

UTILISATION DE LA P.C.R. SUR SANG POUR LE DIAGNOSTIC DES TRYPANOSOMOSES PORCINES.

PENCHENIER L^{1,2}, BODO JM¹, BUREAU PH¹, MORLAIS J^{1,2}, GREBAUT P^{1,2}, DIOHA S^{1,2}, HERDER S^{1,2}

RESUME

La Polymerase Chain Reaction (PCR) sur sang a été réalisée sur du sang de porcs d'un village camerounais en utilisant des amorces de *T. brucei sl.*, *T. congolense*, *T. simiæ* et *T. vivax*. Les résultats montrent qu'alors que l'examen parasitologique mettait en évidence des trypanosomes chez 15,8% des porcs, la PCR permettait de diagnostiquer 84,2% de ceux-ci comme étant trypanosomés. Les perspectives ouvertes par cette technique pour l'étude des trypanosomoses sont évoquées par les auteurs.

INTRODUCTION

La mise en évidence de *Trypanosoma brucei sl.* dans le sang par les techniques parasitologiques classiques peut être extrêmement difficile, particulièrement en cas de faible parasitémie. La biologie moléculaire représente un progrès considérable dans les techniques de diagnostic de la maladie du sommeil (Gibson *et al.*, 1988).

La technique que nous avons mis au point au centre ORSTOM de Montpellier, de réalisation très simple, permet de détecter, par PCR, sans purification préalable de l'ADN, 1 trypanosome dans 1ml de sang. De plus, elle permet de conserver les prélèvements dans les conditions de terrain et de les traiter ultérieurement au laboratoire. Nous l'avons testée, dans les conditions expérimentales, d'une part sur du sang humain dans lequel avaient été introduits des trypanosomes (*T. brucei gambiense*) préalablement clonés, et d'autre part sur des intestins de glossines nourries sur rongeurs parasités par *T. congolense* (Penchenier *et al.*, 1996). Par contre nous ne l'avons pas testée dans les conditions réelles (ni sur du sang animal, ni dans les infestations naturelles).

Le porc est un réservoir potentiel de la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA) qui

pourrait expliquer la résurgence de certaines épidémies. L'étude de ce réservoir passe par le typage des souches de *T. brucei sl.* Malheureusement, outre le fait que le porc soit souvent pauci-parasité, le biparasitisme par l'association *T. brucei sl.*, *T. congolense*, aboutit fréquemment au fait que *T. brucei* soit masqué par *T. congolense*. Le seul moyen actuel pour mettre *T. brucei* en évidence est la mise en culture des prélèvements de sang ce qui est un travail astreignant, délicat et onéreux, qui se conclue souvent par un échec. Les résultats obtenus au laboratoire montrent que la PCR permet de faire le diagnostic d'espèce pour des parasitémies extrêmement basses. Les perspectives qu'elle ouvre pour les études épidémiologiques sur les trypanosomoses sont très nombreuses. Encore faut-il que les résultats obtenus à partir de prélèvements faits sur du sang naturellement infesté soient analogues à ceux obtenus au laboratoire. C'est pour le vérifier que nous avons effectué cette étude.

MATERIEL ET METHODES

Des porcs ont été prélevés dans le village de Yemessoa situé à quarante kilomètres au nord de Yaoundé, sur la rive gauche de la Sanaga. Ce village, limitrophe du foyer de THA de Bafia (Mbam), est situé dans une zone où, depuis plus de 50 ans, l'on n'a jamais signalé de malade. Grossièrement longiligne, il borde sur 4 km la piste qui le traverse.

Dans ce village les porcs ne vivent pas en liberté. Ils

1- Laboratoire de Recherche sur les Trypanosomiases - OCEAC - BP 288 Yaoundé - Cameroun.

2- ORSTOM - BP 1857 Yaoundé - Cameroun.

e-mail : pencheni @ oceac.orstom.cm



sont parqués par petits groupes près des habitations de leurs propriétaires. Nous en avons prélevés 19 dans 13 enclos dispersés dans le village. On peut estimer le nombre total des porcs du village à une cinquantaine. Ceux qui n'ont pas été inclus dans l'enquête appartiennent à des familles qui n'ont pas autorisé les prélèvements.

Le sang de chaque porc a été prélevé au niveau de la veine sous-clavière dans des tubes contenant de l'EDTA. L'examen parasitologique a été fait par Centrifugation sur Tubes Capillaires (CTC) (Woo, 1971) à raison de 2 capillaires par porc. Nous ne pouvions utiliser de mini Colonnes Echangeuses d'Anions (mAEC) (Lanham et Godfrey, 1988), celles à notre disposition étant adaptées au sang humain et non au sang de porc.

