the methods used, and upon the range of

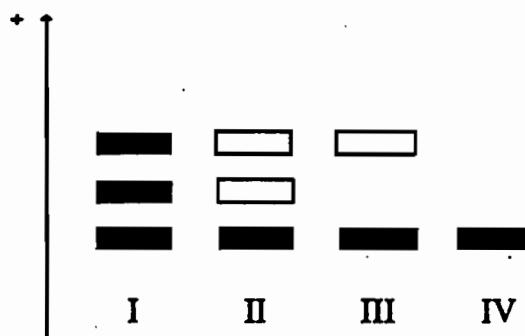


Fig. 1. Diagrams for the observed PEP2 patterns (see Table 4).

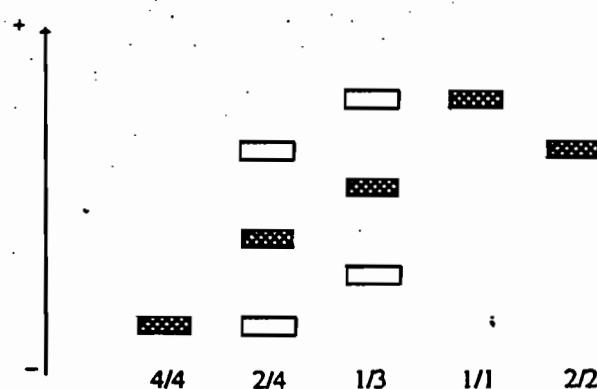
ANNEXE 12 (suite)

Fig. 2. Diagrams for the observed ALAT patterns, with putative allelic interpretations: 1/1 = homozygote for the allele 1, etc. (see Table 4).

isozyme markers under study (Tibayrenc and Ayala, 1988). The number of different zymodemes recorded is expected to increase with the range of markers and the number of stocks examined.

Although the present stock sample is still limited, our results confirm the presence of identical zymodemes both in animal and human hosts in the Congo, as already recorded by Scott et al. (1983). In particular zymodeme 5 in the present study was isolated four times, independently from a sheep, from a pig and from a patient. Zymodeme No. 4 was recorded twice, respectively from a pig and from two patients. So our results extend the data presented by Scott et al., suggesting the role of pigs as animal reservoirs in the Congo, as has been shown to be the case in West Africa (Mehlitz, 1977; Mehlitz et al., 1982; Gibson et al., 1978, 1980). These data are still too limited to allow the significance of animal reservoir hosts in the Congo to be ascertained precisely. Indeed, isolation of the same zymodeme both from man and from animal is not definitive evidence for communication between human and animal reservoirs. Nevertheless, the animal hosts are likely to be important in the maintenance of residual foci in this country (see Noireau et al., 1986, 1989). It is worth noting that the stock D12K, which was isolated from a sheep, was identified by Paindavoine et al. (1986) as *T. brucei gambiense*, which again favors the existence of an animal reservoir of human African trypanosomiasis in the Congo.

Work is in hand to survey a larger sample of stocks from the same region, in order to give a more accurate picture of the epidemiology of sleeping sickness in this area, and especially, to provide better estimates of the role of the animal reservoir in Central Africa.

Acknowledgements

We are indebted to Prof. P. Kageruka and Prof. D. Le Ray (Tropical Medicine Institute, Antwerp, Belgium), and Dr J.L. Frézil and Dr F. Noireau (ORSTOM Montpellier), who kindly supplied the stocks included in this study. This research was supported by a French Ministry of Research & Technology grant No. 418 209 16, and a Région Languedoc-Roussillon Grant No. 891891.

ANNEXE 12 (suite)

8

References

- Avise, J.C. and Aquadro, C.F. (1982) A comparative summary of genetic distances in the vertebrates. *Evolution. Biol.* 15, 151-185.
- Cariou, M.L. (1977) Recherches sur le polymorphisme enzymatique du complexe *Juvera whistleri*, leach (Crustacé, Isopode). Thèse Sciences, Paris VI.
- Cibulskis, R.E. (1988) Origins and organization of diversity in natural populations of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 96, 303-322.
- Gibson, W.C., Marshall, T.F. de C. and Godfrey, D.G. (1980) Numerical analysis of enzymic polymorphism: A new approach to epidemiology and taxonomy of trypanosomes of subgenus *Trypanozoon*. *Adv. Parasit.* 18, 175-246.
- Gibson, W.C., Mehlitz, D., Lanham, S.M. and Godfrey, D.G. (1978) The identification of *Trypanosoma brucei gambiense* in Liberian pigs and dogs by isoenzymes and resistance to human plasma. *Tropenmed. Parasit.* 29, 335-345.
- Godfrey, D.G., Baker, R.D. and Mehlitz, D. (1990) The distribution, relationships and identification of enzymatic variants within the subgenus *Trypanozoon*. *Adv. Parasit.* 29, 1-74.
- Jenni, L., Marti, S., Schweizer, J. and Betschart, B., Le Page, R.W.F., Wells, J.M., Tait, A., Paindavoine, P., Pays, E. and Steinert, M. (1986) Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature* 322, 173-175.
- Kreutzer, R.D. and Christensen, H.A. (1980) Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29 (2), 199-208.
- Kreutzer, R.D., Semko, M.E., Hendricks, L.D. and Wright, N. (1983) Identification of *Leishmania* spp. by isozymes analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32 (4), 703-715.
- Kreutzer, R.D. and Sousa, O.E. (1981) Biochemical characterization of *Trypanosoma* spp. by isozyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30 (2), 308-317.
- Lanham, S.M. and Godfrey, D.G. (1970) Isolation of salivarian trypanosomes from man and other animals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* 25, 521-534.
- Lanham, S.M., Grendon, J.M., Miles, M.A., Povoa, M.M. and Almeida 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. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 742-750.
- Mehlitz, D. (1977) The behaviour in the blood incubation infectivity tests of four *Trypanozoon* strains isolated from pigs in Liberia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 86.
- Mehlitz, D., Zillmann, U., Scott, C.M. and Godfrey, D.G. (1982) Epidemiological studies on the animal reservoir of *gambiense* sleeping sickness. Part III. Characterization of *Trypanozoon* stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Tropenmed. Parasit.* 33, 113-118.
- Miles, M. and Ward, R. (1978) Preliminary isoenzyme studies on phlebotomines sandflies (*Diptera, Psychodidae*). *Ann. Trop. Med. Parasit.* 35, 105-108.
- Noireau, F., Gouteux, J.P., Toudic, A., Samba, F. and Frézil, J.L. (1986) Importance épidémiologique du réservoir animal à *Trypanosoma brucei gambiense* au Congo. I Prévalence des trypanosomoses animales dans les foyers de maladie du sommeil. *Tropenmed. Parasit.* 37, 393-398.
- Noireau, F., Paindavoine, P., Lemesre, J.L., Toudic, A., Pays, E., Gouteux, J.P., Steinert, M. and Frézil, J.L. (1989) The epidemiological importance of the animal reservoir of *Trypanosoma brucei gambiense* in the Congo. II Characterization of the *Trypanosoma brucei* complex. *Tropenmed. Parasit.* 40, 9-11.
- Paindavoine, P., Pays, E., Laurent, M., Geltmeyer, Y., Le Ray, D., Mehlitz, D. and Steinert, M. (1986) The use of DNA hybridisation and taxonomy in determining relationships between *Trypanosoma brucei* stocks and subspecies. *Parasitology* 92, 31-50.
- Richardson, B.J., Baverstock, P.R. and Adams, M. (1986) A Handbook for Animal Systematics and Population Studies. Academic Press, 410 p.
- Shaw, C.R. and Prasad, R. (1970) Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Gen.* 4, 297-320.
- Scott, M.C., Frézil, J.L., Toudic, A. and Godfrey, D.G. (1983) The sheep as a potential reservoir of human trypanosomiasis in the Republic of the Congo. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 3, 397-401.
- Sternberg, J., Turner, C.M.R., Wells, J.M., Ransford-Cartwright, L.C., Le Page, R.W.F. and Tait, A. (1989) Gene exchange in African trypanosomes: frequency and allelic segregation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 269-280.
- Tait, A. (1980) Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. *Nature* 287, 536-538.

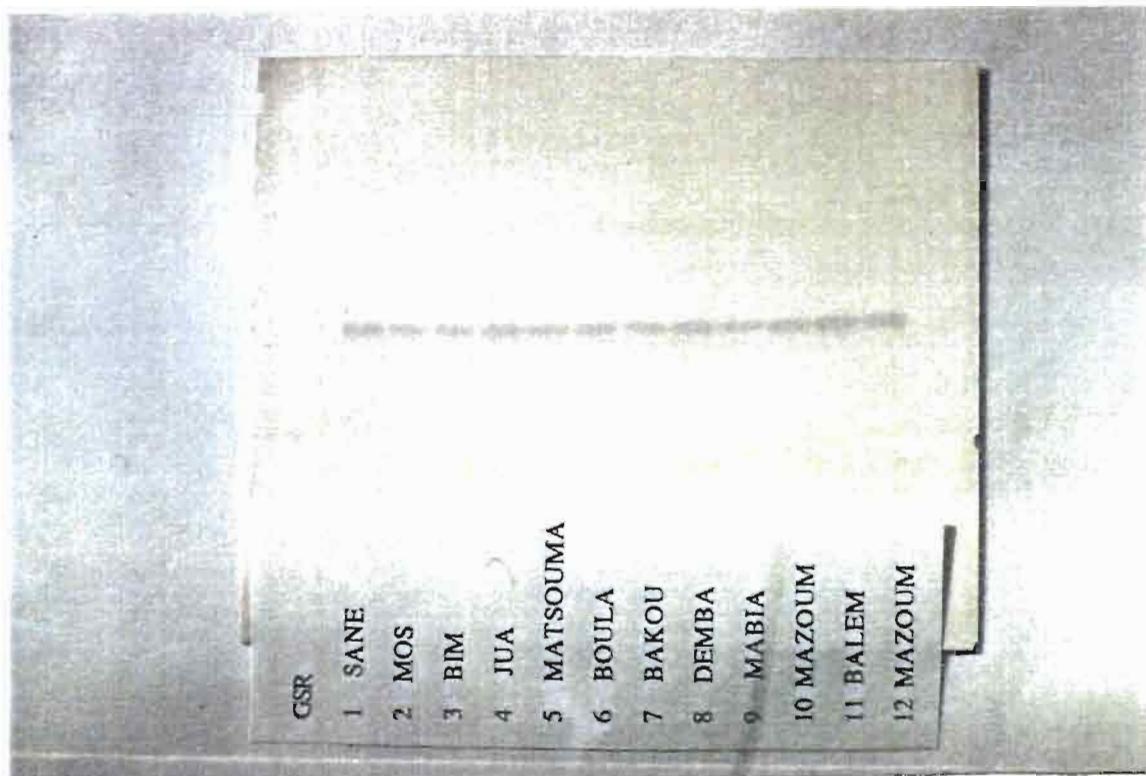
ANNEXE 12 (suite)

9

- Tait, A., Eldirdiri, A., Babiker, A. and Le Ray, D. (1984) Enzyme variation in *Trypanosoma brucei* spp. I. Evidence for the sub-speciation of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Parasitology* 89, 311-326.
- Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Solignac, M. and Carlier, Y. (1981) Arguments génétiques contre l'existence d'une sexualité actuelle chez *Trypanosoma cruzi*. Implications taxinomiques. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Paris* 292, 623-625.
- Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Solignac, M., Dedet, J.P., Poch, O. and Desjeux, P. (1985) New electrophoretic evidence of genetic variation and diploidy in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease. *Genetica* 67, 223-230.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A. and Ayala, F.J. (1986) Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multicolonial structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 115-119.
- Tibayrenc, M. and Ayala, F.J. (1988) Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42, 277-292.

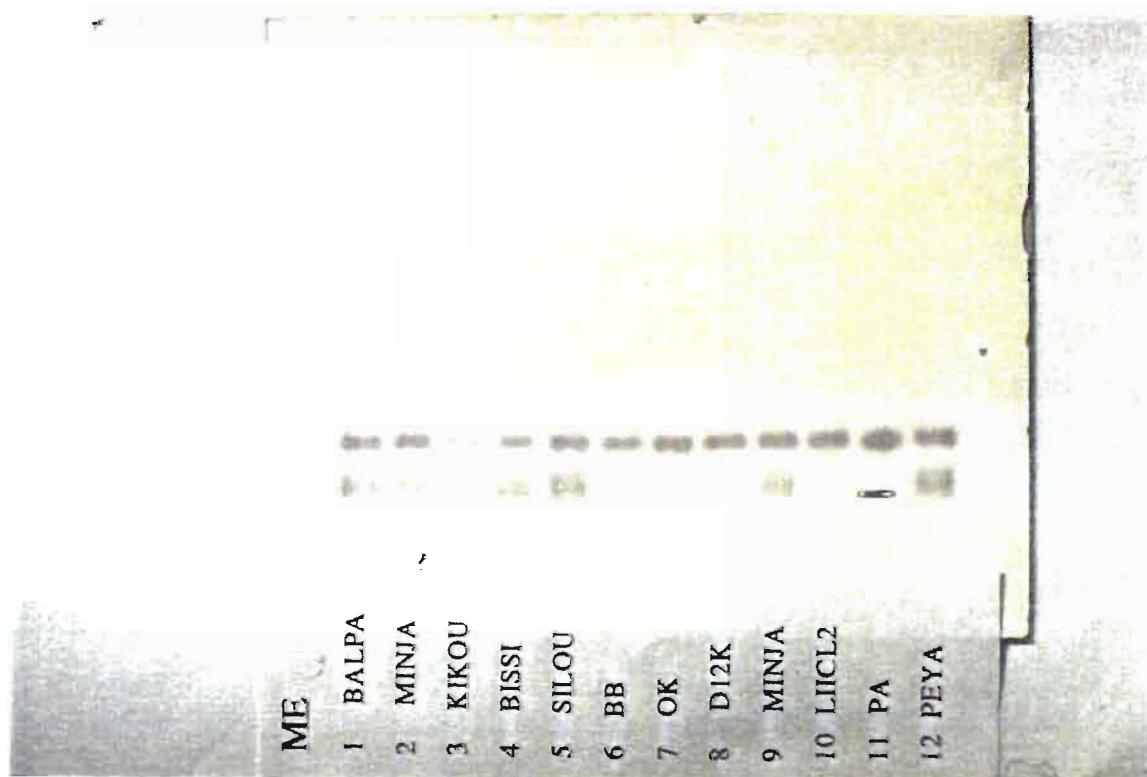
ANNEXE 13

Exemple de zymogramme obtenu pour l'enzyme GSR (Glutathion réductase). Cette enzyme s'est avérée monomorphe dans notre étude. Les stocks sont numérotés de 1 à 12.