La préparation des échantillons pour la PCR a été réalisée 3 jours après les prélèvements, ceux-ci ayant été maintenus à 4°C. La technique utilisée est celle décrite précédemment (Penchenier *et al.*, 1996). Un ml de sang de chaque échantillon est traité avec le kit commercial, Ready AMP™ Genomic Purification System (Promega, Madison, WI, USA). L'ensemble de la préparation dure environ 3/4 d'heures. Elle permet l'obtention de l'ADN purifié. L'extrait peut être directement traité par PCR ou conservé à 4°C ou -20°C.

La PCR a été réalisée à partir de 5 µl de ce produit. Les amorces utilisées étaient celles de *T. brucei* sl., *T. congolense* souche riverine forest, *T. vivax* (Masiga *et al.*, 1992) et *T. simiax* (Majiwa et Otieno, 1990).

RESULTATS (figure 1)

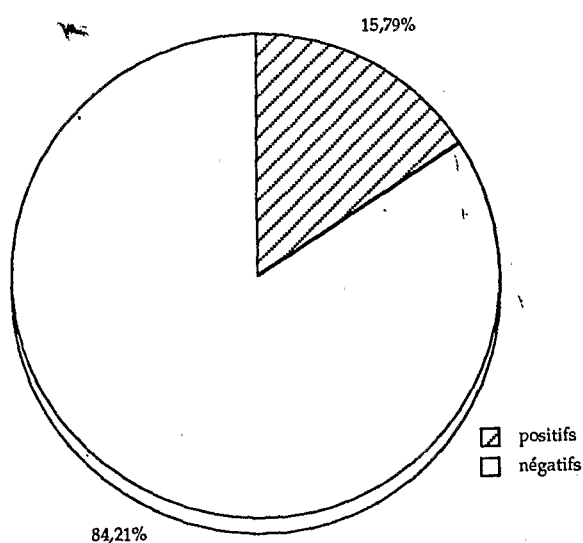
1. Recherche de parasites par Centrifugation sur Tubes Capillaires (CTC)

Trois des porcs ont été trouvés porteurs de trypanosomes dont les caractéristiques morphologiques les rattachent au sous genre *Nannomonas* qui comprend les 2 espèces *T. congolense* et *T. simiax*. Pour chaque porc, un seul trypanosome a été mis en évidence dans les 2 capillaires.

2. PCR

Les amplifications effectuées avec les amorces de *T. brucei*, étaient toutes négatives alors qu'avec les amorces de *T. congolense* (riverine forest) et de *T. vivax*, 16 des 19 porcs étaient positifs. Un seul porc était positif avec les amorces de *T. simiax*. Il était également positif pour les amorces de *T. congolense* et *T. vivax*. Treize porcs étaient positifs à la fois pour *T. congolense* et *T. vivax*, dont les 3 porcs positifs en CTC, un porc n'était positif que pour *T. congolense* et un autre pour *T. vivax* (voir figure 1).

Résultats de la parasitologie



Résultats de la PCR

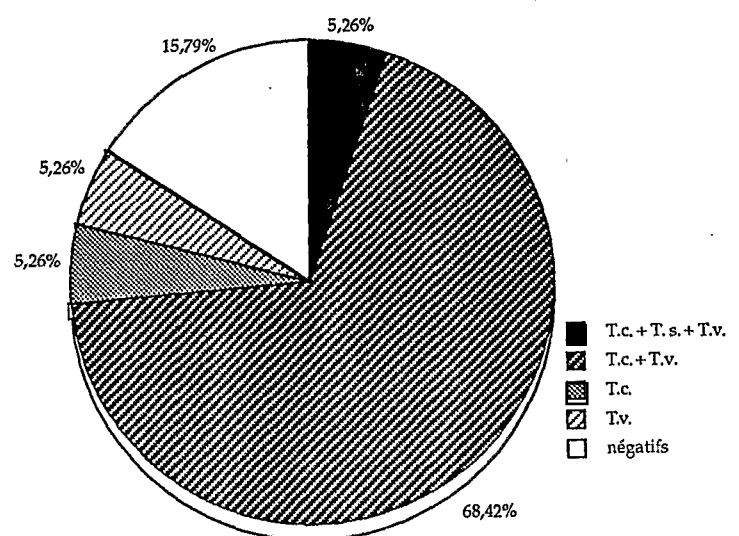


Figure 1 : résultats comparatifs de l'examen par Centrifugation sur Tubes Capillaires et par Polymerase Chain Reaction effectué sur le sang de 19 porcs d'un village camerounais (*T. brucei* sl. n'a été mis en évidence par aucune des 2 techniques).