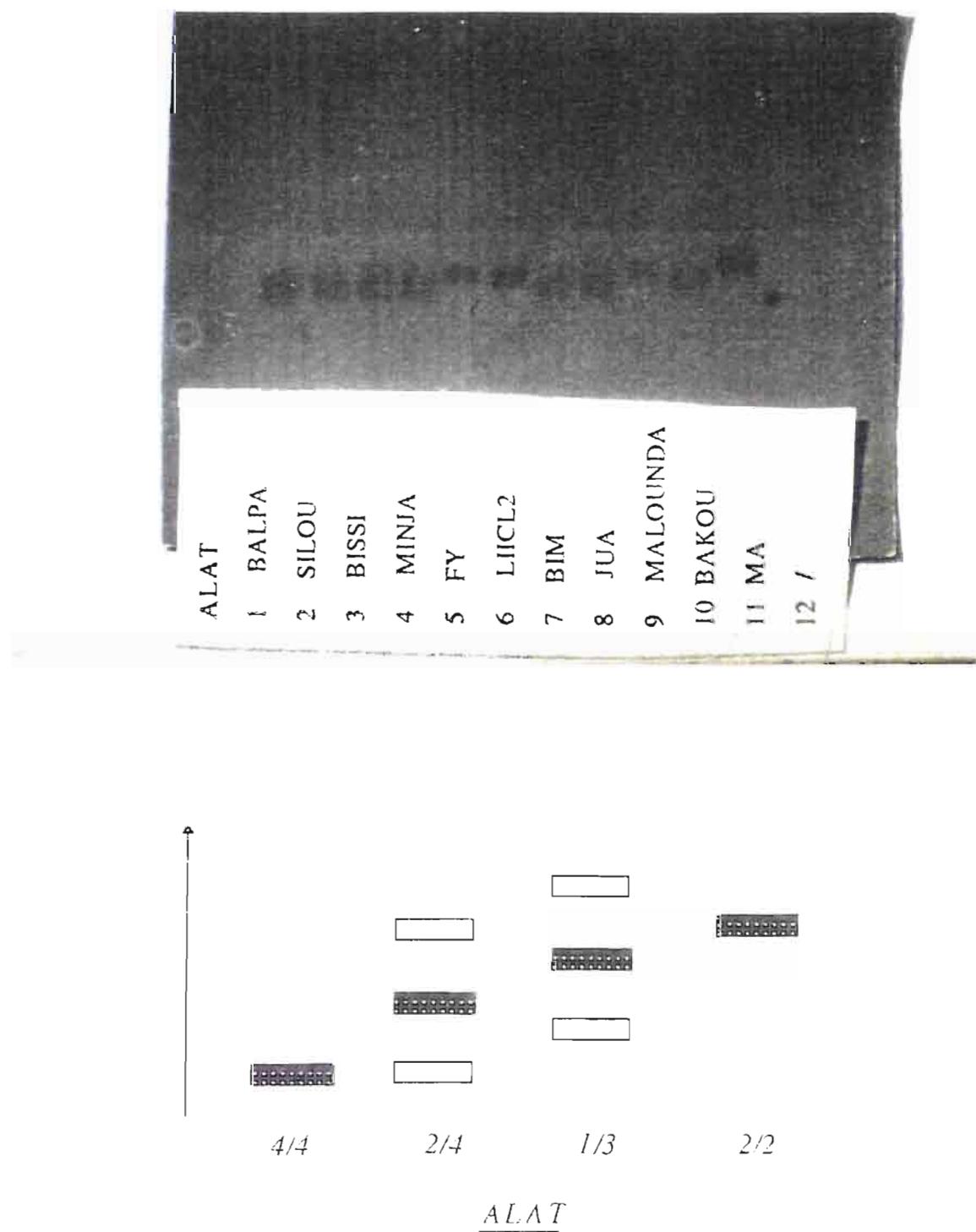
ANNEXE 14

Exemple de zymogramme obtenu pour l'enzyme malique (ME). Cette enzyme présente deux loci: *ME 1*, monomorphe, est plus rapide que *ME 2*, qui lui est polymorphe, et présente des hétérozygotes à trois bandes (enzyme dimère, Pasteur et al., 1987), ainsi que des homozygotes pour les allèles 1 et 0 (allèle nul).



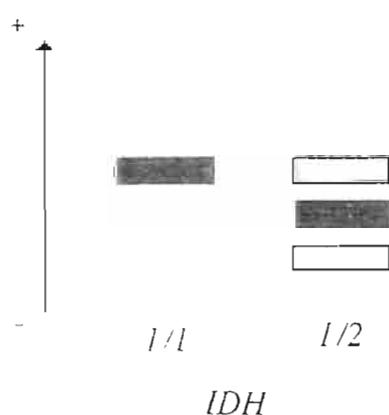
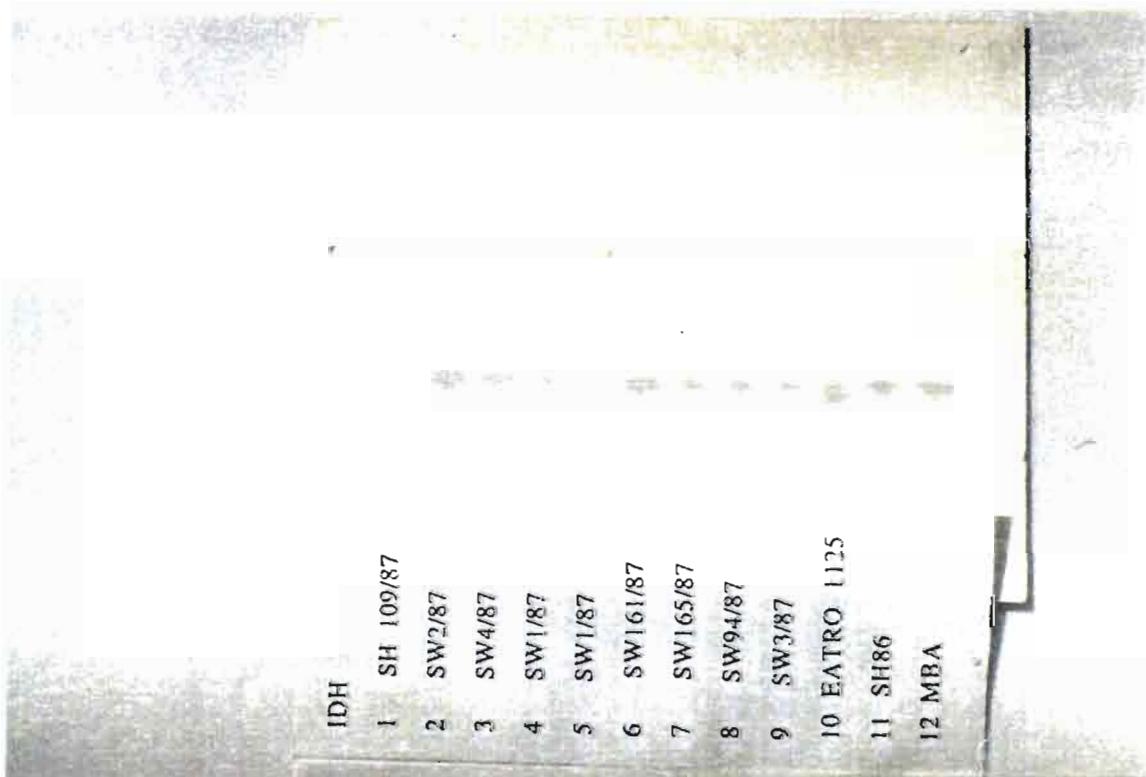
ANNEXE 15

Exemple de zymogramme pour l'alanine amino-transférase (ALAT), enzyme révélée en ultra-violet (320 nm). La représentation schématique des génotypes observés résume l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude. Les génotypes $4/4$ et $1/3$ ne sont pas visibles sur le gel présenté. Les stocks n° 1, 2, 3, 4, 7, 8 et 10 ont le génotype $2/4$, alors que les stocks n° 5, 6, 9 et 11 ont le génotype $2/2$.



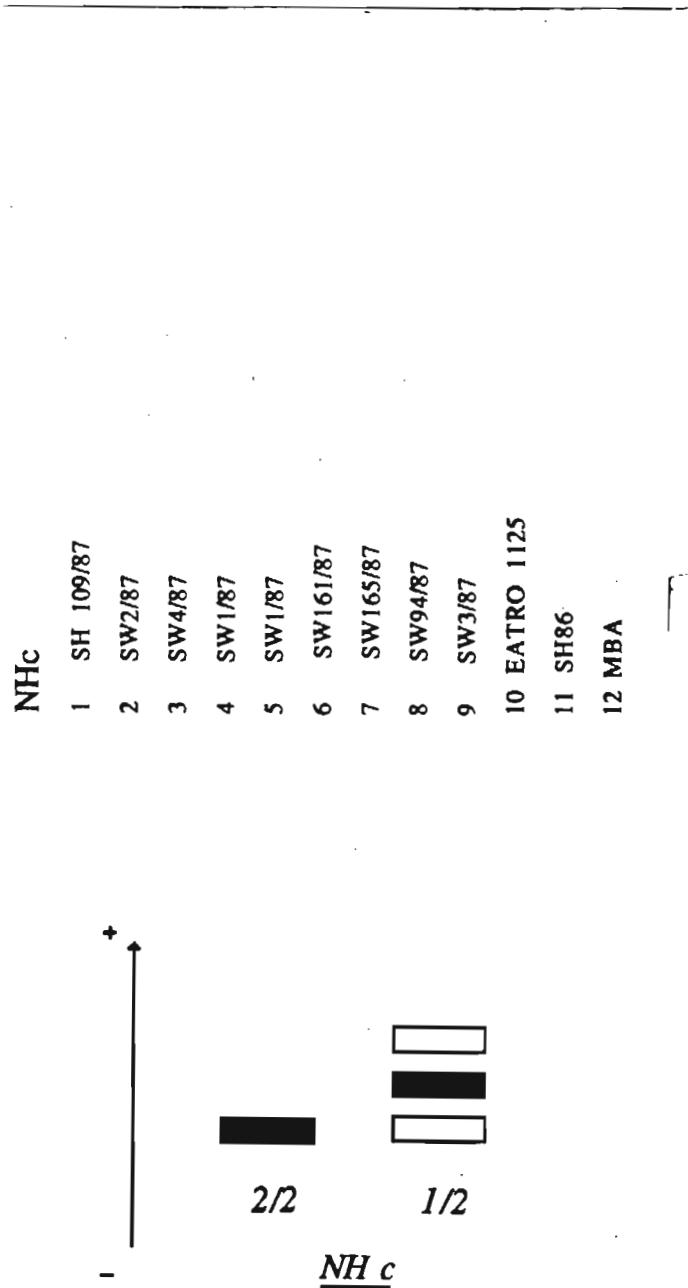
ANNEXE 16

Exemple de zymogramme pour l'isocitrate déshydrogénase (IDH). Le stock n° 10 (EATRO 1125) présente un génotype hétérozygote I/I_2 , tous les autres stocks sont homozygotes à ce locus (génotype I/I).



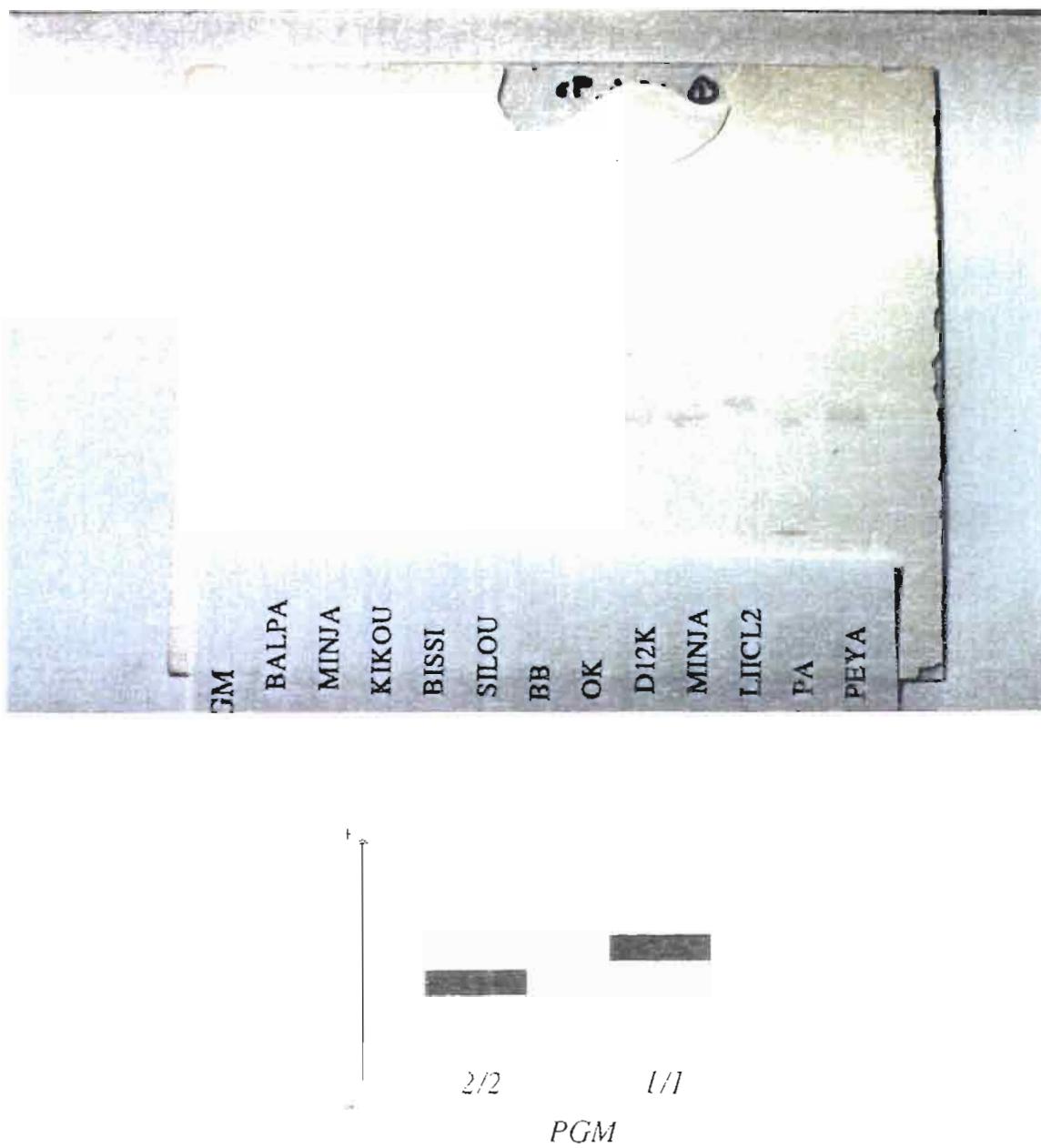
ANNEXE 17

Exemple de zymogramme pour l'enzyme nucléoside hydrolase (NH) au locus *NH c*. Le stock n° 10 (EATRO 1125) présente un génotype hétérozygote 1/2, toutes les autres sont homozygotes à ce locus (génotype 1/1).