DISCUSSION

La recherche de trypanosomes par CTC n'a été positive que chez 15,8% (3/19) des porcs et seuls des *Nannomonas* ont été mis en évidence. Quoique faible, ce résultat n'est pas surprenant si on le compare à ce qui a été constaté en Afrique Centrale. Par CTC, Penchenier trouve au Congo 20% des porcs parasités par des *Nannomonas* (1992, non publié). Il n'en est pas de même en Afrique de l'ouest où, avec le même examen parasitologique, Mehlitz (1986) et Penchenier (1987) trouvent, en Côte d'Ivoire, près de 50% des porcs parasités par des *Nannomonas*. Les seules données sur les trypanosomoses porcines au Cameroun que nous ayons trouvées, sont celles de Asonganyi *et al.* (1986 et 1990). Dans ces études, basées sur le Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT), les auteurs signalent respectivement 54,2% puis 33,3% de porcs CATT positifs et 54,5% puis 36,7% de porcs chez lesquels des trypanosomes ont été mis en évidence par goutte épaisse. Alors qu'en 1990 les auteurs signalent que, dans la région de Fontem, tous les trypanosomes mis en évidence sont des *Nannomonas*, en 1986, dans la région du Mbam (Bafia), il n'est nulle part indiqué à quelle espèce se rattachent les trypanosomes. L'utilisation du CATT pourrait laisser croire qu'il s'agit de *T. brucei sl.*, mais il faut savoir que les résultats obtenus chez le porc avec ce test immunologique adapté à l'homme n'ont guère de valeur.

Les résultats de la PCR sont tout à fait intéressants. De 15,8% à la CTC, le nombre de porcs parasités passe à 84,2%. De plus, alors que la CTC n'avait permis de mettre en évidence que des *Nannomonas* (*T. congolense* ou *T. simia*), la PCR montre que les porcs sont également parasités par *T. vivax* (sous-genre *Duttonella*) mais pas par *T. brucei sl.* (sous-genre *Trypanozoon*). C'est, à notre connaissance, la 1ère fois que la PCR sur sang est réalisée dans les conditions naturelles et que de tels résultats sont publiés.

Le fait qu'en PCR 79% des porcs soient trypanosomés par *T. congolense* n'a rien de surprenant compte tenu de la prévalence constatée en microscopie (jusqu'à 50% des porcs parasités) et de la sensibilité de la méthode utilisée. Cela paraît plus surprenant pour *T. vivax*, mais nous n'avons pas trouvé de données

chiffrées dans la littérature. *T. simia*, malgré son nom, est un parasite des suidés vis à vis desquels il est très pathogène, c'est pourquoi on le trouve bien plus rarement que *T. congolense* dans des populations de porcs en bonne santé, ce qui est le cas ici. Enfin, pour *T. brucei sl.*, l'absence de ce parasite chez le porc est à rapprocher du fait, sans qu'on puisse en conclure à une relation de cause à effet, qu'aucune épidémie de THA n'a jamais été décrite dans la région depuis plus de 50 ans.

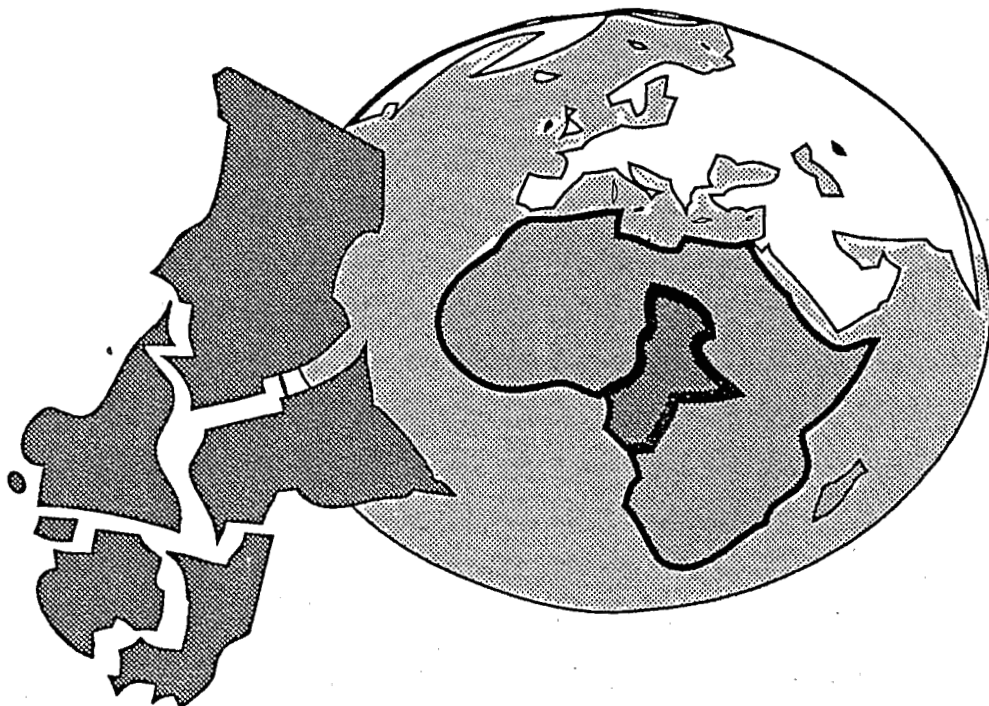
Il n'y a aucune relation entre la localisation des porcs dans le village, leur âge et le fait qu'ils ne soient pas porteurs de trypanosomes. Les 3 porcs négatifs pour *T. congolense* et *T. vivax* vivaient dans 3 endroits différents du village et ce, depuis longtemps (entre 4 mois et 2 ans).