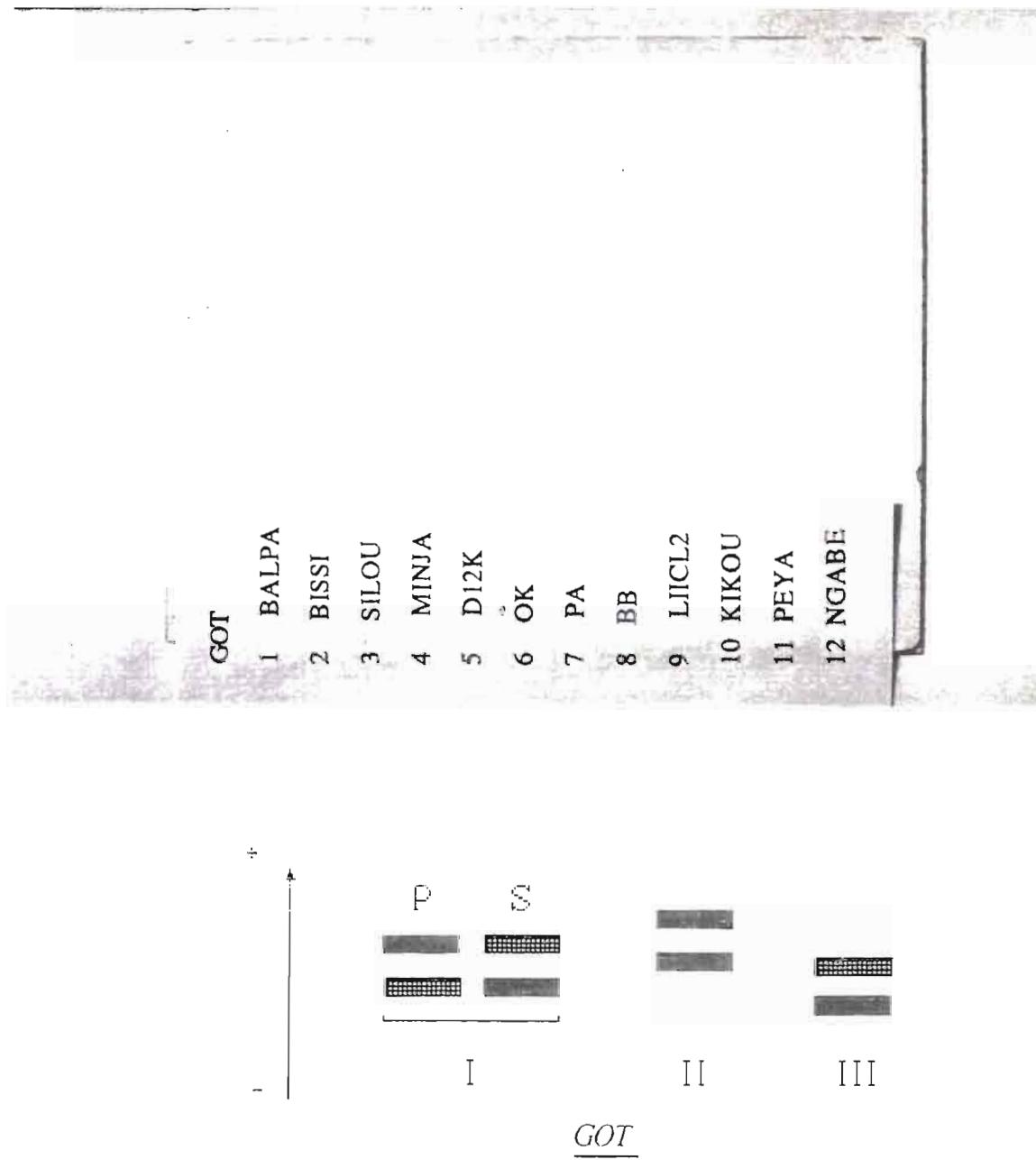
ANNEXE 18

Exemple de zymogramme pour l'enzyme phosphoglucomutase (PGM). Le stock n° 10 (LII CL2) est homozygote pour l'allèle 1, tous les autres sont homozygotes pour l'allèle 2.



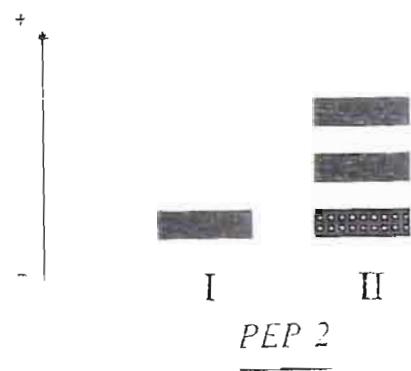
ANNEXE 19

Exemple de zymogramme pour l'enzyme aspartate aminotransférase. = glutamate oxaloacétate transaminase (ASAT ou GOT). La représentation schématique des phénotypes observés résume l'ensemble des résultats obtenus pour cette enzyme dans la présente étude. Le phénotype II n'est pas visible sur le gel présenté. Notons la différence d'activité, pour cette enzyme, entre les stocks étudiés sous forme procyclique P et ceux étudiés sous forme sanguicole S.



ANNEXE 20

Exemple de zymogramme observé pour l'enzyme peptidase II (PEP II). Les stocks n°5, 6, 7, 8 et 9 ont le phénotype I, tous les autres ont le phénotype II



ANNEXE 21

Matrice des distances génétiques standard de Nei. Les distances génétiques représentent le nombre moyen de codons différents par gène entre deux populations (Nei, 1972). La numérotation des zymodèmes se base sur la série complète de systèmes enzymatiques étudiés, ceux qui peuvent être interprétés en termes mendéliens comme ceux qui ne se prêtent qu'à une lecture phénotypique. Les distances génétiques étant calculées sur les seuls loci génétiquement interprétables (20), certains zymodèmes sont différents sur la base de 24 loci, mais identiques pour 20 loci: Z4=Z7=Z10=Z15 et Z11=Z13=Z14.