Les résultats obtenus avec la technique de préparation du sang que nous avons mise au point pour la réalisation de PCR, sont aussi satisfaisants sur du sang de porcs naturellement infestés et prélevés sur le terrain que ceux que nous avons obtenu expérimentalement au laboratoire de biologie moléculaire de l'ORSTOM Montpellier sur du sang humain ou des intestins de glossines. Cela ouvre à la PCR, en Afrique, un vaste champ d'études sur les trypanosomoses, qu'il s'agisse du diagnostic ponctuel de la THA ou de son épidémiologie (réservoir animal...), des recherches entomologiques sur les capacités vectorielles, les lieux de transmission... ou en médecine vétérinaire (trypanotolérance, polyparasitisme, surveillance des troupeaux...).

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Asonganyi T, Sede Mbakop J, Ngu JL. Trypanosomiasis in Mbam division (Cameroun) : Parasitological and immunodiagnostic examination of the domestic animal population. *Ann Univ Sci Santé* 1986 ; 3 : 181-9.
- 2- Asonganyi T, Suh S, Tetuh MD. Prevalence of domestic animal trypanosomiasis in the Fontem sleeping sickness focus, Cameroon. *Revue Elev Méd vét Pays trop* 1990 ; 43 (1) : 69-74.
- 2- Gibson WC, Dukes P, Gashumba JK. Species-specific DNA probes for identification of African trypanosomes in tsetse flies. *Parasitology* 1988 ; 97 : 63-73.

- 3- Lanham SM, Godfrey DG. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Expl Parasit* 1970 ; 28 : 521-34.
- 4- Majiwa PAO, Otieno LH. Recombinant DNA probes reveal simultaneous infection of tse tse flies with different trypanosome species. *Mol and Biochem Parasitol* 1990 ; 40 : 245-54.
- 5- Masiga DK, Smith AJ, Hayes P, Bromidge TJ, Gibson WC. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Internat Journal for Parasitol* 1992 ; 22 : 909-18.
- 6- Mehlitz D. Le réservoir animal de la maladie du sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense*. In : *Etudes et Synthèses de l'IEMVT* 1986 ; 18 : 156 pp.
- 7- Penchenier L. Epidémiologie de la trypanosomiase humaine en Afrique de l'ouest. Etude sur le réservoir animal et la dynamique d'un foyer. In : *Rap fin CEE/IPR* 1987.
- 8- Penchenier L, Dumas V, Grebaut P, Reifenberg JM, Cuny G. Nouvelle technique de préparation du sang, applicable sur le terrain, pour le diagnostic des trypanosomoses humaines et animales par P.C.R. *Bull liais doc OCEAC* 1996 ; 29(4).
- 9- Woo PTK. Evaluation of the hæmatocrite centrifuge and other techniques for the field diagnosis of human trypanosomiasis and filariasis. *Acta trop* 1971 ; 28 : 298-303.



Le BULLETIN de l'OCEAC

de liaison et de documentation

MODAC = D_D FRA

COTE =
PM 253

ORSTOM
Centre Documentation
MONTPELLIER

Volume 29(4) : 4^{ème} trimestre 1996

4 DEC. 1996



ORGANISATION DE COORDINATION POUR LA LUTTE
CONTRE LES ENDEMIES EN AFRIQUE CENTRALE

SECRETARIAT GENERAL B.P. 288 YAOUNDE REPUBLIQUE DU CAMEROUN
TEL : 237 23 22 32 FAX : 237 23 00 61 TELEX : 8411 KN