Z/Z	1	2	3	4=5	6	7=10=15	8	9	11=13=14	12	16	17	18	19	20	21	22
1																	
2	0.21																
3	0.23	0.23															
4=5	0.26	0.26	0.17														
6	0.23	0.36	0.26	0.28													
7=10=15	0.15	0.27	0.36	0.09	0.36												
8	0.23	0.36	0.45	0.17	0.45	0.07											
9	0.32	0.32	0.12	0.04	0.34	0.2	0.28										
11=13=14	0.12	0.36	0.45	0.17	0.38	0.02	0.1	0.28									
12	0.23	0.23	0.32	0.07	0.38	0.02	0.1	0.17	0.1								
16	0.26	0.26	0.28	0.04	0.34	0.05	0.12	0.14	0.12	0.02							
17	0.19	0.19	0.4	0.12	0.4	0.02	0.1	0.23	0.05	0.05	0.07						
19	0.43	0.58	0.61	0.28	0.61	0.23	0.15	0.41	0.26	0.26	0.22	0.27					
19	0.38	0.53	0.55	0.25	0.55	0.2	0.12	0.36	0.22	0.22	0.19	0.23	0.02				
20	0.53	0.69	0.72	0.36	0.72	0.32	0.22	0.5	0.34	0.34	0.3	0.36	0.12	0.09			
21	0.12	0.34	0.36	0.32	0.3	0.22	0.14	0.45	0.19	0.3	0.27	0.25	0.24	0.21	0.32		
22	0.26	0.38	0.41	0.14	0.41	0.09	0.02	0.25	0.12	0.12	0.09	0.12	0.12	0.09	0.19	0.11	0.02
23	0.23	0.36	0.32	0.12	0.38	0.12	0.05	0.17	0.15	0.15	0.12	0.15	0.15	0.12	0.22	0.14	0.02

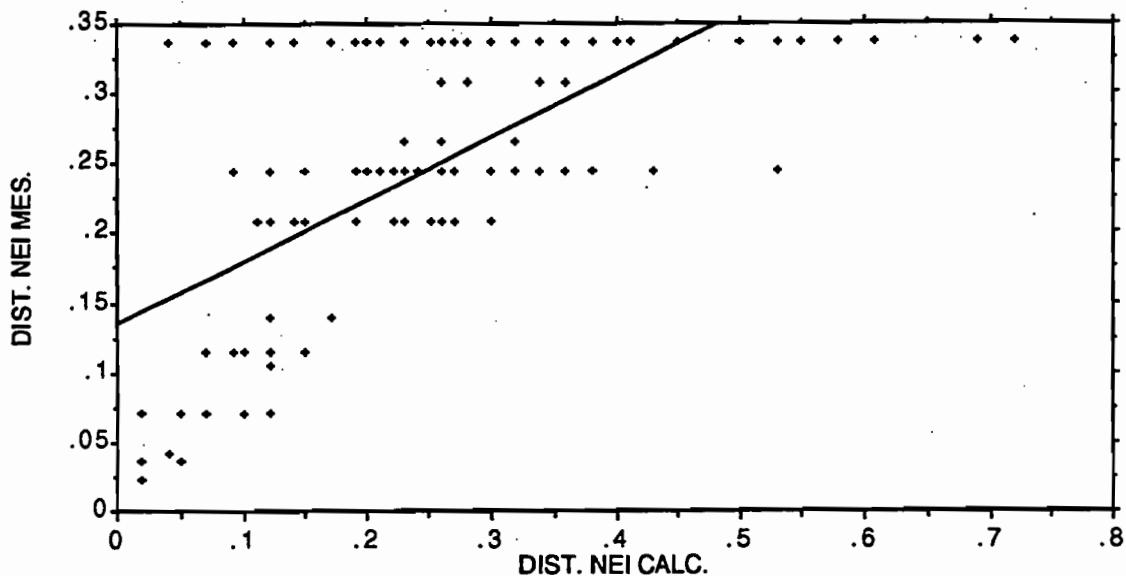
ANNEXE 22

Matrice des distances phénétiques de Jacquard. Elle indique ainsi la ressemblance phénétique entre deux zymodèmes.

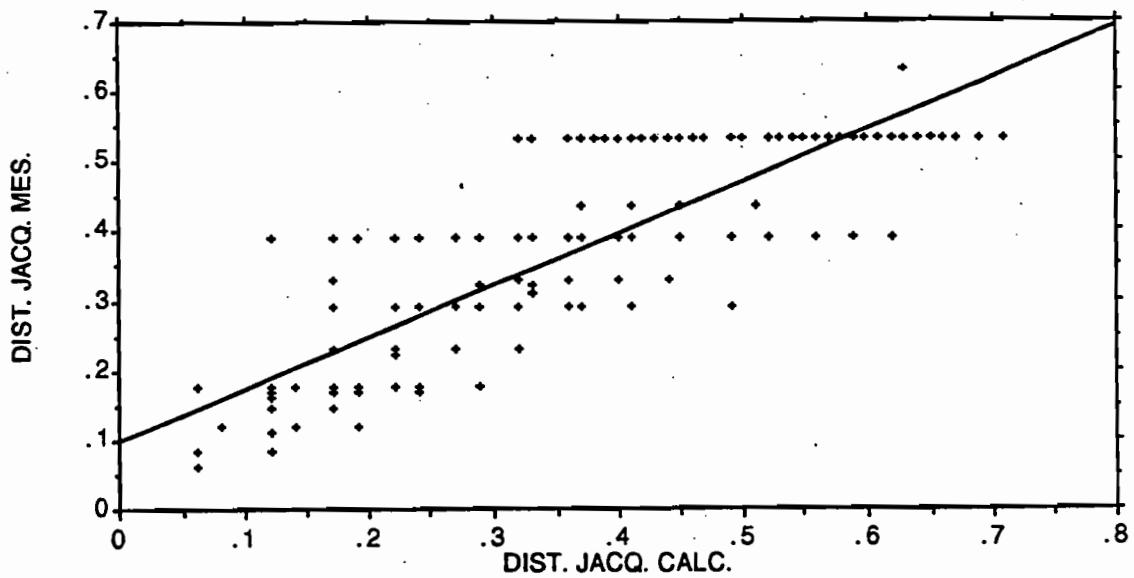
ZIZ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1																						
2	0,22																					
3	0,49	0,49																				
4	0,45	0,45	0,27																			
5	0,44	0,44	0,32	0,06																		
6	0,49	0,56	0,45	0,41	0,37																	
7	0,22	0,32	0,56	0,37	0,36	0,59																
8	0,37	0,45	0,63	0,47	0,46	0,58	0,19															
9	0,63	0,63	0,33	0,29	0,33	0,51	0,57	0,56														
10	0,29	0,37	0,6	0,43	0,42	0,55	0,08	0,12	0,52													
11	0,17	0,36	0,59	0,41	0,4	0,59	0,06	0,24	0,6	0,14												
12	0,27	0,27	0,52	0,33	0,32	0,59	0,06	0,24	0,54	0,14	0,12											
13	0,36	0,17	0,59	0,41	0,4	0,65	0,17	0,33	0,6	0,24	0,22	0,12										
14	0,24	0,41	0,63	0,47	0,46	0,55	0,14	0,17	0,56	0,06	0,08	0,19	0,29									
15	0,27	0,36	0,59	0,41	0,4	0,59	0,17	0,33	0,6	0,24	0,12	0,22	0,22	0,19								
16	0,27	0,36	0,52	0,33	0,32	0,56	0,06	0,24	0,54	0,14	0,12	0,12	0,22	0,19	0,12							
17	0,32	0,22	0,56	0,37	0,36	0,62	0,12	0,29	0,57	0,19	0,17	0,06	0,06	0,24	0,17	0,17						
18	0,52	0,59	0,69	0,54	0,53	0,64	0,37	0,22	0,62	0,32	0,41	0,41	0,49	0,36	0,41	0,33	0,45					
19	0,49	0,56	0,66	0,5	0,49	0,61	0,33	0,17	0,59	0,27	0,37	0,37	0,45	0,32	0,37	0,29	0,41	0,06				
20	0,56	0,62	0,71	0,57	0,56	0,67	0,41	0,27	0,65	0,36	0,45	0,45	0,52	0,4	0,45	0,37	0,49	0,17	0,12			
21	0,37	0,52	0,63	0,6	0,59	0,55	0,45	0,32	0,62	0,4	0,41	0,49	0,56	0,36	0,41	0,41	0,52	0,4	0,36	0,44		
22	0,49	0,56	0,66	0,5	0,49	0,61	0,33	0,17	0,52	0,27	0,37	0,37	0,45	0,32	0,37	0,29	0,41	0,27	0,22	0,32	0,17	
23	0,37	0,45	0,57	0,39	0,38	0,52	0,29	0,12	0,49	0,22	0,33	0,33	0,41	0,27	0,33	0,24	0,37	0,22	0,17	0,27	0,32	0,17

ANNEXE 23

1) Corrélation entre distances génétiques calculées et mesurées sur le dendrogramme. Elle est hautement significative ($R=0,669$, $p<10^{-4}$, d.d.l. = 152). L'équation de la droite de régression est: $y = 0,444 x + 1,36$.

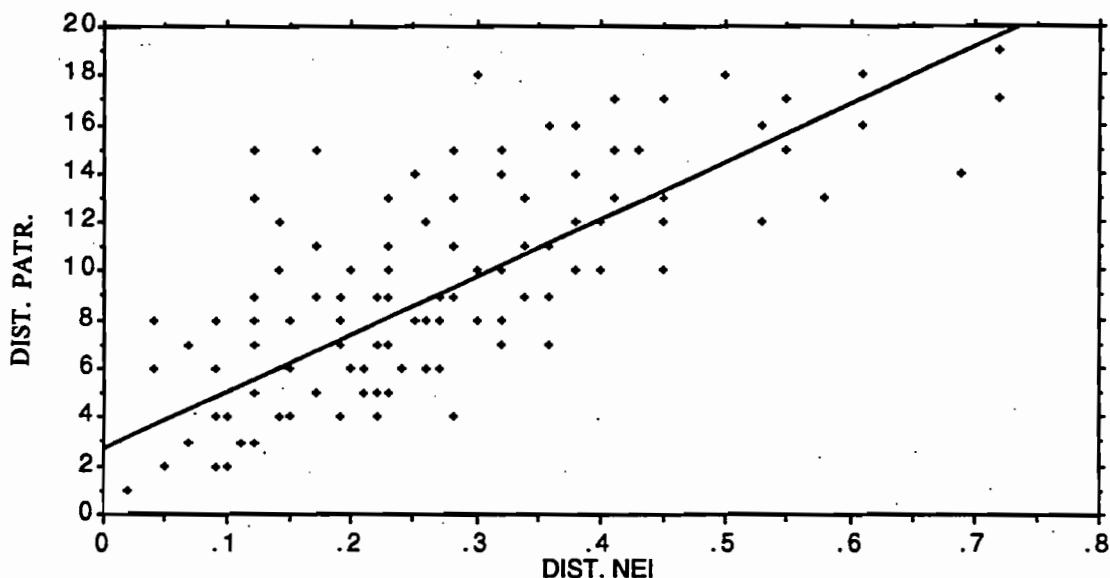


2) Corrélation entre distances de Jacquard calculées et mesurées sur le dendrogramme. Elle est hautement significative ($R=0,848$, $p<10^{-4}$, d.d.l. = 252). L'équation de la droite de régression est: $y= 0,739 x + 0,1$.

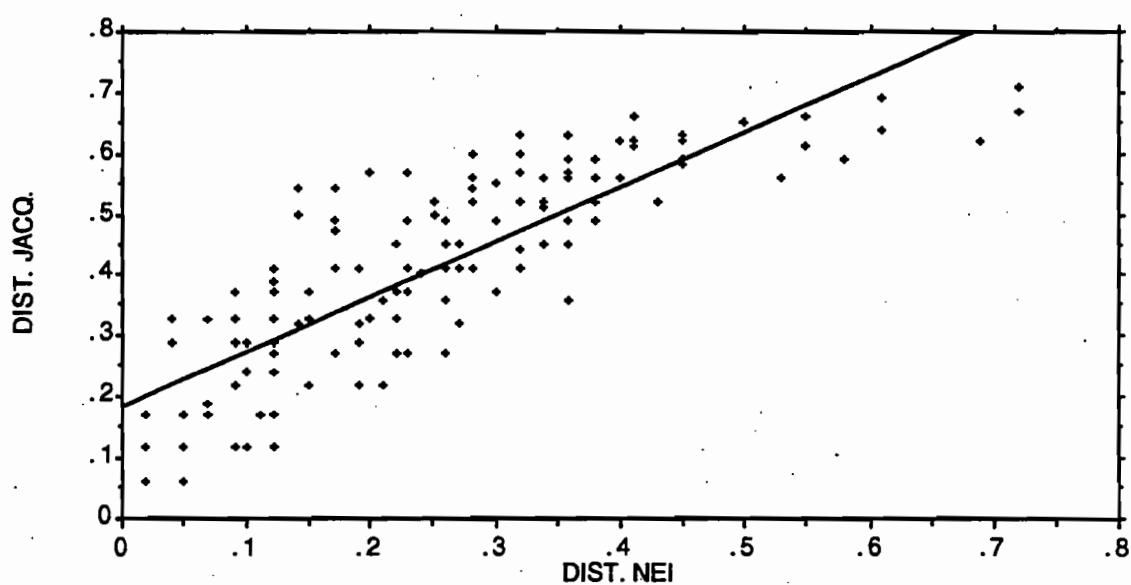


ANNEXE 24

1) Corrélation entre distances patristiques et distances génétiques de Nei. Elle est hautement significative ($R= 0,779$, $p<10^{-4}$, d.d.l.=152). L'équation de la droite de régression est: $y = 23,559 x + 2,708$.

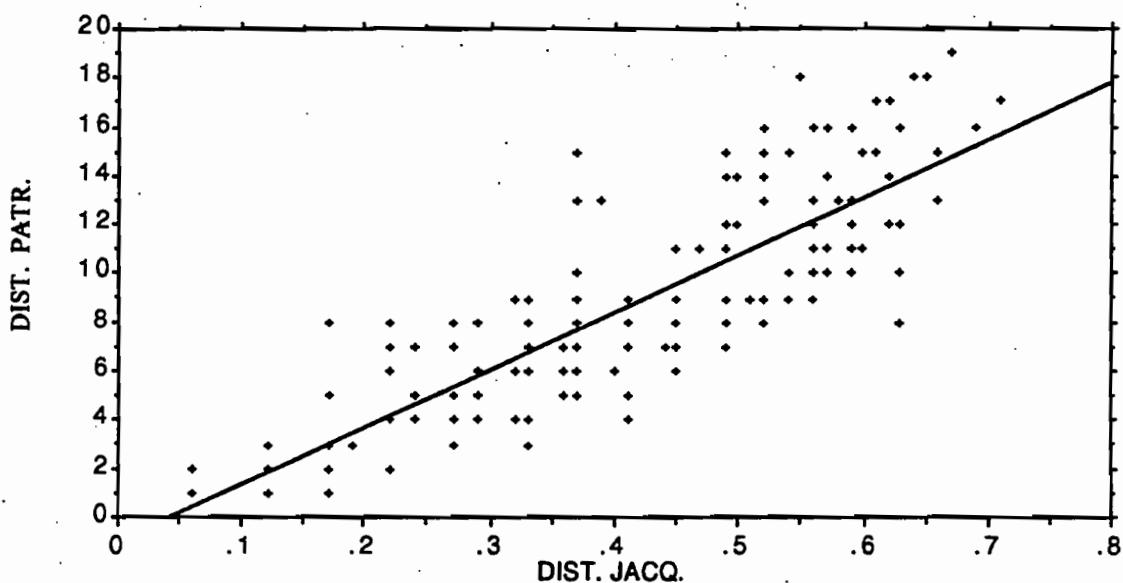


2) Corrélation entre distances génétiques et distances phénétiques. Elle est hautement significative ($R= 0,823$, $p<10^{-4}$, d.d.l.=152). L'équation de la droite de régression est: $y = 0,901 x + 0,677$.



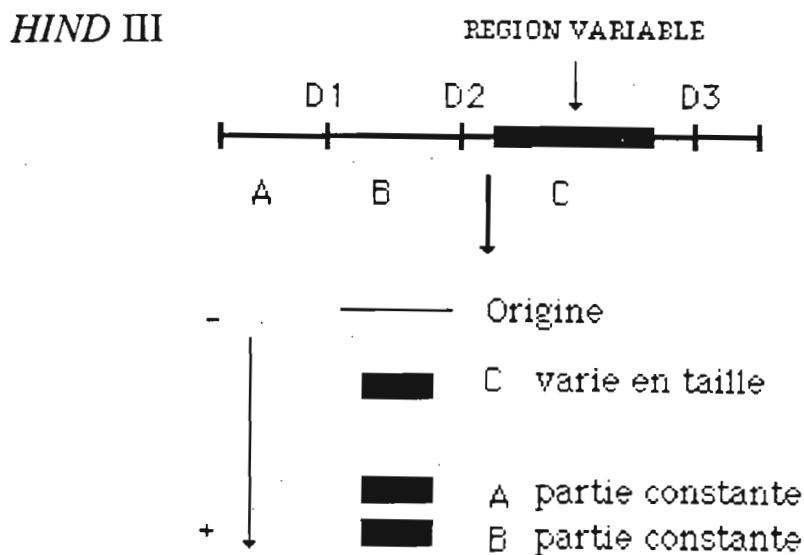
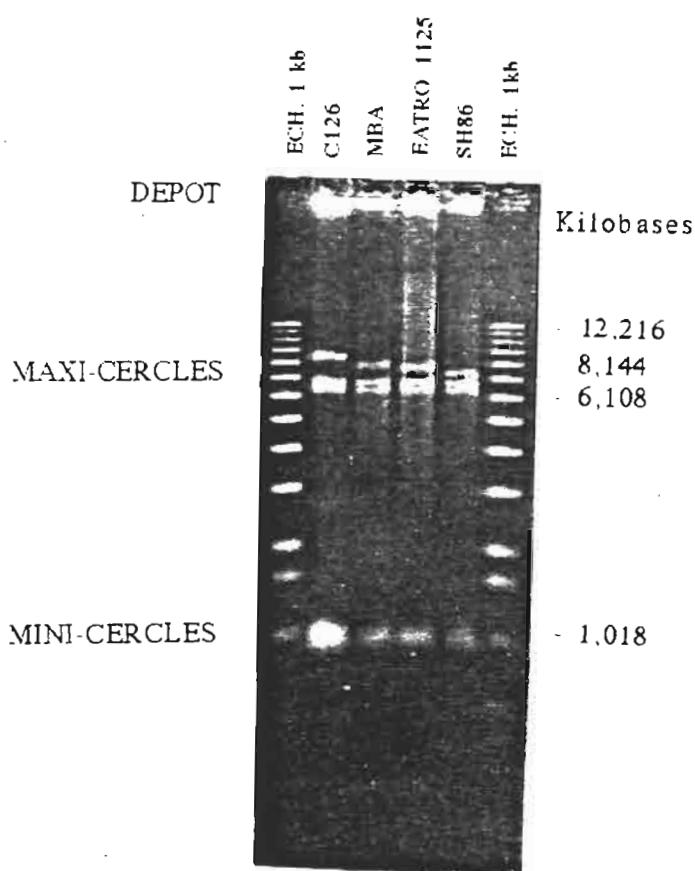
ANNEXE 25

Corrélation entre distances de Jacquard et distances patristiques.
Elle est hautement significative ($R= 0,851$, $p<10^{-4}$, d.d.l.=152).
L'équation de la droite de régression est: $y = 23,496 x + 0,978$.



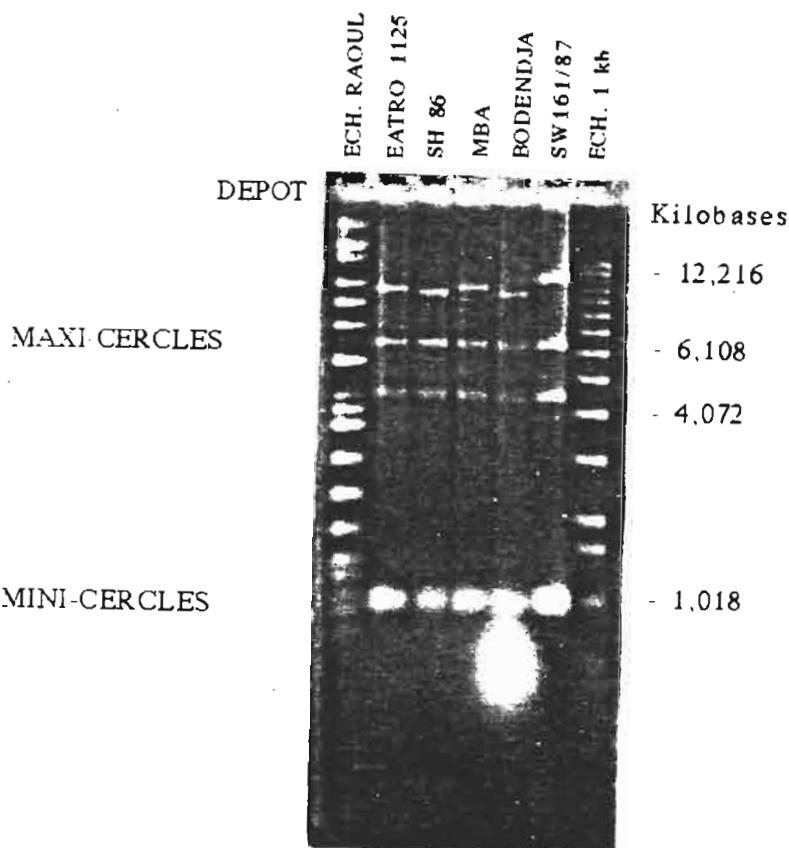
ANNEXE 26

Exemple de profil de restriction obtenu pour l'enzyme *HIND III*. La schématisation des maxicerques linéarisés, qui visualise l'emplacement des 3 sites de coupure, s'appuie sur les cartes de restriction établies par Borst et Fase Fowler (1979). Le marqueur de poids moléculaire est RAOUL 1 (Laboratoire Appligene, n°16067).



ANNEXE 27

Exemple de profil de restriction obtenu pour l'enzyme *ECO R1*. La schématisation des maxicercles linéarisés, qui visualise l'emplacement des 3 sites de coupure, s'appuie sur les cartes de restriction établies par Borst et Fase Fowler (1979). Les marqueurs de poids moléculaire sont: Raoul I (voir annexe 26) et l'Echelle 1 kb (Laboratoire BRL, n° 5615SA/SB).

*ECO R1*

REGION VARIABLE



Origine

B varie en taille

A partie constante

C partie constante

Poids moléculaire
décroissant

+